(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 702 246**

(51) Int. CI.:

C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.03.2013 PCT/US2013/033881**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **03.10.2013 WO13148686**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.2013 E 13714505 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2018 EP 2830658**

(54) Título: **Formulaciones de agente de unión IgG4 estables**

(30) Prioridad:

26.03.2012 US 201261615539 P
06.02.2013 FR 1351013

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.02.2019

(73) Titular/es:

SANOFI (100.0%)
54, rue La Boétie
75008 Paris, FR

(72) Inventor/es:

USENER, DIRK;
YOUSSEF, AHMED;
HAGENDORF, ANNIKA;
KIRSCH, MARTINA;
RUGGEBERG, SABRINA y
SCHNIEDERS, JULIA

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

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 de agente de unión IgG4 estables

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El antígeno LIGHT humano es una diana potencial de citocinas que se ha implicado en los procesos de enfermedades autoinmunitarias inflamatorias crónicas. Como miembro de la superfamilia TNF (TNFSF) de ligandos, el LIGHT también se conoce como TNFSF14 o CD258. El LIGHT se expresa en la superficie de células T tras la activación de una forma estrictamente regulada. Sin embargo, el LIGHT también está presente en niveles detectables constitutivamente en la superficie de células dendríticas inmaduras y en células T y células asesinas naturales (NK) del intestino. El LIGHT media sus efectos biológicos mediante su unión a tres receptores de la superfamilia de TNF, incluido el receptor de linfotoxina β (LTβR), el mediador de entrada del virus del herpes (HVEM) y el receptor señuelo 3 (DcR3). Los linfocitos que expresan LIGHT pueden inducir síntomas similares a la EII en humanos, y se han observado aumentos de la expresión de LIGHT en pacientes con enfermedad de Crohn activa y otros trastornos inflamatorios como la enfermedad de injerto contra huésped.

El CXCR5, también conocido como receptor de linfoma de Burkitt (BLR1), CD185, MDR15 y MGC117347, es un receptor acoplado a proteína G que es miembro de la familia de receptores de quimiocinas CXC. El precursor de CXCR5 sin procesar tiene una longitud de 372 aminoácidos con un peso molecular de 42 K_D. El CXCR5 desempeña un papel en la migración y la localización de células B dentro de compartimentos anatómicos particulares. Los ratones "inactivados" carecen de ganglios linfáticos periféricos, tienen menos parches de Peyer y tienen niveles de células B reducidos. El CXCL13, también conocido como BLC, es un ligando para CXCR5. El CXCL13 es un quimioatrayente de células B.

Los agentes de unión anti-LIGHT y los agentes de unión anti-CXCR5 son cada uno terapéuticamente relevantes, y existe la necesidad de formular cada uno de estos agentes de unión en productos farmacológicos que pueden administrarse a sujetos, particularmente a sujetos humanos, para el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

A fin de desarrollar una formulación farmacéutica que contenga un agente de unión anti-LIGHT o un agente de unión anti-CXCR5 adecuado para la administración intravenosa o subcutánea, el agente de unión debe concentrarse hasta aproximadamente 20 mg/ml o más, generalmente a aproximadamente 100-150 mg/ml, e incluso hasta 250 mg/ml. Pueden surgir muchas complicaciones en concentraciones tan altas, incluido un aumento de la viscosidad, un desplazamiento del pH, un cambio del color de la solución y la formación de partículas visibles y subvisibles.

La formulación de estos agentes de unión se complica aún más por el hecho de que estos agentes son altamente propensos a la agregación a dichas concentraciones elevadas.

La formulación de anticuerpos IgG4 se complica aún más por el hecho de que los anticuerpos IgG4 tienden a formar medias moléculas a concentraciones elevadas en solución. No obstante, los anticuerpos IgG4 son de interés terapéutico porque tienen una función efectora reducida.

El documento WO2004/071439 (ejemplo 15) describe una formulación que comprende 2-50 mM de tampón de citrato, pH 6 +/- 0,5 y del 0,001% al 2,0% de tensioactivo. Este documento también divulga que puede obtenerse una formulación liofilizada que comprende 20-200 mg/ml de un anticuerpo IgG4 (natalizumab; anti-4α-integrina) utilizando: i) un agente tampón elegido del grupo que consiste en fosfato, histidina, citrato, acetato o succinato en el intervalo de concentración de 2-50 mM para proporcionar un pH preferentemente de 6 +/- 0,5 y ii) un tensioactivo tal como un polisorbato en una concentración del 0,001% al 2,0% para mejorar la estabilidad y reducir el tiempo de reconstitución.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

Para satisfacer estas y otras necesidades, en el presente documento se proporcionan formulaciones de agentes de unión IgG4 altamente estables. Se ha descubierto, sorprendentemente, que las formulaciones de agentes de unión IgG4 altamente estables en forma de líquidos y polvos liofilizados que comprenden un agente de unión IgG4 y un tampón de citrato, en los que el pH de la formulación es igual o inferior a aproximadamente pH 6 y al punto isoeléctrico del agente de unión. Estas formulaciones mejoran con respecto a las formulaciones convencionales, que a menudo conducen a la dimerización del agente de unión, tal como un anticuerpo, al aumentar la concentración del agente de unión, tal como un anticuerpo, en la formulación. En particular, las formulaciones de la invención reducen la cantidad de subproductos no deseados, incluidos agregados, medias moléculas, productos de degradación, proteínas de bajo peso molecular (LMWP), proteínas de alto peso molecular (HMWP) y reordenamientos de isoformas ácidas, básicas y neutras del agente de unión, tal como un anticuerpo, componente de la formulación.

La presente invención se define en las reivindicaciones.

En determinados aspectos, la memoria descriptiva proporciona una formulación estable que comprende: un agente

de unión que comprende al menos una porción de una región Fc de un anticuerpo IgG4; y de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 mM de citrato como agente tampón; siendo el pH de la formulación igual o inferior a aproximadamente pH 6 y al pI del agente de unión. Según la invención, el agente de unión es un anticuerpo.

En determinados aspectos, el agente de unión o el anticuerpo se une a sustancias de tipo linfotoxina, muestra una expresión inducible y compite con la glicoproteína D del virus del herpes por el mediador de entrada del virus del herpes, un receptor expresado en linfocitos (LIGHT). En aspectos específicos, el agente de unión o el anticuerpo anti-LIGHT comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en el que la región variable de cadena pesada comprende regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1, 2 y 3, y la región variable de cadena ligera comprende CDR que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 4, 5 y 6. En otros aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo IgG4 anti-LIGHT completamente humano que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8.

En determinados aspectos, el agente de unión o el anticuerpo se une al receptor de quimiocinas C-X-C tipo 5 (CXCR5). En aspectos específicos, el agente de unión o anticuerpo anti-CXCR5 comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en el que la región variable de cadena pesada comprende regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOS: 15, 16 y 17, y la región variable de la cadena ligera comprende CDR que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 18, 19 y 20. En otras formas de realización específicas de la invención, el anticuerpo es un anticuerpo IgG4 anti-CXCR5 humanizado que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26.

Según la invención, la concentración de anticuerpos es de 5 a 280 mg/ml. En determinadas formas de realización específicas de la invención, la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 150 mg/ml. En otras formas de realización específicas de la invención, la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 50 mg/ml. En formas de realización específicas adicionales de la invención, la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 20 mg/ml. En otras formas de realización específicas adicionales de la invención, la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 100 mg/ml.

En determinadas formas de realización de la invención, la concentración de citrato es de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 mM. En algunas formas de realización de la invención, la concentración de citrato es de aproximadamente 10 mM. En algunas formas de realización de la invención, el tampón de citrato es citrato de sodio dihidratado.

En determinadas formas de realización de la invención, el pH de la formulación se encuentra entre pH 5 y pH 6. En formas de realización específicas de la invención, el pH de la formulación se selecciona del grupo que consiste en aproximadamente pH 5,0, aproximadamente pH 5,5 y aproximadamente pH 6,0.

En determinado aspecto específico, el pI del agente de unión o del anticuerpo se encuentra entre aproximadamente 6,8 y aproximadamente 7,2. En un aspecto específico alternativo, el pI del agente de unión o del anticuerpo se encuentra entre aproximadamente 7,6 y aproximadamente 8,4.

Según la invención, la formulación comprende adicionalmente un tensioactivo. Según la invención, la concentración de tensioactivo se encuentra entre el 0,001% y el 0,1% p/v. Según la invención, el polisorbato es polisorbato 20. En algunas formas de realización específicas de la invención, la concentración de polisorbato 20 es de aproximadamente el 0,005% p/v. En formas de realización específicas alternativas de la invención, la concentración de polisorbato 20 es de aproximadamente el 0,01% p/v. En otras formas de realización específicas alternativas de la invención, la concentración de polisorbato 20 es de aproximadamente el 0,02% p/v.

En determinadas formas de realización de la invención, la formulación comprende adicionalmente un agente de tonicidad. En determinadas formas de realización específicas de la invención, la concentración de agente de tonicidad se encuentra entre aproximadamente el 0,1% y aproximadamente el 10% p/v. En determinadas formas de realización específicas de la invención, el agente de tonicidad es un sacárido. En algunas formas de realización específicas de la invención, el sacárido es manitol. En otras formas de realización específicas de la invención, la concentración de manitol se encuentra entre aproximadamente el 1% y aproximadamente el 10% p/v. En otras formas de realización específicas de la invención, la concentración de manitol es de aproximadamente el 4%. En formas de realización específicas alternativas de la invención, el sacárido es sacarosa. En algunas formas de realización específicas de la invención, la concentración de sacarosa se encuentra entre aproximadamente el 1% y aproximadamente el 10% p/v. En algunas formas de realización específicas de la invención, la concentración de sacarosa es de aproximadamente el 5% p/v. En formas de realización específicas alternativas de la invención, la concentración de sacarosa es de aproximadamente el 6% p/v. En otras formas de realización específicas adicionales de la invención, la concentración de sacarosa es de aproximadamente el 4,5% p/v. En formas de realización alternativas específicas adicionales de la invención, el agente de tonicidad es cloruro de sodio. En

algunas formas de realización específicas de la invención, la concentración de cloruro de sodio se encuentra entre aproximadamente el 0,01% y aproximadamente el 1%. En algunas formas de realización específicas de la invención, la concentración de cloruro de sodio es de aproximadamente el 0,2%. En otras formas de realización específicas de la invención, el agente de tonicidad es una combinación de sacarosa y cloruro de sodio. En formas de realización específicas de la invención, la concentración de sacarosa se encuentra entre aproximadamente el 1% y aproximadamente el 10% p/v. En otras formas de realización específicas de la invención, la concentración de cloruro de sodio se encuentra entre aproximadamente el 0,01% y aproximadamente el 1%. En formas de realización específicas alternativas de la invención, la concentración de sacarosa es de aproximadamente el 6% p/v y la concentración de cloruro de sodio es de aproximadamente el 0,2%. En otras formas de realización específicas alternativas adicionales de la invención, la concentración de sacarosa es de aproximadamente el 4,5% p/v y la concentración de cloruro de sodio es de aproximadamente el 0,2%.

En determinadas formas de realización de la invención, la formulación comprende adicionalmente un aminoácido. En determinadas formas de realización específicas de la invención, la concentración de aminoácidos se encuentra entre aproximadamente el 0,1% y aproximadamente el 5% p/v. En determinadas formas de realización específicas de la invención, el aminoácido es prolina o arginina. En formas de realización específicas de la invención, la concentración de prolina o arginina se encuentra entre aproximadamente el 1% y aproximadamente el 2% p/v. En otras formas de realización específicas de la invención, la concentración de prolina es de aproximadamente el 1,5% p/v. En formas de realización específicas alternativas de la invención, la concentración de arginina es de aproximadamente el 1% p/v.

En determinadas formas de realización de la invención, la formulación es una formulación líquida. En otras formas de realización específicas de la invención, la formulación es una formulación liofilizada.

En determinadas formas de realización de la invención, la formulación es estable durante al menos 6 meses a + 5 ºC. En formas de realización alternativas de la invención, la formulación es estable durante al menos 9 meses a + 5 ºC.

En determinados aspectos descritos en el presente documento, la formulación muestra una cantidad reducida de al menos un subproducto seleccionado del grupo que consiste en agregados, medias moléculas, productos de degradación, proteínas de bajo peso molecular, proteínas de alto peso molecular y reordenamientos de isoformas ácidas/básicas/neutras del anticuerpo en comparación con una formulación anti-LIGHT de referencia que comprende un anticuerpo anti-LIGHT en solución salina tamponada con fosfato a pH 7,3 o una formulación anti-CXCR5 de referencia que comprende un anticuerpo anti-LIGHT en solución salina tamponada con fosfato a pH 7,3.

La memoria descriptiva divulga una formulación de anticuerpo líquida estable adecuada para la administración subcutánea, comprendiendo la formulación:

a) 150 mg/ml de un anticuerpo IgG4 anti-LIGHT (tipo linfotoxina, muestra expresión inducible y compite con la glicoproteína D del VHS por HVEM, un receptor expresado por linfocitos T) completamente humano que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8;

b) 10 mM de tampón de citrato;

c) el 0,005% de polisorbato 20 y

d) el 4% de manitol;

siendo el pH de la formulación pH 5,5.

La memoria descriptiva divulga una formulación de anticuerpo líquida estable adecuada para la administración intravenosa, comprendiendo la formulación:

a) 50 mg/ml de un anticuerpo IgG4 anti-LIGHT (tipo linfotoxina, muestra expresión inducible y compite con la glicoproteína D del VHS por HVEM, un receptor expresado por linfocitos T) completamente humano que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8;

b) 10 mM de tampón de citrato y

c) el 0,01% de polisorbato 20;

siendo el pH de la formulación aproximadamente pH 5,5.

La memoria descriptiva divulga una formulación estable de anticuerpos liofilizados adecuada para la administración

intravenosa, comprendiendo la formulación:

a) 50 mg/ml de un anticuerpo IgG4 anti-LIGHT (tipo linfotoxina, muestra expresión inducible y compite con la glicoproteína D del VHS por HVEM, un receptor expresado por linfocitos T) completamente humano que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8;

b) 10 mM de tampón de citrato;

c) el 0,01% de polisorbato 20;

d) el 5% de sacarosa y

e) el 1,5% de prolina;

siendo el pH de la formulación pH 5,5.

En formas de realización específicas alternativas de la invención, la invención proporciona una formulación de anticuerpo estable, que comprende:

a) 20 mg/ml de un anticuerpo IgG4 anti-CXCR5 (receptor de quimiocina CXC tipo 5) humanizado que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26;

b) 10 mM de tampón de citrato;

c) el 0,02% de polisorbato 20;

d) el 6% de sacarosa y

e) el 0,2% de cloruro de sodio;

siendo el pH de la formulación pH 6,0.

En formas de realización específicas alternativas adicionales de la invención, la invención proporciona una formulación de anticuerpo estable que comprende:

a) 100 mg/ml de un anticuerpo IgG4 anti-CXCR5 (receptor de quimiocina CXC tipo 5) humanizado que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26;

b) 10 mM de tampón de citrato;

c) el 0,01% de polisorbato 20;

d) el 4,5% de sacarosa;

e) el 0,2% de cloruro de sodio y

f) el 1% de arginina;

siendo el pH de la formulación pH 6,0.

En un determinado aspecto descrito en el presente documento, la memoria descriptiva proporciona un kit que comprende un recipiente que comprende: 1) la formulación de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores y 2) una etiqueta o instrucciones para la administración y el uso de la formulación. En determinados aspectos descritos en el presente documento, la etiqueta comprende uno o más de lo siguiente: instrucciones para la administración de la formulación, instrucciones para el uso de la formulación, instrucciones sobre las condiciones de almacenamiento de la formulación, información sobre el lote y el número de lote de la formulación y/o kit, información sobre la composición de la formulación, información de seguridad, información sobre posibles reacciones adversas, efectos secundarios y/o efectos secundarios relacionados con la administración de la formulación, o información sobre posibles indicaciones y/o contraindicaciones de la formulación.

En determinadas formas de realización de la invención, la invención proporciona un dispositivo precargado o un recipiente precargado, tal como una jeringa, un cartucho, un vial, una ampolla o un autoinyector que comprende la formulación de la invención. En determinados otros aspectos descritos en el presente documento, la invención

proporciona un kit que comprende dicha jeringa, cartucho, vial, ampolla o autoinyector precargados.

La memoria descriptiva proporciona un procedimiento para tratar una enfermedad intestinal inflamatoria que comprende administrar a un sujeto con necesidad de ello una formulación ta como se describe en el presente documento.

La memoria descriptiva proporciona un procedimiento para tratar artritis reumatoide que comprende administrar a un sujeto con necesidad de ello una formulación tal como se describe en el presente documento.

En determinados aspectos, la memoria descriptiva divulga una formulación para su uso en un procedimiento de diagnóstico o de tratamiento del cuerpo humano o animal. En aspectos específicos, la formulación se utiliza en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria intestinal. En aspectos alternativos, la formulación se utiliza en el tratamiento de artritis reumatoide.

En determinados aspectos, la memoria descriptiva proporciona un procedimiento para preparar una formulación tal como se describe en el presente documento que comprende mezclar los componentes de la formulación y ajustar el pH, en el que la preparación se realiza en condiciones estériles o la formulación se esteriliza después del mezclado de los componentes y del ajuste del pH o de ambos.

En determinados aspectos específicos, la memoria descriptiva proporciona un procedimiento para preparar una formulación de anticuerpo estable que comprende: a) proporcionar un agente de unión anti-LIGHT, b) resuspender el agente de unión anti-LIGHT en de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 mM de tampón de citrato y c) ajustar el pH de la formulación a de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,0.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1 es una imagen de un gel que muestra los resultados de los experimentos de enfoque isoeléctrico desnaturalizado que se utilizaron para determinar el punto isoeléctrico (pI) del anticuerpo IgG4 anti-LIGHT completamente humano que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 formulado en solución salina tamponada con fosfato a pH 7,3 a una concentración de 5,5 mg/ml (la "Formulación original", "Formulación PBS" o el "Lote de referencia"). Carriles 1 y 5: kit de calibración IEF de alto intervalo de pI 5-10,5; carriles 2 y 4: un primer lote de Lote de referencia; carriles 3 y 4: un segundo lote de Lote de referencia. Los valores de pI están indicados con números.

La figura 2 es una imagen de un gel SDS-PAGE que comparaba diferentes lotes de Lotes de referencia en condiciones reductoras y no reductoras. Carriles 1 y 10: patrón Precision Plus Protein de Biorad; carril 5: vacío; carril 2: un primer lote de Lote de referencia en condiciones no reducidas; carriles 3 y 4: un segundo lote de Lote de referencia en condiciones no reducidas; carril 6: un primer lote de Lote de referencia en condiciones reducidas; carriles 7 y 8: un segundo lote de Lote de referencia en condiciones reducidas; y carril 9: control del sistema. Los tamaños están indicados con números dentro de las filas.

La figura 3 muestra un gráfico ELISA que se usó para determinar la actividad de unión al antígeno de los primeros y segundos lotes del Lote de referencia.

La figura 4 muestra un cromatograma de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) del primer lote del Lote de referencia. Como se muestra en la figura 4, la SEC detectó proteínas de alto peso molecular (HMWP), por ejemplo di-/oligómeros (RRT0.8) o agregados, y proteínas de bajo peso molecular (LMWP) o productos de degradación. El primer lote de lote de Lote de referencia tenía una pureza del 97% de contenido de monómero.

La figura 5 muestra un cromatograma de intercambio catiónico débil para el primer lote de Lote de referencia. Tal como se muestra en la figura 5, se produjeron reordenamientos de isoformas ácidas, neutras y básicas durante los estudios de estabilidad. El primer lote de Lote de referencia tenía una distribución de isoformas ácidas/neutras/básicas del 42,3/55,6/1,9%.

La figura 6 muestra un termograma de calorimetría diferencial de barrido del primer lote de Lote de referencia. Tal como se muestra en la figura 6, los tres dominios del anticuerpo se despliegan a 68 ºC, 75 ºC y 78 ºC.

La figura 7 muestra un patrón de dispersión de luz dinámica del primer lote de Lote de referencia, que estaba sin filtrar. Se usó DLS para determinar el diámetro hidrodinámico del primer lote de monómero de anticuerpo del Lote de referencia y potenciales agregados solubles.

La figura 8 muestra un patrón de dispersión de luz del dinámica primer lote de Lote de referencia, que estaba filtrado. Se usó DLS para determinar el diámetro hidrodinámico del primer lote de monómero de anticuerpo del Lote de referencia y potenciales agregados solubles.

La figura 9 es un diagrama de flujo del proceso de fabricación del producto farmacológica para la formulación de alta concentración de anticuerpos.

La figura 10 muestra un patrón de dispersión de luz dinámica de la Formulación 14. Se usó DLS para determinar el diámetro hidrodinámico del monómero de anticuerpo y los potenciales agregados solubles.

La figura 11 es una imagen de un gel que muestra los resultados del enfoque isoeléctrico para determinar el pI (punto isoeléctrico) del Anticuerpo CXCR5 Inicial. Carriles 1,6: kit IEF Calibration High Range pI; Carriles 2,4: Anticuerpo Inicial estándar de referencia LP08031; y carriles 3,5: Sustancia farmacológica de Anticuerpo Inicial, RSN0151.

La figura 12 es una imagen de un gel SDS-PAGE que comparaba diferentes lotes de sustancias farmacológicas en condiciones reductoras y no reductoras. El gel también se usó para determinar el peso molecular del Anticuerpo CXCR5 Inicial y la presencia de cualquier agregado.

La figura 13 es un gráfico ELISA que se usó para determinar la actividad de unión al antígeno del Anticuerpo CXCR5 Inicial a un péptido 28-mérico del antígeno CXCR5.

La figura 14 es un cromatograma SEC del Anticuerpo CXCR5 Inicial estresado. El SEC pudo detectar proteínas de alto peso molecular (HMWP), por ejemplo di-/oligómeros o agregados, y proteínas de bajo peso molecular (LMWP) o productos de degradación. El Anticuerpo CXCR5 Inicial tenía una pureza del 99% de contenido de monómero.

La figura 15 es un cromatograma de WCX que se usó para determinar isoformas ácidas, neutras y básicas del Anticuerpo CXCR5 Inicial. El Anticuerpo CXCR5 Inicial tenía una distribución de isoformas ácidas/neutras/básicas del 14/85/1%.

La figura 16 es una medición por DLS que se utilizó para determinar el diámetro hidrodinámico del monómero de anticuerpo y los potenciales agregados solubles.

La figura 17 es una imagen del Anticuerpo CXCR5 Inicial en un tampón de acetato de pH 5,0 (izquierda) y pH 5,5 (derecha); cada v. WFI (agua para inyección) y después de estrés térmico. Esta figura muestra que el acetato es un sistema tampón adecuado.

La figura 18 es una imagen del Anticuerpo CXCR5 Inicial en un tampón de histidina pH 6,0 (izquierda), pH 5,5 (centro) y pH 5.0 (derecha); cada v. WFI (agua para inyección) y después de estrés térmico. Esta figura muestra que la histidina es un tampón adecuado.

La figura 19 es una imagen del Anticuerpo CXCR5 Inicial en un tampón TRIS de pH 7,5 después de UF/DF (izquierda) y después de filtración (derecha); cada v. WFI (agua para inyección) y después de estrés térmico. Esta figura muestra que TRIS es un sistema de tampón incompatible.

La figura 20 es una imagen del Anticuerpo CXCR5 Inicial en un tampón de citrato de pH 6,0 después de UF/DF y filtración.

La figura 21 es una imagen del Anticuerpo CXCR5 Inicial en un tampón de acetato de pH 5,5 después de UF/DF y filtración.

La figura 22 es una imagen del Anticuerpo CXCR5 Inicial en un tampón de succinato de pH 5,0 después de UF/DF y filtración.

La figura 23 es una imagen del Anticuerpo CXCR5 Inicial en un tampón de histidina de pH 5,0 después de UF/DF y filtración.

La figura 24 es una imagen del Anticuerpo CXCR5 Inicial en un tampón de arginina pH 6,0 después de UF/DF y filtración.

La figura 25 es una imagen del aspecto de las soluciones del Anticuerpo CXCR5 Inicial LA_09_016 con diferentes tensioactivos (sin tensioactivo, polisorbato 20, polisorbato 80, Lutrol F68, Cremophor RH40, Solutol HS15 y SDS) después de estrés mecánico (350 rpm, 2,5 h, TA).

La figura 26 es un gráfico que muestra un aumento de dímeros en condiciones aceleradas, analizado por SEC. Se puede observar un aumento de la formación de dímeros de hasta el 10% después de tres meses de almacenamiento en las cuatro formulaciones de histidina. Las formulaciones de acetato mostraron un aumento del contenido de dímeros de hasta un 6%. En las cuatro formulaciones de citrato, la concentración de dímero fue inferior al 2%, incluso después de tres meses a +40 ºC.

La figura 27 es un gráfico que muestra un aumento de isoformas básicas en condiciones aceleradas, analizado por WCX. La histidina es más deficiente para la estabilidad del Anticuerpo CXCR5 Inicial en condiciones aceleradas. Se puede observar un ligero aumento de isoformas básicas para las cuatro formulaciones de acetato. Es interesante indicar que no fue posible discriminar entre las cuatro formulaciones de citrato.

La figura 28 es un gráfico que muestra una disminución de isoformas neutras en condiciones aceleradas, analizado por WCX. Esta figura muestra una fuerte disminución de las isoformas neutras para las formulaciones de histidina. Se observó una ligera disminución en el acetato. El citrato fue el menos afectado.

La figura 29 muestra el delta de pH de las cuatro formulaciones (A-D) en tampón de citrato en condiciones aceleradas. Las formulaciones que más estabilizan el pH son las tamponadas con citrato, y especialmente las formulaciones B y D.

La figura 30 muestra el delta del pH de las cuatro formulaciones (A-D) en tampón de acetato en condiciones aceleradas. En soluciones tamponadas con acetato del Anticuerpo CXCR5 Inicial, el pH se desplazó hacia un valor más elevado.

La figura 31 muestra el delta del pH de las cuatro formulaciones (A-D) en tampón de histidina en condiciones aceleradas. En las soluciones tamponadas con histidina del Anticuerpo CXCR5 Inicial, el pH disminuyó ligeramente.

La figura 32 es un gráfico que muestra el diámetro hidrodinámico de CXCR5 LA_09_027 A-D después de 3 meses de almacenamiento a 40 ºC. Las formulaciones tamponadas con citrato mostraron solo agregados pequeños después de tres semanas en la formulación C, y después de seis semanas de almacenamiento en la formulación A. También se pudieron detectar algunos agregados después de tres meses en la formulación B. Pero, en comparación con las formulaciones tamponadas con acetato, la cantidad era muy pequeña.

La figura 33 es un gráfico que muestra el diámetro hidrodinámico de CXCR5 LA_09_028 A-D después de 3 meses de almacenamiento a 40 ºC. La formulación C del tampón de acetato mostró algunos agregados < 200 nm después de tres semanas. La formulación A mostró algunos agregados después de tres meses.

La figura 34 es un gráfico que muestra el efecto del aumento de la concentración del Anticuerpo CXCR5 Inicial sobre el promedio Z. El Anticuerpo CXCR5 Inicial mostró un aumento significativo en el diámetro hidrodinámico (promedio Z) al aumentar la concentración del anticuerpo.

La figura 35 es un gráfico que muestra el efecto de diferentes estabilizantes (excipientes) sobre el promedio Z a 100 mg/ml de Anticuerpo CXCR5 Inicial después de un estrés térmico. El promedio Z se midió antes y después del estrés térmico. El efecto estabilizante fue similar en todos los excipientes analizados, pero el aumento en el promedio Z generalmente se redujo al utilizar aminoácidos como estabilizantes (arginina, lisina o glicina). La lisina se excluyó debido a un contenido más elevado de agregados después del estrés. La arginina mostró un mejor efecto que la glicina.

La figura 36 es un gráfico que muestra el efecto de diferentes estabilizantes sobre el promedio Z a 100 mg/ml de Anticuerpo CXCR5 Inicial después de un estrés mecánico. El promedio Z se midió antes y después del estrés mecánico. Se observó la misma reducción en el promedio Z en presencia de aminoácidos. La sacarosa tuvo un mejor efecto protector que la trehalosa contra el estrés mecánico. La arginina y la glicina tuvieron un mejor rendimiento en combinación con NaCl.

La figura 37 es un conjunto de gráficas que muestran la distribución del tamaño de partícula, medida por DLS, del Anticuerpo CXCR5 Inicial formulado en tampón de citrato 10 mM a pH 6 antes del estrés mecánico (A) y después del estrés mecánico (B). Se midió una especie de peso molecular más elevado por DLS después del estrés mecánico del DS.

La figura 38 es un conjunto de gráficas que muestran la distribución del tamaño de partícula, medida por DLS, de las formulaciones prototipo de productos farmacológicos del Anticuerpo CXCR5 Inicial (A-D; tabla 111) antes (A) y después (B) del estrés mecánico.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

A. Definiciones

A menos que se definan de otra forma, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica.

Debe indicarse en el presente documento que, tal como se utilizan en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" "el" y "la" también incluyen referencia al plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

El término "aproximadamente" o la expresión "alrededor de" significa dentro del 10%, tal como dentro del 5% (o el 1% o menos) de un valor o intervalo determinado.

Los términos "administrar" o "administración" se refieren al acto de inyectar o administrar físicamente de otra forma una sustancia tal como existe fuera del cuerpo (por ejemplo, una formulación de la invención) a un paciente, tal como mediante administración mucosa, intradérmica, intravenosa, subcutánea, intramuscular y/o cualquier otro procedimiento de administración física descrito en el presente documento o conocido en la técnica. Cuando se trata una enfermedad, o un síntoma de la misma, la administración de la sustancia se realiza típicamente después de la aparición de la enfermedad o los síntomas de la misma. Cuando se previene una enfermedad o sus síntomas, la administración de la sustancia generalmente se realiza antes del inicio de la enfermedad o sus síntomas.

En el contexto de un polipéptido, el término "análogo" se refiere a un polipéptido que posee una función similar o idéntica a un polipéptido LIGHT o CXCR5, un fragmento de un polipéptido LIGHT o CXCR5, un epítope LIGHT o CXCR5, o un anticuerpo anti-LIGHT o anti-CXCR5, pero que no comprende necesariamente una secuencia de aminoácidos similar o idéntica a la de un polipéptido LIGHT o CXCR5, un fragmento de un polipéptido LIGHT o CXCR5, un epítope LIGHT o CXCR5, o un anticuerpo anti-LIGHT o anti-CXCR5 , o que posee una estructura similar o idéntica a la de un polipéptido LIGHT o CXCR5, un fragmento de un polipéptido LIGHT o CXCR5, un epítope LIGHT o CXCR5, o un anticuerpo anti-LIGHT o anti-CXCR5. Un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos similar se refiere a un polipéptido que satisface al menos uno de los siguientes puntos: (a) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos el 30%, al menos el 35%, al menos el 40%, al menos el 45%, al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, o al menos el 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido LIGHT o CXCR5 (por ejemplo, la SEQ ID NO: 9 o la SEQ ID NO: 14, respectivamente), un fragmento de un polipéptido LIGHT o CXCR5, un epítope LIGHT o CXCR5, o un anticuerpo anti-LIGHT o anti-CXCR5 descrito en el presente documento; (b) un polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones rigurosas a una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido LIGHT o CXCR5, un fragmento de un polipéptido LIGHT o CXCR5, un epítope LIGHT o CXCR5, o un anticuerpo anti-LIGHT o anti-CXCR5 (o la región VH o VL del mismo) descrito en el presente documento de al menos 5 residuos de aminoácidos, al menos 10 residuos de aminoácidos, al menos 15 residuos de aminoácidos, al menos 20 residuos de aminoácidos, al menos 25 residuos de aminoácidos, al menos 40 residuos de aminoácidos, al menos 50 residuos de aminoácidos, al menos 60 residuos de aminoácidos, al menos 70 residuos de aminoácidos, al menos 80 residuos de aminoácidos, al menos 90 residuos de aminoácidos, al menos 100 residuos de aminoácidos, al menos 125 aminoácidos residuos, o al menos 150 residuos de aminoácidos (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.* (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Maniatis *et al.* (1982) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.); y (c) un polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos que es al menos el 30%, al menos el 35%, al menos el 40%, al menos el 45%, al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, o al menos el 99% idéntica a la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido LIGHT o CXCR5, un fragmento de un polipéptido LIGHT o CXCR5, un epítope LIGHT o CXCR5, o un anticuerpo anti-LIGHT o anti-CXCR5 (o una región VH o VL del mismo) descrito en el presente documento. Un polipéptido con una estructura similar a un polipéptido LIGHT o CXCR5, un fragmento de un polipéptido LIGHT o CXCR5, un epítope LIGHT o CXCR5, o un anticuerpo anti-LIGHT o anti-CXCR5 se refiere a un polipéptido que tiene una estructura secundaria, terciaria o cuaternaria similar a la de un polipéptido LIGHT o CXCR5, un fragmento de un polipéptido LIGHT o CXCR5, un epítope LIGHT o CXCR5, o un anticuerpo LIGHT o CXCR5. La estructura de un polipéptido puede determinarse mediante procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, que incluyen, pero sin limitación, cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear y microscopía electrónica cristalográfica.

Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos secuencias de ácidos nucleicos, las secuencias se alinean con fines de comparación de forma óptima (por ejemplo, se pueden introducir huecos en la secuencia de una primera secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos para un alineamiento óptimo con una segunda secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos). Después se comparan los residuos de aminoácidos o los nucleótidos de las posiciones de aminoácidos o las posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando una posición de la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente de la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad = número de posiciones superpuestas idénticas/número total de posiciones X 100%). En una forma de realización, las dos secuencias tienen la misma longitud.

La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias (por ejemplo, secuencias de aminoácidos o secuencias de ácidos nucleicos) también se pueden realizar usando un algoritmo matemático. Un ejemplo no limitante de un algoritmo matemático que se utiliza para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul, 1990, Proc. Natl Acad Sci. U.S.A. 87:2264 2268, modificado como en Karlin y Altschul, 1993, Proc. Natl Acad Sci. U.S.A. 90:5873 5877. Dicho algoritmo está incorporado en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul *et al.*, 1990, J. Mol. Biol. 215:403. Las búsquedas de nucleótidos por BLAST se pueden realizar con el conjunto de

parámetros del programa de nucleótidos NBLAST, por ejemplo, para puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a moléculas de ácidos nucleicos de interés. Las búsquedas de proteínas por BLAST se pueden realizar con el conjunto de parámetros del programa XBLAST, por ejemplo, para una puntuación de 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a una molécula de proteína de interés. Para obtener alineaciones con huecos para fines de comparación, puede utilizarse Gapped BLAST tal como se describe por Altschul *et al.*, 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389 3402. Como alternativa, se puede usar PSI BLAST para realizar una búsqueda iterativa que detecta relaciones distantes entre moléculas (Id.). Al utilizar los programas BLAST, Gapped BLAST y PSI Blast, pueden utilizarse los parámetros predeterminados de los programas respectivos (por ejemplo, de XBLAST y NBLAST) (véase, por ejemplo, National Center for Biotechnology Information (NCBI) en Internet en ncbi.nlm.nih.gov). Otro ejemplo no limitante de un algoritmo matemático que se utiliza para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller, 1988, CABIOS 4:11 17. Dicho algoritmo está incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), que forma parte del paquete informático de alineamiento de secuencias GCG. Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, se puede usar una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización de longitud de hueco de 12 y una penalización de hueco de 4.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias puede determinarse utilizando técnicas similares a las descritas anteriormente, con o sin huecos permitidos. En el cálculo del porcentaje de identidad, normalmente solo se cuentan las coincidencias exactas.

Un "antagonista" o "inhibidor" se refiere a una molécula capaz de inhibir una o más actividades biológicas de una molécula diana. Los antagonistas pueden interferir en la unión de un receptor a un ligando y viceversa, incapacitando o destruyendo células activadas por un ligando y/o interfiriendo en la activación del receptor o ligando (por ejemplo, activación de la tirosina quinasa) o la transducción de señal después de la unión del ligando a un receptor. El antagonista puede bloquear completamente las interacciones receptor-ligando o puede reducir sustancialmente dichas interacciones. Todos dichos puntos de intervención de un antagonista se considerarán equivalentes para los fines de la presente invención.

Por ejemplo, un "antagonista" o "inhibidor" de LIGHT se refiere a una molécula que es capaz de inhibir o reducir de otra forma una o más de las actividades biológicas de LIGHT, tal como en una célula que expresa LIGHT o en una célula que expresa un ligando LIGHT, tal como un receptor LIGHT. Por ejemplo, en determinadas formas de realización, los anticuerpos descritos en el presente documento son anticuerpos antagonistas que inhiben o reducen de otra forma la secreción de CCL20, IL-8 y/o RANTES desde una célula que posee un receptor LIGHT expresado en la superficie celular (por ejemplo, HVEM, LTβR y/o DcR3) cuando dicho anticuerpo se pone en contacto con dicha célula. En algunas formas de realización, un antagonista de LIGHT puede actuar, por ejemplo, inhibiendo o reduciendo las vías de activación y/o señalización celular de la célula que expresa un receptor LIGHT, inhibiendo de esta forma una actividad biológica mediada por LIGHT de la célula con respecto a la actividad biológica mediada por LIGHT en ausencia de antagonista. En determinados aspectos descritos en el presente documento, los anticuerpos anti-LIGHT son anticuerpos anti-LIGHT completamente humanos, tales como anticuerpos anti-LIGHT monoclonales completamente humanos.

Por ejemplo, un "antagonista" o "inhibidor" de CXCR5 se refiere a una molécula capaz de inhibir una o más actividades biológicas, tales como la señalización, por CXCR5. Por lo tanto, en el presente documento se describen antagonistas (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes) que se unen a CXCR5, CXCL13 u otros ligandos de CXCR5, o un complejo de CXCR5 y un ligando del mismo, tal como CXCL13; variantes de la secuencia de aminoácidos o derivados de CXCR5 o CXCL13 que antagonizan la interacción entre CXCR5 y un ligando, tal como CXCL13; CXCR5 soluble, fusionado opcionalmente con una molécula heteróloga tal como una región de inmunoglobulina *(*por ejemplo, una inmunoadhesina); un complejo que comprende CXCR5 en asociación con otro receptor o molécula biológica; péptidos de secuencia nativa o sintética que se unen a CXCR5; etc.

Los términos "anticuerpo", "inmunoglobulina" o "Ig" se pueden usar indistintamente en el presente documento. El término anticuerpo incluye, pero sin limitación, anticuerpos sintéticos, anticuerpos monoclonales, anticuerpos producidos de forma recombinante, anticuerpos multiespecíficos (incluidos anticuerpos biespecíficos), anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, intracuerpos, Fv monocatenario (scFv) (por ejemplo, incluyendo monoespecíficos, biespecíficos, etc.), anticuerpos camelizados, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), Fvs ligados a disulfuro (sdFv), anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) y fragmentos de unión a epítope de cualquiera de los anteriores. En particular, los anticuerpos incluyen moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, dominios de unión a antígeno o moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno LIGHT (por ejemplo, una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo anti-LIGHT) o a un antígeno CXCR5 (por ejemplo, una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo anti-CXCR5). Los anticuerpos anti-LIGHT o anti-CXCR5 pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), cualquier clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2), o cualquier subclase (por ejemplo, IgG2a e IgG2b) de molécula de inmunoglobulina. En algunos aspectos, los anticuerpos anti-LIGHT son completamente humanos, tales como anticuerpos monoclonales anti-LIGHT completamente humanos. En determinados aspectos, los anticuerpos anti-LIGHT son anticuerpos IgG, anticuerpos IgG4 humanos. Como alternativa, en algunas formas de realización, los

anticuerpos anti-CXCR5 están humanizados, tales como anticuerpos anti-CXCR5 monoclonales humanizados. En determinadas formas de realización, los anticuerpos anti-CXCR5 son anticuerpos IgG, anticuerpos IgG4 humanizados.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo anti-LIGHT" significa un anticuerpo o polipéptido derivado del mismo (un derivado) que se une específicamente a LIGHT humano tal como se define en el presente documento, incluidas, pero sin limitación, moléculas que inhiben o reducen sustancialmente la unión de LIGHT a sus ligandos o inhiben la actividad LIGHT.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo anti-CXCR5" significa un anticuerpo o un polipéptido derivado del mismo (un derivado) que se une específicamente a CXCR5 humano tal como se define en el presente documento, incluidas, pero sin limitación, moléculas que inhiben o reducen sustancialmente la unión de CXCR5 a sus ligandos o inhiben la actividad de CXCR5.

La expresión "actividad de células B" significa niveles de células B superiores a lo normal, que pueden ser locales, o la evidencia de una manifestación o función biológica de una célula B, tal como la expresión de anticuerpos, la presencia o la actividad de tirosina quinasa de Bruton, la expresión o la presencia de CD19, la expresión o la presencia de factor de activación de células B, etc.

La expresión "agente de unión" significa cualquier molécula, tal como un anticuerpo, un ARNip, un ácido nucleico, un aptámero, una proteína o un compuesto orgánico de molécula pequeña, que se une o se une específicamente a LIGHT o CXCR5, o una variante o un fragmento de los mismos.

La expresión "subproducto" incluye productos no deseados, que reducen o disminuyen la proporción de agente de unión terapéutico/profiláctico, tal como un anticuerpo, en una formulación dada. Por ejemplo, los subproductos típicos incluyen agregados del anticuerpo, fragmentos del anticuerpo, producidos, por ejemplo, mediante la degradación del anticuerpo por desamidación o hidrólisis, o mezclas de los mismos. Típicamente, los agregados son complejos que tienen un peso molecular superior al del anticuerpo monomérico. Los productos de degradación de anticuerpos pueden incluir, por ejemplo, fragmentos del anticuerpo, por ejemplo, producidos mediante desamidación o hidrólisis. Típicamente, los productos de degradación son complejos que tienen un peso molecular inferior al del anticuerpo monomérico. En el caso de un anticuerpo IgG, dichos productos de degradación tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 150 kD.

Se pretende que los términos "composición" y "formulación" abarquen un producto que contiene los ingredientes especificados (por ejemplo, un anticuerpo anti-LIGHT o un anticuerpo anti-CXCR5) en, opcionalmente, las cantidades especificadas, así como cualquier producto que se obtenga, directa o indirectamente, de la combinación de los ingredientes especificados en, opcionalmente, las cantidades especificadas.

Las expresiones "región constante" o "dominio constante" se refieren a una porción carboxi-terminal de la cadena ligera y de la pesada que no está directamente involucrada en la unión del anticuerpo al antígeno, pero que muestra varias funciones efectoras, tales como la interacción con el receptor Fc. Las expresiones se refieren a la porción de una molécula de inmunoglobulina que tiene una secuencia de aminoácidos más conservada con respecto a la otra porción de la inmunoglobulina, el dominio variable, que contiene el sitio de unión al antígeno. El dominio constante contiene los dominios CH1, CH2 y CH3 de la cadena pesada y el dominio CHL de la cadena ligera.

El término "CXCR5" se refiere a la molécula conocida de origen natural que se encuentra en linfocitos, particularmente en células B, y particularmente en las células B vírgenes; a dicha molécula aislada de dichas células; a dicha molécula fabricada de forma recombinante utilizando materiales y medios conocidos, y utilizando un ácido nucleico que codifica un CXCR5; así como a partes de CXCR5, tales como el dominio extracelular (EC), que conservan las características y propiedades relevantes para la puesta en práctica de la presente invención, tales como la unión a CXCL13. Una molécula de CXCR5 soluble puede consistir esencialmente en el dominio EC de CXCR5, que incluye, en general, aproximadamente los primeros sesenta aminoácidos de la molécula, es decir, la porción amino-terminal de CXCR5.

El CXCR5 es un receptor no promiscuo. El CXCL13 es un ligando de CXCR5 y se expresa constitutivamente en células estromales, tales como células dendríticas foliculares, y en tejidos linfoides. El CXCL13 atrae específicamente las células B y un pequeño subconjunto de células T denominadas células T foliculares auxiliares de B, TFH. Esto puede no ser inesperado dadas las muchas interacciones entre las poblaciones de células T y células B en el sistema inmunológico. Además, las células T activadas inducen o regulan al alza la expresión de CXCR5. Se ha descubierto que la infiltración de linfocitos en centros germinales (GC) ectópicos terciarios se correlaciona bien con el aumento de la gravedad de la enfermedad y la degradación de la tolerancia en determinados trastornos que se presentan con dichas estructuras atípicas similares a ganglios linfáticos. Utilizando modelos murinos *in vivo*, tales como ratones CXCR5 -/- y CXCL13 -/-, la ausencia del receptor o del ligando tiene como consecuencia una arquitectura fina de GC alterada debido a la localización, y posiblemente a la interacción, alterada de las células T y B. Estos ratones también están protegidos contra el desarrollo de artritis inducida por colágeno (CIA) grave. Como el CXCR5 se expresa selectivamente en células B maduras, que están asociadas a la

patogénesis de AR, el bloqueo de este receptor modulará la respuesta artritogénica en los individuos afectados. El tratamiento de la artritis reumatoide con productos biológicos (es decir, anticuerpos anti-TNFα y anti-CD20, rituximab) ha demostrado ser clínicamente eficaz; en particular, los pacientes en tratamiento dirigido a células B han mostrado mejoras duraderas en los signos y los síntomas clínicos. La selección dirigida de CXCR5, que solo se expresa en células B maduras y células T auxiliares de B, no afectará el desarrollo de células B ni inmunocomprometerá al paciente. A diferencia del rituximab, el anticuerpo anti-CXCR5 instantáneo es un anticuerpo neutralizante que no media la citotoxicidad celular.

Una "enfermedad CXCR5" es un malestar, un trastorno, una enfermedad, una afección, una anomalía, etc., que se caracteriza, o está provocada, por una sobreexpresión o un aumento de los niveles de CXCL13 u otro ligando CXCR5, niveles aumentados de células B, niveles aumentados de actividad de las células B, niveles aumentados de CXCR5, o un metabolismo y una actividad inadecuados de CXCR5.

El término "epítope" se refiere a una región localizada en la superficie de un antígeno, tal como un polipéptido LIGHT o CXCR5, o un fragmento de polipéptido LIGHT o CXCR5, que es capaz de unirse a una o más regiones de unión a antígeno de un agente de unión, tal como un anticuerpo, y que posee actividad antigénica o inmunogénica en un animal, tal como un mamífero, tal como en un ser humano, que es capaz de provocar una respuesta inmunitaria. Un epítope que posee actividad inmunogénica es una porción de un polipéptido que provoca una respuesta de anticuerpos en un animal. Un epítope que posee actividad antigénica es una porción de un polipéptido a la que se une específicamente un anticuerpo, determinada por cualquier procedimiento bien conocido en la técnica, por ejemplo, tal como un inmunoensayo. Los epítopes antigénicos no precisan necesariamente ser inmunogénicos. Los epítopes habitualmente consisten en agrupaciones superficiales de moléculas químicamente activas, tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar, y tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Una región de un polipéptido que contribuye a un epítope puede ser aminoácidos contiguos del polipéptido, o el epítope puede provenir de dos o más regiones no contiguas del polipéptido. El epítope puede se o no una característica de superficie tridimensional del antígeno. En determinadas formas de realización, un epítope LIGHT o CXCR5 es una característica de superficie tridimensional de un polipéptido LIGHT o CXCR5 (por ejemplo, en una forma trimérica de un polipéptido LIGHT). En otras formas de realización, un epítope LIGHT es una característica lineal de un polipéptido LIGHT o CXCR5 (por ejemplo, en una forma trimérica o una forma monomérica del polipéptido LIGHT). Los anticuerpos anti-LIGHT o anti-CXCR5 pueden unirse específicamente a un epítope de la forma monomérica (desnaturalizada) de LIGHT o CXCR5, un epítope de la forma trimérica (nativa) de LIGHT o CXCR5, o tanto a la forma monomérica (desnaturalizada) como a la forma trimérica (nativa) de LIGHT o CXCR5. En aspectos específicos descritos en el presente documento, los anticuerpos anti-LIGHT se unen específicamente a un epítope de la forma trimérica de LIGHT pero no se unen específicamente a la forma monomérica de LIGHT.

El término "excipientes" se refiere a sustancias inertes que se usan comúnmente como diluyente, vehículo, conservante, aglutinante, agente estabilizante, etc., para fármacos e incluye, pero sin limitación, proteínas (por ejemplo, seroalbúmina, etc.), aminoácidos (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina, glicina, histidina, etc.), ácidos grasos y fosfolípidos (por ejemplo, sulfonatos de alquilo, caprilato, etc.), tensioactivos (por ejemplo, SDS, polisorbato, tensioactivo no iónico, etc.), sacáridos (por ejemplo, sacarosa, maltosa, trehalosa, etc.) y polioles (por ejemplo, manitol, sorbitol, etc.). Véase, también, Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, Pa

En el contexto de un péptido o un polipéptido, el término "fragmento" se refiere a un péptido o un polipéptido que comprende menos de la secuencia de aminoácidos de longitud completa. Dicho fragmento puede surgir, por ejemplo, de un truncamiento en el extremo amino-terminal, un truncamiento en el extremo carboxi-terminal y/o una deleción interna de un residuo(s) de la secuencia de aminoácidos. Los fragmentos pueden ser el resultado, por ejemplo, de un corte y empalme de ARN alternativo o de la actividad de proteasa *in vivo*. En determinados aspectos descritos en el presente documento, los fragmentos hLIGHT o hCXCR5 incluyen polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos de al menos 5 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 10 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 15 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 20 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 25 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 40 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 50 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 60 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 70 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 80 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 90 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 100 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 125 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 150 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 175 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 200 residuos de aminoácidos contiguos o al menos 250 residuos de aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido LIGHT o CXCR5 o un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido LIGHT o CXCR5. En un aspecto específico, un fragmento de un polipéptido LIGHT o CXCR5 o un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno LIGHT o CXCR5 conserva al menos 1, al menos 2, o al menos 3 funciones del polipéptido o anticuerpo.

Las expresiones "anticuerpo completamente humano" o "anticuerpo humano" se usan de manera intercambiable en el presente documento y se refieren a un anticuerpo que comprende una región variable humana y, posiblemente, una región constante humana. En formas de realización específicas, las expresiones se refieren a un anticuerpo que

comprende una región variable y una región constante de origen humano. Los anticuerpos anti-LIGHT "completamente humanos", en determinados aspectos, también pueden abarcar anticuerpos que se unen a polipéptidos LIGHT y están codificados por secuencias de ácidos nucleicos que son variantes somáticas de origen natural de una secuencia de ácidos nucleicos de inmunoglobulina de línea germinal humana. En un aspecto específico, los anticuerpos anti-LIGHT son anticuerpos completamente humanos. La expresión "anticuerpo completamente humano" incluye anticuerpos que tienen regiones variables y constantes correspondientes a secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana tal como se describe por Kabat *et al.* (Véase Kabat *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication. 91-3242). Los procedimientos para producir anticuerpos completamente humanos son conocidos en la técnica.

La expresión "anticuerpo humano recombinante" incluye anticuerpos humanos que se preparan, se expresan, se crean o se aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos expresados utilizando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped, anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos humanos combinatorios recombinantes, anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón o una vaca) que es transgénico y/o transcromosómico para los genes de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, Taylor, L. D. *et al.* (1992) Nucl. Acidos Res. 20: 6287-6295) o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados mediante cualquier otro medio que implique el corte y empalme de secuencias de genes de inmunoglobulina humana a otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes pueden tener regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (véase Kabat, E. A. *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). En determinadas formas de realización, no obstante, dichos anticuerpos humanos recombinantes se someten a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humanas, mutagénesis somática *in vivo*) y, por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque se derivan de secuencias de VH y VL de línea germinal humana y están relacionadas con las mismas, no pueden existir de forma natural dentro del repertorio de línea germinal del anticuerpo humano *in vivo.*

Un "agente de unión IgG4" o un "agente de unión que comprende al menos una porción de una región Fc de IgG4" se refieren ambos a los agentes de unión descritos en el presente documento que incluyen al menos un fragmento de Fc de IgG4. En determinados aspectos, el fragmento comprende 10, 20, 30, 40, 50, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210 o 220 aminoácidos de la región Fc de IgG4. En otros aspectos, el fragmento incluye 10-50, 50-100, 100-150 o 150-200 aminoácidos de la región Fc de IgG4. En otros aspectos, la porción de la región Fc de IgG4 puede tener una determinada homología con la región Fc de IgG4. Por ejemplo, el agente de unión a IgG4 puede incluir una porción de una proteína con más del 50, 60, 70, 80, 90, 93, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% de homología con la región Fc de IgG4. Las regiones Fc ejemplares de IgG4 se describen a lo largo de la memoria descriptiva.

La expresión "cadena pesada", cuando se usa con referencia a un anticuerpo, se refiere a cinco tipos distintos, denominados alfa (α), delta (Δ), épsilon (ε), gamma (γ) y mu (μ), basados en la secuencia de aminoácidos del dominio constante de la cadena pesada. Estos distintos tipos de cadenas pesadas son bien conocidos en la técnica y dan lugar a cinco clases de anticuerpos, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente, incluidas cuatro subclases de IgG, a saber, IgG1, IgG1, IgG3 e IgG4. En algunas formas de realización, la cadena pesada es una cadena pesada humana.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como F_v, F_{ab}, $F_{ab'}$, $F_{(ab')2}$ u otras subsecuencias de anticuerpos de unión a la diana) que contienen secuencias derivadas de inmunoglobulina no humana, en comparación con un anticuerpo humano. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de plantilla de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también puede comprender al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (F_c), típicamente la de la plantilla de inmunoglobulina humana elegida. En general, el objetivo es poseer una molécula de anticuerpo que sea mínimamente inmunogénica en un ser humano. Por lo tanto, es posible que uno o más aminoácidos de una o más CDR también se puedan cambiar por uno que sea menos inmunogénico para un huésped humano, sin minimizar sustancialmente la función de unión específica de las, una o más, CDR con respecto a CXCR5 o a CXCL13. Como alternativa, el FR puede ser no humano, pero los aminoácidos más inmunogénicos se reemplazan por unos menos inmunogénicos. No obstante, el injerto de CDR, tal como se discutió anteriormente, no es la única forma de obtener un anticuerpo humanizado. Por ejemplo, la modificación de únicamente las regiones CDR puede ser insuficiente, dado que no es infrecuente que los residuos del marco estructural tengan un papel en la determinación de la estructura tridimensional de los bucles de CDR y la afinidad general del anticuerpo por su ligando. Por lo tanto, se puede poner en práctica cualquier medio de forma que se modifique la molécula de anticuerpo parental no humana para que sea una que sea menos inmunogénica para un ser humano, y la identidad de secuencia global con un anticuerpo humano no siempre es una necesidad. Por lo tanto, la humanización también se puede lograr, por ejemplo, mediante la mera sustitución de solo unos pocos residuos, en particular los que están expuestos en la

molécula de anticuerpo, y no están enterrados dentro de la molécula, y por lo tanto, no son fácilmente accesibles para el sistema inmunitario del huésped. Dicho procedimiento se enseña en el presente documento con respecto a la sustitución de residuos "móviles" o "flexibles" de la molécula de anticuerpo, con el objetivo de reducir o amortiguar la inmunogenicidad de la molécula resultante sin comprometer la especificidad del anticuerpo por su epítope o determinante. Véase, por ejemplo, Studnicka *et al.*, Prot Eng 7 (6) 805-814, 1994; Mol Imm 44: 1986-1988, 2007; Sims *et al.*, J Immunol 151: 2296 (1993); Chothia *et al.*, J Mol Biol 196: 901 (1987); Carter *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 89: 4285 (1992); Presta *et al.*, J Immunol 151: 2623 (1993), el documento WO 2006/042333 y la patente de Estados Unidos Nº 5.869.619.

Un agente de unión "aislado" o "purificado", tal como un anticuerpo, está sustancialmente exento de material celular u otras proteínas contaminantes procedentes de la fuente celular o tisular de la que se deriva el agente de unión, o sustancialmente exento de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. Por ejemplo, la expresión "sustancialmente exento de material celular" incluye preparaciones de un anticuerpo en las que el anticuerpo se separa de los componentes celulares de las células a partir de las que se aísla o se produce de forma recombinante. Por lo tanto, un anticuerpo que está sustancialmente exento de material celular incluye preparaciones de anticuerpo que tienen menos de aproximadamente el 30%, 20%, 10% o 5% (en peso seco) de proteína heteróloga (también denominada en el presente documento "proteína contaminante"). Cuando el anticuerpo se produce de forma recombinante, también es deseable que esté sustancialmente exento de medio de cultivo, es decir, que el medio de cultivo represente menos de aproximadamente el 20%, 10% o 5% del volumen de la preparación de proteína. Cuando el anticuerpo se produce por síntesis química, en algunas formas de realización está sustancialmente exento de precursores químicos u otros productos químicos, es decir, está separado de los precursores químicos u otras sustancias químicas implicadas en la síntesis de la proteína. En consecuencia, dichas preparaciones del anticuerpo tienen menos de aproximadamente el 30%, 20%, 10%, 5% (en peso seco) de precursores químicos o compuestos distintos del anticuerpo de interés. En algunos aspectos descritos en el presente documento, los anticuerpos anti-LIGHT o anti-CXCR5 están aislados o purificados.

Las expresiones "LIGHT humano", "hLIGHT" o "polipéptido hLIGHT" y expresiones y términos similares se refieren a los polipéptidos ("polipéptidos", "péptidos" y "proteínas" se utilizan de forma intercambiable en el presente documento) que comprenden la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 y polipéptidos relacionados, incluidas variantes de SNP de los mismos. Los polipéptidos relacionados incluyen variantes alélicas (es decir, variantes de SNP); variantes de corte y empalme; fragmentos; derivados; variantes de sustitución, deleción e inserción; polipéptidos de fusión y homólogos entre especies, en algunos aspectos descritos en el presente documento, que conservan la actividad LIGHT y/o son suficientes para generar una respuesta inmunitaria anti-LIGHT. También se describen formas solubles de LIGHT que son suficientes para generar una respuesta inmunitaria anti-LIGHT. Como apreciarán los expertos en la técnica, un agente de unión anti-LIGHT, tal como un anticuerpo, puede unirse a un polipéptido LIGHT, fragmento de polipéptido, antígeno y/o epítope, ya que un epítope es parte del antígeno más grande, que es parte del fragmento polipeptídico más grande, que, a su vez, es parte del polipéptido más grande. El hLIGHT puede existir en forma trimérica (nativa) o monomérica (desnaturalizada).

Las expresiones "CXCR5 humano", "hCXCR5" o "polipéptido hCXCR5" y expresiones y términos similares se refieren a los polipéptidos ("polipéptidos", "péptidos" y "proteínas" se utilizan de forma intercambiable en el presente documento) que comprenden la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 y polipéptidos relacionados, incluidas variantes de SNP de los mismos. Los polipéptidos relacionados incluyen variantes alélicas (es decir, variantes de SNP); variantes de corte y empalme; fragmentos; derivados; variantes de sustitución, deleción e inserción; polipéptidos de fusión; y homólogos entre especies, en algunos aspectos descritos en el presente documento, que conservan la actividad de CXCR5 y/o son suficientes para generar una respuesta inmunitaria anti-CXCR5. También se incluyen formas solubles de CXCR5 que son suficientes para generar una respuesta inmunológica anti-CXCR5. Como apreciarán los expertos en la técnica, un agente de unión anti-CXCR5, tal como un anticuerpo, puede unirse a un polipéptido, fragmento de polipéptido, antígeno y/o epítope CXCR5, ya que un epítope es parte del antígeno más grande, que es parte del fragmento polipeptídico más grande, que, a su vez, es parte del polipéptido más grande.

La expresión "numeración de Kabat" y expresiones similares se reconocen en la técnica y se refieren a un sistema de numeración de residuos de aminoácidos que son más variables (es decir, hipervariables) que otros residuos de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo (Kabat *et al.* (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190: 382-391 y, Kabat *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication Nº 91-3242). Para la región variable de la cadena pesada, la región hipervariable varía típicamente entre las posiciones de aminoácidos 31 a 35 para CDR1, las posiciones de aminoácidos 50 a 65 para CDR2 y las posiciones de aminoácidos 95 a 102 para CDR3. Para la región variable de la cadena ligera, la región hipervariable típicamente varía de las posiciones de aminoácidos 24 a 34 para CDR1, las posiciones de aminoácidos 50 a 56 para CDR2, y las posiciones de aminoácidos 89 a 97 para CDR3.

La expresión "cadena ligera", cuando se utiliza con referencia a un anticuerpo, se refiere a dos tipos distintos, denominados kappa (κ) o lambda (λ) en base a la secuencia de aminoácidos de los dominios constantes. Las secuencias de aminoácidos de cadena ligera son bien conocidas en la técnica. En algunas formas de realización, la

cadena ligera es una cadena ligera humana.

Los términos "gestionar", "gestionando" y "gestión" se refieren a los efectos beneficiosos que un sujeto obtiene de un tratamiento (por ejemplo, un agente profiláctico o terapéutico), que no dan como resultado la curación de la infección. En determinados aspectos, se administra a un sujeto uno o más tratamientos (es decir, agentes profilácticos o terapéuticos, tales como una formulación de la invención) para "gestionar" una enfermedad mediada por LIGHT (es decir, una enfermedad intestinal crónica, EII, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa o GVHD) o una enfermedad mediada por CXCR5 (es decir, artritis reumatoide), uno o más síntomas de la misma, para prevenir la progresión o el empeoramiento de la enfermedad.

La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos homogéneos o sustancialmente homogéneos, y cada anticuerpo monoclonal típicamente reconocerá un solo epítope del antígeno. En algunas formas de realización, un "anticuerpo monoclonal" es un anticuerpo producido por un único hibridoma u otra célula. El término "monoclonal" no está limitado a ningún procedimiento particular para producir el anticuerpo. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden producirse mediante el procedimiento del hibridoma tal como se describe por Kohler *et al.*; Nature, 256: 495 (1975) o puede aislarse a partir de bibliotecas de fagos. Otros procedimientos para la preparación de líneas celulares clonales y de anticuerpos monoclonales expresados por las mismas son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, el capítulo 11 de: Short Protocols in Molecular Biology, (2002) 5ª ed.; Ausubel *et al.*, eds., John Wiley and Sons, Nueva York).

La expresión "farmacéuticamente aceptable" significa que está aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o un gobierno estatal, o que figura en la Farmacopea de los EE. UU., la Farmacopea Europea u otra Farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos.

Por "excipiente farmacéuticamente aceptable" se quiere decir cualquier sustancia inerte que se combina con una molécula activa, tal como un anticuerpo monoclonal, para preparar una forma de dosificación agradable o conveniente. El "excipiente farmacéuticamente aceptable" es un excipiente que no es tóxico para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas, y es compatible con otros ingredientes de la formulación que comprenden el anticuerpo monoclonal.

Los términos "prevenir", "previniendo" y "prevención" se refieren a la inhibición total o parcial del desarrollo, la recurrencia, la aparición o la propagación de una enfermedad mediada por LIGHT o mediada por CXCR5 y/o los síntomas relacionados con la misma, que se obtiene mediante la administración de un tratamiento o una combinación de tratamientos proporcionados en el presente documento (por ejemplo, una combinación de agentes profilácticos o terapéuticos, tal como una formulación de la invención).

La expresión "agente profiláctico" se refiere a cualquier agente que pueda inhibir totalmente o parcialmente el desarrollo, la recurrencia, la aparición o la propagación de una enfermedad mediada por LIGHT o mediada por CXCR5 y/o síntomas relacionados en un sujeto. En determinadas formas de realización, la expresión "agente profiláctico" se refiere a una formulación de la invención. En otras determinadas formas de realización, la expresión "agente profiláctico" se refiere a un agente distinto de una formulación de la invención. En algunas formas de realización, un agente profiláctico es un agente que se sabe que puede utilizarse o que está siendo utilizando actualmente para prevenir una enfermedad mediada por LIGHT o mediada por CXCR5 y/o un síntoma relacionado con la misma, o que impide la aparición, el desarrollo, la progresión y/o la gravedad de una enfermedad mediada por LIGHT o mediada por CXCR5 y/o un síntoma relacionado con la misma. En formas de realización específicas, el agente profiláctico es un anticuerpo anti-LIGHT completamente humano, tal como un anticuerpo monoclonal anti-LIGHT completamente humano, o un anticuerpo anti-CXCR5 humanizado, tal como un anticuerpo monoclonal anti-CXCR5 humanizado.

La expresión "antígeno LIGHT" se refiere a la porción de un polipéptido LIGHT a la que se une específicamente un agente de unión, tal como un anticuerpo. Un antígeno LIGHT también se refiere a un análogo o un derivado de un polipéptido LIGHT o un fragmento del mismo al que se une específicamente un agente de unión, tal como un anticuerpo. En algunas formas de realización, un antígeno LIGHT es un antígeno LIGHT monomérico o un antígeno LIGHT trimérico. Una región de un polipéptido LIGHT que contribuye a un epítope puede ser aminoácidos contiguos del polipéptido, o el epítope puede provenir de dos o más regiones no contiguas del polipéptido. El epítope puede ser o no una característica de superficie tridimensional del antígeno. Una región localizada en la superficie de un antígeno LIGHT que es capaz de provocar una respuesta inmunitaria es un epítope LIGHT. El epítope puede ser o no una característica de superficie tridimensional del antígeno.

La expresión "antígeno CXCR5" se refiere a la porción de un polipéptido CXCR5 a la que se une específicamente un agente de unión, tal como un anticuerpo. Un antígeno CXCR5 también se refiere a un análogo o un derivado de un polipéptido CXCR5 o un fragmento del mismo al que se une específicamente un agente de unión, tal como un anticuerpo. Una región de un polipéptido CXCR5 que contribuye a un epítope puede ser aminoácidos contiguos del polipéptido, o el epítope puede provenir de dos o más regiones no contiguas del polipéptido. El epítope puede ser o no una característica de superficie tridimensional del antígeno. Una región localizada en la superficie de un antígeno CXCR5 que es capaz de provocar una respuesta inmunitaria es un epítope CXCR5. El epítope puede ser o no una

característica de superficie tridimensional del antígeno.

Las expresiones "enfermedad mediada por LIGHT" y "trastorno mediado por LIGHT" se usan de manera intercambiable y se refieren a cualquier enfermedad que esté totalmente o parcialmente causada por LIGHT o sea resultado del mismo. En determinadas formas de realización, el LIGHT se expresa de forma aberrante (por ejemplo, altamente) en la superficie de una célula. En algunas formas de realización, el LIGHT puede estar regulado al alza de forma aberrante en un tipo de célula particular. En otras formas de realización, la señalización celular normal, aberrante o excesiva es causada por la unión de LIGHT a un ligando LIGHT. En determinadas formas de realización, el ligando LIGHT es un receptor LIGHT (por ejemplo, HVEM, LTβR o DCR3), por ejemplo, que se expresa en la superficie de una célula, tal como una célula epitelial de colon. En determinadas formas de realización, la enfermedad mediada por LIGHT es una enfermedad intestinal crónica, una enfermedad inflamatoria intestinal (EII), tal como la enfermedad de Crohn (EC) o colitis ulcerosa (CU). En otras formas de realización, la enfermedad mediada por LIGHT es una enfermedad de injerto contra huésped (GVHD).

Las expresiones "enfermedad mediada por CXCR5" y "trastorno mediado por CXCR5" se usan indistintamente y se refieren a cualquier enfermedad que esté totalmente o parcialmente causada por CXCR5 o sea resultado del mismo. En determinadas formas de realización, CXCR5 se expresa de forma aberrante (por ejemplo, de forma elevada) en la superficie de una célula. En algunas formas de realización, el CXCR5 puede estar regulado al alza de forma aberrante en un tipo de célula particular. En otras formas de realización, la señalización celular normal, aberrante o excesiva es causada por la unión de CXCR5 a un ligando CXCR5. En determinadas formas de realización, el ligando CXCR5 es CXCL13. En determinadas formas de realización, la enfermedad mediada por CXCR5 es artritis reumatoide (AR).

El término "sacárido" se refiere a una clase de moléculas que son derivados de alcoholes polihidroxílicos. Los sacáridos se denominan comúnmente carbohidratos y pueden contener diferentes cantidades de unidades de azúcar (sacárido), por ejemplo, monosacáridos, disacáridos y polisacáridos.

Las expresiones "se une específicamente" o "que se une específicamente" significan que se une específicamente a un antígeno o un fragmento del mismo y no se une específicamente a otros antígenos. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno puede unirse a otros péptidos o polipéptidos con menor afinidad, determinada por, por ejemplo, radioinmunoensayos (RIA), ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), BIACORE, u otros ensayos conocidos en la técnica. Los anticuerpos o variantes o fragmentos de los mismos que se unen específicamente a un antígeno pueden tener reactividad cruzada con antígenos relacionados. En algunas formas de realización, los anticuerpos o variantes o fragmentos de los mismos que se unen específicamente a un antígeno no reaccionan de forma cruzada con otros antígenos. Un anticuerpo o una variante o un fragmento del mismo que se une específicamente a un antígeno LIGHT o CXCR5 puede identificarse, por ejemplo, mediante inmunoensayos, BIAcore u otras técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Típicamente, una reacción específica o selectiva será al menos el doble de la señal o ruido de fondo, y más típicamente más de 10 veces el fondo. Véase, por ejemplo, Paul, ed., 1989, Fundamental Immunology, segunda edición, Raven Press, Nueva York, en las páginas 332-336, para una discusión con respecto a la especificidad de anticuerpos.

Una formulación "estable" o "estabilizada" es aquella en la que el agente de unión, tal como un anticuerpo, conserva esencialmente en la misma su estabilidad física, identidad, integridad y/o estabilidad química, identidad, integridad y/o actividad biológica durante el almacenamiento. Diversas técnicas analíticas para medir la estabilidad de proteínas están disponibles en la técnica y se revisan en Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., 247-301, Nueva York, N.Y., Pubs. (1991) y Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993), por ejemplo. La estabilidad se puede medir a una temperatura seleccionada y otras condiciones de almacenamiento durante un período de tiempo seleccionado. La estabilidad puede determinarse mediante al menos uno de los procedimientos seleccionados del grupo que consiste en inspección visual, SDS-PAGE, IEF, HPSEC, RFFIT y ELISA kappa/lambda. Por ejemplo, un anticuerpo "conserva su estabilidad física" en una formulación farmacéutica, si no muestra signos de agregación, precipitación y/o desnaturalización tras un examen visual del color y/o la transparencia, o medido por dispersión de luz UV, SDS PAGE o por cromatografía de exclusión por tamaño (de alta presión) (HPSEC). En algunas formas de realización, cuando se usan las formulaciones de la invención, el 5% o menos, típicamente el 4% o menos, típicamente el 3% o menos, más típicamente el 2% o menos y particularmente el 1% o menos de los anticuerpos forman agregados, medidos por HPSEC o cualquier otro procedimiento adecuado para medir la formación de agregación. Por ejemplo, un anticuerpo se considera estable en una formulación particular si el monómero de anticuerpo tiene una pureza de aproximadamente el 90%, típicamente de aproximadamente el 95%, en particular de aproximadamente el 98% después de un determinado período de tiempo predeterminado en determinadas condiciones de almacenamiento en una formulación particular. La estabilidad química se puede evaluar mediante la detección y cuantificación de formas químicamente alteradas de la proteína. La alteración química puede implicar la modificación del tamaño (por ejemplo, por recorte), que puede evaluarse utilizando (HP)SEC, SDS-PAGE y/o ionización de desorción láser asistida por matriz/espectrometría de masas de tiempo de vuelo (MALDI/TOF MS), por ejemplo. Otros tipos de alteración química incluyen la alteración de carga (que se produce, por ejemplo, como resultado de una desamidación), que se puede evaluar mediante cromatografía de intercambio iónico, por ejemplo. Un anticuerpo "conserva su actividad biológica" en una formulación farmacéutica en un momento dado, si la actividad biológica del anticuerpo en un momento dado es al

menos aproximadamente el 90% (dentro de los errores del ensayo) de la actividad biológica exhibida en el momento en que se preparó la formulación farmacéutica, determinada en un ensayo de unión a antígeno o un ensayo de neutralización de virus, por ejemplo.

Los términos "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente. Tal como se usa en el presente documento, un sujeto es típicamente un mamífero, tal como un mamífero no primate (por ejemplo, vacas, cerdos, caballos, gatos, perros, ratas, etc.) o un primate (por ejemplo, mono y ser humano), y en algunas formas de realización un ser humano. En una forma de realización, el sujeto es un mamífero, tal como un ser humano, que padece una enfermedad mediada por LIGHT o mediada por CXCR5. En otra forma de realización, el sujeto es un mamífero, tal como un ser humano, en riesgo de desarrollar una enfermedad mediada por LIGHT o mediada por CXCR5.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de un tratamiento (por ejemplo, una formulación de la invención) que es suficiente para reducir y/o mejorar la gravedad y/o la duración de una enfermedad dada y/o un síntoma relacionado con la misma. Esta expresión también abarca una cantidad necesaria para la reducción o la mejora del avance o la progresión de una enfermedad dada, la reducción o la mejora de la recurrencia, el desarrollo o la aparición de una enfermedad determinada, y/o para mejorar o potenciar el efecto o los efectos profilácticos o terapéuticos de otro tratamiento (por ejemplo, un tratamiento distinto de una formulación de la invención). En algunas formas de realización, la cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de la invención es de aproximadamente 0,1 mg/kg (mg de anticuerpo por kg de peso del sujeto) a aproximadamente 100 mg/kg. En determinadas formas de realización, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo proporcionado en el presente documento es aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, 3 mg/kg, 5 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 15 mg/kg, aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 25 mg/kg, aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 35 mg/kg, aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 60 mg/kg kg, aproximadamente 70 mg/kg, aproximadamente 80 mg/kg aproximadamente 90 mg/kg o aproximadamente 100 mg/kg (o un intervalo entre los mismos). En algunas formas de realización, "cantidad terapéuticamente eficaz", tal como se utiliza en el presente documento, también se refiere a la cantidad de un anticuerpo descrito en el presente documento para lograr un resultado específico (por ejemplo, la inhibición de una actividad biológica de LIGHT de una célula, tal como la inhibición de la secreción de CCL20, IL-8 o RANTES de la célula; o la inhibición de la actividad biológica de CXCR5 de una célula, tal como la unión a CXCL13).

La expresión "agente terapéutico" se refiere a cualquier agente que se pueda utilizar en el tratamiento, la gestión o la mejora de una enfermedad mediada por LIGHT o mediada por CXCR5 y/o un síntoma relacionado con la misma. En determinadas formas de realización, la expresión "agente terapéutico" se refiere a una formulación de la invención. En determinadas otras formas de realización, la expresión "agente terapéutico" se refiere a un agente distinto de una formulación de la invención. En algunas formas de realización, un agente terapéutico es un agente que se sabe que puede utilizarse, o que ha sido o está siendo utilizado actualmente, para el tratamiento, la gestión o la mejora de una enfermedad mediada por LIGHT o mediada por CXCR5 o uno o más síntomas relacionados con la misma.

El término "terapia" se refiere a cualquier protocolo, procedimiento y/o agente que se pueda usar en la prevención, la gestión, el tratamiento y/o la mejora de una enfermedad mediada por LIGHT (por ejemplo, EII o GVHD) o enfermedad mediada por CXCR5 (por ejemplo, artritis reumatoide). En determinadas formas de realización, los términos "terapias" y "terapia" se refieren a una terapia biológica, terapia de apoyo y/u otras terapias útiles en la prevención, la gestión, el tratamiento y/o la mejora de una enfermedad mediada por LIGHT o mediada por CXCR5 conocida por un experto en la técnica, tal como el personal médico.

Los términos "tratar", "tratamiento" y "tratando" se refieren a la reducción o la mejora de la progresión, la gravedad y/o la duración de una enfermedad mediada por LIGHT (por ejemplo, una enfermedad intestinal crónica, EII o GVHD) o una enfermedad mediada por CXCR5 (por ejemplo, artritis reumatoide) resultante de la administración de una o más terapias (que incluyen, entre otras, la administración de uno o más agentes profilácticos o terapéuticos, tales como una formulación de la invención). En formas de realización específicas para LIGHT, dichos términos se refieren a la reducción o la inhibición de la unión de LIGHT a HVEM, la reducción o la inhibición de la unión de LIGHT a LTβR, la reducción o la inhibición de la unión de LIGHT a DcR3, la reducción o la inhibición de la producción o la secreción de CCL20 a partir de una célula que expresa un receptor LIGHT de un sujeto, la reducción o la inhibición de la producción o la secreción de IL-8 a partir de una célula que expresa un receptor LIGHT de un sujeto, la reducción o la inhibición de la producción o secreción de RANTES a partir de una célula que expresa un receptor LIGHT de un sujeto y/o la inhibición o la reducción de uno o más síntomas asociados con una enfermedad mediada por LIGHT, tales como una enfermedad intestinal crónica, EII o GVHD. En formas de realización específicas para CXCR5, dichos términos se refieren a la reducción o la inhibición de la unión de CXCR5 a CXCL13, y/o la inhibición o la reducción de uno o más síntomas asociados con una enfermedad mediada por CXCR5, tal como artritis reumatoide.

Las expresiones "región variable" o "dominio variable" se refieren a una porción de las cadenas ligera y pesada, típicamente aproximadamente los aminoácidos amino-terminales 120 a 130 de la cadena pesada y aproximadamente los aminoácidos 100 a 110 de la cadena ligera, cuya secuencia difiere ampliamente entre los anticuerpos y se utilizan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. La

variabilidad en la secuencia se concentra en las regiones denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), mientras que las regiones más altamente conservadas en el dominio variable se denominan regiones estructurales (FR). Las CDR de las cadenas ligera y pesada son las principales responsables de la interacción del anticuerpo con el antígeno. La numeración de las posiciones de los aminoácidos es según el Índice de la UE, como en Kabat *et al.* (1991) Sequences of proteins of immunological interest. (U.S. Department of Health and Human Services, Washington, D.C.) 5ª ed. ("Kabat *et al*"). En algunas formas de realización, la región variable es una región variable humana.

B. Formulaciones y componentes de formulación

Como se indicó anteriormente, las formulaciones de la invención se han encontrado sorprendentemente en forma de líquidos y polvos liofilizados que comprenden un agente de unión IgG4 y un tampón de citrato, siendo el pH de la formulación igual o inferior a aproximadamente pH 6 y al punto isoeléctrico (pI) del agente de unión. Las formulaciones de la invención proporcionan mejoras significativas sobre las formulaciones de agentes de unión IgG4 convencionales (por ejemplo, formulaciones de solución salina tamponada con fosfato (PBS)), que forman subproductos no deseados al aumentar la concentración del agente de unión en la formulación. En particular, las formulaciones de la invención tienen una cantidad reducida de agregados, medias moléculas, productos de degradación, proteínas de bajo peso molecular (LMWP), proteínas de alto peso molecular (HMWP) y reordenamientos de isoformas ácidas, básicas y neutras del agente de unión en las formulaciones.

i. Agentes de unión anti-LIGHT, y variantes y fragmentos de los mismos

En determinados aspectos descritos en el presente documento, las formulaciones incluyen un agente de unión anti-LIGHT. Los agentes de unión pueden ser cualquier molécula, tal como un anticuerpo, un ARNip, un ácido nucleico, un aptámero, una proteína o un compuesto orgánico de molécula pequeña, que se une o se une específicamente a LIGHT, o una variante o un fragmento del mismo. En algunos aspectos descritos en el presente documento, el agente de unión es un anticuerpo anti-LIGHT, o una variante del mismo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Los anticuerpos anti-LIGHT se unen específicamente a una proteína, fragmento polipeptídico o epítope LIGHT (tipo linfotoxina, muestran una expresión inducible y compiten con la glicoproteína D del VHS por HVEM, un receptor expresado por linfocitos T). La molécula LIGHT puede ser de cualquier especie. En algunos aspectos, la molécula LIGHT es de un ser humano, conocida en el presente documento como "hLIGHT". El hLIGHT tiene la siguiente secuencia de aminoácidos, que se identifica como SEQ ID NO: 9:

```
1   MEESVVRPSV FVVDGQTDIP FTRLGRSHRR QSCSVARVGL GLLLLLMGAG
51  LAVQGWFLLQ LHWRLGEMVT RLPDGPAGSW EQLTQERRSH EVNPAAHLTG
101 ANSSLTGSGG PLLWETQLGL AFLRGLSYHD GALVVTKAGY YYIYSKVQLG
150 GVGCPLGLAS TITHGLYKRT PRYPEELELL VSQQSPCGRA TSSSRVWWDS
200 SFLGGVVHLE AGEEVVVRVL DERLVRLRDG TRSYFGAFMV (SEQ ID NO: 9)
```

En determinados aspectos ejemplares descritos en el presente documento, el anticuerpo anti-LIGHT es un anticuerpo humanizado, un anticuerpo completamente humano, o una variante del mismo o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos aspectos descritos en el presente documento, los anticuerpos anti-LIGHT evitan la unión de LIGHT con sus receptores e inhiben la actividad biológica de LIGHT (por ejemplo, la producción o la secreción mediada por LIGHT de CCL20, IL-8 o RANTES a partir de células que expresan un ligando LIGHT, tal como un receptor LIGHT (por ejemplo, HVEM, LTβR y/o DcR3).

En determinados aspectos específicos descritos en el presente documento, el anticuerpo anti-LIGHT comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de una o más de las siguientes regiones determinantes de la complementariedad (CDR):

HCDR1 - GYNWH (**SEQ ID NO: 1**);

HCDR2 - EITHSGSTNYNPSLKS (**SEQ ID NO: 2**) o

HCDR3 - EIAVAGTGYYGMDV (**SEQ ID NO: 3**).

En otros aspectos específicos descritos en el presente documento, el anticuerpo anti-LIGHT comprende una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de una o más de las siguientes regiones determinantes de la complementariedad (CDR):

LCDR1 - RASQGINSAFA (**SEQ ID NO: 4**);

LCDR2 - DASSLES (**SEQ ID NO: 5**) o

LCDR3 - QQFNSYPLT (**SEQ ID NO: 6**).

En un aspecto específico descrito en el presente documento, el anticuerpo anti-LIGHT comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1, 2 y 3.

En otro aspecto específico, el anticuerpo anti-LIGHT comprende una región variable de cadena ligera (VL) que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 4, 5 y 6.

En aspectos más específicos, el anticuerpo anti-LIGHT comprende una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1, 2 y 3; y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 4, 5 y 6.

En aspectos específicos, el anticuerpo anti-LIGHT comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 7:**

```
  1 QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSFS GYNWHWIRQP PGKGLEWIGE

 51 ITHSGSTNYN PSLKSRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCVREIA

101 VAGTGYYGMD VWGQGTTVTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL

151 VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVPSSSLGT

201 KTYTCNVDHK PSNTKVDKRV ESKYGPPCPP CPAPEFEGGP SVFLFPPKPK

251 DTLMISRTPE VTCVVVDVSQ EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS

301 TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV

351 YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL

401 DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLG (SEQ ID NO: 7)
```

Posiciones 1-122:	región variable de la cadena pesada (VH). Las CDR (regiones determinantes de la complementariedad, según la definición de Kabat) están subrayadas.
Posiciones 123-448:	región constante de IgG4 humana (SwissProt IGHG4_HUMAN con las dos mutaciones S241P y L248E, según la numeración de Kabat).

En otros aspectos específicos descritos en el presente documento, el anticuerpo anti-LIGHT comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 8:**

```
  1 AIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIN SAFAWYQQKP GKAPKLLIYD

 51 ASSLESGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FNSYPLTFGG

101 GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV

151 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG

201 LSSPVTKSFN RGEC (SEQ ID NO: 8)
```

Posiciones 1-107:	región variable de la cadena ligera (VL). Las CDR (regiones determinantes de la complementariedad, según la definición de Kabat) están subrayadas.
Posiciones 108-214:	región constante de Cκ humana.

En otros aspectos descritos en el presente documento, el anticuerpo anti-LIGHT comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 7**y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 8**.

En determinados aspectos descritos en el presente documento, el anticuerpo anti-LIGHT comprende una cadena pesada derivada de la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 10**, que puede estar codificada por la secuencia de ácidos nucleicos de la **SEQ ID NO: 11**.

```
     M  K  H  L  W  F  F  L  L  L  V  A  A  P  R  W  V  L  S  Q  V  Q  L  Q  Q  W  G ·
   1 ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCTCCTAGATGGGTGCTGTCCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTGGGG
     ·  A  G  L  L  K  P  S  E  T  L  S  L  T  C  A  V  Y  G  G  S  F  S  G  Y  N  W  H ·
  81 CGCTGGCCTGCTGAAGCCTTCCGAGACACTGTCCCTGACCTGCGCCGTGTACGGCGGCTCCTTCTCCGGCTACAACTGGC
     ·  W  I  R  Q  P  P  G  K  G  L  E  W  I  G  E  I  T  H  S  G  S  T  N  Y  N  P
 161 ACTGGATCAGGCAGCCTCCCGGCAAGGGCCTGGAATGGATCGGCGAGATCACCCACTCCGGCTCCACCAACTACAACCCT
     S  L  K  S  R  V  T  I  S  V  D  T  S  K  N  Q  F  S  L  K  L  S  S  V  T  A  A ·
 241 AGCCTGAAGTCCAGAGTGACCATCTCCGTGGACACCTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGTCCTCTGTGACCGCCGC
     ·  D  T  A  V  Y  Y  C  V  R  E  I  A  V  A  G  T  G  Y  Y  G  M  D  V  W  G  Q  G ·
 321 TGACACCGCCGTGTACTACTGTGTGCGGGAGATCGCCGTGGCTGGCACCGGCTACTACGGCATGGATGTGTGGGGCCAGG
     ·  T  T  V  T  V  S  S  A  S  T  K  G  P  S  V  F  P  L  A  P  C  S  R  S  T  S
 401 GCACCACCGTGACCGTGTCCAGCGCTTCTACCAAGGGCCCTTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCTTGCTCCCGGTCCACCTCC
      E  S  T  A  A  L  G  C  L  V  K  D  Y  F  P  E  P  V  T  V  S  W  N  S  G  A  L ·
 481 GAGTCCACCGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGTCCTGGAACTCTGGCGCCCT
     ·  T  S  G  V  H  T  F  P  A  V  L  Q  S  S  G  L  Y  S  L  S  S  V  V  T  V  P  S ·
 561 GACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCCTCCGTGGTGACCGTGCCTT
     ·  S  S  L  G  T  K  T  Y  T  C  N  V  D  H  K  P  S  N  T  K  V  D  K  R  V  E
 641 CCTCCTCCCTGGGCACCAAGACCTACACCTGTAACGTGGACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAG
      S  K  Y  G  P  P  C  P  P  C  P  A  P  E  F  E  G  G  P  S  V  F  L  F  P  P  K ·
 721 TCCAAGTACGGCCCTCCTTGCCCTCCCTGCCCTGCCCCTGAGTTCGAGGGCGGACCTAGCGTGTTCCTGTTCCCTCCTAA
     ·  P  K  D  T  L  M  I  S  R  T  P  E  V  T  C  V  V  V  D  V  S  Q  E  D  P  E  V ·
 801 GCCTAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGACCCTGAGG
     ·  Q  F  N  W  Y  V  D  G  V  E  V  H  N  A  K  T  K  P  R  E  E  Q  F  N  S  T
 881 TCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGGGAGGAGCAGTTCAATTCCACC
      Y  R  V  V  S  V  L  T  V  L  H  Q  D  W  L  N  G  K  E  Y  K  C  K  V  S  N  K ·
 961 TACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGTAAGGTCTCCAACAA
     ·  G  L  P  S  S  I  E  K  T  I  S  K  A  K  G  Q  P  R  E  P  Q  V  Y  T  L  P  P ·
1041 GGGCCTGCCCTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTC
     ·  S  Q  E  E  M  T  K  N  Q  V  S  L  T  C  L  V  K  G  F  Y  P  S  D  I  A  V
1121 CTAGCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGACATCGCCGTG
      E  W  E  S  N  G  Q  P  E  N  N  Y  K  T  T  P  P  V  L  D  S  D  G  S  F  F  L ·
1201 GAGTGGGAGTCCAACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCT
     ·  Y  S  R  L  T  V  D  K  S  R  W  Q  E  G  N  V  F  S  C  S  V  M  H  E  A  L  H ·
1281 GTACTCCAGGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGGAGGGCAACGTCTTTTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGC
     ·  N  H  Y  T  Q  K  S  L  S  L  S  L  G  * (SEQ ID NO: 10)
1361 ACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGTCTCTGGGCTGA (SEQ ID NO: 11)
```

Aminoácidos 1-19: péptido señal

Aminoácidos 20-141: región variable (VH) de 124F19k2

Aminoácidos 142-fin: región constante de hIgG4 PE

Ácidos nucleicos 1-57: ácidos nucleicos que codifican el péptido señal

Ácidos nucleicos 58-423: ácidos nucleicos que codifican la región variable (VH) de 124F19k2

Ácidos nucleicos 424-fin: ácidos nucleicos que codifican la región constante de hIgG4 PE

En aspectos específicos alternativos descritos en el presente documento, el anticuerpo anti-LIGHT comprende una cadena ligera derivada de la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 12**, que puede estar codificada por la secuencia de ácidos nucleicos de la **SEQ ID NO: 13**.

```
      M  D  M  R  V  P  A  Q  L  L  G  L  L  L  L  W  L  P  G  A  R  C  A  I  Q  L  T ·

  1   ATGGACATGAGAGTGCCTGCTCAGCTGCTGGGACTGCTGCTGCTGTGGCTGCCTGGCGCTAGATGCGCCATCCAGCTGAC

      · Q  S  P  S  S  L  S  A  S  V  G  D  R  V  T  I  T  C  R  A  S  Q  G  I  N  S  A ·

 81   CCAGTCCCCCTCCTCTCTGTCCGCCTCCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTCGGGCCTCCCAGGGCATCAACTCCG

      · F  A  W  Y  Q  Q  K  P  G  K  A  P  K  L  L  I  Y  D  A  S  S  L  E  S  G  V

161   CCTTCGCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCCCCTAAGCTGCTGATCTACGACGCCTCCTCCCTGGAATCCGGCGTG

       P  S  R  F  S  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  Q  P  E  D  F  A  T ·

241   CCCTCCAGATTTTCCGGCTCCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCCAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCCAC

      · Y  Y  C  Q  Q  F  N  S  Y  P  L  T  F  G  G  G  T  K  V  E  I  K  R  T  V  A  A ·

321   CTACTACTGCCAGCAGTTCAACTCCTACCCTCTGACCTTCGGCGGAGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCTG

      · P  S  V  F  I  F  P  P  S  D  E  Q  L  K  S  G  T  A  S  V  V  C  L  L  N  N

401   CACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAAC

       F  Y  P  R  E  A  K  V  Q  W  K  V  D  N  A  L  Q  S  G  N  S  Q  E  S  V  T  E ·

481   TTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGA

      · Q  D  S  K  D  S  T  Y  S  L  S  S  T  L  T  L  S  K  A  D  Y  E  K  H  K  V  Y ·

561   GCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCT

      · A  C  E  V  T  H  Q  G  L  S  S  P  V  T  K  S  F  N  R  G  E  C  * (SEQ ID NO: 12)

641   ACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG (SEQ ID NO: 13)
```

Aminoácidos 1-22: péptido señal

Aminoácidos 23-129: región variable (VL) de 124F19k2

Aminoácidos 130-fin: región constante de hKappa

Ácidos nucleicos 1-66: ácidos nucleicos que codifican el péptido señal

Ácidos nucleicos 67-387: ácidos nucleicos que codifican la región variable (VL) de 124F19k2

Ácidos nucleicos 388-fin: ácidos nucleicos que codifican la región constante de hKappa

En un aspecto, el anticuerpo anti-LIGHT es un anticuerpo completamente humano. Los ejemplos de isotipos de anticuerpos completamente humanos incluyen IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-LIGHT es un anticuerpo IgG. Existen cuatro formas de IgG. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-LIGHT es un anticuerpo IgG4. En algunos aspectos descritos en el presente documento, el anticuerpo anti-LIGHT es un anticuerpo IgG4 completamente humano.

En algunos aspectos, el anticuerpo anti-LIGHT comprende adicionalmente una región constante, por ejemplo una región constante de IgG humana. En algunos aspectos, la región constante es una región constante de IgG4 humana. En aspectos adicionales, la región constante es una región constante de IgG4 humana modificada. En otros aspectos, la región constante es una región constante de Cκ humana.

En algunos aspectos descritos en el presente documento, el anticuerpo anti-LIGHT es un anticuerpo anti-LIGHT IgG4 completamente humano que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 (El

"Anticuerpo LIGHT Inicial"). En aspectos alternativos descritos en el presente documento, el anticuerpo anti-LIGHT es un anticuerpo IgG4 anti-LIGHT completamente humano que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en el que la región variable de cadena pesada comprende 3 regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1, 2 y 3, y en el que la región variable de la cadena ligera comprende 3 CDR que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 4, 5 y 6. Se han descrito en detalle la identificación, el aislamiento, la preparación y la caracterización de anticuerpos anti-LIGHT, incluido el anticuerpo anti-LIGHT que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 7 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 8, en la patente de Estados Unidos Nº 8.058.402, correspondiente a la publicación PCT WO 2008/027338.

Determinadas formulaciones descritas en el presente documento también incluyen variantes de agentes de unión anti-LIGHT, tales como anticuerpos. Específicamente, las formulaciones descritas en el presente documento pueden incluir variantes del anticuerpo anti-LIGHT que es un anticuerpo IgG4 anti-LIGHT completamente humano que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8. Las variantes de anticuerpos anti-LIGHT pueden tener propiedades fisicoquímicas similares en función de su alta similitud. Las variantes se definen como anticuerpos con una secuencia de aminoácidos que es al menos el 95%, al menos el 97%, por ejemplo al menos el 98% o el 99% homóloga a un anticuerpo anti-LIGHT, y capaz de competir por la unión a un polipéptido LIGHT, un fragmento de polipéptido LIGHT, o un epítope LIGHT. En algunos aspectos, las variantes mejorarán, neutralizarán o inhibirán de otra forma la actividad biológica de LIGHT (por ejemplo, la producción o la secreción mediada por LIGHT de CCL20, IL-8 o RANTES a partir de células que expresan un ligando LIGHT, tal como un receptor LIGHT (por ejemplo, HVEM, LTβR, y/o DcR3). La determinación de la competencia por la unión a la diana puede realizarse mediante procedimientos rutinarios conocidos por los expertos en la técnica. En algunos aspectos descritos en el presente documento, las variantes son anticuerpos humanos y, en algunos aspectos descritos en el presente documento, son moléculas de IgG4. En algunos aspectos descritos en el presente documento, una variante es al menos el 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica en secuencia de aminoácidos con el Anticuerpo Inicial. El término "variante" se refiere a un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos que está modificada con uno o más aminoácidos en comparación con las secuencias de aminoácidos del anticuerpo anti-LIGHT. La variante puede tener modificaciones de secuencia conservativas, que incluyen sustituciones, modificaciones, adiciones y deleciones de aminoácidos.

Los ejemplos de modificaciones incluyen, pero sin limitación, glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivación por grupos protectores/de bloqueo conocidos, escisión proteolítica y enlace a un ligando celular u otra proteína. Pueden introducirse modificaciones de aminoácidos mediante técnicas estándar conocidas en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio, clonación molecular, mutagénesis dirigida por oligonucleótidos y mutagénesis mediada por PCR aleatoria en el ácido nucleico que codifica los anticuerpos. Las sustituciones de aminoácidos conservativas incluyen aquellas en las que el residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene propiedades químicas o estructurales similares. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano). Será evidente para el experto que también pueden emplearse clasificaciones de familias de residuos de aminoácidos distintas de las utilizadas anteriormente. Además, una variante puede tener sustituciones de aminoácidos no conservativas, por ejemplo, el reemplazo de un aminoácido por un residuo de aminoácido que tiene propiedades estructurales o químicas diferentes. Las variaciones secundarias similares también pueden incluir deleciones o inserciones de aminoácidos, o ambas. La orientación para determinar qué residuos de aminoácidos pueden sustituirse, modificarse, insertarse o eliminarse sin eliminar la actividad inmunológica se puede encontrar utilizando programas informáticos bien conocidos en la técnica. Se pueden usar algoritmos informáticos, tales como, entre otros, Gap o Bestfit, que son conocidos por los expertos en la técnica, para alinear óptimamente las secuencias de aminoácidos que se van a comparar y para definir residuos de aminoácidos similares o idénticos. Las variantes pueden tener afinidades de unión iguales o diferentes, tanto mayores como menores, en comparación con un anticuerpo anti-LIGHT, pero aún son capaces de unirse específicamente a LIGHT, y pueden tener una actividad biológica igual, mayor o menor que el anticuerpo anti-LIGHT.

En el presente documento también se describen fragmentos de unión a antígeno de los agentes de unión anti-LIGHT, tales como anticuerpos. La expresión "dominio de unión a antígeno", "región de unión a antígeno", "fragmento de unión a antígeno" y expresiones similares se refieren a la porción de un anticuerpo que comprende los residuos de aminoácidos que interactúan con un antígeno y confieren al agente de unión su especificidad y su afinidad por el antígeno (por ejemplo, las regiones determinantes de la complementariedad (CDR)). La región de unión al antígeno puede derivarse de cualquier especie animal, tal como roedores (por ejemplo, conejo, rata o hámster) y seres humanos. En algunos aspectos descritos en el presente documento, la región de unión al antígeno será de origen humano. Los ejemplos no limitantes de fragmentos de unión a antígeno incluyen: fragmentos Fab,

fragmentos F(ab')2, fragmentos Fd, fragmentos Fv, moléculas Fv monocatenarias (scFv), fragmentos dAb y unidades de reconocimiento mínimas que consisten en los residuos de aminoácidos que imitan la región hipervariable del anticuerpo.

En algunos aspectos, los agentes de unión anti-LIGHT (o una variante de los mismos o un fragmento de unión a antígeno de los mismos) mejorarán, neutralizarán o inhibirán de otra forma la actividad biológica de LIGHT *in vivo* (por ejemplo, la producción o la secreción mediada por LIGHT de CCL20, IL-8 o RANTES a partir de una célula que expresa un receptor LIGHT, por ejemplo, HVEM, LTβR, y/o DcR3).

En algunos aspectos, los agentes de unión anti-LIGHT (o una variante de los mismos o un fragmento de unión a antígeno de los mismos) son agentes de unión antagonistas que mejoran, neutralizan o inhiben de otra forma la actividad biológica de LIGHT *in vivo* (por ejemplo, la producción mediada por LIGHT o la secreción de CCL20, IL-8 o RANTES a partir de células que expresan un ligando LIGHT, tal como un receptor LIGHT, (por ejemplo, HVEM, LTβR, y/o DcR3).

Según la invención, el agente de unión anti-LIGHT (o una variante del mismo o un fragmento de unión a antígeno del mismo) está presente en las formulaciones en una cantidad de 5 mg/ml a 280 mg/m, por ejemplo, de 5 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml, de aproximadamente 100 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml, de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml y de aproximadamente 100 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml. Por ejemplo, el agente de unión anti-LIGHT puede estar presente en la formulación en una cantidad de 5 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 15 mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 25 mg/ml, aproximadamente 30 mg/ml, aproximadamente 35 mg/ml, aproximadamente 40 mg/ml, aproximadamente 45 mg/ml, aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 55 mg/ml, aproximadamente 60 mg/ml, aproximadamente 65 mg/ml, aproximadamente 70 mg/ml ml, aproximadamente 75 mg/ml, aproximadamente 80 mg/ml, aproximadamente 85 mg/ml, aproximadamente 90 mg/ml, aproximadamente 95 mg/ml, aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 105 mg/ml, aproximadamente 110 mg/ml, aproximadamente 115 mg/ml, aproximadamente 120 mg/ml, aproximadamente 125 mg/ml, aproximadamente 130 mg/ml, aproximadamente 135 mg/ml, aproximadamente 140 mg/ml, aproximadamente 145 mg/ml, aproximadamente 150 mg/ml, aproximadamente 155 mg/ml, aproximadamente 160 mg/ml, aproximadamente 165 mg/ml, aproximadamente 170 mg/ml, aproximadamente 175 mg/ml, aproximadamente 180 mg/ml, aproximadamente 185 mg/ml, aproximadamente 190 mg/ml, aproximadamente 195 mg/ml ml, aproximadamente 200 mg/ml, aproximadamente 205 mg/ml, aproximadamente 210 mg/ml, aproximadamente 215 mg/ml, aproximadamente 220 mg/ml, aproximadamente 225 mg/ml, aproximadamente 230 mg/ml, aproximadamente 235 mg/ml, aproximadamente 240 mg/ml, aproximadamente 245 mg/ml, aproximadamente 250 mg/ml, aproximadamente 255 mg/ml, aproximadamente 260 mg/ml, aproximadamente 265 mg/ml, aproximadamente 270 mg/ml, aproximadamente 275 mg/ml, o 280 mg/ml.

En aspectos alternativos, el agente de unión anti-LIGHT puede estar presente en la formulación en una cantidad de 5 a aproximadamente 25 mg/ml, de aproximadamente 26 a aproximadamente 50 mg/ml, de aproximadamente 51 a aproximadamente 75 mg/ml, de aproximadamente 76 a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 101 a aproximadamente 125 mg/ml, de aproximadamente 126 a aproximadamente 150 mg/ml, de aproximadamente 151 a aproximadamente 175 mg/ml, de aproximadamente 176 a aproximadamente 200 mg/ml, de aproximadamente 201 mg/ml a aproximadamente 225 mg/ml, de aproximadamente 226 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml, de aproximadamente 251 a 280 mg/ml, de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 mg/ml, de aproximadamente 40 a aproximadamente 60 mg/ml, de aproximadamente 75 a aproximadamente 85 mg/ml, o de aproximadamente 140 a aproximadamente 160 mg/ml.

En determinados aspectos ejemplares descritos en el presente documento, el agente de unión anti-LIGHT está presente en la formulación en una cantidad de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 170 mg, de aproximadamente 100 mg/ml a aproximadamente 160 mg/ml, por ejemplo aproximadamente 150 mg/ml. Como alternativa, el agente de unión anti-LIGHT está presente en una cantidad de aproximadamente 50 mg/ml. En otro aspecto ejemplar, un anticuerpo IgG4 anti-LIGHT completamente humano que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 está presente en la formulación en una cantidad de aproximadamente 150 mg/ml.

ii. Agentes de unión anti-CXCR5, y variantes y fragmentos de los mismos

En determinados aspectos descritos en el presente documento, las formulaciones descritas en el presente documento incluyen un agente de unión anti-CXCR5. Los agentes de unión pueden ser cualquier molécula, tal como un anticuerpo, un ARNip, un ácido nucleico, un aptámero, una proteína o un compuesto orgánico de molécula pequeña, que se une o se une específicamente a CXCR5, o una variante o un fragmento de la misma. En algunos aspectos descritos en el presente documento, el agente de unión es un anticuerpo anti-CXCR5, o una variante del mismo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Los anticuerpos anti-CXCR5 se unen específicamente a una proteína, un fragmento de polipéptido o un epítope CXCL13 (también conocido como BLC). La molécula CXCR5 puede ser de cualquier especie. En algunos aspectos descritos en el presente documento, la molécula CXCR5 es de un ser humano, conocida en el presente documento como "hCXCR5". El hCXCR5 tiene la secuencia de aminoácidos

siguiente, que se identifica como SEQ ID NO: 14:

MNYPLTLEMD LENLEDLFWE LDRLDNYNDT SLVENHLCPA TEGPLMASFK AVFVPVAYSL
IFLLGVIGNV LVLVILERHR QTRSSTETFL FHLAVADLLL VFILPFAVAE GSVGWVLGTF
LCKTVIALHK VNFYCSSLLL ACIAVDRYLA IVHAVHAYRH RRLLSIHITC GTIWLVGFLL
ALPEILFAKV SQGHHNNSLP RCTFSQENQA ETHAWFTSRF LYHVAGFLLP MLVMGWCYVG
VVHRLRQAQR RPQRQKAVRV AILVTSIFFL CWSPYHIVIF LDTLARLKAV DNTCKLNGSL
PVAITMCEFL GLAHCCLNPM LYTFAGVKFR SDLSRLLTKL GCTGPASLCQ LFPSWRRSSL
SESENATSLT TF (**SEQ ID NO: 14**).

En determinados aspectos ejemplares descritos en el presente documento, el anticuerpo anti-CXCR5 es un anticuerpo humanizado, un anticuerpo completamente humano, o una variante del mismo o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-CXCR5 evitan la unión de CXCR5 con sus ligandos e inhiben la actividad biológica de CXCR5 (por ejemplo, la unión de CXCR5 a CXCL13).

En determinadas formas de realización específicas, el anticuerpo anti-CXCR5 comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de una o más de las siguientes regiones determinantes de la complementariedad (CDR):

HCDR1 - GFSLIDYGVN (**SEQ ID NO: 15**);

HCDR2 - VIWGDGTTY (**SEQ ID NO: 16**) o

HCDR3 - IVY (**SEQ ID NO: 17**).

En otras formas de realización específicas, el anticuerpo anti-CXCR5 comprende una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera o más de las siguientes regiones determinantes de la complementariedad (CDR):

LCDR1 - RSSKSLLHSSGKTYLY (**SEQ ID NO: 18**);

LCDR2 - RLSSLA (**SEQ ID NO: 19**) o

LCDR3 - MQHLEYPYT (**SEQ ID NO: 20**).

En una forma de realización específica, el anticuerpo anti-CXCR5 comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 15, 16 y 17.

En otra forma de realización específica, el anticuerpo anti-CXCR5 comprende una región variable de cadena ligera (VL) que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 18, 19 y 20.

En formas de realización más específicas, el anticuerpo anti-CXCR5 comprende una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 15, 16 y 17; y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 18, 19 y 20.

En un aspecto específico descrito en el presente documento, el anticuerpo anti-CXCR5 comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21:

QVQLKESGPG LVAPSESLSI TCTVSGFSLI DYGVNWIRQP PGKGLEWLGV IWGDGTTYYN
PSLKSRLSIS KDNSKSQVFL KVTSLTTDDT AMYYCARIVY WGQGTLVTVS A (**SEQ ID NO: 21**).

En otro aspecto específico descrito en el presente documento, el anticuerpo anti-CXCR5 comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22:

DIVMTQAAPS VAVTPGASVS ISCRSSKSLL HSSGKTYLYW FLQRPGQSPQ LLIYRLSSLA SGVPDRFSGS
GSGTAFTLRI SRVEAEDVGV YYCMQHLEYP YTFGGGTKLE IK (**SEQ ID NO: 22**).

En aspectos más específicos descritos en el presente documento, el anticuerpo anti-CXCR5 comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22.

En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CXCR5 comprende además una región constante, por ejemplo, una región constante de IgG humana. En algunas formas de realización, la región constante es una región constante de IgG4 humana. En formas de realización adicionales, la región constante es una región constante de IgG4 humana modificada. En algunas formas de realización, la región constante de IgG4 humana tiene las siguientes modificaciones: S241P (que se muestra a continuación en la SEQ ID NO: 23 en negrita), L248E (que se muestra a continuación en la SEQ ID NO: 23 en negrita), y la carencia de una lisina terminal a fin de evitar la heterogeneidad. En algunas formas de realización, la región constante de IgG4 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23:

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT

VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES KYGPPCP**P**CP APEF**E**GGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT

CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS

SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS

DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG (**SEQ ID NO: 23**).

En otras formas de realización, la región constante es una región constante de Cκ humana. En algunas formas de realización, la región constante de Cκ comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24:

RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG NSQESVTEQD SKDSTYSLSS

TLTLSKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK SFNRGEC (**SEQ ID NO: 24**).

En formas de realización específicas, el anticuerpo anti-CXCR5 comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25:

QVQLKESGPG LVAPSESLSI TCTVSGFSLI DYGVNWIRQP PGKGLEWLGV IWGDGTTYYN PSLKSRLSIS

KDNSKSQVFL KVTSLTTDDT AMYYCARIVY WGQGTLVTVS AASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV

KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTK TYTCNVDHKP SNTKVDKRVE

SKYGPPCP**P**C PAPEF**E**GGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT

KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT

KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH

EALHNHYTQK SLSLSLG (**SEQ ID NO: 25**).

Posiciones 1-111:	región variable de la cadena pesada (VH). Las CDR (regiones determinantes de la complementariedad, según la definición de Kabat) están subrayadas.
Posiciones 112-432:	región constante de IgG4 humana (SwissProt IGHG4_HUMAN, incluidas las siguientes modificaciones: S241P, L248E, y la carencia de una lisina terminal para evitar la heterogeneidad).

En otras formas de realización específicas, el anticuerpo anti-CXCR5 comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26:

DIVMTQAAPS VAVTPGASVS ISCRSSKSLL HSSGKTYLYW FLQRPGQSPQ LLIYRLSSLA SGVPDRFSGS

GSGTAFTLRI SRVEAEDVGV YYCMQHLEYP YTFGGGTKLE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL

LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV

TKSFNRGEC (**SEQ ID NO: 26**).

Posiciones 1-112:	Región variable de la cadena ligera (VL). Las CDR (regiones determinantes de la complementariedad, según la definición de Kabat) están subrayadas.
Posiciones 113-182:	región constante de Cκ humana.

En formas de realización adicionales, el anticuerpo anti-CXCR5 comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26.

En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CXCR5 comprende además una secuencia líder. La secuencia líder, en algunas formas de realización, comprende una secuencia de aminoácidos de 1-30 aminoácidos de longitud,

tal como 25-25 aminoácidos, y típicamente 19 aminoácidos. La cadena pesada, la cadena ligera o tanto la cadena pesada como la ligera pueden comprender una secuencia líder. En algunas formas de realización, la secuencia líder comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16: MGWSCIILFL VATATGVHS (**SEQ ID NO: 27**).

En aspectos específicos descritos en el presente documento, el anticuerpo anti-CXCR5 comprende una cadena pesada derivada de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28:

MGWSCIILFL VATATGVHSQ VQLKESGPGL VAPSESLSIT CTVSGFSLID YGVNWIRQPP GKGLEWLGVI
WGDGTTYYNP SLKSRLSISK DNSKSQVFLK VTSLTTDDTA MYYCARIVYW GQGTLVTVSA ASTKGPSVFP
LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT
YTCNVDHKPS NTKVDKRVES KYGPPCP**P**CP APEF**E**GGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED
PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK
GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSRL
TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG (**SEQ ID NO: 28**).

Posiciones 1-19:	secuencia líder
Posiciones 20-130:	región variable de la cadena pesada (VH). Las CDR (regiones determinantes de la complementariedad, según la definición de Kabat) están subrayadas.
Posiciones 131-456:	región constante de IgG4 humana (SwissProt IGHG4_HUMAN, incluidas las siguientes modificaciones: S241P, L248E, y la carencia de una lisina terminal para evitar la heterogeneidad).

En otros aspectos específicos descritos en el presente documento, el anticuerpo anti-CXCR5 comprende una cadena ligera derivada de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29:

MGWSCIILFL VATATGVHSD IVMTQAAPSV AVTPGASVSI SCRSSKSLLH SSGKTYLYWF LQRPGQSPQL
LIYRLSSLAS GVPDRFSGSG SGTAFTLRIS RVEAEDVGVY YCMQHLEYPY TFGGGTKLEI KRTVAAPSVF
IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLSKADY
EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC (**SEQ ID NO: 29**).

Posiciones 1-19:	secuencia líder
Posiciones 20-131:	región variable de la cadena ligera (VL). Las CDR (regiones determinantes de la complementariedad, según la definición de Kabat) están subrayadas.
Posiciones 132-238:	región constante de Cκ humana.

En aspectos adicionales descritos en el presente documento, el anticuerpo anti-CXCR5 comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29.

En algunos aspectos descritos en el presente documento, el anticuerpo anti-CXCR5 es un anticuerpo humanizado o completamente humano. Los ejemplos de isotipos de anticuerpos humanizados y completamente humanos incluyen IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CXCR5 es un anticuerpo IgG. Existen cuatro formas de IgG. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CXCR5 es un anticuerpo IgG4. En algunas formas de realización de la invención, el anticuerpo anti-CXCR5 es un anticuerpo IgG4 humanizado.

En algunas formas de realización de la invención, el anticuerpo anti-CXCR5 es un anticuerpo IgG4 anti-CXCR5 humanizado que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26 (El "Anticuerpo CXCR5 Inicial"). En aspectos alternativos descritos en el presente documento, el anticuerpo anti-CXCR5 es un anticuerpo IgG4 anti-CXCR5 humanizado que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en el que la región variable de cadena pesada comprende 3 regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 15, 16 y 17, y en el que la región variable de la cadena ligera comprende 3 CDR que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 18, 19 y 20. Se han descrito en detalle la identificación, el aislamiento, la preparación y la caracterización de anticuerpos anti-CXCR5, incluido el anticuerpo anti-CXCR5 que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 25 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 26, en la publicación PCT WO 2009/032661.

Determinadas formulaciones descritas en el presente documento también incluyen variantes de agentes de unión anti-CXCR5, tales como anticuerpos. Específicamente, las formulaciones descritas en el presente documento pueden incluir variantes del anticuerpo anti-CXCR5 que es un anticuerpo IgG4 anti-CXCR5 humanizado que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26. Las variantes de anticuerpos anti-CXCR5 pueden tener propiedades fisicoquímicas similares basadas en su alta similitud. Las variantes se definen como anticuerpos con una secuencia de aminoácidos que es al menos el 95%, al menos el 97%, por ejemplo, al menos el 98% o el 99% homóloga a un anticuerpo anti-CXCR5, y capaz de competir por la unión a un polipéptido CXCR5, un fragmento de polipéptido CXCR5 o un epítope CXCR5. En algunos aspectos descritos en el presente documento, las variantes mejorarán, neutralizarán o inhibirán de otra forma la actividad biológica de CXCR5 (por ejemplo, la unión de CXCL13 a CXCR5). La determinación de la competencia por la unión a la diana puede realizarse mediante procedimientos de rutina conocidos por los expertos en la técnica. En algunos aspectos, las variantes son anticuerpos humanos y, en algunos aspectos descritos en el presente documento, son moléculas de IgG4. En algunos aspectos, una variante es al menos el 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica en su secuencia de aminoácidos con el Anticuerpo Inicial. El término "variante" se refiere a un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos que está modificada mediante uno o más aminoácidos en comparación con las secuencias de aminoácidos del anticuerpo anti-CXCR5. La variante puede tener modificaciones de secuencia conservativas, que incluyen sustituciones, modificaciones, adiciones y deleciones de aminoácidos.

Los ejemplos de modificaciones incluyen, pero sin limitación, glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivación por grupos protectores/de bloqueo conocidos, escisión proteolítica y enlace a un ligando celular u otra proteína. Pueden introducirse modificaciones de aminoácidos mediante técnicas estándar conocidas en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio, clonación molecular, mutagénesis dirigida por oligonucleótidos y mutagénesis mediada por PCR aleatoria en el ácido nucleico que codifica los anticuerpos. Las sustituciones de aminoácidos conservativas incluyen aquellas en las que el residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene propiedades químicas o estructurales similares. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano). Será evidente para el experto que también pueden emplearse clasificaciones de familias de residuos de aminoácidos distintas de las utilizadas anteriormente. Además, una variante puede tener sustituciones de aminoácidos no conservativas, por ejemplo, el reemplazo de un aminoácido por un residuo de aminoácido que tiene diferentes propiedades estructurales o químicas. Las variaciones secundarias similares también pueden incluir deleciones o inserciones de aminoácidos, o ambas. La guía para determinar qué residuos de aminoácidos pueden sustituirse, modificarse, insertarse o eliminarse sin eliminar la actividad inmunológica se puede encontrar utilizando programas informáticos bien conocidos en la técnica. Se pueden usar algoritmos informáticos, tales como, entre otros, Gap o Bestfit, que son conocidos por los expertos en la técnica, para alinear óptimamente las secuencias de aminoácidos que se van a comparar y para definir residuos de aminoácidos similares o idénticos. Las variantes pueden tener afinidades de unión iguales o diferentes, tanto mayores como menores, en comparación con un anticuerpo anti-CXCR5, pero aún son capaces de unirse específicamente a CXCR5, y pueden tener una actividad biológica igual, mayor o menor que la del anticuerpo anti-CXCR5.

Los aspectos descritos en el presente documento también incluyen fragmentos de unión a antígeno de los agentes de unión anti-CXCR5, tales como anticuerpos. La expresión "dominio de unión a antígeno", "región de unión a antígeno", "fragmento de unión a antígeno" y expresiones similares se refieren a la porción de un anticuerpo que comprende los residuos de aminoácidos que interactúan con un antígeno y confieren al agente de unión su especificidad y su afinidad por el antígeno (por ejemplo, las regiones determinantes de la complementariedad (CDR)). La región de unión al antígeno puede derivarse de cualquier especie animal, tal como roedores (por ejemplo, conejo, rata o hámster) y seres humanos. En algunos aspectos, la región de unión al antígeno será de origen humano. Los ejemplos no limitantes de fragmentos de unión a antígeno incluyen: fragmentos Fab, fragmentos F(ab')2, fragmentos Fd, fragmentos Fv, moléculas Fv monocatenarias (scFv), fragmentos dAb y unidades de reconocimiento mínimas que consisten en los residuos de aminoácidos que imitan la región hipervariable del anticuerpo.

En algunas formas de realización de la invención, los agentes de unión anti-CXCR5 (o una variante de los mismos o un fragmento de unión a antígeno de los mismos) mejorarán, neutralizarán o inhibirán de otra forma la actividad biológica de CXCR5 *in vivo* (por ejemplo, la unión de CXCL13 a CXCR5).

En algunas formas de realización de la invención, los agentes de unión anti-CXCR5 (o una variante de los mismos o un fragmento de unión a antígeno de los mismos) son agentes de unión antagonistas que mejoran, neutralizan o inhiben de otra forma la actividad biológica de CXCR5 *in vivo (*por ejemplo, la unión de CXCL13 a CXCR5).

Según la invención, el agente de unión anti-CXCR5 (o una variante del mismo o un fragmento de unión a antígeno

del mismo) está presente en las formulaciones en una cantidad de 5 mg/ml a 280 mg/ml, por ejemplo, de 5 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, de 5 mg/ml a aproximadamente 125 mg/ml, de 5 mg/ml a aproximadamente 75 mg/ml, de 5 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml y de 5 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml. Por ejemplo, el agente de unión anti-CXCR5 puede estar presente en la formulación en una cantidad de 5 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 15 mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 25 mg/ml, aproximadamente 30 mg/ml, aproximadamente 35 mg/ml, aproximadamente 40 mg/ml, aproximadamente 45 mg/ml, aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 55 mg/ml, aproximadamente 60 mg/ml, aproximadamente 65 mg/ml, aproximadamente 70 mg/ml ml, aproximadamente 75 mg/ml, aproximadamente 80 mg/ml, aproximadamente 85 mg/ml, aproximadamente 90 mg/ml, aproximadamente 95 mg/ml, aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 105 mg/ml, aproximadamente 110 mg/ml, aproximadamente 115 mg/ml, aproximadamente 120 mg/ml, aproximadamente 125 mg/ml, aproximadamente 130 mg/ml, aproximadamente 135 mg/ml, aproximadamente 140 mg/ml, aproximadamente 145 mg/ml, aproximadamente 150 mg/ml, aproximadamente 155 mg/ml, aproximadamente 160 mg/ml, aproximadamente 165 mg/ml, aproximadamente 170 mg/ml, aproximadamente 175 mg/ml, aproximadamente 180 mg/ml, aproximadamente 185 mg/ml, aproximadamente 190 mg/ml, aproximadamente 195 mg/ml ml, aproximadamente 200 mg/ml, aproximadamente 205 mg/ml, aproximadamente 210 mg/ml, aproximadamente 215 mg/ml, aproximadamente 220 mg/ml, aproximadamente 225 mg/ml, aproximadamente 230 mg/ml, aproximadamente 235 mg/ml, aproximadamente 240 mg/ml, aproximadamente 245 mg/ml, aproximadamente 250 mg/ml, aproximadamente 255 mg/ml, aproximadamente 260 mg/ml, aproximadamente 265 mg/ml, aproximadamente 270 mg/ml, aproximadamente 275 mg/ml, o 280 mg/ml.

En formas de realización alternativas, el agente de unión anti-CXCR5 puede estar presente en la formulación en una cantidad de 5 a aproximadamente 25 mg/ml, de aproximadamente 26 a aproximadamente 50 mg/ml, de aproximadamente 51 a aproximadamente 75 mg/ml, de aproximadamente 76 a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 101 a aproximadamente 125 mg/ml, de aproximadamente 126 a aproximadamente 150 mg/ml, de aproximadamente 151 a aproximadamente 175 mg/ml, de aproximadamente 176 a aproximadamente 200 mg/ml, de aproximadamente 201 mg/ml a aproximadamente 225 mg/ml, de aproximadamente 226 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml, de aproximadamente 251 a 280 mg/ml, de 5 a aproximadamente 25 mg/ml, de aproximadamente 40 a aproximadamente 60 mg/ml, de aproximadamente 75 a aproximadamente 85 mg/ml, o de aproximadamente 90 a aproximadamente 110 mg/ml.

En determinadas formas de realización ejemplares, el agente de unión anti-CXCR5 está presente en la formulación en una cantidad de aproximadamente 20 mg/ml. Como alternativa, el agente de unión anti-CXCR5 está presente en una cantidad de aproximadamente 100 mg/ml. En otra forma de realización ejemplar, un anticuerpo IgG4 anti-CXCR5 humanizado que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26 está presente en la formulación en una cantidad de aproximadamente 20 mg/ml o 100 mg/ml.

iii. Agentes tampón

Las formulaciones de la invención comprenden un tampón de citrato como agente tampón. Un agente tampón mantiene un pH fisiológicamente adecuado. Además, un agente tampón mejora la isotonicidad y la estabilidad química de la formulación. El tampón de citrato está presente en las formulaciones a una concentración de 5 mM a 50 mM, por ejemplo, de 5 mM a aproximadamente 15 mM. Por ejemplo, el tampón citrato puede estar presente en la formulación a una concentración de aproximadamente 5 mM, aproximadamente 6 mM, aproximadamente 7 mM, aproximadamente 8 mM, aproximadamente 9 mM, aproximadamente 10 mM, aproximadamente 11 mM, aproximadamente 12 mM, aproximadamente 13 mM , aproximadamente 14 mM, aproximadamente 15 mM, aproximadamente 16 mM, aproximadamente 17 mM, aproximadamente 18 mM, aproximadamente 19 mM, aproximadamente 20 mM, aproximadamente 21 mM, aproximadamente 22 mM, aproximadamente 23 mM, aproximadamente 24 mM, aproximadamente 25 mM, aproximadamente 26 mM, aproximadamente 27 mM, aproximadamente 28 mM, aproximadamente 29 mM, aproximadamente 30 mM, aproximadamente 31 mM, aproximadamente 32 mM, aproximadamente 33 mM, aproximadamente 34 mM, aproximadamente 35 mM, aproximadamente 36 mM, aproximadamente 37 mM, aproximadamente 38 mM aproximadamente 39 mM, aproximadamente 40 mM, aproximadamente 41 mM, aproximadamente 42 mM, aproximadamente 43 mM, aproximadamente 44 mM, aproximadamente 45 mM, aproximadamente 46 mM, aproximadamente 47 mM, aproximadamente 48 mM, aproximadamente 49 mM y 50 mM. En algunas formas de realización, el tampón de citrato está presente en la formulación a una concentración de aproximadamente 7 mM a aproximadamente 13 mM, tal como de aproximadamente 9 mM a aproximadamente 11 mM. En algunas formas de realización, el tampón de citrato está presente en una concentración de aproximadamente 10 mM.

Las formulaciones de la invención tienen un pH igual o inferior al más pequeño de entre pH 6 y el punto isoeléctrico (pI) del anticuerpo, y el pH de las formulaciones varía de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,0. Por ejemplo, el pH de las formulaciones puede ser aproximadamente 5,0, aproximadamente 5,1, aproximadamente 5,2, aproximadamente 5,3, aproximadamente 5,4, aproximadamente 5,5, aproximadamente 5,6, aproximadamente 5,7, aproximadamente 5,8, aproximadamente 5,9 y aproximadamente 6,0. En algunas formas de realización, el pH de las formulaciones puede variar de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,0. En algunas formas de realización, el pH es aproximadamente 5,5 o aproximadamente 6,0. El pH de la formulación puede medirse por cualquier medio

conocido por los expertos en la técnica. Un medio para medir el pH es usar un medidor de pH con un microelectrodo. El pH de la formulación puede ajustarse utilizando cualquier medio conocido en la técnica. Algunos ejemplos de productos químicos para alterar el pH de las formulaciones son ácido clorhídrico (HCl) e hidróxido de sodio (NaOH).

El punto isoeléctrico es el pH al que una molécula o superficie particular no porta carga eléctrica neta. El pI de un agente de unión anti-LIGHT o anti-CXCR5 puede determinarse por cualquier medio conocido por los expertos en la técnica. En algunas formas de realización, el pI de un anticuerpo anti-LIGHT o anti-CXCR5 se determina mediante un enfoque isoeléctrico desnaturalizado. Tal como se muestra en la **figura 1**, el pI de un anticuerpo IgG4 anti-LIGHT completamente humano que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 es de 6,8-7,2. Tal como se muestra en la **figura 11**, el pI de un anticuerpo IgG4 anti-CXCR5 humanizado que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26 es de 7,6-8,4.

iv. Tensioactivos

Las formulaciones de la invención comprenden además un tensioactivo, que también se conoce como agente estabilizante. Los tensioactivos/agentes estabilizantes son compuestos químicos que interactúan y estabilizan moléculas biológicas y/o excipientes farmacéuticos generales en una formulación. En determinadas formas de realización, los tensioactivos se pueden usar junto con un almacenamiento a temperatura reducida. Los tensioactivos generalmente protegen el agente de unión de las tensiones inducidas por la interfaz aire/solución y las tensiones inducidas por la solución/superficie, que de otra forma pueden producir la agregación de proteínas. Los tensioactivos descritos en el presente documento pueden incluir, pero sin limitación, polisorbatos, glicerina, ácidos dicarboxílicos, ácido oxálico, ácido succínico, ácidos fumáricos, ácidos ftálicos y combinaciones de los mismos. Los expertos en la técnica son conscientes de que se pueden utilizar otros tensioactivos, por ejemplo detergentes no iónicos o iónicos, siempre que sean farmacéuticamente aceptables, es decir, adecuados para la administración a sujetos. El tensioactivo es, según la invención, un polisorbato. Los ejemplos de polisorbatos incluyen polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 65 y polisorbato 80.

En formas de realización ejemplares, el tensioactivo está presente en las formulaciones en una cantidad de aproximadamente el 0,001% a aproximadamente el 0,1% (p/v). Por ejemplo, el tensioactivo puede estar presente en las formulaciones en una cantidad de aproximadamente el 0,001% (p/v), aproximadamente el 0,002% (p/v), aproximadamente el 0,003% (p/v), aproximadamente el 0,004% (p/v) , aproximadamente el 0,005% (p/v), aproximadamente el 0,006% (p/v), aproximadamente el 0,007% (p/v), aproximadamente el 0,008% (p/v), aproximadamente el 0,009% (p/v), aproximadamente el 0,01% (p/v), aproximadamente el 0,02% (p/v), aproximadamente el 0,03% (p/v), aproximadamente el 0,04% (p/v), aproximadamente el 0,05% (p/v), aproximadamente el 0,06% (p/v), aproximadamente el 0,07% (p/v), aproximadamente el 0,08% (p/v), aproximadamente el 0,09% (p/v), y aproximadamente el 0,1% (p/v). En formas de realización particulares, el tensioactivo está presente en las formulaciones de aproximadamente el 0,003% a aproximadamente el 0,05% (p/v), de aproximadamente el 0,004% a aproximadamente el 0,025% (p/v), o de aproximadamente el 0,005% a aproximadamente el 0,02% (p/v)), por ejemplo aproximadamente el 0,005% (p/v). Por ejemplo, el polisorbato 20 puede estar presente en una cantidad de aproximadamente el 0,001% a aproximadamente el 0,1% (p/v), de aproximadamente el 0,002% a aproximadamente el 0,01% (p/v), de aproximadamente el 0,003% a aproximadamente el 0,008% (p/v) y de aproximadamente el 0,004% a aproximadamente el 0,006% (p/v), por ejemplo aproximadamente el 0,005% (p/v). En formas de realización alternativas, el polisorbato 20 está presente en una cantidad de aproximadamente el 0,001% a aproximadamente el 0,1% (p/v), de aproximadamente el 0,005% a aproximadamente el 0,05% (p/v) y de aproximadamente el 0,0075% a aproximadamente el 0,025% (p/v), por ejemplo de aproximadamente el 0,01% (p/v). En formas de realización alternativas adicionales, el polisorbato 20 está presente en una cantidad de aproximadamente el 0,001% a aproximadamente el 0,1% (p/v), de aproximadamente el 0,005% a aproximadamente el 0,05% (p/v) y de aproximadamente el 0,01% a aproximadamente el 0,03% (p/v), por ejemplo de aproximadamente el 0,02% (p/v).

v. Agentes de tonicidad

Las formulaciones de la invención pueden comprender, opcionalmente, además, un agente de tonicidad. Típicamente, los agentes de tonicidad se usan para ajustar o mantener la osmolalidad de las formulaciones a fin de acercarla a la presión osmótica de los fluidos corporales, tales como la sangre o el plasma. Los agentes de tonicidad también pueden mantener los niveles de agente de unión en una formulación. En parte, el agente de tonicidad contribuye a preservar el nivel, la tasa o la proporción del agente de unión terapéuticamente activo presente en la formulación. Tal como se usa en el presente documento, el término "tonicidad" se refiere al comportamiento de los componentes biológicos en un medio fluido o una solución fluida. Las soluciones isotónicas poseen la misma presión osmótica que el plasma sanguíneo y pueden infundirse por vía intravenosa a un sujeto sin cambiar la presión osmótica del plasma sanguíneo del sujeto. De hecho, en determinadas formas de realización de la invención, el agente de tonicidad está presente en una cantidad suficiente como para hacer que la formulación sea adecuada para infusión intravenosa. A menudo, el agente de tonicidad sirve también como agente de carga o como agente

estabilizador. Como tal, el agente de tonicidad puede permitir que el agente de unión supere varias tensiones, tales como la congelación y el cizallamiento. Los agentes de tonicidad pueden incluir, pero sin limitación, sacáridos, azúcares, glicerol, sorbitol, manitol, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de magnesio y otras sales inorgánicas. Los expertos en la técnica son conscientes de que se pueden utilizar otros agentes de tonicidad siempre que sean farmacéuticamente aceptables, es decir, adecuados para su administración a sujetos.

En determinadas formas de realización, el agente de tonicidad está presente en las formulaciones en una cantidad de aproximadamente el 0,1% al 10% (p/v). Por ejemplo, el agente de tonicidad puede estar presente en la formulación en una cantidad de aproximadamente el 0,1% (p/v), aproximadamente el 0,2% (p/v), aproximadamente el 0,3% (p/v), aproximadamente el 0,4% (p/v), aproximadamente el 0,5% (p/v), aproximadamente el 0,6% (p/v), aproximadamente el 0,7% (p/v), aproximadamente el 0,8% (p/v), aproximadamente el 0,9% (p/v), aproximadamente el 1% (p/v), aproximadamente el 2% (p/v), aproximadamente el 3% (p/v), aproximadamente el 4% (p/v), aproximadamente el 4,5% (p/v), aproximadamente el 5% (p/v) , aproximadamente el 5,5% (p/v), aproximadamente el 6% (p/v), aproximadamente el 7% (p/v), aproximadamente el 8% (p/v), aproximadamente el 9% (p/v) y aproximadamente el 10% (p/v). Como alternativa, el agente de tonicidad puede estar presente en la formulación en una cantidad de aproximadamente el 2% a aproximadamente el 8% (p/v), de aproximadamente el 3% a aproximadamente el 7% (p/v) y de aproximadamente el 4% a aproximadamente el 6% (p/v). En formas de realización alternativas adicionales, el agente de tonicidad puede estar presente en la formulación en una cantidad de aproximadamente el 0,1% a aproximadamente el 1%, de aproximadamente el 0,1% a aproximadamente el 0,5%, de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 0,3% y de aproximadamente el 0,2%.

En determinadas formas de realización ejemplares, el agente de tonicidad es un sacárido. Los ejemplos de sacáridos incluyen glucosa, sacarosa, maltosa, trehalosa, dextrosa, xilitol, fructosa y manitol. Por ejemplo, el manitol puede estar presente en una cantidad de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 10% (p/v), de aproximadamente el 2% a aproximadamente el 8% (p/v), o de aproximadamente el 3% a aproximadamente el 5% (p/v), por ejemplo aproximadamente el 4% (p/v). Como alternativa, la sacarosa puede estar presente en una cantidad de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 10% (p/v), de aproximadamente el 3% a aproximadamente el 8% (p/v), o de aproximadamente el 4% a aproximadamente el 6% (p/v), por ejemplo aproximadamente el 4,5, 5, 5,5 o 6% (p/v).

En determinadas otras formas de realización ejemplares, el agente de tonicidad es cloruro de sodio. Por ejemplo, el cloruro de sodio puede estar presente en una cantidad de aproximadamente el 0,1% (p/v), aproximadamente el 0,2% (p/v), aproximadamente el 0,3% (p/v), aproximadamente el 0,4% (p/v), aproximadamente el 0,5% (p/v), aproximadamente el 0,6% (p/v), aproximadamente el 0,7% (p/v), aproximadamente el 0,8% (p/v), aproximadamente el 0,9% (p/v) y aproximadamente el 1% (p/v). Alternativamente, el cloruro de sodio puede estar presente en la formulación en una cantidad de aproximadamente el 0,1% a aproximadamente el 1%, de aproximadamente el 0,1% a aproximadamente el 0,5%, de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 0,3% y de aproximadamente el 0,2%.

En formas de realización ejemplares adicionales, las formulaciones pueden comprender uno o más agentes de tonicidad. Por ejemplo, las formulaciones pueden comprender uno o más de los agentes de tonicidad anteriores en las concentraciones anteriores. En determinadas formas de realización específicas, las formulaciones pueden comprender sacarosa y cloruro de sodio, en las que cada una de las concentraciones de sacarosa y cloruro de sodio se encuentra entre aproximadamente el 0,1% y aproximadamente el 10% (p/v). En algunas formas de realización, la concentración de sacarosa es de aproximadamente el 6% y la concentración de cloruro de sodio es de aproximadamente el 0,2%. Como alternativa, la concentración de sacarosa es de aproximadamente el 4,5% y la concentración de cloruro de sodio es de aproximadamente el 0,2%.

En determinadas formas de realización de la invención, la osmolalidad de las formulaciones varía de aproximadamente 200 mOsm/kg a aproximadamente 350 mOsm/kg, de aproximadamente 270 mOsm/kg a aproximadamente 330 mOsm/kg, de aproximadamente 280 mOsm/kg a aproximadamente 320 mOsm/kg o de aproximadamente 290 mOsm/kg a aproximadamente 310 mOsm/kg, siendo, por ejemplo, de aproximadamente 300 mOsm/kg. En otras palabras, las formulaciones de la invención son, en algunas formas de realización, sustancialmente isotónicas, es decir, que tienen sustancialmente la misma presión osmótica que la sangre humana. La osmolalidad se puede medir por cualquier medio conocido por los expertos en la técnica, tales como utilizando osmómetros de tipo presión de vapor o congelación de hielo. La osmolalidad de las formulaciones de la invención puede estar regulada, por ejemplo, por uno o más agentes de tonicidad descritos en el presente documento.

vi. Aminoácidos

Las formulaciones de la invención pueden comprender, opcionalmente, además, un aminoácido. Los ejemplos de aminoácidos incluyen, pero sin limitación, glicina, alanina, ácido aspártico, lisina, serina, tirosina, cisteína, glutamina, metionina, arginina y prolina. En formas de realización ejemplares, el aminoácido está presente en las formulaciones en una cantidad de aproximadamente el 0,1% al 5% (p/v). Por ejemplo, el aminoácido puede estar presente en la formulación en una cantidad de aproximadamente el 0,1% (p/v), aproximadamente el 0,2% (p/v), aproximadamente el 0,3% (p/v), aproximadamente el 0,4% (p/v), aproximadamente el 0,5% (p/v), aproximadamente el 0,6% (p/v),

aproximadamente el 0,7% (p/v), aproximadamente el 0,8% (p/v), aproximadamente el 0,9% (p/v), aproximadamente el 1,0% (p/v), aproximadamente el 1,1% (p/v), aproximadamente el 1,2% (p/v), aproximadamente el 1,3% (p/v), aproximadamente el 1,4% (p/v), aproximadamente el 1,5% (p/v), aproximadamente el 1,6% (p/v), aproximadamente el 1,7% (p/v), aproximadamente el 1,8% (p/v), aproximadamente el 1,9% (p/v), aproximadamente el 2,0% (p/v), aproximadamente el 3% (p/v), aproximadamente el 4% (p/v) y aproximadamente el 5% (p/v). Como alternativa, el aminoácido está presente en la formulación en una cantidad de aproximadamente el 1,3% a aproximadamente el 1,8% (p/v), o de aproximadamente el 1,4% a aproximadamente el 1,6% (p/v), por ejemplo de aproximadamente el 1,5% (p/v). En formas de realización alternativas adicionales, el aminoácido está presente en la formulación en una cantidad de aproximadamente el 0,5% a aproximadamente el 1,5% (p/v), o de aproximadamente el 0,8% a aproximadamente el 1,2% (p/v), por ejemplo de aproximadamente el 1,0% (p/v). Un aminoácido ejemplar es la prolina o la arginina. Por ejemplo, la prolina puede estar presente en la formulación en una cantidad de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 2% (p/v), de aproximadamente el 1,3% a aproximadamente el 1,8% (p/v), de aproximadamente el 1,4% a aproximadamente el 1,6% (p/v), por ejemplo de aproximadamente el 1,5% (p/v). Como alternativa, la arginina puede estar presente en la formulación en una cantidad de aproximadamente el 0,5% a aproximadamente el 1,5% (p/v), o de aproximadamente el 0,8% a aproximadamente el 1,2% (p/v), por ejemplo de aproximadamente el 1,0% (p/v).

vii Otros excipientes

Además, las formulaciones de la invención pueden comprender otros excipientes que incluyen, pero sin limitación, agua para inyección, diluyentes, agentes solubilizantes, agentes calmantes, tampones adicionales, sales inorgánicas u orgánicas, antioxidantes o similares. En algunas formas de realización, sin embargo, las formulaciones de la invención no comprenden otros excipientes, excepto los descritos anteriormente. Otros vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables, como los descritos en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980) pueden incluirse en la formulación siempre que no afecten adversamente a las características deseadas de la formulación. En una forma de realización particular, la formulación está sustancialmente exenta de conservantes, aunque, en formas de realización alternativas, se pueden añadir conservantes según sea necesario. Por ejemplo, pueden incluirse crioprotectores o lioprotectores en formulaciones liofilizadas.

viii. Formulaciones líquidas o liofilizadas.

Las formulaciones de la invención pueden ser formulaciones líquidas o formulaciones liofilizadas. En algunas formas de realización, las formulaciones son formulaciones líquidas. En algunas formas de realización, las formulaciones líquidas están listas para inyección. Como alternativa, las formulaciones pueden ser polvos liofilizados. En algunas formas de realización, los polvos liofilizados están listos para combinarse con un disolvente justo antes de la administración.

ix Formulaciones ejemplares

En un aspecto ejemplar descrito en el presente documento, la memoria descriptiva divulga una formulación de anticuerpos líquida estable adecuada para administración subcutánea, comprendiendo la formulación:

a) más de aproximadamente 80 mg/ml, por ejemplo, aproximadamente 150 mg/ml, de un anticuerpo IgG4 anti-LIGHT (tipo linfotoxina, muestra una expresión inducible y compite con la glicoproteína D del VHS por un HVEM, un receptor expresado por linfocitos T) completamente humano que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8;

b) aproximadamente 10 mM de tampón citrato;

c) aproximadamente el 0,005% (p/v) de polisorbato 20 y

d) aproximadamente el 4% (p/v) de manitol;

siendo el pH de la formulación aproximadamente pH 5,5.

En determinados aspectos ejemplares, esta formulación puede ser producirse:

a) disolviendo aproximadamente 10 mM de citrato de sodio dihidratado en agua para inyección y ajustando el pH de la solución tamponada a aproximadamente pH 5,5, por ejemplo, utilizando ácido clorhídrico o hidróxido de sodio;

b) añadiendo más de aproximadamente 80 mg/ml, por ejemplo, aproximadamente 150 mg/ml, de un anticuerpo IgG4 anti-LIGHT (tipo linfotoxina, mustra una expresión inducible y compite con la glicoproteína D del VHS por un HVEM, un receptor expresado por linfocitos T) completamente humano que comprende una cadena pesada que

comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8, aproximadamente el 4% (p/v) de manitol y el 0,005% (p/v) de polisorbato 20 a la solución tamponada de la etapa a) mientras se agita en un recipiente fabricado de material inerte hasta que esté completamente disuelto, y ajustando después el pH de la formulación resultante a aproximadamente pH 5,5 utilizando ácido clorhídrico o hidróxido de sodio, y añadiendo después solución tamponada de la etapa a) para ajustar el peso final de la formulación resultante;

c) filtrando la formulación de la etapa b) en condiciones asépticas utilizando un filtro de membrana compatible esterilizado que tenga un tamaño de poro nominal de 0,2 µm, y esterilizando después la formulación por filtración en condiciones asépticas en recipientes esterilizados fabricados de material inerte utilizando un filtro de membrana compatible esterilizado que tenga un tamaño de poro nominal de 0,2 µm;

d) rellenando con la formulación de la etapa c) en condiciones asépticas viales esterilizados que se cierran con tapones y tapas abatibles con una brida; y, opcionalmente,

e) inspeccionando los recipientes de la etapa d) para detectar contaminantes gruesos, que el sellado esté intacto y partículas visibles.

En otro aspecto ejemplar, la memoria descriptiva divulga una formulación de anticuerpo líquida estable adecuada para administración intravenosa, comprendiendo la formulación:

a) de 5 a aproximadamente 80 mg/ml, por ejemplo, aproximadamente 50 mg/ml, de un anticuerpo IgG4 anti-LIGHT (tipo linfotoxina, muestra una expresión inducible y compite con la glicoproteína D del VHS por un HVEM, un receptor expresado por linfocitos T) completamente humano que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8;

b) aproximadamente 10 mM de tampón citrato y

c) aproximadamente el 0,01% (p/v) de polisorbato 20;

siendo el pH de la formulación aproximadamente pH 5,5.

En un aspecto ejemplar alternativo, la memoria descriptiva divulga una formulación de anticuerpo liofilizada estable adecuada para administración intravenosa, comprendiendo la formulación:

a) de 5 a aproximadamente 80 mg/ml, por ejemplo, aproximadamente 50 mg/ml, de un anticuerpo IgG4 anti-LIGHT (tipo linfotoxina, muestra una expresión inducible y compite con la glicoproteína D del VHS por un HVEM, un receptor expresado por linfocitos T) completamente humano que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8;

b) aproximadamente 10 mM de tampón citrato;

c) aproximadamente el 0,01% (p/v) de polisorbato 20;

d) aproximadamente el 5% (p/v) de sacarosa y

e) aproximadamente el 1,5% (p/v) de prolina;

siendo el pH de la formulación aproximadamente pH 5,5.

En una forma de realización ejemplar de la invención, la invención proporciona una formulación de anticuerpo estable que comprende:

a) 20 mg/ml de un anticuerpo IgG4 anti-CXCR5 (receptor de quimiocina CXC tipo 5) humanizado que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26;

b) 10 mM de tampón de citrato;

c) el 0,02% de polisorbato 20;

d) el 6% de sacarosa y

e) el 0,2% de cloruro de sodio;

siendo el pH de la formulación pH 6,0.

En una forma de realización ejemplar alternativa de la invención, la invención proporciona una formulación de anticuerpo estable que comprende:

a) 100 mg/ml de un anticuerpo IgG4 anti-CXCR5 (receptor de quimiocina CXC tipo 5) humanizado que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26;

b) 10 mM de tampón de citrato;

c) el 0,01% de polisorbato 20;

d) el 4,5% de sacarosa;

e) el 0,2% de cloruro de sodio y

f) el 1% de arginina;

siendo el pH de la formulación pH 6,0.

X. Estabilidad

Las formulaciones descritas en el presente documento son estables a 5 ºC durante al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses o más, y típicamente al menos aproximadamente 12, 18 o 24 meses o más. En formas de realización ejemplares, son estables a 5 ºC durante al menos aproximadamente 6 meses o más. En otras formas de realización ejemplares, son estables a 5 ºC durante al menos aproximadamente 9 meses. En formas de realización ejemplares adicionales, son estables a 5ºC durante al menos aproximadamente 1 año o más, y típicamente aproximadamente 2 años.

C. Modos de administración

En determinadas formas de realización de la invención, las formulaciones son adecuadas para administración parenteral, intravenosa, intramuscular, intradérmica, subcutánea o una combinación de las mismas. Las formulaciones de la invención son adecuadas para la administración por medio de una diversidad de técnicas.

En algunas formas de realización de la invención, la formulación se administra por vía intravenosa. Por ejemplo, es deseable que las formulaciones que contienen 80 mg/ml de agente de unión IgG4, tal como un anticuerpo, o menos se administren por vía intravenosa. Por lo tanto, las formulaciones son típicamente estériles. Los procedimientos para producir formulaciones estériles son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, filtración a través de membranas de filtración estériles o esterilización en autoclave de los ingredientes de la formulación, con la excepción de los anticuerpos, a aproximadamente 120 ºC durante aproximadamente 30 minutos. Por ejemplo, la memoria descriptiva divulga una formulación de anticuerpo líquida estable adecuada para administración intravenosa, comprendiendo la formulación: a) de 5 a aproximadamente 80 mg/ml, por ejemplo, aproximadamente 50 mg/ml, de un anticuerpo IgG4 anti-LIGHT (tipo linfotoxina, muestra una expresión inducible y compite con la glicoproteína D del VHS por un HVEM, un receptor expresado por linfocitos T) completamente humano que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8; b) aproximadamente 10 mM de tampón citrato y c) aproximadamente el 0,01% (p/v) de polisorbato 20; siendo el pH de la formulación aproximadamente pH 5,5. Como alternativa, la invención proporciona una formulación de anticuerpo estable que comprende: a) aproximadamente 20 mg/ml de un anticuerpo IgG4 anti-CXCR5 (receptor de quimiocina CXC tipo 5) humanizado que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26; b) aproximadamente 10 mM de tampón citrato; c) aproximadamente el 0,02% de polisorbato 20; d) aproximadamente el 6% de sacarosa y e) aproximadamente el 0,2% de cloruro de sodio; siendo el pH de la formulación aproximadamente pH 6,0.

En algunas formas de realización de la invención, la formulación se administra por vía subcutánea. Por ejemplo, es deseable que las formulaciones que contienen más de 80 mg/ml de agente de unión a IgG4, tal como un anticuerpo, se administren por vía subcutánea. En una forma de realización específica, es deseable administrar por vía subcutánea a sujetos una formulación de anticuerpo líquida estable que comprende: a) aproximadamente 150 mg/ml de un anticuerpo IgG4 anti-LIGHT (tipo linfotoxina, muestra una expresión inducible y compite con la glicoproteína D del VHS por un HVEM, un receptor expresado por linfocitos T) completamente humano que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8; b) aproximadamente 10 mM de tampón citrato; c) aproximadamente el 0,005% (p/v) de polisorbato 20; d) aproximadamente el 4% (p/v) de manitol; siendo el pH de la formulación

aproximadamente pH 5,5. Como alternativa, la invención proporciona una formulación de anticuerpo estable que comprende: a) aproximadamente 100 mg/ml de un anticuerpo IgG4 anti-CXCR5 (receptor de quimiocina CXC tipo 5) humanizado que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26; b) aproximadamente 10 mM de tampón citrato; c) aproximadamente el 0,01% de polisorbato 20; d) aproximadamente el 4,5% de sacarosa; e) aproximadamente el 0,2% de cloruro de sodio y f) aproximadamente el 1% de arginina; siendo el pH de la formulación aproximadamente pH 6,0.

D. Dosis y formas de dosificacion

Las dosis eficaces de las formulaciones de la invención varían en función de muchos factores diferentes, incluidos el medio de administración, el sitio diana, el estado fisiológico del sujeto, si el sujeto es un ser humano o un animal, otros medicamentos administrados y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Habitualmente, el sujeto es un ser humano, pero también pueden tratarse mamíferos no humanos, incluidos mamíferos transgénicos. Puede ser necesario valorar las dosis de tratamiento para optimizar la seguridad y la eficacia.

Las formulaciones de la invención se pueden administrar en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosis individuales pueden ser diarios, semanales, quincenales, mensuales o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares. En algunos procedimientos, la dosis se ajusta para lograr una determinada concentración de agente de unión en el plasma, tal como un anticuerpo. La dosis y la frecuencia variarán en función de la semivida del agente de unión anti-LIGHT o anti-CXCR5, tal como un anticuerpo, en el sujeto. En general, los anticuerpos humanos muestran la semivida más larga, seguidos de los anticuerpos humanizados, los anticuerpos quiméricos y los anticuerpos no humanos.

En formas de realización adicionales, la invención proporciona una forma de dosificación farmacéutica unitaria que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una formulación de la invención para el tratamiento de una o más enfermedades en un sujeto mediante la administración de la forma de dosificación al sujeto. En algunas formas de realización, el sujeto es un ser humano. El ser humano puede ser un adulto o puede ser un niño de pecho. El término "forma farmacéutica de dosificación unitaria" se refiere a una unidad físicamente discreta adecuada como dosis unitarias para los sujetos que se van a tratar, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico/profiláctico deseado en asociación con el tampón de citrato requerido y el pH.

La forma de dosificación unitaria puede ser un recipiente que comprende la formulación. Los recipientes adecuados incluyen, pero sin limitación, ampollas selladas, viales, frascos, jeringas y tubos de ensayo. Los recipientes pueden estar formados por una diversidad de materiales, tales como vidrio o plástico, y pueden tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). En algunas formas de realización, el recipiente es un vial. Generalmente, el envase debe mantener la esterilidad y la estabilidad de la formulación.

En formas de realización específicas, las formulaciones se envasan en viales de 2 ml que están fabricados de vidrio de tipo I transparente incoloro, y se cierran con un tapón (bromobutilo recubierto con fluoropolímero) sellado con tapas abatibles con brida (polipropileno). Los viales, en algunas formas de realización, se rellenan con 1,2 ml de las formulaciones, de forma que el vial tenga un volumen de sobrellenado de aproximadamente 0,2 ml por vial y un volumen extraíble de 1,0 ml. Por ejemplo, esto significa que la fuerza de dosificación del anticuerpo anti-LIGHT (por ejemplo, 150 mg/ml) estará contenida dentro de 1 ml de solución.

En una forma de realización específica, las formulaciones se empaquetan de forma secundaria en un recipiente, tal como una caja de cartón, que protege los viales de la luz.

E. Procedimientos de tratamiento

En el presente documento se proporcionan además procedimientos para tratar una enfermedad o trastorno mediado por LIGHT, comprendiendo los procedimientos administrar una formulación de la invención a un sujeto. La memoria descriptiva describe además una formulación de la invención para su uso en un procedimiento descrito en el presente documento para tratar una enfermedad o trastorno mediado por LIGHT. En determinados aspectos descritos en el presente documento, la enfermedad mediada por LIGHT es una enfermedad intestinal crónica o una enfermedad inflamatoria intestinal (EII), tal como la enfermedad de Crohn (CD) o colitis ulcerosa (UC). En otros aspectos descritos en el presente documento, la enfermedad mediada por LIGHT es la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD).

En el presente documento también se proporcionan procedimientos para tratar una enfermedad o trastorno mediado por CXCR5, comprendiendo los procedimientos administrar una formulación de la invención a un sujeto. La memoria descriptiva describe además una formulación de la invención para su uso en un procedimiento descrito en el presente documento para tratar una enfermedad o trastorno mediado por CXCR-5. En determinados aspectos, el agente de unión anti-CXCR5 se usa para la reducción de signos y síntomas, la inhibición de la progresión del daño

estructural, la inducción de una respuesta clínica principal y la prevención de discapacidad en pacientes adultos con artritis reumatoide (AR) activa de forma moderada a grave que hayan tenido una respuesta inadecuada a uno o más fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARD), tales como el metotrexato (MTX) o los antagonistas del TNFα. El agente de unión anti-CXCR5 se puede utilizar en combinación con DMARD o agonistas anti-TNFα.

En determinadas formas de realización, las formulaciones de la invención pueden administrarse en combinación con una o más terapias (por ejemplo, terapias que no son las formulaciones de la invención que se administran actualmente para prevenir, tratar, gestionar y/o mejorar una enfermedad mediada por LIGHT o una enfermedad mediada por CXCR5. El uso de la expresión "en combinación" no restringe el orden en que se administran las terapias a un sujeto. Una primera terapia puede administrarse antes (por ejemplo, 1 minuto, 45 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas), simultáneamente o después (por ejemplo, 1 minuto, 45 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas) de la administración de una segunda terapia a un sujeto que ha padecido, padece o es susceptible de padecer a una enfermedad mediada por LIGHT o una enfermedad mediada por CXCR5. Cualquier terapia adicional se puede administrar en cualquier orden con las otras terapias adicionales. Los ejemplos no limitantes de terapias que pueden administrarse en combinación con un anticuerpo de la invención incluyen los agentes antiinflamatorios aprobados enumerados en la Farmacopea de los EE. UU. y/o la Physician's Desk Reference.

F. Kits

Determinados aspectos descritos en el presente documento incluyen un kit que comprende una formulación tal como se describe en el presente documento. El kit puede comprender además uno o más recipientes que comprenden excipientes farmacéuticamente aceptables, e incluir otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, que incluyen filtros, agujas y jeringas. Asociadas con los kits se pueden incluir instrucciones que se incluyen habitualmente en paquetes comerciales de productos terapéuticos, profilácticos o de diagnóstico, que contienen información sobre, por ejemplo, las indicaciones, el uso, la dosificación, la fabricación, la administración, contraindicaciones y/o advertencias sobre el uso de dichos productos terapéuticos, profilácticos o de diagnóstico. El kit también puede asociarse con una etiqueta que puede ser cualquier tipo de soporte de datos (por ejemplo, un folleto, una etiqueta, un chip, un texto impreso o un código de barras) que incluye información. En determinados aspectos descritos en el presente documento, las instrucciones, etc., tal como se enumeran anteriormente puede incluirse en o sobre la etiqueta. El kit puede comprender además un dispositivo para la administración de la formulación, y particularmente un dispositivo que contiene la formulación, es decir, un dispositivo precargado tal como, por ejemplo, una jeringa precargada o un autoinyector precargado. El kit también puede comprender un recipiente que comprende la formulación, es decir, un recipiente precargado, tal como un vial, un cartucho, un sobre o una ampolla precargados.

G. Combinación de diferentes formas de realización.

En el contexto de la presente invención, cualquiera de las formas de realización descritas en el presente documento puede combinarse con una o más de las otras formas de realización descritas en el presente documento, a menos que se indique explícitamente lo contrario. En particular, cualquiera de los agentes de unión y los anticuerpos descritos en el presente documento y las formulaciones de los mismos descritas en el presente documento se puede utilizar en combinación con cualquiera de los kits, dispositivos precargados o recipientes precargados, o se pueden usar en los procedimientos de tratamiento o usos médicos tal como se describen en el presente documento en relación con el anticuerpo respectivo (por ejemplo, las formulaciones estables que comprenden los anticuerpos anti-LIGHT o los anticuerpos anti-CXCR5 se pueden combinar con cualquiera de los kits, recipientes o dispositivos descritos en el presente documento). Cualquiera de los agentes de unión descritos en el presente documento que se unen específicamente a un antígeno (por ejemplo, un agente de unión que se une específicamente a LIGHT o un agente de unión que se une específicamente a CXCR5) también se puede usar en cualquiera de los procedimientos de tratamiento que se describen en el presente documento en relación con los respectivos anticuerpos (es decir, anti-LIGHT o anti-CXCR5) y viceversa.

EJEMPLOS

Para ayudar a ilustrar la invención, se proporcionan los siguientes ejemplos. Los ejemplos no pretenden limitar el alcance de la invención de ninguna manera. En general, la práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de formulación farmacéutica, química, biología molecular, tecnología de ADN recombinante, inmunología tal como tecnología de anticuerpos y técnicas estándar de preparación de polipéptidos tales como las descritas, por ejemplo, por Sambrook, Fritsch y Maniatis, Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Biology), volumen 51, Ed.: Paul S., Humana Press (1996); Antibody Engineering: A Practical Approach (Practical Approach Series, 169), Eds.: McCafferty J. *et al.*, Humana Press (1996); Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow y Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999); y Current Protocols in Molecular Biology, Eds. Ausubel *et al.*, John Wiley & Sons (1992).

Anti-LIGHT

Un anticuerpo IgG4 anti-LIGHT completamente humano que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 (el "anticuerpo LIGHT Inicial") se usó en los ejemplos 1-9 para determinar las condiciones óptimas de formulación.

Materiales

Lote de sustancias farmacológicas

El Anticuerpo Inicial, formulado en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a una concentración de 5,5 mg/ml y a un pH de 7,3 (la "Formulación original", la "Formulación de PBS" o el "Lote de referencia") se utilizó en los ejemplos siguientes.

Excipientes

La Tabla 1 muestra los excipientes que se usaron en los siguientes ejemplos, que se eligieron según su aceptabilidad/idoneidad para su uso en productos de administración parenteral.

Tabla 1 - Excipientes utilizados en este estudio.

Excipientes	Art Nº/carga	Proveedor
Arginina	1.01587	Merck
Ácido cítrico	100241	Merck
HCl	114027	Merck
Acetato de sodio	1.06265	Merck
Cloruro de sodio	10158	Riedel de Haen
Hidróxido de sodio	114076	Merck
Citrato de sodio	114196	Boehringer Ingelheim KG
Polisorbato 20	139850	Fluka
Trehalosa-dihidrato	T9531	Sigma-Aldrich

Procedimientos

Los siguientes procedimientos se utilizaron para fabricar las formulaciones experimentales y las formulaciones que contienen el Anticuerpo LIGHT Inicial.

Fabricación y composición de tampones.

Todos los tampones se fabricaron con agitación para disolver los excipientes respectivos. El pH se ajustó utilizando HCl 0,1 M o NaOH 0,1 M. La concentración general de todos los tampones fue de 10 mM.

Fabricación y composición de soluciones madre de excipientes.

Todas las soluciones madre se fabricaron con agitación para disolver los excipientes. La concentración se proporcionó como peso/peso (p/p).

Filtración estéril de muestras

Todas las muestras, soluciones, tampones, etc., se filtraron (0,22 µm) de forma estéril utilizando una membrana Sartopore-2. Las muestras se filtraron vertiéndolas en frascos o viales esterilizados, que se cerraron en condiciones asépticas dentro de una mesa de trabajo limpia para evitar la contaminación microbiológica.

Ensayo de estrés mecanico

El estrés mecánico con una velocidad de agitación de 350 rpm durante 2,5 horas a temperatura ambiente se realizó utilizando un aparato de agitación de laboratorio horizontal con una distancia de 26 mm (aparato de agitación y campana de incubación de Bühler Company). Los viales 2R se llenaron con 1 ml de solución con un espacio de cabeza de aproximadamente 2,5 ml. El ensayo de estrés mecánico se planificó y se realizó durante los primeros

estudios de preformulación y durante estudios relevantes para la selección de tensioactivo.

Ensayo de estrés termico

El estrés térmico se utilizó como ensayo de estrés durante todas las etapas del programa de preformulación. Las muestras se almacenaron a +40 ºC durante 24 horas o 7 días, dependiendo del estudio.

Procedimientos analíticos en relleno de formulación y acabado

Los siguientes procedimientos analíticos se utilizaron en el relleno de la formulación y el acabado en los siguientes ejemplos.

Apariencia

La apariencia de las soluciones de anticuerpos se verificó visualmente y, adicionalmente, se documentó tomando una fotografía con una cámara digital.

pH

Todas las mediciones de pH se realizaron utilizando un medidor de pH con un microelectrodo.

Concentración utilizando UV

Las concentraciones de proteína de todas las soluciones de anticuerpos se midieron frente al tampón utilizando un NanoDrop ND1000. Las concentraciones de proteínas cercanas o inferiores a 5 mg/ml se diluyeron 1:3, mientras que las concentraciones más elevadas de proteínas cercanas a 20 mg/ml se diluyeron 1:20, y la absorción se midió a 215 nm y 280 nm.

Dispersión dinámica de la luz (DLS)

El diámetro hidrodinámico de la molécula se midió usando dispersión de luz láser. Las muestras se filtraron de forma estéril antes de la analítica si se observaba turbidez, por lo que solo se pudieron detectar agregados solubles.

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Se examinaron partes alícuotas de la mayor parte de las muestras de preformulación mediante DSC utilizando un VPCapillary DSC de Microcal y se analizador en el automuestreador a 90 ºC/hora con un tiempo de filtro de 2 segundos. Se dispusieron muestras de 400 µl en placas de 96 pocillos y se analizaron para determinar la temperatura de desplegamiento Tm.

Osmolaridad

La osmolaridad se midió utilizando un osmómetro Knaur automatizado.

Densidad

La densidad de las formulaciones se midió utilizando un viscosímetro de esfera descendente DMA4500 Anton Paar.

Procedimientos analíticos en bioanalítica FF

Los siguientes procedimientos analíticos se utilizaron en el relleno y acabado bioanalíticos en los siguientes ejemplos.

Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)

Los agregados, así como los productos de degradación del Anticuerpo Inicial, se cuantificaron utilizando cromatografía GL de exclusión por tamaño. El ensayo se llevó a cabo mediante HPLC isocrática con una columna SUPERDEX 200 10/300.

SDS-PAGE reductor y no reductor

Se usó electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) para analizar la integridad molecular (por ejemplo, medias moléculas) y la pureza. Este análisis electroforético se realizó con geles en gradiente del 4-12% en condiciones reductoras y no reductoras. Las proteínas se visualizaron con tinción de Coomassie después de la separación electroforética.

Intercambio de cationes débil (WCX)

Se utilizó cromatografía de intercambio catiónico débil para supervisar la heterogeneidad de carga del anticuerpo. Se informó de los porcentajes de isoformas básicas, neutras y ácidas. El ensayo se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) discontinua con una columna ProPac WCX10.

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima de antígeno (ELISA de antígeno)

El ELISA de antígeno se realizó para determinar la funcionalidad del anticuerpo. Las propiedades de unión a la proteína LIGHT nativa se supervisaron en comparación con el patrón actual del anticuerpo. Esta potencia fue comunicó como la EC_{50} relativa.

Enfoque isoeléctrico (IEF)

Se realizó un IEF. El patrón isoeléctrico era específico para el Anticuerpo Inicial y sirvió como ensayo de identificación. La degradación se puede observar mediante un patrón de carga diferente.

Almacenamiento

Todas las soluciones tampón, soluciones de excipientes y muestras se almacenaron a 5 ºC (± 3 ºC), si no se indica lo contrario.

RESUMEN DE TODAS LAS FORMULACIONES PREPARADAS Y ANALIZADAS

La Tabla 2 siguiente muestra un resumen de todas las formulaciones que se prepararon y analizaron en los ejemplos siguientes. Cada una de las formulaciones contenía el Anticuerpo LIGHT Inicial en la concentración indicada.

Tabla 2 - Resumen de todas las formulaciones preparadas y analizadas

Numero de muestra	Tampón	pH	Concentración	Comentario
Formulación 1.1	Citrato 10 mM	5,0	5,5 mg/ml	
Formulación 1.2	Citrato 10 mM	5,5	5,5 mg/ml	
Formulación 1.3	Citrato 10 mM	6,0	5,5 mg/ml	
Formulación 2	PBS	7,3	<80 5 mg/ml	Muy turbia
	Citrato 10 mM	5,0		
Formulación 3.1	PS20 al 0,01%		5 mg/ml	
	Citrato 10 mM	5,5		
Formulación 3.2	PS20 al 0,01%		5 mg/ml	
	Citrato 10 mM	5,5		
Formulación 4	PS20 al 0,01%		80 mg/ml	Transparente
	Citrato 10 mM	5,0		
Formulación 5	PS20 al 0,01%		5 mg/ml	
	Citrato 10 mM	5,5		
	PS20 al 0,01%			
	Prolina al 1,5%			
Formulación 6.1	Sacarosa al 5%		50 mg/ml	Lyo
	Citrato 10 mM	5,5		
	PS20 al 0,01%			
Formulación 6,2	Sacarosa al 5%		50 mg/ml	Lyo
Formulación 7	Histidina 10 mM	5,5	50 mg/ml	
	Histidina 10 mM	5,5		

Numero de muestra	Tampón	pH	Concentración	Comentario
Formulación 8	PS20 al 0,01%		50 mg/ml	
Formulación 9	Citrato 10 mM	5,5	50 mg/ml	
	Citrato 10 mM	5,5		
Formulación 10	PS20 al 0,01%		50 mg/ml	
	Citrato 10 mM	5,5		
Formulación 11	Sacarosa al 5%		50 mg/ml	lyo
Formulación 12	Citrato 10 mM	**7,0**	5 mg/ml	µDSC
Formulación 13	PBS	**5,0**	5 mg/ml	µDSC

EJEMPLO DE REFERENCIA 1 - Caracterización de una formulación en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y desventajas asociadas con la misma

En este ejemplo, se caracterizó el Lote de referencia. Tal como se indica en la sección de Materiales anterior, el Lote de referencia contiene el Anticuerpo LIGHT Inicial formulado en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a una concentración de 5,5 mg/ml y un pH de 7,3, y se produce en soluciones de investigación Vitry (BioSCP).

Se utilizó el enfoque isoeléctrico (IEF) para determinar el punto isoeléctrico (pI) del Anticuerpo Inicial. El pI del Anticuerpo LIGHT Inicial se calculó teóricamente como 6,28, y luego se midió mediante enfoque isoeléctrico desnaturalizado utilizando procedimientos estándar conocidos en la técnica. Tal como se muestra en la **figura 1,** las bandas principales muestran que el pI del Anticuerpo LIGHT Inicial era 6,8-7,2.

Se utilizó SDS-PAGE para identificar el peso molecular del monómero de anticuerpo, los agregados potenciales o la presencia de medias moléculas. La **figura 2** muestra un gel SDS-PAGE que compara diferentes lotes de Lote de referencia en condiciones reductoras y no reductoras. Se utilizó un ELISA para determinar la actividad de unión al antígeno del Anticuerpo LIGHT Inicial. La **figura 3** muestra un gráfico ELISA que se utilizó para determinar la actividad de unión al antígeno de los lotes primero y segundo de Lote de referencia.

Se utilizó SEC para determinar la presencia de agregados, así como los productos de degradación del primer lote de Lote de referencia. Tal como se muestra en la **figura 4,** La cromatografía de exclusión por tamaño detectó proteínas de alto peso molecular (HMWP), por ejemplo, di-/oligómeros (RRT0.8) o agregados, y proteínas de bajo peso molecular (LMWP) o productos de degradación. El primer lote de Lote de Referencia tenía una pureza del 97% de contenido de monómero.

Se usó WCX para supervisar la heterogeneidad de carga del primer lote de Lote de referencia. Tal como se muestra en la **figura 5,** durante los estudios de estabilidad se produjeron reordenamientos de isoformas ácidas, neutras y básicas. El primer lote de Lote de referencia tenía una distribución de isoformas ácidas/neutras/básicas del 42,3/55,6/1,9%.

Se utilizó DSC para analizar la temperatura de desplegamiento Tm del primer lote de Lote de Referencia. Tal como se muestra en la **figura 6,** los tres dominios del anticuerpo se despliegan a 68 ºC, 75 ºC y 78 ºC.

Se usó DLS para determinar el diámetro hidrodinámico del monómero de anticuerpo y los posibles agregados solubles. Tal como se muestra en f**iguras 7 y 8,** se detectó un diámetro hidrodinámico de aproximadamente 10 nm, pero se observaron agregados en PBS. Sin embargo, los agregados no se observaron en el tampón de citrato (**figura 10**).

EJEMPLO DE REFERENCIA 2 - Desarrollo de formulaciones tamponadas con citrato y ventajas asociadas con las mismas

El tampón original, solución salina tamponada con fosfato (PBS) a un pH de 7,3, estaba, en términos de pH, muy cerca del punto isoeléctrico (pI) del Anticuerpo Inicial (véase el Ejemplo 1). Además, la Formulación original mostró agregados; medias moléculas; productos de degradación; proteínas de bajo peso molecular (LMWP); proteínas de alto peso molecular (HMWP) y reordenamientos de isoformas de anticuerpos ácidos, básicos y neutros (véase el Ejemplo 1). Por lo tanto, existía la necesidad de una formulación mejorada que no padeciera de estas desventajas.

Se analizaron formulaciones del Anticuerpo LIGHT Inicial (un anticuerpo IgG4 anti-LIGHT completamente humano que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8) que contenían tampón de citrato 10 mM a un pH de 5, 5,5 y 6, con y sin polisorbato 20. La Tabla 3 muestra los resultados analíticos del primer lote de Lote de

referencia y las diversas formulaciones experimentales del Anticuerpo LIGHT Inicial formulado en citrato, a un pH de 5,0 y 5,5 y 6,0, con y sin polisorbato 20. Se encontraron agregados en mediciones de dispersión de luz dinámica (DLS) para el Lote de referencia, pero no en todas las otras formulaciones analizadas. La Tm, medida mediante calorimetría diferencial de barrido (μDSC), indicó que cuanto más elevado era el pH, mayor era la estabilidad termodinámica que podía asumir. Pero para formulaciones concentradas de alta concentración de anticuerpos, el pH tuvo que elegirse por debajo del pI del anticuerpo.

Tal como se muestra en la Tabla 4, los datos de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) mostraron una cantidad significativamente reducida de proteínas de alto peso molecular (HMWP) para el Anticuerpo LIGHT Inicial en tampón de citrato en comparación con el Lote de referencia (tampón de fosfato a pH 7,3). Por el contrario, no se pudieron detectar diferencias con SDS-PAGE (Tabla 5).

Tabla 3 - Resultados analíticos de las formulaciones

Numero de muestra	**Tm1 [ºC]**	**Tm2 [ºC]**	**Tm3 [ºC]**	**pH**	**Prom. Z [nm]**	**Concentración [mg/ml]**	**Tampón**
Lote de referencia	67,94	75,00	77,37	7,3	179,85	5,5	PBS
Formulación 1.1	58,39	69,98	75,75	5,0	10,97	5,0	Citrato 10 mM
Formulación 1.2	62,02	72,26	76,59	5,5	10,71	5,0	Citrato 10 mM
Formulación 1.3	65,46	73,74	77,02	6,0	10,81	5,0	Citrato 10 mM
Formulación 3.1	58,33	69,93	75,74	5,0	13,14	5,0	Citrato 10 mM
							PS20 al 0,01%
Formulación 3.2	61,42	71,97	76,45	5,5	12,79	5,0	Citrato 10 mM
							PS20 al 0,01%

Tabla 4 - Datos de SEC de formulaciones

	ANTICUERPO		**RRT0.8**		**LMWP**		**HMWPs**		
Nombre de la muestra	Área	**Área rel.**	Área	**Área rel.**	Área	**Área rel.**	Área	**Área rel.**	Contenido de monómero
	mAU* min	**%**	mAU* min	**%**	mAU* min	**%**	mAU* min	**%**	[mg/ml]
Lote de ref.	255,61	**98,00**	3,98	**1,52**	1,50	**0,57**	0,59	**0,23**	
Formulación 3.1	223,23	**98,07**	3,22	**1,42**	1,01	**0,44**	0,16	**0,07**	45,49
Formulación 3.2	257,09	**98,24**	3,74	**1,43**	0,79	**0,30**	0,09	**0,03**	48,92

Tabla 5 - Datos de SDS-PAGE de formulaciones

Nombre de la muestra	tamaño kDa	Cant. rel. %	tamaño kDa	Cant. rel. %	tamaño kDa	Cant. rel. %	tamaño kDa	Cant. rel. %	comentario
Lote de ref.	172,5	98,4	150,1	1,4	68,4	0,2			Bandas adicionales < 0,5%
Formulación 3.1	166,1	97,7	147,8	2	71,5	0,3			Patrón idéntico al Lote de ref.

Nombre de la muestra	tamaño kDa	Cant. rel. %	tamaño kDa	Cant. rel. %	tamaño kDa	Cant. rel. %	tamaño kDa	Cant. rel. %	comentario
Formulación 3.2	166,2	96,2	147,2	3,4	71,4	0,4			Patrón idéntico al Lote de ref.

EJEMPLO DE REFERENCIA 3 - Desarrollo de formulaciones de anticuerpos de alta concentración

En vista de las mejoras proporcionadas por la Formulación de anticuerpos tamponada con citrato del Ejemplo 2, los componentes del tampón de citrato se optimizaron para concentraciones aumentadas de Anticuerpo LIGHT Inicial. La Tabla 6 muestra los resultados analíticos del primer lote de formulaciones de anticuerpos de alta concentración (aproximadamente 40 mg/ml): solución salina tamponada con alto contenido de fosfato (PBS) a un pH de 7,3 (Formulación 2) o citrato a un pH de 5,5 con polisorbato 20 (Formulación 4).

Tabla 6 - Resultados analíticos de las Formulaciones 2 y 4

Numero de muestra	**Tm1 [ºC]**	**Tm2 [ºC]**	**Tm3 [ºC]**	**pH**	**Prom. Z [nm]**	**Concentración [mg/ml]**	**Tampón**
Lote de referencia	67,94	75,00	77,37	7,3	10,05	5,5	PBS
Formulación 2	67,87	74,87	77,28	7,3	12,89	42,1	PBS
Formulación 4	61,55	72,00	76,48	5,5	16,71	39,97	Citrato 10 mM
							PS20 al 0,01%

Se observó un contenido de monómero ligeramente reducido después de concentrar la solución de proteína en tampón de citrato. Además, la concentración de dímero se redujo y las proteínas de alto peso molecular (HMWP) también pudieron reducirse significativamente (véase la Tabla 7). Por el contrario, estas impurezas y subproductos se incrementaron al aumentar la concentración en el tampón de fosfato. No se pudieron detectar diferencias con el análisis SDS-PAGE (Tabla 8).

Tabla 7 - Datos de SEC de las Formulaciones 2 y 4

Análisis por SEC		**ANTICUERPO**		**RRT0.8**		**LMWP**		**HMWP**		
	Nombre de la muestra	Área	**Área rel.**	Área	**Área rel.**	Área	**Área rel.**	Área	**Área rel.**	Contenido de monómero
		mAU* min	%	mAU* min	%	mAU* min	%	mAU* min	%	[mg/ml]
	Lote de ref.	255,61	**98,00**	3,98	**1,52**	1,50	**0,57**	0,59	**0,23**	
	Formulación 2	121,42	**97,39**	2,13	**1,71**	0,98	**0,79**	0,15	**0,12**	44,08
	Formulación 4	141,90	**97,65**	2,17	**1,49**	1,16	**0,80**	0,09	**0,06**	45,83

Tabla 8 - Datos de SDS-PAGE de las Formulaciones 2 y 4

Análisis por SDS-PAGE		**Anticuerpo**		**2. banda principal**		**Medias moléculas**		**Bandas adicionales**		
	Nombre de la muestra	tamaño	cant. rel.	tamaño	cant. rel.	tamaño	cant. rel.	tamaño	cant. rel.	comentario
		kDa	%	kDa	%	kDa	%	kDa	%	
	Lote de ref.	172,5	98,4	150,1	1,4	68,4	0,2			Bandas adicionales < 0,5%
	Formulación 2	170,6	97,9	147,6	1,9	72,2	0,2			Patrón idéntico al Lote de ref.
	Formulación 4	171	97,2	149	2,5	70,5	0,3			Patrón idéntico al Lote de ref

EJEMPLO DE REFERENCIA 4 - Desarrollo de formulaciones de anticuerpos liofilizadas

Para evaluar la viabilidad de la liofilización, se produjeron diferentes formulaciones experimentales liofilizadas y se sometieron a análisis de estabilidad. La concentración del Anticuerpo LIGHT Inicial se aumentó a 50 mg/ml.

La Tabla 9 muestra el programa de liofilización que se utilizó en este ejemplo.

Tabla 9 - Programa de liofilización

Programa de Lyo (vacío) N °	**8**
Cámara de carga	5 min/TA/100%
Congelación	2 h/-45 ºC/100%
Secado principal I	30 min/-45 ºC/30%
Secado principal II	5 h/-20 ºC/30%
Secado principal III	8 h/+20 ºC/30%
Secado final	2 h/+20 ºC/3%

La Tabla 10 muestra los resultados analíticos del primer lote de Lote de Referencia y las diversas formulaciones liofilizadas experimentales del Anticuerpo LIGHT Inicial formulado en varias combinaciones de tampón de citrato, sacarosa, polisorbato 20 y prolina.

Tal como se muestra en la Tabla 11, las proteínas de alto peso molecular (HMWP) podrían reducirse significativamente utilizando un tampón de citrato. No se observaron diferencias en el contenido de dímeros durante el periodo de almacenamiento a 40 ºC. Se observó un aumento de proteínas de bajo peso molecular (LMWP) después de la liofilización. Como antes, estas diferencias no se pudieron detectar con el análisis SDS-PAGE (Tabla 12).

Tabla 10 - Datos analíticos de las Formulaciones 6-6.2 y 11

Numero de muestra	Tm1	Tm2	Tm3	Tiempo/ Temp.	pH	Prom Z [nm]	Concentración	Tampón
Lote de referencia	67,94	75,00	77,37		7,3	10,05	5,5 mg/ml	PBS
Formulación 6	Nd	Nd	Nd	N/A	5,7	17,46	57,32	Citrato 10 mM
								PS20 al 0,01%
Formulación 6.1	64,30	72,61	77,02	T0	5,7	59,66	Nd	Citrato 10 mM
				T1/5 ºC	5,7	18,85	Nd	PS20 al 0,01%
				T1/40 ºC	5,7	19,12	Nd	Prolina al 1,5%
				T2/5 ºC	5,7	Nd	Nd	
				T2/40 ºC	5,7	Nd	Nd	Sacarosa al 5%
Formulación 6.2	65,45	75,08	79,37	T0	5,7	19,58	Nd	Citrato 10 mM
				T1/5 ºC	5,7	31,34	Nd	PS20 al 0,01%
				T1/40 ºC	5,7	18,1	Nd	
				T2/5 ºC	5,7	Nd	Nd	Sacarosa al 5%
				T2/40 ºC	5,7	Nd	Nd	
Formulación 11	68,84	75,61	77,91	T0	7,0	98,60	56,49	PBS
				T1/5 ºC	5,7	20,22	Nd	Sacarosa al 5%
				T1/40 ºC	5,7	22,68	Nd	
				T2/5 ºC	5,7	Nd	Nd	
				T2/40 ºC	5,7	Nd	Nd	

Tabla 11 - Datos de SEC de las Formulaciones 6.1-6.2 y 11

Análisis por SEC			**ANTICUERPO**		**RRT0.8**		**LMWP**		**HMWP**	
	Nombre de la muestra	Hora	Área	**Área rel.**	Área	**Área rel.**	Área	**Área rel.**	Área	**Área rel.**
			[mAU * min]	[%]	[mAU * min]	[%]	[mAU * min]	[%]	[mAU * min]	[%]
	Lote de ref.		255,61	**98,00**	3,98	**1,52**	1,50	**0,57**	0,59	**0,23**
	Formulación 6.1	T0	222,94	**97,43**	3,89	**1,70**	1,91	**0,83**	0,09	**0,04**
	Formulación 6.1	T1 5 ºC	369,72	**97,57**	6,31	**1,66**	2,75	**0,73**	0,18	**0,05**
	Formulación 6.1	T1 40 ºC	405,49	**97,35**	7,33	**1,76**	3,60	**0,86**	0,12	**0,03**
	Formulación 6.1	T2 5 ºC	422,46	**97,59**	7,01	**1,62**	2,74	**0,63**	0,68	**0,16**
	Formulación 6.1	T2 40 ºC	289,65	**97,28**	5,50	**1,85**	2,13	**0,72**	0,48	**0,16**
	Formulación 6.2	T0	230,06	**97,61**	3,93	**1,67**	1,64	**0,70**	0,07	**0,03**
	Formulación 6.2	T1 5 ºC	407,17	**97,56**	6,81	**1,63**	3,23	**0,77**	0,17	**0,04**
	Formulación 6.2	T1 40 ºC	468,74	**97,36**	8,79	**1,83**	3,78	**0,78**	0,16	**0,03**
	Formulación 6.2	T2 5 ºC	552,31	**97,64**	9,80	**1,73**	2,96	**0,52**	0,61	**0,11**
	Formulación 6.2	T2 40 ºC	249,95	**96,78**	5,39	**2,09**	2,39	**0,93**	0,52	**0,20**
	Formulación 11	T0	211,45	**97,49**	3,64	**1,68**	1,47	**0,68**	0,35	**0,16**
	Formulación 11	T15 ºC	339,08	**97,71**	5,45	**1,57**	2,28	**0,66**	0,23	**0,07**
	Formulación 11	T1 40 ºC	700,91	**97,30**	12,69	**1,76**	5,19	**0,72**	1,60	**0,22**
	Formulación 11	T2 5 ºC	325,80	**97,17**	5,80	**1,73**	2,17	**0,65**	1,52	**0,45**
	Formulación 11	T2 40 ºC	229,29	**96,96**	4,33	**1,83**	1,78	**0,75**	1,09	**0,46**

Tabla 12 - Datos de SDS-PAGE de las Formulaciones 6.1-6.2 y 11

Análisis por SDS-PAGE			**ANTICUERPO**		**2.Banda principal**		**HM**		**Bandas adicionales**		
	Nombre de la muestra	Muestra ID	tamaño	cant. rel.	tamaño	cant. rel.	tamaño	cant. rel.	tamaño	cant. rel.	comentario
	Lote de ref.		182,9	95,6	161,2	2,3	73,8	0,5			
	Formulación 6.1	T0	175,6	94,7	156,1	2,7	73,5	0,5			
	Formulación 6.1	T1 5 ºC	180,2	86,9	159,9	11,4	75,9	0,1			
	Formulación 6.1	T1 40 ºC	179,2	90,4	158,5	7,5	76,1	0,4			
	Formulación 6.1	T2 5 ºC	177,3	95,6	157,9	2,1	74,9	0,3			
	Formulación 6.1	T2 40 ºC	179,8	94,7	159,8	2,9	75,4	0,3			
	Formulación 6.2	T0	176,6	94,9	156,3	2,6	73,6	0,5			
	Formulación 6.2	T1 5 ºC	180,2	89,8	159,3	7,9	76,3	0,4			
	Formulación 6.2	T1 40 ºC	182,1	88,7	160,9	9,4	76,3	0,1			
	Formulación 6.2	T2 5 ºC	177,5	95,5	160,2	2,9	75,4	0,2			
	Formulación 6.2	T2 40 ºC	180,9	95,5	161,5	2,4	75,7	0,3			
	Formulación 11	T0	178,7	95,1	156,5	2,3	73,7	0,4			
	Formulación 11	T1 5 ºC	181,0	70,0	154,7	25,7	74,5	0,3			
	Formulación 11	T1 40 ºC	181,3	66,2	154,2	28,9	74,5	0,3			
	Formulación 11	T2 5 ºC	177,7	87,5	155,9	10,9	75,2	0,3			
	Formulación 11	T2 40 ºC	176,8	86,2	155,2	12,0	74,5	0,3			

EJEMPLO DE REFERENCIA 5 - Estudio de estabilidad acelerada

Se realizó un estudio de estabilidad acelerada con tampones de citrato e histidina. La Tabla 13 muestra los resultados analíticos del primer lote de Lote de referencia y las diversas formulaciones experimentales del Anticuerpo LIGHT Inicial formulado en varias combinaciones de tampón de citrato o tampón de histidina. Cabe señalar que la formulación de citrato pareció funcionar mejor en todos los experimentos que la histidina. En particular, las formulaciones de citrato tuvieron un contenido de monómero más alto en comparación con el lote de Lote de referencia y la histidina (Tabla 13) y el contenido de proteínas de bajo peso molecular (LMWP) y de proteínas de alto peso molecular (HMWP) también fueron significativamente más bajos (Tabla 14). Como antes, estas diferencias no se pudieron detectar con el análisis SDS-PAGE (Tabla 15).

Tabla 13 - Datos analíticos de las Formulaciones 7, 8, 9 y 10

Numero de muestra	**Tm1 [ºC]**	**Tm2 [ºC]**	**Tm3 [ºC]**	**pH**	**Prom Z [nm]**	**Concentración [mg/ml]**	**Tampón**
Lote de ref.	67,94	75,00	77,37	7,3	10,05	5,5	PBS
Formulación 7	58,95	68,51	76,20	5,5	12,97	53,65	Histidina 10 mM
Formulación 8	58,69	68,23	76,12	5,4	13,29	58,72	Histidina 10 mM
							PS20 al 0,01%
Formulación 9	61,67	72,01	76,53	5,6	59,26	55,01	Citrato 10 mM
Formulación 10	62,24	72,32	76,61	5,6	17,3	55,8	Citrato 10 mM
							PS20 al 0,01%

Tabla 14 - Análisis de SEC de las Formulaciones 7 y 8 y 9 y 10

		ANTICUERPO		RRT0.8		LMWP		HMWP		
Nombre de la muestra	Tiempo	Área	**Área rel.**	Área	**Área rel.**	Área	**Área rel.**	Área	**Área rel.**	Contenido de monómero
		[mAU * min]	[%]	[mAU * min]	[%]	[mAU * min]	[%]	[mAU * min]	[%]	[mg/ml]
Lote de ref.		282,42	**97,40**	4,55	**1,57**	2,15	**0,74**	0,85	**0,29**	
Formulación 7	T0	184,4	**95,1**	163,8	**1,6**	72,8	**1**			
Formulación 7	T1 5 ºC	390,84	**97,85**	5,72	**1,43**	2,80	**0,70**	0,06	**0,01**	
Formulación 7	T1 40 ºC	379,81	**96,74**	7,04	**1,79**	5,77	**1,47**	0	**0**	
Formulación 7	T2 5 ºC	863,01	**97,75**	14,19	**1,61**	4,14	**0,47**	1,54	**0,18**	164,88
Formulación 7	T2 40 ºC	1085,91	**95,22**	29,59	**2,60**	23,25	**2,04**	1,69	**0,15**	207,47
Formulación 8	T0	184,6	**94,9**	165,9	**2,1**	72,7	**0,8**			
Formulación 8	T1 5ºC	507,64	**97,74**	7,52	**1,45**	4,19	**0,81**	0,05	**0,01**	
Formulación 8	T1 40 ºC	461,44	**96,98**	8,05	**1,69**	6,19	**1,30**	0	**0**	
Formulación 8	T2 5 ºC	416,54	**97,46**	6,59	**1,54**	3,49	**0,82**	0,79	**0,18**	79,58
Formulación 8	T2 40 ºC	422,21	**93,23**	11,17	**2,47**	18,40	**4,06**	1,11	**0,25**	80,66
Formulación 9	T0	229,01	**97,63**	3,75	**1,60**	1,63	**0,70**	0,19	**0,08**	45,28
Formulación 9	T1 5 ºC	307,94	**97,96**	4,2	**1,34**	2,20	**0,7**	0	**0**	
Formulación 9	T1 40 ºC	319,10	**97,54**	5,24	**1,60**	2,59	**0,79**	0,23	**0,07**	
Formulación 9	T2 5 ºC	337,15	**97,48**	5,41	**1,56**	2,84	**0,82**	0,49	**0,14**	64,41
Formulación 9	T2 40 ºC	325,54	**96,26**	7,78	**2,30**	3,66	**1,08**	1,20	**0,36**	62,20
Formulación 10	T0	233,11	**97,54**	3,84	**1,61**	1,97	**0,82**	0,08	**0,03**	46,09
Formulación 10	T15 ºC	343,38	**97,77**	5,21	**1,48**	2,58	**0,73**	0,04	**0,01**	
Formulación 10	T1 40 ºC	329,56	**97,21**	5,06	**1,49**	4,29	**1,26**	0,13	**0,04**	
Formulación 10	T2 5 ºC	343,33	**97,43**	5,47	**1,55**	3,06	**0,87**	0,53	**0,15**	65,59
Formulación 10	T2 40 ºC	257,20	**94,59**	5,59	**2,06**	8,98	**3,30**	0,15	**0,05**	49,14

Tabla 15 - Datos SDS-PAGE de las Formulaciones 7 y 8 y 9 y 10

Análisis por SDS-PAGE			ANTICUERPO		2. banda principal		Medias moléculas		Bandas adicionales		
	Nombre de la muestra	Tiempo/Temp	tamaño [kDa]	cant. rel. [%]	tamaño [kDa]	cant. rel. [%]	tamaño [kDa]	cant. rel. [%]	tamaño [kDa]	cant. rel. [%]	comentario
	Lote de ref.		173,6	96,3	155,8	2,2	74	0,4			
	Formulación 7	T0	184,4	95,1	163,8	1,6	72,8	1			
	Formulación 7	T1 5 ºC	183,0	91,1	159,9	7,2	76,1	0,4			
	Formulación 7	T1 40 ºC	182,2	83,1	158,4	13,8	74,0	0,4			
	Formulación 7	T2 5 ºC	181,5	95,7	160,3	2,7	75,6	0,3			
	Formulación 7	T2 40 ºC	173,0	84,6	151,1	10,3	73,9	0,7	12,1	0,9	más LMWP
	Formulación 8	T0	184,6	94,9	165,9	2,1	72,7	0,8			
	Formulación 8	T1 5 ºC	180,1	86,2	158,3	11,4	73,9	0,4			
	Formulación 8	T1 40 ºC	180,9	79,4	158,2	16,9	74,0	0,3			
	Formulación 8	T2 5 ºC	175,1	95,2	154,9	3,1	74,4	0,3			
	Formulación 8	T2 40 ºC	174,8	84,7	150,5	9,2	74,0	0,9	12,1	1,5	más LMWP
	Formulación 9	T0	187,7	95,5	163,1	1,1	72,9	0,9			
	Formulación 9	T1 5 ºC	178,9	65,8	160,4	29,6	73,7	0,9			
	Formulación 9	T1 40 ºC	184,7	82,9	160,3	14,8	74,4	0,3			
	Formulación 9	T2 5 ºC	176,2	95,6	155,6	2,6	73,6	0,3			
	Formulación 9	T2 40 ºC	174,3	91,5	153,9	3,1	73,1	0,3	12,1	0,2	más LMWP
	Formulación 10	T0	182,5	95,2	161,3	1,6	72,3	0,8			
	Formulación 10	T1 5 ºC	184,5	68,4	156,4	26,6	75,1	0,3			
	Formulación 10	T1 40 ºC	180,8	65,4	153,8	28,8	74,8	0,3			
	Formulación 10	T2 5 ºC	188,7	88,6	165,0	9,6	73,5	0,2			
	Formulación 10	T2 40 ºC	181,7	78,9	158,2	15,8	75,7	0,8	12,6	1,3	más LMWP

EJEMPLO DE REFERENCIA 6 - Desarrollo de una formulación de alta concentración de anticuerpos para administración subcutánea

Sobre la base de los resultados exitosos de las formulaciones tamponadas con citrato de los Ejemplos 2-5, se desarrolló una formulación de anticuerpo de alta concentración (150 mg/ml) adecuada para administración subcutánea. El desarrollo de la formulación se realizó en el Anticuerpo LIGHT Inicial con el objetivo de desarrollar una forma de dosificación líquida con una vida útil aceptable cuando se almacena entre +2 y +8 ºC. Los estudios preliminares de estrés mostraron la formación de partículas subvisibles y visibles, especies de alto peso molecular y especies más básicas. Por lo tanto, estos parámetros se supervisaron durante el cribado de las formulaciones candidatas utilizando evaluación visual, dispersión dinámica de la luz, oscurecimiento de la luz, cromatografía de exclusión por tamaño, electroforesis en gel de poliacrilamida con dodocilsulfato de sodio y cromatografía de intercambio catiónico débil. Se utilizaron diferentes formulaciones líquidas en los ensayos de preformulación y formulación antes de la selección de la formulación clínica. Según los hallazgos, se seleccionó una formulación en tampón de citrato 10 mM ajustada a pH 5,5 (Formulación 14) para su posterior desarrollo. El pH de la formulación se encuentra en la región de estabilidad física y química óptima de la sustancia farmacéutica y de una tolerabilidad fisiológica aceptable (por ejemplo, osmolaridad).

Tal como se muestra en la Tabla 16, la Formulación 14 es una solución para inyección y es una solución acuosa, estéril y transparente que contiene el Anticuerpo LIGHT Inicial, citrato de sodio dihidratado (agente tampón), polisorbato 20 (agente estabilizante) y manitol (agente de tonicidad). Se utilizaron una solución de hidróxido de sodio y ácido clorhídrico para ajustar el pH a 5,5.

Todos los excipientes eran excipientes estándar de farmacopea solubles y bien tolerados para administración parenteral y se enumeran en Ph. Eur. y USP.

Tabla 16 – Composición

Componentes[a]	**Composición**		**Función**	**Referencia a normas**[b]
	por ml (mg)	**por vial (1,2 ml) (mg)**		
Anticuerpo Inicial	150,00	180,00	Substancia farmacológica	Doméstico
Citrato de sodio deshidratado	2,94	3,53	Agente tampón	Ph. Eur., USP
Manitol	40,00	48,00	Agente de tonicidad	Ph. Eur., USP
Polisorbato 20	0,05	0,06	Agente estabilizante	Ph. Eur., NF, JP
Ácido clorhídrico, concentrado [ácido clorhídrico]	q.s pH 5,5	q.s. pH 5,5	Agente acidificante	Ph. Eur., NF
Hidróxido de sodio	q.s.pH 5;5	q.s. pH 5,5	Agente alcalinizante	Ph. Eur., NF
Agua para inyección	q.s. 1 ml	q.s. 1,2 ml	disolvente	Ph. Eur., USP
Nitrógeno	Ayuda de proceso para la filtración.			Ph. Eur., NF

[a] Los componentes están enumerados de acuerdo a sus nombres de Farmacopea. Si existe más de una monografía, se dan otros nombres entre paréntesis, junto con el origen del compendio.
[b] Se hace referencia a la edición actual de la Farmacopea.

EJEMPLO DE REFERENCIA 7 - Proceso de fabricación para la formulación de anticuerpos para administración subcutáneos

Se desarrolló un proceso de fabricación compatible con GMP para la formulación de administración subcutánea de anticuerpos a alta concentración (Formulación 14) del Ejemplo 6. El procedimiento de fabricación consistió en disolución, ajuste del pH, filtración estéril, llenado y etapas de envasado.

La sustancia farmacológica (el Anticuerpo LIGHT Inicial) se proporciona en forma líquida en el tampón de formulación (tampón de citrato 10 mM a pH 5,5). Los excipientes eran todos solubles en agua y se disolvieron en la porción acuosa inicial del tampón de formulación durante la fabricación. La solución de sustancia farmacológica masiva se diluyó adicionalmente con el mismo tampón de formulación hasta alcanzar la concentración de 150 mg/ml de Anticuerpo LIGHT Inicial. La solución masiva se mezcló bien para facilitar el proceso de disolución y para asegurar la homogeneidad.

Se llevó a cabo una esterilización por filtración (según Ph. Eur. y USP) utilizando filtros retentivos de bacterias que

tienen un tamaño de poro nominal de 0,2 µm. Se realizó un procedimiento de filtración adicional antes de la "esterilización por filtración" para asegurar una baja carga biológica. El muestreo de la carga biológica se realizó antes de la etapa de prefiltración y de la filtración estéril.

La preparación y el llenado de la solución esterilizada en los recipientes adecuados se realizaron en condiciones asépticas. Esto estaba de acuerdo con las monografías de la farmacopea y las directrices relacionadas, que requerían una esterilización por filtración y el posterior procesamiento aséptico. El equipo, que entra en contacto con el producto después de la etapa de "esterilización por filtración", se esterilizó mediante calor o vapor utilizando un procedimiento validado (según Ph. Eur./USP).

Los viales se llenaron a aproximadamente 1,2 ml para asegurar un volumen extraíble de 1,0 ml. Los viales de 2 ml estaban fabricados de vidrio tipo I transparente e incoloro y se cerraron con un tapón (bromobutilo recubierto con fluoropolímero) sellado con tapas abatibles con una brida (polipropileno). Los materiales de envasado primarios cumplían con los requisitos de la Ph. Eur. y USP. La idoneidad de los materiales de envasado primarios se verificó mediante los resultados de los ensayos de estabilidad. No se observaron incompatibilidades con el material de envasado primario utilizado. El envasado secundario proporciona protección al producto frente a la luz.

La compatibilidad con las jeringas de aplicación se evaluó utilizando 3 tamaños diferentes de jeringas y diámetros de agujas (entre 25 y 28 de calibre) en la solución del producto farmacológico. No se obtuvieron diferencias en cuanto a la calidad del producto. La compatibilidad se evaluó durante un período de tiempo de 8 horas.

La formulación 14 se fabricó en lotes de 5 l, cuya composición se muestra en la tabla 17. Sin embargo, el tamaño del lote puede ajustarse según los requerimientos clínicos.

Tabla 17 - Fórmula por lotes

Componentes	**Tamaño de lote de 5 litros[a]**
	[g]
Anticuerpo Inicial [b]	750,00
Manitol	200,00
Polisorbato 20	0,25
Citrato de sodio dihidratado	14,71
Ácido clorhídrico, concentrado[c]	q.s. pH 5,5
Hidróxido de sodio [c]	q.s. pH 5,5
Agua para inyección	Ad 5285,25 [d]
Nitrógeno	Ayuda de proceso para la filtración.

[a] Los viales se llenaron con un volumen de 1,2 ml para asegurar un volumen extraíble de 1,0 ml. Por lo tanto, un tamaño de lote de 6,0 l da como resultado un rendimiento teórico de 5000 viales.
[b] Para el ajuste del pH.
[c] Esto se calculó según la densidad de la solución final del producto farmacológico (1,05705 mg/ml)

El proceso de fabricación y los controles de proceso para la Formulación 14 se muestran en el diagrama de flujo de la **figura 9.** La fabricación por lotes incluía las etapas siguientes:

I. El citrato de sodio dihidratado se disolvió en agua para inyección mientras se agitaba en un recipiente fabricado de material inerte (por ejemplo, acero inoxidable o vidrio), hasta su completa disolución. El valor de pH se ajustó a 5,5 usando ácido clorhídrico, diluido (por ejemplo, ácido clorhídrico 0,1 M) y/o solución de hidróxido de sodio (por ejemplo, hidróxido de sodio 0,1 M), si es necesario.

II. Se diluyeron el Anticuerpo Inicial, manitol y polisorbato 20 en la solución tampón de la etapa 1 mientras se agitaba en un recipiente fabricado de material inerte (por ejemplo, acero inoxidable o vidrio) hasta su completa disolución. Si es necesario, el valor de pH se ajustó a 5,5 usando ácido clorhídrico, diluido (por ejemplo, ácido clorhídrico 1 M) y/o solución de hidróxido de sodio (por ejemplo, hidróxido de sodio 1 M)). Se añadió solución tampón de la etapa 1 (remanente) para ajustar el peso final.

III. a) Prefiltración:

La solución de la etapa II se filtró en condiciones asépticas utilizando un filtro de membrana compatible y esterilizado (por ejemplo, polieter-sulfona o difluoruro de polivinilideno) con un tamaño de poro nominal de 0,2

µm.

b) Esterilización por filtración:

La solución de la etapa III.a se esterilizó por filtración en condiciones asépticas en recipientes esterilizados fabricados de material inerte (por ejemplo, acero inoxidable o vidrio) utilizando un filtro de membrana compatible esterilizado (por ejemplo, polieter-sulfona o difluoruro de polivinilideno) con un tamaño de poro nominal de 0,2 µm.

IV. Con la solución de la etapa III.b se llenaron en condiciones asépticas viales esterilizados, que se cerraron con tapones y tapas abatibles con una brida.

V. Los recipientes de la etapa IV se inspeccionaron en busca de contaminantes gruesos, un sellado intacto y partículas visibles.

VI. Los recipientes inspeccionados de la etapa V se envasaron adicionalmente en recipientes adecuados (por ejemplo, cajas de cartón).

Además, se usó DLS para determinar el diámetro hidrodinámico del monómero de anticuerpo y los potenciales agregados solubles. Como se muestra en la **figura 10,** no se observaron agregados en el tampón de citrato. Sin embargo, tal como se muestra en las **figuras 7 y 8,** se observaron agregados en PBS. Debido a la mayor concentración de anticuerpos, se observó un aumento de promedio Z a 28 nm, en comparación con la muestra en PBS.

EJEMPLO DE REFERENCIA 8 - Perfil de estabilidad para la formulación de anticuerpos para administración subcutánea

El perfil de estabilidad del lote clínico (lote 2) del Ejemplo 7 se evaluó para su almacenamiento en condiciones de ensayo aceleradas y de largo plazo según las directrices de la ICH. Las muestras se empaquetaron y almacenaron en viales transparentes e incoloros de 2 ml (vidrio tipo I) cerrados con tapones (bromobutilo recubierto con fluoropolímero) y con tapas abatibles con una brida (polipropileno).

Se realizaron los ensayos siguientes durante la estabilidad: aspecto (transparencia, color), ensayo (antígeno ELISA, UV), pureza (SEC, SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras), integridad molecular (SDS-PAGE en condiciones no reductoras), heterogeneidad de carga (cromatografía de intercambio catiónico débil, enfoque isoeléctrico), pH, esterilidad, endotoxinas bacterianas, material particulado (partículas visibles y subvisibles) e integridad de cierre.

Las muestras se almacenaron en posiciones invertidas y verticales. Los resultados del almacenamiento invertido se presentaron como la condición más estricta. Los datos de estabilidad a -20 ºC, +5 ºC y +25 ºC se presentan en las Tablas 18-20, respectivamente. Las investigaciones sobre las propiedades físicas, químicas y biológicas del almacenamiento en condiciones de ensayo a largo plazo confirmaron una buena estabilidad del producto farmacológico a 5 ºC (véase la Tabla 19). En condiciones de ensayo aceleradas (+25 ºC), solo se detectó una ligera disminución en la pureza mediante cromatografía de exclusión por tamaño (véase la Tabla 20). Por lo tanto, se llegó a la conclusión de que el medicamento debería almacenarse a una temperatura de +2 ºC a +8 ºC protegido de la luz.

Tabla 18 - Estabilidad a largo plazo a -20 ºC para el producto farmacológico

Producto farmacológico:	**Solución para inyección del Anticuerpo LIGHT Inicial**		**Lote Nº:**		**11_021**		
Fuerza de dosificación:	**150 mg/ml**		**Formulación Nº:**		**14**		
Contenedor/cierre:	**viales de vidrio de 2 ml**						
	Condición de almacenamiento:	-20 ºC ± 5 ºC					
	Orientación de almacenamiento:	Vertical					
	Elemento de ensayo	**Tiempo**					
	Resultados iniciales	**1 mes**	**3 meses**	**6 meses**	**12 meses**	**18 meses**	**24 meses**

Aspecto de la solución							
Transparencia	<I	III	II	> IV	IV	> IV	
Color	BY7	BY7	BY6	BY6	BY6	BY7	
Identificación							
IEF							
- Patrón isoeléctrico.	Se ajusta	Se ajusta	Se ajusta	Se ajusta	Se ajusta	Se ajusta	
Ensayo							
Antígeno ELISA							
- valor de CE50 (en comparación con la referencia	76%	110%	76%	103%	96%	105%	
Contenido total de proteínas (UV)	153 mg/ml	148 mg/ml	151 mg/ml	151 mg/ml	149 mg/ml	156 mg/ml	
Pureza							
HPLC (SEC)							
- Monómero (% área)	98,2%	97,5%	96,2%	94,5%	94,3%	94,1%	
- HMWP (% área)	1,3%	2,3%	3,7%	5,4%	5,5%	5,5%	
- LMWP (% área)	0,4%	0,2%	0,1%	0,0%	0,1%	0,5%	
SDS-PAGE en condiciones no reductoras	<1,0%	<1,0%	<1,0%	2,7%	<1,0%	<5,0%	
- La mitad de las moléculas.							
SDS-PAGE en condiciones reductoras	98%	100%	100%	100%	96%	100%	
- Pureza relativa							
Integridad molecular							
SDS-PAGE en condiciones no reductoras							
- patrón de gel	Se ajusta	No se ajusta	Se ajusta	Se ajusta	Se ajusta	Se ajusta	
Heterogeneidad de carga							
HPLC (WCX)							
- ácida	40%	36%	44%	42%	43%	41%	
- neutra	55%	60%	54%	47%	51%	56%	
- Isoformas básicas (% de área)	5%	4%	2%	2%	6%	3%	
pH (potenciometría)	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	

Material particulado (partículas visibles)	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	
Material particulado (partículas subvisibles)	313	Sin analizar	Sin analizar	Sin analizar	33	Sin analizar	
Número de partículas por vial ≥10 µm	10				5		
Número de partículas por vial ≥25 µm							
Integridad de cierre	Cumple	Sin analizar	Sin analizar	Sin analizar	Cumple	Sin analizar	
Contaminación microbiana							
TAMC	<1 UFC/2 ml	Sin analizar	Sin analizar	Sin analizar	Sin analizar	Sin analizar	
TAnMC	<1 UFC/2 ml	Sin analizar	Sin analizar	Sin analizar	Sin analizar	Sin analizar	

Tabla 19 – Estabilidad a largo plazo a +5 ºC para el producto farmacológico

Producto farmacológico:	**Solución para inyección del Anticuerpo LIGHT Inicial**		**Lote Nº:**		**11_021**		
Fuerza de dosificación:	**150 mg/ml**		**Formulación Nº:**		**14**		
Contenedor/cierre:	**viales de vidrio de 2 ml**						
Condición de almacenamiento:	+5 ºC ± 3 ºC						
Orientación de almacenamiento:	Vertical						
Elemento de ensayo	Tiempo						
	Resultados iniciales	**1 mes**	**3 meses**	**6 meses**	**12 meses**	**18 meses**	**24 meses**
Aspecto de la solución							
Transparencia	<I	<I	<I	<I	<I **¡Error! No se encontró la fuente de referencia**	>IV	
Color	BY7	BY7	BY7	BY7	BY6	BY7	
Identificación							
IEF							
- Patrón isoeléctrico.	Se ajusta	Se ajusta	Se ajusta	Se ajusta	Se ajusta	Se ajusta	
Ensayo							
Antígeno ELISA							
- valor de CE50 (en comparación con la referencia	76%	119%	83%	107%	96%	115%	
Contenido total de proteínas (UV)	153 mg/ml	150 mg/ml	150 mg/ml	151 mg/ml	148 mg/ml	155 mg/ml	
Pureza							
HPLC (SEC)							
- Monómero (% área)	98,2%	98,5%	98,5%	98,3%	98,0%	97,4%	
- HMWP (% área)	1,3%	1,4%	1,5%	1,7%	1,9%	2,0%	
- LMWP (% área)	0,4%	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%	0,6%	
SDS-PAGE en condiciones no reductoras	<1,0%	<1,0%	<1,0%	1,8%	<1,0%	<1,0%	
- La mitad de las moléculas.							
SDS-PAGE en condiciones reductoras	98%	100%	100%	100%	96%	100%	
- Pureza relativa							
Integridad molecular							

SDS-PAGE en condiciones no reductoras - patrón de gel	Se ajusta	No se ajusta	Se ajusta	Se ajusta	Se ajusta	Se ajusta	
Heterogeneidad de carga HPLC (WCX) - ácida - neutra - Isoformas básicas (% de área)	40% 55% 5%	36% 60% 4%	44% 54% 2%	42% 57% 2%	43% 52% 5%	39% 57% 4%	
pH (potenciometría)	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	
Material particulado (partículas visibles) **Material particulado (partículas subvisibles)** Número de partículas por vial ≥10 µm Número de partículas por vial ≥25 µm	Cumple 313 10	Cumple Sin analizar	Cumple Sin analizar	Cumple Sin analizar	Cumple 35 5	Cumple Sin analizar	
Integridad de cierre	Cumple	Sin analizar	Sin analizar	Sin analizar	Cumple	Cumple	
Contaminación microbiana TAMC TAnMC	<1 UFC/2 ml <1 UFC/2 ml	Sin analizar Sin analizar	Sin analizar Sin analizar	Sin analizar Sin analizar	Sin analizar Sin analizar	Sin analizar Sin analizar	

Tabla 20 – Estabilidad a largo plazo a +25 ºC para el producto farmacológico

Producto farmacológico:	**Solución para inyección del Anticuerpo LIGHT Inicial**		**Lote Nº: 11_021**	
Fuerza de dosificación:	**150 mg/ml**		**Formulación Nº: 14**	
Contenedor/cierre:	**viales de vidrio de 2 ml**			
Condición de almacenamiento:	+25 ºC ± 2 ºC/60% ± 5% de HR			
Orientación de almacenamiento:	Vertical			
Elemento de ensayo	Tiempo			
	Resultados iniciales	**1 mes**	**3 meses**	**6 meses**
Aspecto de la solución Transparencia Color	 <I BY7	 <I BY7	 <I BY7	 <I BY7
Identificación				

IEF - Patrón isoeléctrico.	Se ajusta	Se ajusta	Se ajusta	Se ajusta
Ensayo Antígeno ELISA - valor de CE50 (en comparación con la referencia	76%	108%	96%	111%
Contenido total de proteínas (UV)	153 mg/ml	149 mg/ml	150 mg/ml	151 mg/ml
Pureza HPLC (SEC) - Monómero (% área)	98,2%	98,2%	97,7%	96,8%
- HMWP (% área)	1,3%	1,7%	2,2%	3,1%
- LMWP (% área)	0,4%	0,1%	0,1%	0,1%
SDS-PAGE en condiciones no reductoras - La mitad de las moléculas.	<1,0%	<1,0%	<1,0%	<1,0%
SDS-PAGE en condiciones reductoras - Pureza relativa	98%	100%	100%	100%
Integridad molecular				
SDS-PAGE en condiciones no reductoras - patrón de gel	Se ajusta	No se ajusta	Se ajusta	Se ajusta
Heterogeneidad de carga HPLC (WCX) - ácida	40%	36%	44%	41%
- neutra	55%	59%	53%	56%
- Isoformas básicas (% de área)	5%	5%	2%	3%
pH (potenciometría)	5,5	5,5	5,5	5,5
Material particulado (partículas visibles)	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Material particulado (partículas subvisibles)	313	Sin analizar	Sin analizar	22
Número de partículas por vial ≥10 µm	10			1
Número de partículas por vial ≥25 µm				
Integridad de cierre	Cumple	Sin analizar	Sin analizar	Cumple
Contaminación microbiana TAMC	<1 UFC/2 ml	Sin analizar	Sin analizar	<1 UFC/2 ml
TAnMC	<1 UFC/2 ml	Sin analizar	Sin analizar	<1 UFC/2 ml

EJEMPLO DE REFERENCIA 9 - Desarrollo de una formulación de concentración de anticuerpo ultraalta para administración subcutánea

Sobre la base de los resultados exitosos de las formulaciones tamponadas con citrato para concentraciones de anticuerpos de hasta 150 mg/ml en el Ejemplo 7, se desarrollaron formulaciones de anticuerpos más concentradas (hasta 250 mg/ml) adecuadas para administración subcutánea.

Los datos preliminares mostraron que en la formulación de concentraciones de anticuerpos superiores a 150 mg/ml puede producirse viscosidades más altas que afectan el uso de la formulación.

Tabla 21 - Concentraciones ultraaltas con formulación 14

Muestra	Concentración [mg/ml]	Densidad [kg/m-3]	Viscosidad [mPa]	DLS	Cromatografía de exclusión por tamaño		
				Promedio Z [nm]	HMWP	Monómero	LMWP
Anticuerpo LIGHT Inicial_11_30A	237	1,066	42,29	30	1,3	98,6	0,0
Anticuerpo LIGHT Inicial_11_30B	212	1,059	22,58	39	1,3	98,7	0,0
Anticuerpo LIGHT Inicial_11_30C	181	1,052	13,57	28	1,3	98,7	0,1
Anticuerpo LIGHT Inicial_11_30D	173	1,046	8,8	27	1,2	98,8	0,0
Anticuerpo LIGHT Inicial_11_30E	143	1,039	6,16	25	1,1	98,8	0,1

Como puede observarse en la Tabla 21, la viscosidad disminuye con concentraciones de anticuerpos más bajas, pero aún se encuentra en un nivel aceptable en la concentración más alta formulada con la formulación 14. Todos los demás parámetros parecían no verse afectados o solo ligeramente afectados por las concentraciones ultraaltas.

Como se muestra en la Tabla 22, las concentraciones de anticuerpos no afectaron a la estabilidad de las formulaciones, lo que se indicó mediante datos de estabilidad de 1 mes idénticos a largo plazo y condiciones de estrés.

Tabla 22 - Datos de estabilidad a 1 mes de formulaciones de Anticuerpos Inicial concentradas de forma ultraalta

	Concentración [mg/ml]	HMWP	Monómero	LMWP
Anticuerpo LIGHT Inicial_11_30A 40 ºC	237	4,7	95,2	0,2
Anticuerpo LIGHT Inicial_11_30B 40 ºC	212	4,4	95,4	0,2
Anticuerpo LIGHT Inicial_11_30C 40 ºC	181	5,8	91,7	2,6
Anticuerpo LIGHT Inicial_11_30D 40 ºC	173	3,9	96,0	0,2
Anticuerpo LIGHT Inicial_11_30E 40 ºC	143	4,2	94,7	1,1
Anticuerpo LIGHT Inicial_11_30A 5 ºC	237	1,4	98,6	0,0
Anticuerpo LIGHT Inicial_11_30B 5 ºC	212	1,3	98,7	0,0
Anticuerpo LIGHT Inicial_11_30C 5 ºC	181	1,3	98,7	0,0
Anticuerpo LIGHT Inicial_11_30D 5 ºC	173	1,2	98,8	0,0
Anticuerpo LIGHT Inicial_11_30E 5 ºC	143	1,1	98,9	0,0

Estudios de preformulación anti-CXCR5 (20 mg/ml)

Se utilizó un anticuerpo IgG4 anti-CXCR5 humanizado que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26 (el "Anticuerpo CXCR5 Inicial") en los Ejemplos 10-12 para determinar las condiciones de

formulación óptimas para una formulación de 20 mg/ml.

El Anticuerpo Inicial es un anticuerpo monoclonal humanizado (mAB) específico para CXCR5 humano, con un marco estructural de IgG4 manipulado genéticamente que contiene 2 sustituciones de aminoácidos destinadas a reducir las medias moléculas (S241P) y las funciones efectoras (L248E). La estructura de la proteína Anticuerpo CXCR5 Inicial está compuesta por dos cadenas ligeras kappa, cada una con un peso molecular de aproximadamente 24 kDa, y dos cadenas pesadas IgG4, cada una con un peso molecular de aproximadamente 48 kDa, unidas a través de puentes disulfuro. Cada cadena ligera consta de 219 residuos de aminoácidos y cada cadena pesada consta de 437 residuos de aminoácidos.

Los datos en los Ejemplos 10-12 se recogieron durante las actividades de preformulación para el Anticuerpo CXCR5 Inicial y su producto farmacológico para administración intravenosa y subcutánea. El objetivo de los estudios de preformulación fue proporcionar una buena estabilidad de las soluciones de Anticuerpo CXCR5 Inicial tamponadas con una concentración diana de 20 mg/ml, con especial énfasis en el comportamiento de agregación del Anticuerpo CXCR5 Inicial y su tendencia a formar medias moléculas, dado que el Anticuerpo Inicial es un anticuerpo de la subclase IgG4, que es propenso a la agregación y la formación de partículas.

Materiales

Sustancia farmacológica (DS)

El lote de anticuerpos CXCR5 Inicial RSN0151 se formuló en PBS pH 7,2 con una concentración de 5,13 mg/ml.

Excipientes

La Tabla 23 muestra los excipientes que se utilizaron durante los estudios de preformulación.

Tabla 23 - Excipientes utilizados durante la preformulación

Excipientes	**Art. Nº/carga**	**Proveedor**
Ácido acético	A002630	MTP / VWR International SAS
Arginina-HCl	A1700	AppliChem
Arginina	1.01587	Merck
Alcohol bencílico	113594	Industrial Affairs / Harrmann & Reimer
Ácido cítrico	100241	Merck
Dextrano 40	CL-AO19A	Meito Sangyo
Glicina	113560	Industrial Affairs[1] / Tessenderlo Chemie.
HCl	114027	Industrial Affairs[1] / Merck
Histidina	1.04352	Merck
Dihidroenofosfato de potasio	1.04871	Merck
Lisina	62840	Fluka
Cloruro de magnesio	814733	Merck
Maltosa	105911	Merck
Manitol	A000780	MTP / Roquette Freres
Acetato de sodio	1.06265	Merck
Cloruro de sodio	10158	Industrial Affairs[1] / Riedel de Haen
Hidróxido de sodio	114076	Industrial Affairs[1] / Merck
Citrato de sodio	114196	Industrial Affairs[1] / Boehringer Ingelheim KG
Hidrogenofosfato de disodio anhidro	1.06586	Merck
Polisorbato 20	139850	Industrial Affairs[1] / Fluka
Succinato/ácido succínico	14079	Fluka

Excipientes	Art. Nº/carga	Proveedor
Sacarosa	S3929	Sigma-Aldrich
Trehalosa-dihidrato	T9531	Sigma-Aldrich
Trometamol	114011	Industrial Affairs / Merck

Procedimientos

Los siguientes procedimientos se utilizaron para fabricar las formulaciones experimentales y las formulaciones de la invención que contienen el Anticuerpo CXCR5 Inicial.

Fabricación y composición de tampones.

Todos los tampones se produjeron agitando constantemente para disolver los excipientes respectivos. El pH se ajustó utilizando HCl 0,1 M o NaOH 0,1 M. La concentración general de todos los tampones fue de 10 mM.

Fabricación y composición de soluciones madre de excipientes.

Todas las soluciones madre se produjeron agitando constantemente para disolver los excipientes. Las concentraciones se dieron como peso/peso (p/p).

UF/DF - pequeña escala

Los experimentos de UF/DF se realizaron utilizando unidades Vivaspin (Sartorius Stedim, Göttingen, Alemania) con una membrana Hydrosart y un límite de corte de 30 kDa para eliminar el tampón de fosfato y reemplazarlo por los tampones apropiados y aumentar la concentración. Estas unidades se colocaron en una centrifugadora de laboratorio común (Multifuge 3S, Haereus, Alemania) y se centrifugaron a 2000 rpm (860 G, radio del rotor 192 mm) a + 5 ºC.

UF/DF - escala más grande

Los experimentos de UF/DF se realizaron utilizando unidades Vivaflow (Sartorius Stedim, Göttingen, Alemania) con una membrana Hydrosart y un límite de corte de 30 kDa para eliminar el tampón de fosfato y reemplazarlo por los tampones apropiados y aumentar la concentración. El equipo se colocó dentro de un banco de trabajo limpio en condiciones asépticas y el proceso se realizó a temperatura ambiente.

Filtración estéril de muestras.

Todas las muestras, soluciones, tampones, etc. se filtraron de forma estéril (0,22 µm) utilizando una membrana Sartopore-2. Las muestras se filtraron vertiéndolas en frascos o viales esterilizados y se cerraron en condiciones asépticas dentro de un banco de trabajo limpio para evitar la contaminación microbiológica.

Ensayo de estrés mecanico

El estrés mecánico con una velocidad de agitación de 350 rpm/min durante 2,5 horas a temperatura ambiente se realizó utilizando un aparato de agitación de laboratorio horizontal con una distancia de 26 mm (aparato de agitación y campana de incubación de Bühler Company). Los viales 2R se llenaron con 1 ml de solución con un espacio de cabeza de aproximadamente 2,5 cm^3.

Se planificó y realizó un ensayo de estrés mecánico durante los primeros estudios de preformulación. Como los resultados analíticos no mostraron ninguna información adicional en comparación con los ensayos de estrés térmico, durante la selección del tampón o la selección del pH, este ensayo solo se usó durante la selección del tensioactivo.

Ensayo de estrés termico

El estrés térmico se utilizó como ensayo de estrés acelerado durante todas las etapas del programa de preformulación. Las muestras se almacenaron a +40 ºC durante 24 h, 7 días o 3 meses, según el estudio.

Procedimientos analíticos en relleno de la formulación y acabado

Los siguientes procedimientos analíticos se usaron en los siguientes ejemplos.

Apariencia

La apariencia de las soluciones de anticuerpos se verificó visualmente y, además, se documentó tomando una fotografía con una cámara.

pH

Todas las mediciones de pH se realizaron utilizando un medidor de pH con un microelectrodo.

Concentración utilizando UV

La concentración de proteína de todas las soluciones de anticuerpos se midió contra el tampón utilizando un Nanodrop ND1000. Las concentraciones de proteína cercanas o inferiores a 5 mg/ml se diluyeron 1:3, y las concentraciones de proteína más altas cercanas a 20 mg/ml se diluyeron 1:20, antes de medir la absorción a 215 nm y 280 nm.

Dispersión dinámica de la luz (DLS)

El diámetro hidrodinámico de la molécula se midió usando dispersión de luz láser. Las muestras se filtraron de forma estéril antes de la analítica si se observaba turbidez, por lo que solo se podían detectar agregados solubles.

Ensayo de tioflavina

Las mediciones de fluorescencia de algunas muestras de preformulación se llevaron a cabo utilizando un Tecan GENios Plus, XFLOUR4. Las muestras se sometieron a estrés mecánico (4 h a +37 ºC, velocidad de agitación 300 unidades/min y 26 mm de distancia en un aparato de agitación y campana de incubador de la empresa Bühler). Los espectros de fluorescencia de tioflavina-T se midieron a temperatura ambiente. Se añadieron 10 µl de solución de tioflavina-T (10,1 mM en agua ultrapura) a 1 ml de las formulaciones y se mezclaron suavemente. La mezcla se distribuyó luego en una copa negra en forma de V de Eppendorf y después en una placa de 96 pocillos (100 µl por pocillo).

El ensayo de tioflavina-T se utilizó al inicio de las actividades de preformulación para detectar agregados insolubles. Pero, como estos agregados se pueden observar visualmente como una turbidez de la solución, este procedimiento no se utilizó para todo el programa de preformulación.

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Se examinaron partes alícuotas de las muestras de preformulación mediante DSC utilizando un DSC VPCapillary de Microcal y se analizaron en el instrumento de muestreo automático a 90 ºC/h con un tiempo de filtro de 2 segundos. Se colocaron muestras de 400 µl en placas de 96 pocillos y se analizaron para determinar la temperatura de desplegamiento Tm.

Osmolaridad

La osmolaridad se midió utilizando un osmómetro Knaur automatizado.

Densidad

La densidad de las formulaciones se midió utilizando un viscosímetro de esfera descendente DMA4500 Anton Paar.

Procedimientos analíticos en bioanalítica FF.

Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)

Los oligómeros/dímeros de los anticuerpos se cuantificaron utilizando cromatografía de exclusión por tamaño. El ensayo se llevó a cabo mediante HPLC isocrática con una columna SUPERDEX 200 10/300.

SDS-PAGE, reductor y no reductor

Se usó electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) para analizar la integridad molecular (por ejemplo, medias moléculas) y aparición de productos de degradación. Este análisis por electroforesis se realizó con geles homogéneos al 15% en condiciones reductoras y no reductoras. Las proteínas se visualizaron con tinción de plata después de la separación por electroforesis.

WCX

Se usó una cromatografía de intercambio catiónico débil (WCX) para controlar la heterogeneidad de carga del

anticuerpo. Se informó del porcentaje de isoformas básicas, neutras y ácidas. El ensayo se llevó a cabo mediante HPLC discontinua con una columna ProPac WCX10.

ELISA de antígeno

El ELISA de antígeno se realizó para determinar la funcionalidad del anticuerpo. La propiedad de unión a un péptido 28-mérico del antígeno CXCR5 se controló en comparación con el patrón actual del anticuerpo. Esta potencia fue comunicada como la CE50 relativa.

Enfoque isoeléctrico (IEF)

Se realizó un IEF.

Almacenamiento

Todas las soluciones tampón, soluciones de excipientes y muestras se almacenaron a +5 ºC, si no se menciona lo contrario.

RESUMEN DE TODAS LAS FORMULACIONES PREPARADAS Y ANALIZADAS

La Tabla 24 a continuación muestra un resumen de todas las formulaciones que se prepararon y analizaron en los Ejemplos 10-12. Cada una de las formulaciones contenía el Anticuerpo CXCR5 Inicial. PBS significa solución salina tamponada con fosfato. PB significa tampón de fosfato. PS significa polisorbato. LA significa el Anticuerpo CXCR5 Inicial.

Tabla 24 - **Resumen de todas las formulaciones preparadas y analizadas.**

Numero de muestra	Tampón	pH
LA_09_05-1	PBS 155 mM	7,5
LA _09_05-2	PBS 155 mM	7,0
LA_09_05-3	PBS 155 mM	6,5
LA_09_06-1	PB 5 mM	7,5
LA_09_06-2	PB 5 mM	7,0
LA_09_06-3	PB 5 mM	6,5
LA_09_07-1	PB 10 mM	7,5
LA_09_07-2	PB 10 mM	7,0
LA_09_07-3	PB 10 mM	6,5
LA_09_08-1	Citrato 10 mM	7,0
LA_09_08-2	Citrato 10 mM	6,5
LA_09_08-3	Citrato 10 mM	6,0
LA_09_08-4	Citrato 10 mM	5,5
LA_09_08-5	Citrato 10 mM	5,0
LA_09_09-1	Solución salina 150 mM	6,0
LA_09_10-1	Acetato 10 mM	5,5
LA_09_10-2	Acetato 10 mM	5,0
LA_09_11-1	Succinato 10 mM	6,0
LA_09_11-2	Succinato 10 mM	5,5
LA_09_11-3	Succinato 10 mM	5,0
LA_09_12-1	Histidina 10 mM	6,5
LA_09_12-2	Histidina 10 mM	6,0
LA_09_12-3	Histidina 10 mM	5,5

Numero de muestra	Tampón	pH
LA_09_13-1	Glicina 10 mM	8,0
LA_09_13-2	Glicina 10 mM	7,0
LA_09_14-1	Arginina 10 mM	8,0
LA_09_14-2	Arginina 10 mM	6,0
LA_09_15-1	TRIS 10 mM	8,5
LA_09_15-2	TRIS 10 mM	7,5
LA_09_16	Citrato 10 mM	6,0
LA_09_16_1	Citrato 10 mM/PS20	6,0
LA_09_16_2	Citrato 10 mM/PS80	6,0
LA_09_16_3	Citrato 10 mM/LutrolF68	6,0
LA_09_16_4	Citrato 10 mM/Cremophor	6,0
LA_09_16_5	Citrato 10 mM/SolutolHS15	6,0
LA_09_16_6	Citrato 10mM/SDS	6,0
LA_09_17	Acetato 10 mM	5,5
LA_09_17_1	Acetato 10 mM + PS20	5,5
LA_09_17_2	Acetato 10 mM + PS80	5,5
LA_09_17_3	Acetato 10 mM + Lutrol F68	5,5
LA_09_17_4	Acetato 10 mM + Cremophor R40	5,5
LA_09_17_5	Acetato 10 mM + Solutol HS15	5,5
LA_09_17_6	Acetato 10 mM + SDS	5,5
LA_09_18	Succinato 10 mM	5,0
LA_09_18_1	Succinato 10 mM + PS20	5,0
LA_09_18_2	Succinato 10 mM + PS80	5,0
LA_09_18_3	Succinato 10 mM + Lutrol F68	5,0
LA_09_18_4	Succinato 10 mM + Cremophor	5,0
LA_09_18_5	Succinato 10 mM + Solutol HS15	5,0
LA_09_19	Histidina 10 mM	5,5
LA_09_19_1	Histidina 10 mM + PS20	5,5
LA_09_19_2	Histidina 10 mM + PS80	5,5
LA_09_19_3	Histidina 10 mM + Lutrol F68	5,5
LA_09_19_4	Histidina 10 mM + Cremophor	5,5
LA_09_19_5	Histidina 10 mM + Solutol HS15	5,5
LA_09_20	Arginina 10 mM	6,0
LA_09_20_1	Arginina 10 mM + PS20	6,0
LA_09_20_2	Arginina 10 mM + PS80	6,0
LA_09_20_3	Arginina 10 mM + Lutrol F68	6,0
LA_09_20_4	Arginina 10 mM + Cremophor	6,0
LA_09_20_5	Arginina 10 mM + Solutol HS15	6,0
LA_09_21	Histidina 10 mM + PS20	5,5
LA_09_22	PBS 155 mM	7,2

Numero de muestra	Tampón	pH
LA_09_22_1	PBS 155 mM	7,2
LA_09_22_2	PBS 155 mM + NaCl	7,2
LA_09_22_3	PBS 155 mM + $MgCl_2$	7,2
LA_09_22_4	PBS 155 mM + $CaCl_2$	7,2
LA_09_22_5	PBS 155 mM + manitol	7,2
LA_09_22_6	PBS 155 mM + maltosa	7,2
LA_09_22_7	PBS 155 mM + trehalosa	7,2
LA_09_22_8	PBS 155 mM + sacarosa	7,2
LA_09_22_9	PBS 155 mM + Dextran40	7,2
LA_09_22_10	PBS 155 mM + alcohol bencílico	7,2
LA_09_22_11	PBS 155 mM + arginina	7,2
LA_09_22_12	PBS 155 mM + lisina	7,2
LA_09_23	Citrato 10 mM (= LA_09_16)	6,0
LA_09_23_1	Citrato 10 mM	6,0
LA_09_23_2	Citrato 10 mM + NaCl	6,0
LA_09_23_3	Citrato 10 mM + $MgCl_2$	6,0
LA_09_23_4	Citrato 10 mM + manitol	6,0
LA_09_23_5	Citrato 10 mM + maltosa	6,0
LA_09_23_6	Citrato 10 mM + trehalosa	6,0
LA_09_23_7	Citrato 10 mM + sacarosa	6,0
LA_09_23_8	Citrato 10 mM + alcohol bencílico	6,0
LA_09_23_9	Citrato 10 mM + arginina	6,0
LA_09_23_10	Citrato 10 mM + lisina	6,0
LA_09_24	Acetato 10 mM (= LA_09_17)	5,5
LA_09_24_1	Acetato 10 mM	5,5
LA_09_24_2	Acetato 10 mM + NaCl	5,5
LA_09_24_3	Acetato 10 mM + $MgCl_2$	5,5
LA_09_24_4	Acetato 10 mM + manitol	5,5
LA_09_24_5	Acetato 10 mM + maltosa	5,5
LA_09_24_6	Acetato 10 mM + trehalosa	5,5
LA_09_24_7	Acetato 10 mM + sacarosa	5,5
LA_09_24_8	Acetato 10 mM + alcohol bencílico	5,5
LA_09_24_9	Acetato 10 mM + arginina	5,5
LA_09_24_10	Acetato 10 mM + lisina	5,5
LA_09_25	Histidina 10 mM (= LA_09_19)	5,5
LA_09_25_1	Histidina 10 mM + NaCl 50 mM	5,5
LA_09_25_2	Histidina 10 mM + $MgCl_2$ 50 mM	5,5
LA_09_25_3	Histidina 10 mM + 5% de manitol	5,5
LA_09_25_4	Histidina 10 mM + 10% de maltosa	5,5
LA_09_26_1	Histidina 10 mM + PS20 (= LA_09_21)	5,5

Numero de muestra	Tampón	pH
LA_09_26_2	Histidina 10 mM + PS20 + NaCl 50 mM	5,5
LA_09_26_3	Histidina 10 mM + PS20 + $MgCl_2$ 50 mM	5,5
LA_09_26_4	Histidina + PS20 + 5% de manitol	5,5
LA_09_26_5	Histidina + PS20 + 10% de maltosa	5,5
LA_09_26_6	Histidina + PS20 + 6% de trehalosa	5,5
LA_09_26_7	Histidina + PS20 + 5% de sacarosa	5,5
LA_09_26_8	Histidina + PS20 + 9 mg de alcohol bencílico	5,5
LA_09_26_9	Histidina + PS20 + arginina-HCl 20 mM	5,5
LA_09_26_10	Histidina + PS20 + lisina 20 mM	5,5
LA_09_27	Citrate 10 mM + PS20	6,0
LA_09_27_A	Citrato 10 mM + Formulación prototipo PS20	6,0
LA_09_27_B	Citrato 10 mM + Formulación prototipo PS20	6,0
LA_09_27_C	Citrato 10 mM + Formulación prototipo PS20	6,0
LA_09_27_D	Citrato 10 mM + Formulación prototipo PS20	6,0
LA_09_28	Acetato 10 mM + PS20	5,5
LA_09_28_A	Acetato 10 mM + formulación prototipo PS20	5,5
LA_09_28_B	Acetato 10 mM + formulación prototipo PS20	5,5
LA_09_28_C	Acetato 10 mM + formulación prototipo PS20	5,5
LA_09_28_D	Acetato 10 mM + formulación prototipo PS20	5,5
LA_09_29	Histidina 10 mM + PS20	5,0
LA_09_29_A	Formulación prototipo de histidina 10 mM + PS20	5,0
LA_09_29_B	Formulación prototipo de histidina 10 mM + PS20	5,0
LA_09_29_C	Formulación prototipo de histidina 10 mM + PS20	5,0
LA_09_29_D	Formulación prototipo de histidina 10 mM + PS20	5,0

Ejemplo 10 - Formulación de tampón de fosfato

A continuación se ofrece una descripción general de los resultados de la caracterización de la sustancia farmacológica Anticuerpo CXCR5 Inicial en un tampón de fosfato.

IEF

El pI (punto isoeléctrico) del Anticuerpo CXCR5 Inicial se calculó teóricamente como 7,6 y se confirmó mediante enfoque isoeléctrico desnaturalizado (pI de 7,6 a 8,4). Véase la **figura 11**.

SDS-PAGE

Se usó SDS-PAGE para determinar el peso molecular del monómero de anticuerpo, los agregados potenciales o la presencia de medias moléculas. La **figura 12** mostró un ejemplo de un gel SDS-PAGE para comparar diferentes lotes de sustancias farmacológicas en condiciones reductoras y no reductoras.

ELISA

La **figura 13** muestra un ejemplo de un gráfico ELISA para determinar la actividad de unión al antígeno del Anticuerpo Inicial.

SEC

Como se muestra en la **figura 14**, la cromatografía de exclusión por tamaño detectó proteínas de alto peso molecular (HMWP), por ejemplo, di-/oligómeros o agregados y proteínas de bajo peso molecular (LMWP) o

productos de degradación. El lote de Anticuerpo CXCR5 Inicial tenía una pureza del 99% de contenido de monómero.

WCX

La cromatografía de intercambio catiónico débil para el anticuerpo de plomo se muestra en la **figura 15**, que representa heterogeneidad de carga. Durante los estudios de estabilidad, la disposición de los picos ácidos cambió y aumentó el porcentaje de isoformas básicas. El Anticuerpo CXCR5 Inicial tenía una distribución de isoformas ácidas/neutras/básicas del 14/85/1%.

Dispersión dinámica de la luz

Tal como se muestra en la **figura 16** se usó DLS para determinar el diámetro hidrodinámico del monómero de anticuerpo y los posibles agregados solubles.

En conclusión, el Anticuerpo Inicial podría ser estable en PBS, pero la formación de agregados es fácil de generar por fuerzas de corte o estrés lumínico.

Además, el pH de PBS está cerca del pI del Anticuerpo CXCR5 Inicial. Por lo tanto, la formulación debe formularse al menos un grado de pH por debajo del pI.

La Tabla 25 muestra los resultados de un estudio de estabilidad de tres meses para el Anticuerpo CXCR5 Inicial. El Anticuerpo Inicial se almacenó a diferentes temperaturas y se analizó después de uno y tres meses.

Tabla 25 - **Resultados analíticos de un estudio de estabilidad de 3 meses de DS**

Temperatura				**5 ºC**			**-20 ºC**		**25 ºC**	
Procedimiento		**Elemento de ensayo**	**Espec. para la liberación**	**Liberación**	**1 mes**	**3 meses**	**1 mes**	**3 meses**	**1 mes**	**3 meses**
Apariencia	**Color**		Supervisión	> B9,> BY7	> B9,> BY7	> B9,> BY7	> B9,> BY7	> B9,> BY7	> B9,> BY7	> B9,> BY7
	Transparencia		Supervisión	<I	<I	<I	<I	<I	<I	<I
Identidad	**IEF**		Ajustarse	8,30-7,50*	8,31-7,60	8,31-7,51	8,30-7,63	8,34-7,57	8.30-7.58	8.31-7.61
Potencia	**UV**	mg/ml	Supervisión	5,13	5,26	5,18	5,14	5,16	5.20	5.11
	SEC	Monómero (mg/ml)	Supervisión	5,34	5,04	5,13	5,02	5,11	5.00	5.08
	Ag-ELISA	EC50%	50-200	100	83	112	132	93	106	108
Pureza	**SDS-PAGE reducido**	valores kD	Supervisión	46,8/26,1	47,4/25,5	47,4/25,0	46,8/25,2	47,9/25,2	46.5/25.7	47.2/25.2
		patrón de gel	Supervisión	No se ajusta	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios
	SDS-PAGE no reducido	valores kD	Supervisión	134,6	128,0	147,5	128,4	145,9	131.3	147.1
		patrón de gel	Supervisión	Se ajusta	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios
		Medias moléculas		< 5%	< 5%	< 5%	< 5%	< 5%	< 5%	< 5%
	Inmuno-transferencia Western reducida	patrón de gel		No se ajusta	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	Bandas adicionales (155.0kD, 134.4kD)
	Inmuno-transferencia Western no reducida	patrón de gel		No se ajusta	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	Bandas adicionales (117.2kD, 33.0kD)
	SDS-PAGE plata reducida	patrón de gel		No se ajusta	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios
	SDS-PAGE plata no reducida	patrón de gel		Se ajusta	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	Banda adicional (122.5 kD)
	SEC	% Monómero	≥ 90	99,8	99,8	99,7	99,7	99,7	99.5	99.4
Hetero-geneidad de carga	**WCX**	(ácido/neutro/básico) (%)		13,9/84,9/1,2	13,2/86,2/0,6	13,1/86,1/0,8	13,1/86,1/0,9	13.3/85.5/1,2	13.0/85.8/1.3	12.6/85.2/2.2
pH	**pH**		5.5-8,0	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2	7.2	7.2

* Inicialmente comunicó pH 8,61-7,66

Los datos de estabilidad a 3 meses con el Anticuerpo CXCR5 Inicial tamponado en PBS indicaron que no hubo cambios relevantes a +5 ºC y -20 ºC de almacenamiento. Después de 3 meses en condiciones aceleradas (+25 ºC), se pudieron observar cambios significativos. Las bandas adicionales, analizadas mediante SDS-PAGE y análisis de inmunotransferencia Western, mostraron un aumento de las isoformas básicas y una disminución de las isoformas ácidas, lo que sugiere productos de degradación.

Ejemplo 11 - Optimización de tampón y pH

El PBS pH 7,2 mostró agregación y degradación después de los ciclos de congelación/descongelación y después del almacenamiento de congelación. Por lo tanto, fue necesario encontrar otro tampón y un mejor intervalo de pH. Además, el PBS no es adecuado para congelar las soluciones, ya que se produce un cambio de pH.

Se utilizaron 30 tampones diferentes con varios pH y sistemas de tampón para seleccionar el mejor rango de pH. Estos experimentos se realizaron en una escala muy pequeña y se analizaron intensivamente.

Cribado de selección del mejor tampon y pH - pequeña escala (rendimiento 5 ml)

Los resultados analíticos se resumen en la Tabla 40, Tabla 41, Tabla 42 y Tabla 43.

En la **figura 17** y la **figura 18**, se muestra la aparición de dos sistemas tampón adecuados (acetato e histidina) después del estrés térmico. Se eligieron pH 5,5 en acetato y pH 5,0 en histidina para una evaluación adicional. A modo de comparación, en la **figura 19**, se muestra la apariencia de un sistema de tampón incompatible (tampón de TRIS).

Se seleccionaron los siguientes tampones para analizar en una escala UF/DF más grande:

- Citrato 10 mM, pH 6
- Acetato 10 mM, pH 5,5
- Succinato 10 mM, pH 5
- Histidina 10 mM, pH 5
- Arginina 10 mM, pH 6

Cribado de selección del mejor tampon y pH - gran escala (rendimiento ~20 g)

Después de seleccionar los mejores tampones y el pH, se preparó una mayor cantidad de Anticuerpo CXCR5 Inicial en cada sistema de tampón utilizando el sistema Sartorius Vivaflow. Cada lote se analizó analíticamente y los resultados se describen a continuación.

Tampón de citrato 10 mM, pH 6 (LA_09_016)

La etapa de UF/DF funcionó bien y solo se obtuvo una solución ligeramente turbia; no se encontraron dificultades durante la filtración estéril. No se observó aumento del diámetro hidrodinámico, analizado por DLS.

Los resultados analíticos indicaron que no hay aumento en los dímeros y no hay cambios en las isoformas básicas o ácidas en comparación con el material del lote de Anticuerpo CXCR5 Inicial. Véase la Tabla 26 y la **figura 20**.

Tabla 26 - Resultados analíticos del Anticuerpo Inicial en tampón de citrato pH 6

Muestra	pH	Apariencia	Conc. UV	DLS	Rendimiento	Tm
LA_09_016	6,0	Ligeramente turbio después de UF/DF, Transparente después de la filtración	18,2 mg/ml	12,73 nm	20,8 g	79,4 ºC

Tampón de acetato 10 mM, pH 5,5 (LA_09_017)

La etapa de UF/DF funcionó bien, pero se obtuvo una solución turbia; bloqueo del filtro durante la filtración estéril.

Los resultados analíticos indicaron que no hay aumento en los dímeros y no hay cambios en las isoformas básicas o ácidas en comparación con el material del lote de Anticuerpo CXCR5 Inicial. Véase la Tabla 27 y la **figura 21**.

Tabla 27 - Resultados analíticos del Anticuerpo Inicial en un tampón de acetato pH 5,5

Muestra	pH	Apariencia	Conc. UV	DLS	Rendimiento	Tm
LA_09_017	5,5	Ligeramente turbio después de UF/DF, Transparente después de la filtración	17,8 mg/ml	12,22 nm	20,4 g	77,7 ºC

Tampón de succinato 10 mM, pH 5 (LA_09_018)

La filtración estéril después de UF/DF fue difícil de realizar debido a la obstrucción del filtro. El rendimiento de 12 g fue muy bajo.

Los resultados analíticos indicaron una ligera disminución en los dímeros y ningún cambio en las isoformas básicas o ácidas en comparación con el material del lote de Anticuerpo CXCR5 Inicial. Después del estrés mecánico, la concentración del dímero aumentó ligeramente y el pico de isoformas ácidas en WCX disminuyó a medida que aumentaban las isoformas básicas. Véase la Tabla 28 y la **figura 22**.

Tabla 28 - **Resultados analíticos del Anticuerpo Inicial en un tampón de succinato pH 5**

Muestra	pH	Apariencia	Conc. UV	Rendimiento	DLS	Tm
LA_09_018	4,9	Ligeramente turbio después de UF/DF, Transparente después de la filtración	22,4 mg/ml	12 g	12,82 nm	73,3 ºC

Tampón de histidina 10 mM, pH 5 (LA_09_019)

La filtración estéril después de UF/DF fue muy difícil de realizar debido al bloqueo del filtro. El rendimiento de 10,5 g fue muy bajo.

Los resultados analíticos indicaron una ligera disminución en los dímeros y ningún cambio en las isoformas básicas o ácidas en comparación con el material de lote del Anticuerpo CXCR5 Inicial. Después del estrés mecánico, la concentración del dímero aumentó ligeramente y el pico de isoformas ácidas en WCX disminuyó a medida que aumentaban las isoformas básicas. Véase la Tabla 29 y la **figura 23**.

Tabla 29 - Resultados analíticos del Anticuerpo Inicial en el tampón de histidina pH 5

Muestra	pH	Apariencia	Conc. UV	Rendimiento	DLS	Tm
LA_09_019	5,4	Ligeramente turbio después de UF/DF, Transparente después de la filtración	23,4 mg/ml	10,5 g	11,32 nm	nd

Tampón de arginina 10 mM, pH 6 (LA_09_020)

La filtración estéril después de UF/DF fue muy difícil de realizar. La DLS mostró un pico presentado con un diámetro hidrodinámico de 21,08 nm, lo que podría indicar la formación de dímeros.

Los resultados analíticos indicaron un ligero aumento en los dímeros del 0,29% en el lote de Anticuerpo CXCR5 Inicial al 0,49% en arginina. Después del estrés mecánica, se encontró el 0,61% de dímeros y se detectó un aumento en las isoformas básicas en WCX. Véase la Tabla 30 y la **figura 24**.

Tabla 30 - Resultados analíticos del Anticuerpo Inicial en el tampón de arginina pH 5

Muestra	pH	Apariencia	Conc. UV	Rendimiento	DLS	Tm
LA_09_020	6,2	Ligeramente turbio después de UF/DF, Transparente después de la filtración	22,5 mg/ml	15,3 g	21,08 nm	nd

En conclusión, tres de los cinco lotes son compatibles con el Anticuerpo CXCR5 Inicial en una concentración de 20 mg/ml:

- Citrato pH 6,0
- Acetato pH 5,5
- Histidina pH 5,0

Estos lotes se caracterizaron en términos de compatibilidad y estabilidad más detalladamente.

Ejemplo 12 - Compatibilidad con excipientes

Todos los lotes mencionados anteriormente se usaron para estudios de compatibilidad con tensioactivos. Los

estudios de compatibilidad se realizaron con el Anticuerpo CXCR5 Inicial y cuatro tampones seleccionados. El succinato pH 5,0 y la arginina pH 6,0 no se analizaron ya con excipientes, ya que estos tampones no eran compatibles con el Anticuerpo CXCR5 Inicial. Los excipientes se clasificaron de la siguiente manera:

- Tensioactivos
- Azúcares
- Sales
- Otros (aminoácidos, conservante)

Se aplicó estrés mecánica (velocidad del aparato de agitación 350/min, 2,5 h, temperatura ambiente) para analizar el efecto de los tensioactivos, y se usó estrés térmico (+40 ºC, una semana) para analizar todos los demás excipientes.

Tensioactivos

Los estudios de orientación sobre la selección del tipo de tensioactivos (LA_08_001) y la concentración de tensioactivo (LA_09_003; 0,01%, 0,05% y 0,1%) indicaron que una concentración del 0,01% era suficiente para prevenir agregados visibles. Los tensioactivos siguientes no eran adecuados para el Anticuerpo CXCR5 Inicial: PVP K12 y K17, ya que ambos mostraban turbidez antes de aplicar estrés mecánica. Además, se demostró que los tensioactivos iónicos como el dodecilsulfato de sodio no eran compatibles con las soluciones de proteínas del Anticuerpo CXCR5 Inicial.

Como ejemplo, la **figura 25** muestra la apariencia de diferentes soluciones tamponadas con citrato con varios tensioactivos después de estrés mecánico, y en comparación con una solución sin ningún tensioactivo. Los resultados analíticos se recogen en la Tabla 44 y la Tabla 45.

Otros excipientes

Después de un estrés térmico de +40 ºC durante una semana y la determinación analítica, se pudo proporcionar una selección de excipientes compatibles con el Anticuerpo CXCR5 Inicial en diferentes sistemas de tampón.

Algunos excipientes no se pudieron analizar en los cuatro sistemas de tampón, ya que solo había un pequeño volumen de muestra disponible.

Después de revisar todos los datos analíticos, se identificó que los excipientes en la Tabla 31 son compatibles con el Anticuerpo CXCR5 Inicial. Estos excipientes no mostraron un aumento significativo en dímeros, HMWP o isoformas básicas analizadas por SEC y WCX.

Todas las medidas de diámetro hidrodinámico indicaban un pico de monómero agudo y la Tm de los excipientes adecuados no disminuía en comparación con el Anticuerpo CXCR5 Inicial en el respectivo sistema tampón. Todos los datos analíticos se resumieron en la Tabla 46, Tabla 47, Tabla 48 y Tabla 49.

Tabla 31 - Compatibilidad de todos los excipientes analizados en los diferentes sistemas tampón

	PBS pH 7,2	**Citrato pH 6,0**	**Acetato pH 5,5**	**Histidina pH 5,0**
NaCl	X	X	X	
$MgCl_2$	X	X	X	X
$CaCl_2$	X	Nd	Nd	Nd
Manitol		X	X	X
Maltosa				
Trehalosa		X	X	Nd
Sacarosa	X	X	X	Nd
Dextrano		Nd	Nd	Nd
Alcohol de bencilo				Nd
Arginina-HCl	X	X	X	Nd
Lisina			X	Nd

En conclusión, los estudios de compatibilidad con tensioactivos muestran claramente que el polisorbato 20 es adecuado para todos los tampones seleccionados en combinación con el Anticuerpo CXCR5 Inicial a 20 mg/ml. El tensioactivo previene la formación de partículas durante el estrés mecánico. Casi todos los demás tensioactivos llevaron a un aumento de HMWP.

Los excipientes siguientes se seleccionaron para formular las diferentes formulaciones prototipo: NaCl, trehalosa (la sacarosa es más o menos comparable a la trehalosa en términos de estabilidad) y Arginina-HCl.

ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL PROTOTIPO DE 3 MESES

Para respaldar el desarrollo de la formulación del Anticuerpo CXCR5 Inicial, se fabricaron doce formulaciones prototipo diferentes y se dispusieron en condiciones diferentes (-20 ºC, +5 ºC y +40 ºC) durante tres meses.

Se seleccionaron tres sistemas de tampón diferentes en base al tampón, el pH y el cribado de excipientes descritos anteriormente.

Citrato pH 6,0 (número de formulación LA_09_027), acetato pH 5,5 (LA_09_028) e histidina pH 5.0 (LA_09_029) se usaron como soluciones tampón 10 mM con 20 mg/ml de Anticuerpo Inicial y cuatro combinaciones diferentes de excipientes (Tabla 32).

Estos cuatro excipientes mostraron resultados prometedores después del cribado del excipiente. Se seleccionó NaCl para ajustar la osmolaridad, se eligió la trehalosa para el ajuste de la tonicidad y tener un azúcar para una opción de liofilización, si fuera necesario. Adicionalmente, la trehalosa puede estabilizar el anticuerpo, y también se seleccionó arginina-HCl como estabilizante. Se encontró que el polisorbato 20 era útil para prevenir la agregación durante el estrés mecánico.

Los siguientes párrafos muestran datos seleccionados que se compilaron durante el estudio de estabilidad para seleccionar el mejor sistema de tampón y los mejores excipientes para el desarrollo de la formulación. En la Tabla 33 se recopilaron todas las condiciones de almacenamiento, los puntos temporales y los procedimientos analíticos.

Tabla 32 - Composiciones de cuatro opciones de formulación diferentes

Formulación	NaCl	α,α-trehalosa * H_2O	Arginina	Polisorbato 20
A	3 mg	25 mg	20 mM	10 mg
B		50 mg		10 mg
C	6 mg		20 mM	10 mg
D		50 mg	20 mM	10 mg

Tabla 33 - Condiciones de almacenamiento y puntos temporales para las pruebas analíticas

Condiciones de almacenamiento	T0	T 21 días	T 6 semanas	T 3 meses
	SEC, WCX, SDS-PAGE, ELISA, Tm, pH, DLS, UV, apariencia, HIAC, osmolaridad			
-80 ºC			SEC, WCX, SDS-PAGE *, Tm, pH, DLS, UV	
-20 ºC		SEC, WCX, SDS-PAGE*, Tm, pH, DLS, UV	SEC, WCX, SDS-PAGE*, Tm, pH, DLS, UV	SEC, WCX, SDS-PAGE*, Tm, pH, DLS, UV, apariencia
+5 ºC		SEC, WCX, SDS-PAGE*, Tm, pH, DLS, UV, HIAC	SEC, WCX, SDS-PAGE*, Tm, pH, DLS, UV	SEC, WCX, SDS-PAGE*, Tm, pH, DLS, UV, apariencia
+40 ºC		SEC, WCX, SDS-PAGE *, Tm, pH, DLS, UV	SEC, WCX, SDS-PAGE *, Tm, pH, DLS, UV	SEC, WCX, SDS-PAGE *, Tm, pH, DLS, UV
* si es razonable				

Desafortunadamente, los datos de estabilidad a los 3 meses del Anticuerpo CXCR5 Inicial en el tampón PBS no fueron comparables con la estabilidad del prototipo debido a las diferencias de lotes y debido a las diferentes condiciones aceleradas.

Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)

En la **figura 26**, se puede observar claramente un aumento de la formación de dímeros de hasta el 10% después de tres meses de almacenamiento en las cuatro formulaciones de histidina. Las formulaciones de acetato mostraron un aumento del contenido de dímeros de hasta el 6%. En las cuatro formulaciones de citrato, la concentración de dímero fue inferior al 2%, incluso después de tres meses a +40 ºC.

Cromatografía de intercambio catiónico débil (WCX)

Como la determinación de isoformas neutras, básicas y ácidas es un buen indicador de la estabilidad de diferentes formulaciones, se utilizaron estos procedimientos para enmendar los datos de la SEC.

En la **figura 27** se puede observar nuevamente que la histidina es peor para la estabilidad del Anticuerpo CXCR5 Inicial en condiciones aceleradas. Se puede observar un ligero aumento de las isoformas básicas para las cuatro formulaciones de acetato, pero curiosamente para las formulaciones de citrato, no es posible la discriminación entre las cuatro formulaciones a este respecto. Adicionalmente, la **figura 28** muestra una fuerte disminución de las isoformas neutras para las formulaciones de histidina, y una ligera disminución en el acetato. Nuevamente, el Anticuerpo CXCR5 Inicial en el citrato es el menos afectado.

SDS-PAGE

Los resultados de las mediciones de SDS-PAGE se pueden encontrar en las tablas de resultados en el apéndice. Véase las Tablas 37-61.

Temperatura de desplegamiento (Tm)

La temperatura de desplegamiento puede usarse para predecir la estabilidad de diferentes formulaciones y se midió en este caso con el equipo Microcal. Cuanto mayor sea la Tm, más prometedoras serán las formulaciones. La precisión de las medidas de Tm fue de +/- 0,4 ºC.

Entre las formulaciones de citrato y acetato, casi no se notaron diferencias entre Tm en T0. Además, las formulaciones A, B y D tenían una Tm ligeramente más alta, en comparación con C. Las formulaciones A, B y D contienen todas trehalosa.

Las formulaciones de histidina tuvieron una Tm significativamente menor en todos los casos.

Tabla 34 - Desplegamiento de temperaturas en T_0

Formulación	LA_09_027	LA_09_028	LA_09_29
A	81,4 ºC	81,1 ºC	79,4 ºC
B	81,5 ºC	81,6 ºC	81,0 ºC
C	80,7 ºC	80,5 ºC	78,9 ºC
D	81,6 ºC	81,7 ºC	80,7 ºC

pH

Como el pH es de gran interés e importancia para la estabilidad de una solución de anticuerpos, se supervisó el pH. Las siguientes figuras muestran el delta de pH entre T0, T1, T2 y T3 en condiciones de almacenamiento acelerado.

Las formulaciones que más estabilizan el pH son las tamponadas con citrato, y especialmente las formulaciones B y D (**figura 29**). En soluciones tamponadas con acetato de Anticuerpo CXCR5 Inicial, el pH se desplazó hacia valores más altos (**figura 30**). En las soluciones tamponadas con histidina, el pH disminuyó ligeramente (**figura 31**).

DLS

El diámetro hidrodinámico del monómero y los posibles agregados solubles se midieron utilizando la dispersión dinámica de la luz.

Solo después del almacenamiento en condiciones aceleradas (+40 ºC), se pudieron observar agregados solubles

<200 nm. Estos agregados se produjeron principalmente en la formulación tamponada con histidina LA_09_029 A, C, D después de 3 semanas de almacenamiento.

Las formulaciones tamponadas con citrato mostraron solo ligeros agregados (**figura 32**) después de tres semanas en la formulación C y después de seis semanas de almacenamiento en la formulación A. También se pudieron detectar algunos agregados después de tres meses en la formulación B. Pero, en comparación con las formulaciones tamponadas con acetato, la cantidad era muy pequeña.

La formulación LA_09_028 C tamponada con acetato mostró algunos agregados < 200 nm después de tres semanas, y luego de tres meses también en la formulación A. Véase la **figura 33**.

UV

Al realizar un seguimiento de la concentración de proteína mediante mediciones UV, no se notaron diferencias significativas entre todos los puntos temporales, muestras y formulaciones. Como el volumen de la muestra era muy pequeño, la concentración se midió con un equipo Nanodrop. Los resultados variaron +/- 5%. Para una información detallada, véanse las Tablas 50-61.

Apariencia

Después del período de almacenamiento de tres meses, todas las muestras permanecieron transparentes e incoloras sin ninguna turbidez, incluso en histidina. Esta observación también indica que todos los agregados medidos en DLS eran solubles. Los agregados insolubles y subvisibles podían detectarse mediante la medición del bloqueo de la luz mediante HIAC.

HIAC

Se detectaron partículas subvisibles a T0 y después de tres semanas de almacenamiento a +5 ºC. Se puede observar claramente en la Tabla 36 que la formación de partículas se observó principalmente en un tampón de acetato. Curiosamente, la histidina mostró buenos resultados para las cuatro formulaciones diferentes. En las formulaciones de citrato A, B y C también son buenos. Como el nivel de partículas > 10 µm y > 25 µm y los valores en todas las formulaciones están muy por debajo de los límites definidos en Ph. Eur. y USP, la formación de partículas no es motivo de preocupación.

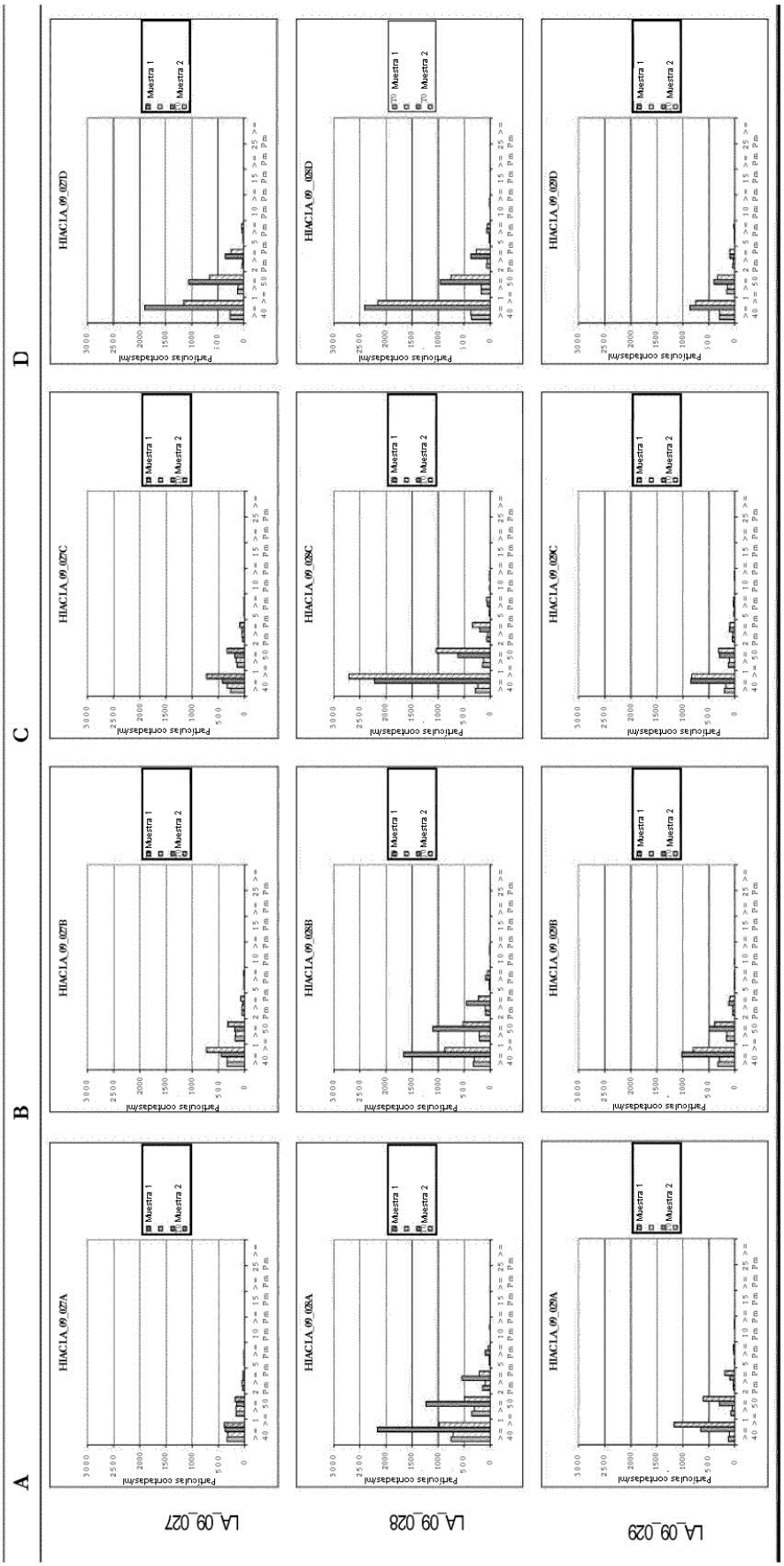
Osmolaridad

La cuantificación de los excipientes para ajustar la osmolaridad se realizó antes de la fabricación de las muestras mediante cálculo, ya que no se disponía de un volumen de muestras para orientar los experimentos. Por lo tanto, la osmolaridad fue menor de lo que debería ser (idealmente entre 280 y 320 mOsmol/kg). Tabla 35. Se realizarán estudios adicionales para un mejor ajuste durante los estudios de optimización de la formulación.

Tabla 35 - Osmolaridad en T0 para todas las formulaciones de prototipos.

Formulación	LA_09_027	LA_09_028	LA_09_29
A	241	221	220
B	181	160	165
C	238	220	220
D	214	192	197

Tabla 36 - Cuentas de partículas por ml de dos muestras separadas a T0 y después de 3 semanas de almacenamiento a +5 ºC analizadas por bloqueo de la luz (HIAC)



Conclusión

En conclusión, el tampón de citrato, el tampón de acetato y el tampón de histidina no mostraron cambios después del almacenamiento a +5 ºC y -20 ºC, y solo se observó un aumento secundario en los productos de degradación con el tampón de acetato después de 3 meses.

El almacenamiento del Anticuerpo CXCR5 Inicial en condiciones aceleradas llevó a cambios significativos en la DS. Aunque se observaron cambios menores en el tampón de citrato, el tampón de acetato mostró un aumento significativo de los productos de degradación y agregación y una disminución de isoformas neutras para dar isoformas ácidas o básicas.

Se observó un efecto tremendo en el Anticuerpo CXCR5 Inicial en condiciones aceleradas (hasta un 29,6% de proteínas de alto peso molecular y hasta un 8,2% de di-/oligómero y hasta un 1,3% de proteínas de bajo peso molecular). Además, la cromatografía de intercambio catiónico reveló una disminución de las isoformas neutras al 50%.

La concentración diana de 20 mg/ml pudo lograrse con todos los tampones analizados, por ejemplo, citrato, acetato e histidina.

El intervalo de pH de un DP estable podría definirse como pH 5-6,5.

Se realizaron con éxito dos etapas de ampliación (4 ml Æ 100 ml - 1000 ml UF/DF) con tres tampones seleccionados.

La reducción de la formación de agregados con el 0,01% de polisorbato 20 en todos los tampones seleccionados después de la estrés mecánico (velocidad del aparato de agitación 350/min, 2,5 h, TA) se evaluó y confirmó analíticamente.

Se pudo observar la ausencia o disminución de los HMWP, aumentando así la filtrabilidad (0,22 µm) mediante la adición del 0,01% de polisorbato 20.

La cantidad de dímeros/oligómeros fue muy dependiente del tampón y el pH y se analizó utilizando SEC, SDS-PAGE y DLS.

Caracterización de la sustancia farmacológica.

La molécula del Anticuerpo CXCR5 Inicial es muy estable en términos de degradación o formación de medias moléculas, pero resultó durante las actividades de preformulación, que el Anticuerpo CXCR5 Inicial disuelto en PBS a pH 7,2 tiene una tendencia a la agregación. Por lo tanto, este tampón no es adecuado para la estabilidad a largo plazo. La formación de partículas visibles y subvisibles durante el almacenamiento o los ciclos de congelación/descongelación deberá controlarse cuidadosamente durante el desarrollo de la formulación y los estudios de estabilidad.

Selección de mejor tampón y pH

Después de seleccionar el mejor tampón y pH, se identificó que el tampón de citrato 10 mM a pH 6,0 era adecuado para soluciones de 20 mg/ml de Anticuerpo CXCR5 Inicial. El tampón de histidina 10 mM pH 5 o el tampón de acetato 10 mM pH 5,5 podrían servir como opciones de respaldo.

Estudio de compatibilidad con excipientes.

Los siguientes excipientes se recomiendan para formulaciones prototipo:

- Polisorbato 20
- Trehalosa/sacarosa
- NaCl
- Arginina-HCl

Los siguientes excipientes no se recomiendan para el desarrollo:

- Alcohol bencílico

- Maltosa
- Manitol
- Dextrano
- Lisina-HCl

Estudio de estabilidad a 3 meses de la formulación prototipo.

Se observó una excelente estabilidad de 20 mg/ml de Anticuerpo CXCR5 Inicial en tampón citrato pH 6,0, tampón acetato pH 5,5 y tampón de histidina pH 5,0 a +5 ºC y -20 ºC después de tres meses de almacenamiento. Se observó una ligera degradación a +40 ºC (< 5% de reducción del contenido de monómero) con tampón de citrato, mientras que el tampón de acetato mostró un aumento, pero significativo, y el tampón de histidina un fuerte aumento del producto.

Todas las formulaciones analizadas mostraron una reducción significativa de la formación de partículas durante el almacenamiento en comparación con la formulación de descubrimiento genérica en PBS pH 7,2.

Por lo tanto, la recomendación de este estudio de preformulación es utilizar un tampón de citrato 10 mM pH 6 para DS y DP del Anticuerpo CXCR5 Inicial. Una solución tamponada filtrada y estéril con 20 mg/ml de Anticuerpo CXCR5 Inicial y excipientes que aumentan la estabilidad debería ser factible con una recomendación de almacenamiento a +5 ºC en viales.

Para el ajuste de la tonicidad, se podrían usar trehalosa y NaCl y se debería usar polisorbato 20 para prevenir la formación de agregados.

La viabilidad de los experimentos UF/DF para cambiar el sistema de tampón y/o para aumentar la concentración de mAB de 5 mg/ml a 20 mg/ml se puede mostrar en diferentes escalas.

Tabla 37 – Explicación de evaluación de datos

Evaluación de datos de preformulación del Anticuerpo CXCR5 Inicial

Evaluación en principio	Proceso		T0							después de 1 semana a +40 °C				
	Procesabilidad a pequeña escala	Duración a pequeña escala	Apariencia		pH	Clasificación	DLS	UV		Apariencia		pH	Clasificación	DLS	UV	
			Transparencia	Partícula		Evaluación personal				Transparencia	Partícula		Evaluación personal			
Buena	Buena	Buena	Transparente	No	Correcto	0	Sin agregados Sin agregados subvisibles observados en mediciones de DLS			Transparente	No	Correcto	0	Sin agregados Sin agregados subvisibles observados en mediciones de DLS	Correcto Si el valor después de estrés térmico difiere del valor básico en la fila K < 10%	
	Fácil de manejar Viscosidad correcta	< 10 h a +5 °C para 4 ml	No se observó turbidez	Sin partículas visibles	Si el pH difiere < 0,3 del valor básico en la fila C	No aceptable para estudios posteriores				No se observó turbidez	No se observaron partículas visibles	Si el pH difiere < 0,3 del valor básico en la fila C	No aceptable para estudios posteriores			
Media			Transparente-turbia No se puede aplicar una evaluación clara Turbia			0,5 No está totalmente claro si es aceptable o no 1		Valor básico medido a T0		Transparente-turbia No se puede aplicar una evaluación clara Turbia		No es correcto	0,5 No está totalmente claro si es aceptable o no 1			
Mala	Mala	Mala	Fuerte turbidez observada	Sí	No es correcto	Se recomienda tampón para estudios posteriores	Agregados de partículas subvisibles observados en DSL (en muestras filtradas en 0,22 µm)			Fuerte turbidez observada	Sí	Si el pH difiere < 0,3 del valor básico en la fila C	Se recomienda tampón para estudios posteriores	Agregados de partículas subvisibles observados en DSL (en muestras filtradas en 0,22 µm)	No correcto Si el valor después de estrés térmico difiere del valor básico en la fila K < 10%	
	Muy viscoso; difícil de manejar	≥ 10 h a +5 °C para 4 ml		Partículas visibles observadas	Si el pH difiere > 0,3 de valor básico en la fila C						Partículas visibles observadas					

Tabla 38 – Resultados del ensayo preliminar de material de envasado (evaluación de datos)

Tampón	Número de formulación	Material de envasado	Estrés	pH	PSD		ASD		SEC	Elisa			
					DLS	UV							
					[nm]	[mg/ml]	Monómero [%]		Dímero /oligómero [%]	CE50%	CE50	pendiente	
PBS 155 mM	LA_09_004_1	Vidrio transparente tipo 1	24 h + 40 °C	7,1	11,4	4,8	99,793		0,207	131,1	5,18E-13	0,98	1,12
	Patrón: RSN0151						99,780		0,22	100	3,95E-13	1,18	1,12
	LA_09_004_2	Vidrio ámbar tipo II	24 h + 40 °C	7,1	10,5	4,6	99,793		0,207	90,1	3,56E-13	1,16	1,12
	Patrón: RSN0151						99,780		0,22	100	3,95E-13	1,08	1,12
	LA_09_004_3	Polietileno de alta densidad	24 h + 40 °C	7,1	11,1	5,3	99,767		0,233	157	6,20E-13	1,06	
	Patrón: RSN0151						99,780		0,22	100	3,95E-13	1	
	LA_09_004_4	Polietileno de baja densidad	24 h + 40 °C	7,1	11,0	4,4	99,722		0,278	104,3	4,12E-13		
	Patrón: RSN0151						99,780		0,22	100	3,95E-13		
	LA_09_004_5	Polipropileno	24 h + 40 °C	7,1	11,2	5,1	99,781		0,219	106,9	5,11E-13		
	Patrón: RSN0151						99,780		0,22	100	4,78E-13		

Tabla 39 – Resultados de diversos ensayos preliminares de estrés (evaluación de datos)

Tampón	Número de formulación	Estrés	Temperatura	PSD				ASD				
				Apariencia	pH	DLS [nm]	UV [mg/ml]	SEC Monómero [%]	SEC Dímero /oligómero [%]	Elisa CE50%	Elisa CE50	Elisa pendiente
PBS 155 mM	LA_09_004_6	Vidrio transparente tipo 1 + pieza V2A	24 h	Transparente	7.1	11.9	4.9	99,551	0,391	80.8	3.86E−13	1.15
	Patrón: RSN0151							99,780	0.22	100	4.78E−13	1
	LA_09_004_7	Vidrio transparente tipo 1 + 1 h purgado con N2	24 h	Turbia	7.1	11.2	4.6	99,727	0,273	89.3	4.27E−13	1.04
	Patrón: RSN0151							99,780	0.22	100	4.78E−13	1
	LA_09_004_8	Vidrio transparente tipo 1 + 1 h purgado con aire	24 h	Turbia	7.0	11.0	4.4	99,791	0,265	84.3	4.03E−13	1.05
	Patrón: RSN0151							99,780	0.22	100	4.78E−13	1
	LA_09_004_9	Vidrio transparente tipo 1 + estrés luminico	24 h	Turbia	7.1	10.1	4.7	99,662	0,338	72.3	3.55E−13	1.06
	Patrón: RSN0151							99,780	0.22	100	4.91E−13	1.15
	LA_09_004_10	Vidrio transparente tipo 1 como T0	24 h	Transparente	7.1	11.1	4.3	99,773	0,227	62.3	3.06E−13	1.19
	Patrón: RSN0151							99,780	0.22	100	4.91E−13	1.15

Tabla 40 – Resultados de selección de tampón a pequeña escala (evaluación de datos)

Evaluación de datos de preformulación del Anticuerpo CXR5 Inicial

			Proceso			T0						Después de 1 semana a +40 °C					
Formulación número	Tampón	pH	Procesabilidad a pequeña escala	Duración a pequeña escala	Apariencia		pH	Clasificación	DLS	UV	Apariencia		pH	Clasificación	DLS	UV
					Transparencia	partícula					Transparencia	partícula				
LA_09_05-1	PBS 155 mM	7,50	buena	buena	transparente-turbia	sí	7,5	0	sin agregados	23,39	transparente	no	7,39	1	sin agregados	18
LA_09_05-2	PBS 155 mM	7,00	buena	buena	transparente-turbia	sí	7	0,5	sin agregados	22,63	transparente	sí	6,99	0	sin agregados	21,71
LA_09_05-3	PBS 155 mM	6,50	buena	buena	transparente-turbia	sí	6,6	1	sin agregados	22,73	transparente	sí	6,64	0,5	sin agregados	23,77
LA_09_06-1	PB 5 mM	7,50	mala	mala	turbia	sí	7,4	0	sin agregados	13,44	turbia	sí	7,45	0	sin agregados	12,72
LA_09_06-2	PB 5 mM	7,00	mala	mala	turbia	sí	7	0	sin agregados	18,34	turbia	no	7	0,5	sin agregados	16,94
LA_09_06-3	PB 5 mM	6,50	mala	mala	turbia	sí	6,6	0	sin agregados	20,75	turbia	no	6,5	0,5	sin agregados	20,4
LA_09_07-1	PB 10 mM	7,50	mala	mala	turbia	sí	7,5	0	sin agregados	18,12	transparente	no	7,49	1	sin agregados	16,24
LA_09_07-2	PB 10 mM	7,00	mala	mala	turbia	sí	7	0	sin agregados	16,97	transparente-turbia	no	7	0	sin agregados	17,42
LA_09_07-3	PB 10 mM	6,50	mala	mala	turbia	sí	6,6	0	sin agregados	20,73	transparente-turbia	sí	6,5	0	sin agregados	18,88
LA_09_08-1	Citrato 10 mM	7,00	buena	buena	transparente	nc	7	1	sin agregados	19,69	transparente	no	7,4	1	sin agregados	23
LA_09_08-2	Citrato 10 mM	6,50	buena	buena	transparente	nc	8,5	1	sin agregados	23,77	transparente	no	6,8	1	sin agregados	24,55
LA_09_08-3	Citrato 10 mM	6,00	buena	buena	transparente	nc	6	1	sin agregados	21,93	transparente	no	6,1	1	sin agregados	22,58
LA_09_08-4	Citrato 10 mM	5,50	buena	buena	transparente	nc	5,5	1	sin agregados	23,67	transparente	no	5,6	1	sin agregados	24,6
LA_09_08-5	Citrato 10 mM	5,00	buena	buena	transparente	nc	5	1	sin agregados	22,97	transparente	no	5,1	1	agregados	23,42
LA_09_09-1	S. salina 150 mM	6,00	buena	buena	transparente-turbia	sí	7	0	sin agregados	24,13	transparente	no	6,8	1	sin agregados	22,48
LA_09_10-1	Acetato 10 mM	5,50	buena	buena	transparente	sí	5,8	0,5	sin agregados	24,86	transparente	no	5,8	1	sin agregados	24,32
LA_09_10-2	Acetato 10 mM	5,00	buena	buena	transparente-turbia	sí	5,2	0	sin agregados	24,99	transparente	sí	5,2	0,5	sin agregados	22,45
LA_09_11-1	Succinato 10 mM	6,00	mala	buena	transparente-turbia	sí	6,1	1	sin agregados	23,99	transparente	no	6,2	0,5	sin agregados	26,13
LA_09_11-2	Succinato 10 mM	5,50	buena	buena	transparente-turbia	sí	5,7	0,5	sin agregados	24,54	transparente	no	5,6	0,5	sin agregados	23,33
LA_09_11-3	Succinato 10 mM	5,00	buena	buena	transparente-turbia	sí	6,1	0	sin agregados	24,22	transparente	no	5,2	1	sin agregados	26,1
LA_09_12-1	Histidina 10 mM	6,5	buena	buena	transparente-turbia	sí	6,6	0,5	sin agregados	19,75	transparente-turbia	sí	6,57	1	sin agregados	19,38
LA_09_12-2	Histidina 10 mM	6	buena	buena	transparente-turbia	nc	6,1	1	sin agregados	20,95	transparente-turbia	no	6,09	0,5	sin agregados	20,74
LA_09_12-3	Histidina 10 mM	5,5	buena	buena	transparente-turbia	sí	5,1	0	sin agregados	21,37	transparente-turbia	no	5,56	0	sin agregados	21,98
LA_09_13-1	Glicina 10 mM	8	mala	mala	turbia	sí	0	0	agregados	0	turbia	sí	0	0	agregados	0
LA_09_13-2	Glicina 10 mM	7	buena	buena	transparente-turbia	sí	6,91	0	agregados	21,19	transparente-turbia	sí	7,09	0	agregados	20,4
LA_09_14-1	Arginina 10 mM	8	mala	mala	turbia	sí	7,7	0	sin agregados	10,06	turbia	sí	7,6	0	sin agregados	9,6
LA_09_14-2	Arginina 10 mM	6	buena	buena	transparente	sí	6,4	0,5	sin agregados	21,17	turbia	sí	6,4	0,5	sin agregados	21,5
LA_09_15-1	TRIS 10 mM	8,5	mala	mala	turbia	sí	3,4	0	agregados	6,37	transparente	no	6,5	0,5	sin agregados	6,12
LA_09_15-2	TRIS 10 mM	7,5	mala	mala	turbia	sí	7,5	0	agregados	14,28	turbia	sí	7,5	0	sin agregados	13,26

Tabla 41 – Resultados de selección de tampón a pequeña escala, T0 (evaluación de datos)

Evaluación de datos de preformulación del Anticuerpo CXR5 Inicial

Nº de formulación	Tampón	pH	T0										
			SEC		Elisa			WCX			SDS-PAGE red.		SDS-PAGE no red.
			Monómero [%]	Dí-/oligómero [%]	CE50%	CE50	pendiente	% ácido	% neutro	% básico	HC [kDa]	LC [kDa]	Banda principal
LA_09_05-1	PBS 155 mM	7,50	99,543	0,457	81	4,00E−13	0,96	13,4	85,6	1,1	49,81	25,79	141,88
LA_09_05-2	PBS 155 mM	7,00	99,546	0,452	74	3,82E−13	1,01	13,6	85,4	1	50,81	26,37	136,83
LA_09_05-3	PBS 155 mM	6,50	99,582	0,416	139	1,43E−12	0,72	13,3	85,6	1,1	50,91	26,87	136,69
LA_09_06-1	PB 5 mM	7,50	99,437	0,563	176	1,81E−12	0,78	12	86,5	1,5	47,62	25,94	161,36
LA_09_06-2	PB 5 mM	7,00	99,194	0,606	68	9,48E−13	0,76	14	84,6	1,4	48,06	25,19	168,27
LA_09_06-3	PB 5 mM	6,50	99,266	0,714	109,63	8,54E−13	1,12	14,2	84,4	1,3	49,79	26,56	157,05
LA_09_07-1	PB 10 mM	7,50	98,676	1,124	117	1,44E−12	0,81	14,2	83,7	2,1	52,1	25,31	148,91
LA_09_07-2	PB 10 mM	7,00	98,670	1,130	144,66	1,49E−12	0,87	13,9	84,2	1,9	50,16	25,81	140,47
LA_09_07-3	PB 10 mM	6,50	99,342	0,658	105	1,29E−12	0,73	13,9	85,1	1	50,34	25,61	131,66
LA_09_08-1	Citrato 10 mM	7,00	99,394	0,606	59,85	7,90E−13	0,90	12,6	86,0	1,1	49,5	26,1	157,3
LA_09_08-2	Citrato 10 mM	6,50	99,596	0,404	59	1,26E−12	0,53	12,7	85,6	1,4	49,7	26,4	147,0
LA_09_08-3	Citrato 10 mM	6,00	99,681	0,339	52	1,10E−12	0,50	12,7	86,0	1,2	50,9	26,8	144,5
LA_09_08-4	Citrato 10 mM	5,50	99,766	0,234	112	8,83E−13	1,01	12,8	88,1	1,1	49,1	26,0	147,9
LA_09_08-5	Citrato 10 mM	5,00	99,830	0,17	79	1,46E−12	0,66	12,7	86,1	1,2	49,77	26,18	143,43
LA_09_09-1	S. salina 150 mM	6,00	99,232	0,768	96,18	1,51E−12	0,71	13,4	84,9	1,6	50	26,26	128,56
LA_09_10-1	Acetato 10 mM	5,50	99,507	0,493	180,25	2,83E−12	0,55	13,5	85,2	1,3	49,46	25,31	126,83
LA_09_10-2	Acetato 10 mM	5,00	99,622	0,378	146,86	9,81E−13	0,77	13,4	85,2	1,4	50,35	26,61	127,54
LA_09_11-1	Succinato 10 mM	6,00	99,447	0,553	112,43	7,51E−13	0,81	13,0	85,7	1,3	49,45	25,17	165,19
LA_09_11-2	Succinato 10 mM	5,50	99,582	0,418				13,0	85,8	1,3	50,3	25,44	155,06
LA_09_11-3	Succinato 10 mM	5,00	99,703	0,297	124	1,81E−12	0,72	12,9	85,8	1,2	50,15	25,51	150,47
LA_09_12-1	Histidina 10 mM	6,5	99,547	0,453	110	1,60E−12	0,60	13,3	86	0,7	47,7	24,5	157,44
LA_09_12-2	Histidina 10 mM	6	99,630	0,37	184	2,68E−12	0,55	13,1	86,2	0,6	47,77	24,7	157,86
LA_09_12-3	Histidina 10 mM	5,5	99,683	0,317	57	1,71E−12	0,71	13,2	86,1	0,7	47,41	25	156,38
LA_09_13-1	Glicina 10 mM	8	n/a										
LA_09_13-2	Glicina 10 mM	7	99,176	0,324	127	3,81E−12	0,57	13,6	85,5	0,8	48,74	25,04	163,07
LA_09_14-1	Arginina 10 mM	8	99,705	0,295	121	2,10E−12	0,71	15,9	83,6	0,5	49	25,22	157,49
LA_09_14-2	Arginina 10 mM	6	99,582	0,438	114	1,97E−12	0,66	13,1	88,3	0,6	49,43	25,96	147,5
LA_09_15-1	TRIS 10 mM	8,5	99,226	0,774	118	2,05E−12	0,71	25,5	74,1	0,4	50,06	25,8	147,5
LA_09_15-2	TRIS 10 mM	7,5	99,294	0,706	104	1,64E−i2	0,71	13	88,1	0,8	48,75	25,41	159,79

Tabla 42 – Resultados de selección de tampón a pequeña escala, T una semana +40 °C (evaluación de datos de ASD)

Evaluación de datos de preformulación del Anticuerpo CXR5 Inicial

Nº de formulación	Tampón	pH	después de 1 semana a +40 ºC												
			SEC			Elisa			WCX			SDS-PAGE red.		SDS-PAGE no red.	
			Monómero [%]	Dímero /oligómero [%]	HMW	CE50%	CE50	pendiente	% ácido	% neutro	% básico	HC [kDa]	LC [kDa]	Banda principal	Comentario
LA_09_05-1	PBS 155 mM	7,50	99,897	1,103		52	2,67E-13	1,11	14,8	83,5	1,7	50,25	26,07	142,27	Banda adicional
LA_09_05-2	PBS 155 mM	7,00	99,279	0,721		97	9,96E-13	0,86	13,4	85,2	1,4	51,14	26,27	135,83	
LA_09_05-3	PBS 155 mM	6,50	99,233	0,767		115	',18E-12	0,84	13,3	85,3	1,4	49,79	25,9	141	Banda adicional en 59,27
LA_09_06-1	PB 5 mM	7,50	98,770	1,23		141	',96E-12	0,88	15,3	82,6	2	46,92	26,73	166,69	
LA_09_06-2	PB 5 mM	7,00	98,673	1,327		68	9,49E-13	0,81	11,7	86,1	2,2	49	26,11	159,55	
LA_09_06-3	PB 5 mM	6,50	98,644	1,356		77	',07E-12	0,75	13,9	84,1	2	49,35	26,15	164,49	
LA_09_07-1	PB 10 mM	7,50	98,307	1,679	0,014	68	8,40E-13	0,81	15,1	82,2	2,6	50,18	25,41	137,71	
LA_09_07-2	PB 10 mM	7,00	98,612	1,388		109	',34E-12	0,68	14,8	88,2	2	49,89	25,52	131,79	
LA_09_07-3	PB 10 mM	6,50	98,909	1,091		78,79	',04E-12	0,78	14,1	84	1,9	51,63	26,2	139,92	
LA_09_08-1	Citrato 10 mM	7,00	99,214	0,786		111	',36E-12	0,72	10,500	88,000	1,5	50,060	26,830	153,790	
LA_09_08-2	Citrato 10 mM	6,50	99,588	0,404		46	9,79E-13	0,60	12,700	85,800	1,4	49,690	26,390	146,970	
LA_09_08-3	Citrato 10 mM	6,00	99,661	0,338		98	?,77E-13	1,01	12,700	86,000	1,2	50,880	26,780	144,500	
LA_09_08-4	Citrato 10 mM	5,50	99,766	0,234		175	',38E-12	0,84	12,5	86,1	1,4	49,23	25,9	144,79	Banda adicional en 152,62 kDa
LA_09_08-5	Citrato 10 mM	5,00	99,772	0,228		75	',38E-12	0,82	12,7	86	1,3	49,05	25,84	144,336	
LA_09_09-1	S. salina 150 mM	6,00	98,962	1,038		80,89	',27E-12	0,59	13	85,1	1,3	49,33	25,23	127,67	
LA_09_10-1	Acetato 10 mM	5,50	99,106	0,834		94,9	',49E-12	0,55	13,5	84,7	1,9	50,17	26,14	126,06	
LA_09_10-2	Acetato 10 mM	5,00	99,463	0,537		101,5	6,78E-13	0,79	13,4	84,8	1,8	49,86	26,18	128,96	
LA_09_11-1	Succinato 10 mM	6,00	99,145	0,855		125,90	8,41E-13	0,74	12,7	85,6	1,7	49,95	49,4	163,2	
LA_09_11-2	Succinato 10 mM	5,50	99,410	0,890					12,6	85,7	1,6	49,84	25,23	161,74	
LA_09_11-3	Succinato 10 mM	5,00	99,521	0,479		157	2,29E-12	0,64	12,8	85,6	1,5	49,72	25,01		En comparación con el patrón presenta la
LA_09_12-1	Histidina 10 mM	6,5	99,300	0,700		175	2,55E-12	0,57	13,4	85,7	0,9	47,73	24,7	158,71	
LA_09_12-2	Histidina 10 mM	6	99,508	0,492		77	2,32E-12	0,65	12,6	86,9	0,5	48,03	24,9	159,02	
LA_09_12-3	Histidina 10 mM	5,5	99,667	0,333		81	2,45E-12	0,64	13,1	88,2	0,8	47,67	24,69	153,93	
LA_09_13-1	Glicina 10 mM	8													
LA_09_13-2	Glicina 10 mM	7	98,446	1,554		65	',95E-12	0,70	13,4	85,1	1,3	49,02	25,27	160,97	
LA_09_14-1	Arginina 10 mM	8	99,247	0,783		88	',53E-12	0,80	14,1	84,6	1,3	49,13	25,52	154,37	
LA_09_14-2	Arginina 10 mM	6	99,277	0,723		99	',72E-12	0,76	12,9	88,3	0,8	49,57	25,56	149,34	
LA_09_15-1	TRIS 10 mM	8,5	98,456	1,644		237	3,72E-12	0,84	23,8	73,9	2,3	49,37	25,05	150,98	
LA_09_15-2	TRIS 10 mM	7,5	98,998	1,002		184	2,89E-12	0,69	13,7	85	1,3	49,25	25,14	158,5	

Tabla 43 – Resultados de selección de tampón a pequeña escala, después de estrés mecánico (evaluación de datos)

Evaluación de datos de preformulación del Anticuerpo CXR5 Inicial

Nº de formulación	Tampón	pH	Después de 1 semana a +40 °C												
			SEC			Elisa			WCX			SDS-PAGE red.		SDS-PAGE no red.	
			Monómero [%]	Dímero /oligómero [%]	HMW	CE50%	CE50	pendiente	% ácido	% neutro	% básico	HC [kDa]	LC [kDa]	Banda principal	Comentario
LA_09_05-1	PBS 155 mM	7,50	99,263	0,658	0,080	71	3,64E−13	0,9	10,2	88,6	1,2	51,01	26,64	144,8	
LA_09_05-2	PBS 155 mM	7,00	98,753	0,650	0,597	50	2,58E−13	1,02	10,1	88,6	1,3	51,38	26,94	138,72	Banda en 59
LA_09_05-3	PBS 155 mM	6,50	98,923	0,527	0,551	79,3	9,12E−13	0,77	11,6	87,4	1,2	50,4	26,17	135,68	
LA_09_06-1	PB 5 mM	7,50	99,677	0,423		111	1,54E−12	0,79	17,1	82	0,9	47,57	25,79	163,25	
LA_09_06-2	PB 5 mM	7,00	99,084	0,915		110,14	8,58E−13	0,89	11,2	87,6	1,2	47,36	24,75	166,93	
LA_09_06-3	PB 5 mM	6,50	99,202	0,798		150	1,23E−12	0,94	13,6	86,2	1,3	50,68	26,88	168,84	
LA_09_07-1	PB 10 mM	7,50	98,909	1,391		60,85	4,99E−13	0,87	12,9	86,3	1,8	50,47	26,26	147,83	
LA_09_07-2	PB 10 mM	7,00	99,053	0,947		61,36	6,32E−13	0,92	14,8	83,6	1,6	52,27	26,31	136,88	
LA_09_07-3	PB 10 mM	6,50	99,272	0,729		89,39	1,18E−12	0,94	13,6	86,4	1	50,05	25,62	131,53	
LA_09_08-1	Citrato 10 mM	7,00	99,138	0,538	0,024	100,76	1,33E−12	0,74	10,5	88,0	1,5	50,06	26,83	153,79	
LA_09_08-2	Citrato 10 mM	6,50	99,517	0,468	0,015	41	8,61E−13	0,51	10,6	88,2	1,2	50,82	26,79	143,82	
LA_09_08-3	Citrato 10 mM	6,00	99,608	0,334	0,088	136	1,07E−12	0,85	10,3	88,4	1,3	49,57	25,38	145,79	
LA_09_08-4	Citrato 10 mM	5,50	98,317	0,328	0,345	79	1,46E−12	0,73	10,1	88,6	1,4	49,29	25,88	144,93	
LA_09_08-5	Citrato 10 mM	5,00	99,299	0,269	1,493	99	1,84E−12	0,71	10,1	83,4	1,5	49,31	26,02	143,32	
LA_09_09-1	S, salina 150 mM	6,00	N/A												
LA_09_10-1	Acetato 10 mM	5,50													
LA_09_10-2	Acetato 10 mM	5,00													
LA_09_11-1	Succinato 10 mM	6,00													
LA_09_11-2	Succinato 10 mM	5,50													
LA_09_11-3	Succinato 10 mM	5,00													
LA_09_12-1	Histidina 10 mM	6,5													
LA_09_12-2	Histidina 10 mM	6													
LA_09_12-3	Histidina 10 mM	5,5													
LA_09_13-1	Glicina 10 mM	8													
LA_09_13-2	Glicina 10 mM	7													
LA_09_14-1	Arginina 10 mM	8													
LA_09_14-2	Arginina 10 mM	6													
LA_09_15-1	TRIS 10 mM	8,5													
LA_09_15-2	TRIS 10 mM	7,5													

Tampones seleccionados para análisis a gran escala

Dado que no se observaron diferencias principales después del estrés mecánico, las muestras LA_09_09 a 15 no se sometieron a estrés mecánico

Tabla 44 – Resultados – Evaluación de datos de selección de tensioactivo

Evaluación de Anticuerpo CXCR5 Inicial – Datos de tensioactivo

	Número de formulación	Estrés mecánico 350 rpm 2,5 h	Tensioactivo	pH	Tm	pH	DLS	PSD UV	Apariencia	ASD								
										SEC			WCX				SDS-PAGE no	
					[°C]		[nm]	[mg/ml]		Monómero [%]	Di/Oligómero [%]	HMW [%]	% ácido	% neutro	% básico	Comentario	Banda principal	Comentario
Citrato 10 mM	LA_09_16	no	ninguno		79,4	6,0	12,7	18,2	Transparente	99,74	0,260		12,79	86,98	1,28		153,79	
										99,74	0,260		13,43	85,41	1,16		146,19	
	LA_09_16	sí	ninguno		nd	6,1	N/A	18,1	Turbia			N/A						
	LA_09_16-1	sí	Polisorbato 20		79,1	6,1	12,2	17,1	Transparente	99,72	0,280		12,28	85,92	1,28		151,33	
										99,74	0,260		13,43	85,41	1,16		146,19	
	LA_09_16-2	sí	Polisorbato 80		78,6	6,1	12,5	18,6	Transparente	99,71	0,290		12,71	86,04	1,26		149,35	
										99,74	0,260		13,43	85,41	1,16		146,19	
	LA_09_16-3	sí	Lutrol F68	6,0	78,6	6,1	12,7	18,5	Transparente	99,73	0,270		13,13	85,6	1,27		147,77	
										99,74	0,260		13,43	85,41	1,16		146,19	
	LA_09_16-4	sí	Cremophor RH40		78,6	6,1	13,0	17,7	Transparente	98,52	0,440	1,04	11,37	86,86	1,19	1 ácido	149,68	
										99,74	0,260		13,43	85,41	1,16		146,19	
	LA_09_16-5	sí	Solutol HS15		78,4	6,1	12,8	19,2	Transparente	99,1	0,560	0,56	12,92	88,52	1,26	1 ácido	151,82	
										99,74	0,260		13,43	85,41	1,16		146,19	
	LA_09_16_6	N/A	SDS		nd	6,1	N/A	N/A	Turbia									
													N/A					
Acetato 10 mM	LA_09_17	no	ninguno		77,7	5,5	12,2	17,8	Transparente	99,74	0,260		12,92	89,98	1,11		173,63	
										99,75	0,250		13,42	85,43	1,14		169,47	
	LA_09_17	sí	ninguno		nd	5,6	13,4	13,2	Turbia									
													N/A					
	LA_09_17-1	sí	Polisorbato 20		77,4	5,5	12,5	17,7	Transparente	99,74	0,280		12,88	86,02	1,12		175,92	
										99,75	0,250		13,42	85,43	1,14		169,47	
	LA_09_17-2	sí	Polisorbato 80		76,4	5,6	12,8	17,8	Transparente	99,52	0,369		12,76	89,03	1,21		178,34	
				5,5						99,75	0,250		13,42	85,43	1,14		169,47	
	LA_09_17-3	sí	Lutrol F68		76,7	5,5	12,5	18,0	Transparente	98,79	0,240		12	85,86	1,14		176,33	
										99,75	0,250		13,42	85,43	1,14		169,47	
	LA_09_17-4	sí	Cremophor RH40		76,7	5,5	13,3	17,7	Transparente	97,23	0,530	1,95	11,51	87,18	1,31	k en ácido	174,25	
										99,75	0,250		13,42	85,43	1,14		169,47	
	LA_09_17-5	sí	Solutol HS15		76,4	5,5	12,9	17,7	Transparente	98,54	0,450	1,01	12,28	89,67	1,1	K en ácido	169,78	
										99,75	0,250		13,42	85,43	1,14		169,47	
	LA_09_17_6	sí	SDS		nd	5,6	N/A	N/A	Turbia									
													N/A					
Succinato 10 mM	LA_09_18	no	ninguno		73,3	4,9	12,8	20,1	Transparente	98,76	0,240		13,318	85,425	1,258		159,8	
										99,71	0,290		13,8	85,06	1,13		160,51	
	LA_09_18	sí	ninguno		nd	5,0	13,0	20,8	Turbia	99,7	0,300		12,189		1,423	Pico k	155,65	
										99,71	0,290		13,8	85,06	1,13		160,51	
	LA_09_18-1	sí	Polisorbato 20		72,9	5,0	12,6	20,4	Transparente									
	LA_09_18-2	sí	Polisorbato 80	5,0	72,6	5,0	12,7	20,1	Transparente			N/A						
	LA_09_18-3	sí	Lutrol F68		72,6	5,0	12,7	21,0	Transparente									
	LA_09_18-4	sí	Cremophor RH40		72,4	5,0	12,9	21,1	Transparente									
	LA_09_18-5	sí	Solutol HS15		nd	5,0	12,6	20,4	Transparente									

Tabla 45 – Resultados – Evaluación de datos de selección de tensioactivo

Histidina 10 mM	LA_09_19		ninguno							99,76	0,240		13,967	84,657	1,457		157,26		
		no			nd nd	N/A	11,3	23,1	Transparente Turbia				13,662	85,263	1,173		160,51		
	LA_09_19		ninguno		nd nd	5,4				99,7	0,300	1,6	12,237	86,306	1,257	rer Pico k	162,08	Banda adicional	
		sí					21,9	23,4	Transparente Transparente	97,98	0,420		13,662	85,263	1,173		160,51		
	LA_09_19-1		Polisorbato 20		nd	5,3				99,7	0,300		12,756	84,86	1,384		159,2		
		sí					21,0	21,1	Turbia				13,662	85,263	1,173		160,51		
	LA_09_19-2		Polisorbato 80							99,3	0,320	0,13	12,516	84,949	1,535		161,06		
		sí		5,0		5,3	21,0	21,0		99,7	0,300		13,662	85,263	1,173		160,51	Banda adicional	
	LA_09_19-3	sí	Lutrol F68			5,3	21,0	21,3		99,53	0,350	1,23	12,182	86,561	1,257	rer Pico k	163,05		
										99,7	0,300		13,662	85,263	1,173		160,51		
	LA_09_19-4	sí	Cremophor RH40		nd	5,3	N/A	20,1	Transparente	97,19	0,850	1,96	10,437	87,667	1,906	rer Pico k	168,73	Banda adicional	
										99,7	0,300		13,662	85,263	1,173		160,51		
	LA_09_19-5	sí	Solutol HS15		nd	5,3	21,5	21,2	Transparente	99,14	0,330	0,52	12,561	85,891	1,548	rer Pico k	160,22		
										99,7	0,300		13,662	85,263	1,173		160,51		
Arginina 10 mM	LA_09_20	no	ninguno		nd		20,2		Transparente	99,51	0,490			85,224	1,267		157,89		
										99,71	0,290		13,8	85,06	1,13		155,98		
	LA_09_20-1	sí	ninguno		nd	6,2	N/A	22,5	Turbia	99,29	0,610	0,1	12,32	88,015	1,636	rer Pico k	152,77	Banda adicional	
										99,71	0,290		13,8	85,06	1,13		155,98		
	LA_09_20-2	sí	Polisorbato 20		71,8	6,2	11,9	22,64	Transparente										
	LA_09_20-3	sí	Polisorbato 80	6,0	nd	6,2	12,22	22,16	Transparente										
	LA_09_20-4	sí	Lutrol F68		nd	6,2	12,34	22,79	Turbia							N/A			
	LA_09_20-5	sí	Cremophor RH40		nd	6,2	13,2	22,36	Transparente										
	LA_09_20-1	sí	Solutol HS15		nd	6,2	N/A	22,04	Turbia										

N/A , las muestras no se sometieron a ensayo analíticamente, dado que había disponible demasiado poco volumen de muestra

Excipientes y anticuerpo CXCR5 Inicial (LA_09_022)

Tabla 46 – Resultados - compatibilidad de Anticuerpo Inicial con excipientes

Evaluación de Anticuerpo CXCR5 Inicial - compatibilidad

				PSD						ASD								
										SEC			WCX				SDS-PAGE no	
Tampón	Número de formulación	Estrés térmico	Excipiente	pH	Tm	pH	DLS	UV	Apariencia	Monómero [%]	Di/Oligómero [%]	HMW [%]	% ácido	% neutro	% básico	Comentario	Banda principal	Comentario
					[ºC]		[nm]	[mg/ml]										
RSN0151 155 mM PBS	LA_09_22	no	ninguno		80,3	6,0	12,7	18,2	Transparente	99,689	0,314		14,323	84,306	1,373		155,76	
	Patrón: RSN0151									99,707	0,293		13,867	85,032	1,102		155,98	
	LA_09_22_1	sí	ninguno			6,1	N/A	18,1	Turbia	99,383	0,542		13,878	84,289	1,833		142,95	
	Patrón: RSN0151									99,707	0,293		13,867	85,032	1,102		154,13	
	LA_09_22_2	sí	NaCl		80,3	6,1	12,2	17,1	Transparente	99,533	0,4		13,606	84,404	1,790		147,97	
	Patrón: RSN0151									99,707	0,293		13,867	85,032	1,102		154,13	
	LA_09_22_3	sí	MgCl2		nd	6,1	12,5	18,6	Transparente	99,697	0,303		13,353	81,235	1,412		149,38	
	Patrón: RSN0151									99,707	0,293		13,867	85,032	1,102		154,13	
	LA_09_22_4	sí	CaCl2		78,2	6,1	12,7	18,5	Transparente	99,655	0,132		14,887	83,908	1,296		148,81	
	Patrón: RSN0151									99,707	0,293		13,867	85,032	1,102		154,13	
	LA_09_22_5	sí	Manitol		nd	6,1	13,0	17,7	Transparente	89,483	0,489	0,013	15,727	82,649	1,824		150,42	
	Patrón: RSN0151									99,707	0,293		13,867	85,032	1,102		154,13	
	LA_09_22_6	sí	Maltosa		nd	6,1	12,8	19,2	Transparente	98,324	1,676		34,894	82,913	2,191		152,49	2/14 banda
	Patrón: RSN0151									99,707	0,293		13,867	85,032	1,102		154,13	
	LA_09_22_7	sí	Trehalosa		80,8	6,1	N/A	N/A	Turbia	98,507	0,389		17,291	81,167	1,552		154,74	
	Patrón: RSN0151									99,363	0,343		13,867	84,575	1,407		154,13	
	LA_09_22_8	sí	Sacarosa		80,5	5,5	12,2	17,8	Transparente	99,307	0,535		15,184	83,506	1,508		158,76	
	Patrón: RSN0151									99,363	0,343		14,019	84,575	1,407		154,13	
	LA_09_22_9	sí	Dextrano 40		79,3	5,6	13,4	13,2	Turbia	99,821	1,545		15,184	77,996	1,596		166,61	
	Patrón: RSN0151									99,363	0,343		14,019	84,575	1,407		154,13	
	LA_09_22_10	sí	Alcohol bencílico		75,8	5,5	12,5	17,7	Transparente	97,515	1,027		20,308	83,508	2,17		168,13	
	Patrón: RSN0151									99,363	0,343		14,019	84,575	1,407		154,13	
	LA_09_22_11	sí	Arginina-HCl		80,0	5,6	12,8	17,8	Transparente	99,622	0,331		18,282	83,116	1,621		169,77	
	Patrón: RSN0151									99,363	0,343		14,019	84,575	1,407		154,13	
	LA_09_22_12	sí	Lisina		80,9	5,5	12,5	18,0	Transparente	99,047	0,701		19,042	83,104	17,854		169,9 ad	Banda principal ap. 7
	Patrón: RSN0151									99,363	0,343		14,019	84,575	1,407		154,13	

Excipientes y citrato tamponado (LA_09_023)

Tabla 47 – Resultados - compatibilidad de Anticuerpo Inicial en tampón de citrato con excipientes

Evaluación de Anticuerpo CXCR5 Inicial – compatibilidad en tampón de citrato

					PSD				ASD								
Tampón	Número de formulación	Estrés térmico	Excipiente	pH	Tm	pH	DLS	UV	SEC			WCX				SDS-PAGE no	
					[°C]		[nm]	[mg/ml]	Monómero [%]	Dí/Oligómero [%]	HMW [%]	% ácido	% neutro	% básico	Comentario	Banda principal	Comentario
RSN0151 155 mMPBS	LA_09_23	no	ninguno		81,5		12,6	18,6	99,596	0,404		13,307	85,310	1,383		155,59	
	Patrón: RSN0151								99,686	0,314		14,058	84,609	1,333		146,11	
	LA_09_23_1	sí	ninguno				12,4	18,7	99,493	0,309		12,807	85,597	1,396		151,85	
	Patrón: RSN0151								99,686	0,314		14,058	84,609	1,333		146,11	
	LA_09_23_2	sí	NaCl		81,7		12,2	21,8	99,498	0,302		12,803	85,641	1,354		145,12	
	Patrón: RSN0151								99,686	0,314		14,058	84,609	1,333		146,11	
	LA_09_23_3	sí	MgCl2		77,2		12,3	14,7	99,538	0,462		12,799	85,692	1,509		151,67	
	Patrón: RSN0151								99,686	0,314		14,058	84,609	1,333		146,11	
	LA_09_23_4	sí	Manitol		82,1		13,5	23,3	99,533	0,467		12,703	85,302	1,495		147,96	
	Patrón: RSN0151								99,686	0,314		14,058	84,609	1,333		146,11	
	LA_09_23_5								98,899	0,677		15,263	82,106	1,631		155,02	
	Patrón: RSN0151								99,686	0,314		14,058	84,609	1,333		146,11	
	LA_09_23_6	sí	Trehalosa		82,1		13,9	17,6	99,656	0,344		12,693	85,848	1,465		151,43	
	Patrón: RSN0151								99,686	0,314		14,058	84,609	1,333		146,11	
	LA_09_23_7	sí	Sacarosa		81,9		13,5	17,5	99,594	0,406		12,758	85,754	1,487		152,67	
	Patrón: RSNU151								99,686	0,314		14,058	84,609	1,333		146,11	
	LA_09_23_8	sí	Alcohol bencílico		77,1		13,9	20,5	97,744	0,507	1,322	11,591	87,216	1,192		145,93	
	Patrón: RSN0151								99,686	0,314		14,058	84,609	1,333		146,11	
	LA_09_23_9	sí	Arginina-HCl		80,7		14,7	17,6	99,327	0,412		13,047	85,453	1,500		146,01	
	Patrón: RSN0151								99,686	0,314		14,058	84,609	1,333		146,11	
	LA_09_23_10	sí	Lisina		nd		12,0	16,7	98,849	0,985		13,642	80,787	5,591		144,05	
	Patrón: RSN0151								99,686	0,314		14,058	84,609	1,333		146,11	

Excipientes y (LA_09_024) tamponado en acetato

Tabla 48 – Resultados - compatibilidad con excipientes y Anticuerpo Inicial en tampón de acetato

Evaluación de Anticuerpo CXCR5 Inicial – compatibilidad en tampón de acetato- datos

Tampón	Número de formulación	Estrés térmico	Excipiente	PSD					ASD								
				pH	Tm	pH	DLS	UV	SEC			WCX				SDS-PAGE no	
					[ºC]		[nm]	[mg/ml]	Monómero [%]	Di/Oligómero [%]	HMW [%]	% ácido	% neutro	% básico	Comentario	Banda principal	Comentario
RSN0151 155 mM PBS	LA_09_24	no	ninguno		81,8		12,2	17,8	99,603	0,397		13,408	85,225	1,368		173,63	
	Patrón: RSN0151								99,628	0,309		14,230	84,407	1,363		169,47	
	LA_09_24_1	sí	ninguno		nd		12,5	16,5	99,405	0,595		13,368	85,052	1,580		149,18	
	Patrón: RSN0151								99,628	0,309		14,230	84,407	1,363		151,63	
	LA_09_24_2	sí	NaCl		81,3		12,3	17,4	99,479	0,521		13,507	84,895	1,598		156,31	
	Patrón: RSN0151								99,628	0,309		14,230	84,407	1,363		151,63	
	LA_09_24_3	sí	MgCl2		81,0		12,3	16,8	99,517	0,483		13,470	84,915	1,615		142,23	
	Patrón: RSN0151								99,628	0,309		14,230	84,407	1,363		151,63	
	LA_09_24_4	sí	Manitol		82,5		14,2	15,3	99,546	0,431	0,023	13,567	84,965	1,478		155,89	
	Patrón: RSN0151								99,628	0,309		14,230	84,407	1,363		151,63	
	LA_09_24_5								98,647	0,539	0,029	16,304	82,016	1,680		156,15	
	Patrón: RSN0151								99,628	0,309		14,230	84,407	1,363		151,63	
	LA_09_24_6	sí	Trehalosa		82,5		14,0	15,4	99,522	0,478		13,558	84,905	1,537		146,61	
	Patrón: RSN0151								99,628	0,309		14,230	84,407	1,363		151,63	
	LA_09_24_7	sí	Sacarosa		82,3		14,0	19,1	99,542	0,458		13,587	84,923	1,490		149,12	
	Patrón: RSN0151								99,628	0,309		14,230	84,407	1,363		151,63	
	LA_09_24_8	sí	Alcohol bencílico		78,0		13,2	16,4	98,272	0,67	0,745	12,739	85,960	1,301		152,48	
	Patrón: RSN0151								99,628	0,309		14,230	84,407	1,363		151,63	
	LA_09_24_9	sí	Arginina-HCl		81,5		12,2	16,9	99,226	0,439		13,412	84,978	1,611		152,88	
	Patrón: RSN0151								99,628	0,309		14,230	84,407	1,363		151,63	
	LA_09_24_10	sí	Lisina		81,2		12,3	15,3	99,134	0,692		13,546	84,814	1,639		153,32	
	Patrón: RSN0151								99,628	0,309		14,230	84,407	1,363		151,63	

Excipientes y (LA_09_025) tamponado en histidina

Tabla 49 – Resultados - compatibilidad con excipientes y Anticuerpo Inicial en tampón de acetato

Evaluación de Anticuerpo CXCR5 Inicial – compatibilidad en tampón de histidina- datos

					PSD				ASD								
									SEC			WCX				SDS-PAGE no	
Tampón	Número de formulación	Estrés térmico	Excipiente	pH	Tm	pH	DLS	UV	Monómero [%]	Di/Oligómero [%]	HMW [%]	% ácido	% neutro	% básico	Comentario	Banda principal	Comentario
					[°C]		[nm]	[mg/ml]									
Histidina 10 mM	09_25 Patrón: RSN0151	no	ninguno	5.5	nd	[illegible]	11.3	29.1	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
	09_25_1 Patrón: RSN0151	si	NaCl		70.8		25.8	29.8	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
	09_25_2 Patrón: RSN0151	si	MgCl2				12.8	21.5	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
	09_25_3 Patrón: RSN0151	si	Manitol		69.9		13.1	29.1	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
	09_25_4 Patrón: RSN0151	si	Maltosa		69.6		15.5	21.5	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]

Tabla 50 – Resultados - formulación prototipo LA_09_27A

Tampón	Número de formulación	Punto temporal	Condición de almacenamiento	pH	PSD				ASD													
					Tm [ºC]	pH	DLS [nm]	UV [mg/ml]	SEC				WCX				SDS-PAGE no red.		Elisa			
									Monómero [%]	Di-/oligomero [%]	HMW [%]	NP [%]	% ácidas	% neutras	% básicas	comentario	Banda principal	cometario	CE50%	CE50	pendiente	
Citrato 10 mM, 3 mg/ml de NaCl, 25 mg/ml de trehalosa, 20 mM de arginina HCl, 0,01% de polisorbato 20	LA_09_27A	T0	N/A	6,0	81,4	N/A	12,2	20,0	99,712	0,217			13,988	84,86	1,151		118,94		112	2,09E+12	0,53	
	Patrón: RSN0151								99,691	0,309			13,759	85,041	1,2		122,88		100	1,86E+12	0,56	
	LA_09_27A	T: 3 semanas +5ºC T:			81.6	5,8	12,2	19,7	99,670	0,309		0,021	14,143	84,561	1,297				N/A			
	Patrón: RSN0151								99,463	0,563			14,000	84,450	1,551		N/A		112	2,09E+12	0,53	
	LA_09_27A	3 semanas -20ºC T: 3			81.6	5,8	12,2	20,1	99,649	0,313		0,033	14,382	84,423	1,195				100	1,86E+12	0,56	
	Patrón: RSN0151								99,463	0,563			14,000	84,450	1,551							
	LA_09_27A	semanas +40ºC T: 6			81.6	5,8	13,4	19,3	97,322	0,807	1,324	0,547	12,133	85,819	2,048							
	Patrón: RSN0151								99,463	0,563			14,000	84,450	1,551							
	LA_09_27A	semanas +50ºC T: 6			81.6	5,9	12,3	24,8	99,673	0,327			13,798	85,176	1,026							
	Patrón: RSN0151								99,460	0,54			14,054	84,285	1,662				N/A			
	LA_09_27A	semanas -20ºC T: 6			81.4	5,9	12,2	24,9	99,670	0,33			13,756	86,192	1,052							
	Patrón: RSN0151								99,460	0,54			14,054	84,285	1,662							
	LA_09_27A	semanas +40ºC T: 6			81.4	5,9	13,8 +A	25,9	96,260	1,06	0,919	0,731	11,826	85,289	2,886							
	Patrón: RSN0151								99,460	0,54			14,054	84,285	1,662							
	LA_09_27A	semanas -80ºC T:3			N/A	5,9	12,2	24,7	99,667	0,333			13,298	86,669	1,033							
	Patrón: RSN0151								99,460	0,54			14,054	84,285	1,662							
	LA_09_27A	meses +5ºC T: 3			81.7	5,8	12,2	19,9	99,582	0,418			14,528	83,928	1,543							
	Patrón: RSN0151								99,427	0,573			14,413	84,08	1,507							
	LA_09_27A	meses -20ºC T: 3			81.7	5,8	12,4	20,4	99,684	0,316			14,936	83,655	1,409							
	Patrón: RSN0151								99,427	0,573			14,413	84,08	1,507							
	LA_09_27A	meses +40ºC			81.6	5,8	14,65 +A	20,3	94,276	2,005	2,599		14,671	80,287	4,843							
									99,427	0,573			14,413	84,08	1,507							

ES 2 702 246 T3

Tabla 51 – Resultados - formulación prototipo LA_09_27B

Tampón	Número de formulación	Punto temporal	Condición de almacenamiento	pH	PSD				ASD												
					Tm [°C]	pH	DLS [nm]	UV [mg/ml]	SEC				WCX				SDS-PAGE no red.		Elisa		
									Monómero [%]	Di-/oligomero [%]	HMW [%]	NP [%]	% ácidas	% neutras	% básicas	comentario	Banda principal	cometario	CE50%	CE50	pendiente
Citrato 10 mM, 50 mg de trahalosa, 0,01% de polisorbato	LA_09_27B	T0	N/A	6,0	81,5	N/A	13,6	20,9	99,688	0,312			13,723	85,084	1,194		117,40		104	1,93E+12	0.62
	Patrón: RSN0151								99,691	0,309			13,759	85,041	1,2		122,88		100	1,86E+12	0,56
	LA_09_27B	T: 3 semanas +5°C				6,1	13,6	20,5	99,321	0,384		0,295	13,911	84,772	1,317						
	Patrón: RSN0151								99,463	0,563			14,000	84,450	1,551				N/A		
	LA_09_27B	T:3 semanas -20°C				6,0	13,6	19,7	99,626	0,374			14,14	84,541	1,318						
	Patrón: RSN0151								99,463	0,563			14,000	84,450	1,551						
	LA_09_27B	T: 3 semanas +40°C				6,0	14,4	19,9	95,851	0,934	3,7	0,515	12,455	85,392	2,153						
	Patrón: RSN0151								99,463	0,563			14,000	84,450	1,551						
	LA_09_27B	T: 6 semanas +50°C				6,1	13,6	25,6	99,612	0,388			13,747	84,98	1,273						
	Patrón: RSN0151								99,460	0,54			14,054	84,285	1,662						
	LA_09_27B	T: 6 semanas -20°C				6,1	13,6	25,0	99,628	0,372			13,835	84,901	1,264						
	Patrón: RSN0151				N/A				99,460	0,54			14,054	84,285	1,662						
	LA_09_27B	T: 6 semanas +40°C				6,2	14,9	24,9	95,606	1,283	2,782	0,729	12,685	83,854	3,483		218,32	90, 28, 14 kD		N/A	
	Patrón: RSN0151								99,460	0,54			14,054	84,285	1,662		189,54				
	LA_09_27B	T: 6 semanas -80°C				6,1	13,7	25,0					13,382	84,783	1,336						
	Patrón: RSN0151								99,460	0,54			14,054	84,285	1,662						
	LA_09_27B	T:3 meses +5°C T: 3				6,1	13,7	20,8	99,636	0,349			14,63	83,798	1,571						
	Patrón: RSN0151								99,427	0,573			14,413	84,08	1,507				N/A		
	LA_09_27B	T: 3 meses -20°C				6,1	13,6	19,9	99,621	0,379			13,128	83,406	1,466						
	Patrón: RSN0151								99,427	0,573			14,413	84,08	1,507						
	LA_09_27B	T: 3 meses +40°C				6,0	15,56 +A	19,4	94,631	1,783	2,567		15,373	79,378	5,25						
	Patrón: RSN0151								99,427	0,573			14,413	84,08	1,507						

Tabla 52 – Resultados - formulación prototipo LA_09_27C

Tampón	Número de formulación	Punto temporal	Condición de almacenamiento	pH	PSD				ASD												
					Tm [°C]	pH	DLS [nm]	UV [mg/ml]	SEC				WCX				SDS-PAGE no red.		Elisa		
									Monómero [%]	Di-/oligomero [%]	HMW [%]	NP [%]	% ácidas	% neutras	% básicas	comentario	Banda principal	cometario	CE50%	CE50	pendiente
Citrato 10 mM. 6mg de NaCl. 0,01% de polisorbato 20	LA_09_27C	T0	N/A	6,0	80,7	N/A	11,6		99,688	0,312			13,723	85,084	1,194		117,40		104	1,93E+12	0.62
	Patrón: RSN0151							19,921,1	99,691	0,309			13,759	85,041	1,2		122.88		100	1,86E+12	0,56
	LA_09_27C	T: 3 semanas +5°C T:			80.9	5,8	11,6		99,321	0,384		0,295	13,911	84,772	1,317						
	Patrón: RSN0151							20,620,4	99,463	0,563			14,000	84,450	1,551						
	LA_09_27C	3 semanas -20°C T: 3			80.7	5,8	11,6		99,626	0,374			14,14	84,541	1,318						
	Patrón: RSN0151							25,425,4	99,463	0,563			14,000	84,450	1,551						
	LA_09_27C	semanas +40°C T: 6			80.4	5,8	12,98+ A		96,857	0,934	1,7	0,515	12,455	85,392	2,153						
	Patrón: RSN0151							5,325,7	99,463	0,563			14,000	84,450	1,551				N/A		
	LA_09_27C	semanas +50°C T: 6			80.7	5,9	11,6		99,612	0,388			13,747	84,98	1,273						
	Patrón: RSN0151							21,420,9	99,460	0,54			14,054	84,285	1,662						
	LA_09_27C	semanas -20°C T: 6			80.9	5,9	11,5		99,623	0,372			13,335	84,901	1,264						
	Patrón: RSN0151							21,4	99,460	0,54			14,054	84,285	1,662						
	LA_09_27C	semanas +40°C T: 6			80.7	5,9	19,77+ A		95,806	1,263	2,162	0,729	12,685	83,332	3,483		218.32			N/A	
	Patrón: RSN0151								99,460	0,54			14,054	84,285	1,662		189.54				
	LA_09_27C	semanas -80°C T:3			N/A	5,8	18,7						13,382	84,789	1,336						
	Patrón: RSN0151								99,460	0,54			14,054	84,285	1,662						
	LA_09_27C	meses +5°C T: 3			80.9	5,8	11,6		99,636	0,349			14,63	83,798	1,571						
	Patrón: RSN0151								99,427	0,573			14,413	84,08	1,507				N/A		
	LA_09_27C	meses -20°C T: 3			81.2	5,8	11,7		99,621	0,379			15,128	83,406	1,466						
	Patrón: RSN0151								99,427	0,573			14,413	84,08	1,507						
	LA_09_27C	meses +40°C			80.9	5,8	14,28+ A		94,631	1,783	2,567		16,373	79,378	5,25						
									99,427	0,573			14,413	84,08	1,507						

Tabla 53 – Resultados - formulación prototipo LA_09_27D

Tampón	Número de formulación	Punto temporal	Condición de almacenamiento	pH	PSD		DLS	UV	ASD		SEC			WCX			SDS-PAGE no red.		Elisa		
					Tm [°C]	pH	[nm]	[mg/ml]	Monómero [%]		Di-/oligomero [%]	HMW [%]	NP [%]	% ácidas	% neutras	% básicas	comentario	Banda principal	comentario	CE50%	CE50	pendiente
Citrato 10 mM, 50 mg de trehalosa, 20 mg de arginina HCl, 0,01 % de polisorbato 20	LA_09_27D Patrón RSN0151	T0	N/A		81,6	N/A	13,3	19,8	99,579		0,283			13,974	84,912	1,114		117,29		94	1,75E+12	0,61
	LA_09_27D Patrón RSN0151	T: 3 semanas +5°C T:			81.4	6,0	13,1	19,5	99,691		0,309			13,759	85,041	1,2		122,88		100	1,98E+12	0,56
	LA_09_27D Patrón RSN0151								99,676		0,313		0,011	13,825	84,918	1,256						
									99,463		0,563			14,000	84,450	1,551						
	LA_09_27D Patrón RSN0151	3 semanas - 20°C T: 3			81.4	5,8	13,2	20,4	99,633		0,338		0,024	14,028	84,745	1,227						
									99,463		0,563			14,000	84,450	1,551						
	LA_09_27D Patrón RSN0151	semanas +40°C T: 6			81.4	6,0	13,9	19,6	97,660		0,809	0,946	0,592	12,315	85,553	2,131				N/A		
									99,463		0,563			14,000	84,450	1,551						
	LA_09_27D Patrón RSN0151	semanas +5°C T: 6			80.9	6,0	13,1	24,4	99,660		0,34			13,475	85,337	1,188						
									99,460		0,54			14,054	84,285	1,662						
	LA_09_27D Patrón RSN0151	semanas - 20°C T: 6			80.6	6,0	13,2	24,2	99,643		0,352			13,445	85,502	1,053						
									99,460		0,54			14,054	84,285	1,662						
	LA_09_27D Patrón RSN0151	semanas +40°C T: 6			80.9	6,0	14,5	24,8	96,540		1,056	1,637	0,763	11,916	85,099	2,985		192,29	90_14 kD		N/A	
									99,460		0,54			14,054	84,285	1,662		189,54				
	LA_09_27D Patrón RSN0151	semanas - 80°C T: 3			N/A	6,0	13,2	24,5	99,664		0,336			13,485	83,357	1,159						
									99,460		0,54			14,054	84,285	1,662						
	LA_09_27D Patrón RSN0151	meses +5°C T: 3			82.1	5,9	13,1	20,4	99,693		0,341			14,09	84,528	1,38						
									99,427		0,573			14,413	84,08	1,507				N/A		
	LA_09_27D Patrón RSN0151	meses -20°C T: 3			82.1	5,9	13,2	19,8	99,655		0,394			14,521	84,08	1,398						
									99,427		0,573			14,413	84,08	1,507						
	LA_09_27D Patrón RSN0151	meses +40°C T: 3			81.9	5,9	15,2	20,4	94,413		1,634	2,448	1,12	14,173	81,003	4,823						
									99,427		0,573			14,413	84,08	1,507						

Tabla 54 – Resultados - formulación prototipo LA_09_28A

Tampón	Número de formulación	Punto temporal	Condición de almacenamiento	pH	PSD				ASD												
					Tm [ºC]	pH	DLS [nm]	UV [mg/ml]	SEC				WCX				SDS-PAGE no red.		Elisa		
									Monómero [%]	Di-/oligomero [%]	HMW [%]	NP [%]	% ácidas	% neutras	% básicas	comentario	Banda principal	cometario	CE50 %	CE50	pendiente
Acetato 10 mM, 3 mg/ml de NaCl, 25 mg/ml de trehalosa , 20 mM de arginina HCl, 0,01% de polisorbato 20	LA_09_28A	T0	N/A		81,1	N/A	12,9	17,4	99,503	0,26			14,153	84,625	1,221		118,94		112	2,09E+12	0,53
	Patrón: RSN0151								99,691	0,309			13,772	85,024	1,204		122,88		100	1,86E+12	0,56
	LA_09_28A	T: 3 semanas +5ºC T:			81.1	5,6	12,6	16,1	99,650	0,33			14,036	84,717	1,247						
	Patrón: RSN0151								99,481	0,519			14,278	84,346	1,377				N/A		
	LA_09_28A	3 semanas -20ºC T: 3			81.1	5,6	12,5	15,7	99,639	0,315		0,046	13,99	84,778	1,231		N/A		112	2,09E+12	0,53
	Patrón: RSN0151								99,481	0,519			14,278	84,346	1,377				100	1,86E+12	0,56
	LA_09_28A	semanas +40ºC T: 6			81.1	5,6	13,9	15,6	96,870	1,168	1,484	0,478	13,418	83,352	2,730						
	Patrón: RSN0151								99,481	0,519			14,278	84,346	1,377						
	LA_09_28A	semanas +50ºC T: 6			81.1	5,6	12,6	16,4	99,634	0,366			13,603	84,981	1,216				N/A		
	Patrón: RSN0151								99,460	0,545			13,864	85,048	1,088						
	LA_09_28A	semanas -20ºC T: 6			81.1	5,6	12,7	16,6	99,650	0,35			13,844	84,952	1,205						
	Patrón: RSN0151			5,5					99,460	0,545			13,864	85,048	1,088						
	LA_09_28A	semanas +40ºC T: 6			N/A	5,7	14,7	16,5	94,863	1,837	2,189	1,121	13,593	82,452	3,952		195,57	66, 28, 14 kDa		N/A	
	Patrón: RSN0151								99,460	0,545			13,864	85,048	1,088		189,54				
	LA_09_28A	semanas -80ºC T:3			N/A	5,6	12,8	16,6	99,623	0,372											
	Patrón: RSN0151								99,460	0,545			13,864	85,048	1,088						
	LA_09_28A	meses +5ºC T: 3			81.1	5,7	12,5	16,6	99,564	0,415			14,363	83,628	2,009						
	Patrón: RSN0151								99,421	0,579			14,618	83,409	1,973				N/A		
	LA_09_28A	meses -20ºC T: 3			81.3	5,7	12,7	16,4	99,594	0,388			14,314	83,738	1,948						
	Patrón: RSN0151								99,421	0,579			14,618	83,409	1,973						
	LA_09_28A	meses +40ºC T: 3			80.7	5,7	15,86+A	16,5	91,596	3,693	2,839	1,872	18,117	74,736	7,147						
									99,421	0,579			14,615	83,409	1,973						

Tabla 55 – Resultados - formulación prototipo LA_09_28B

Tampón	Número de formulación	Punto temporal	Condición de almacenamiento	pH	PSD			ASD					WCX			SDS-PAGE no red		Elisa		
					Tm [°C]	pH	DLS [nm]	UV [mg/ml]	Monómero [%]	SEC Di-/oligomero [%]	HMW [%]	NP [%]	% ácidas	% neutras	% básicas	comentario	Banda principal	cometario	CE50%	CE50	pendiente
Acetato 10 mM, 50 mg de trehalosa, 0,01 % de polisorbato 20	LA_09_28B Patrón RSND151	T0	N/A	5,5	81,6	N/A	14,4	17,1	99,590	0,41			14,257	84,511	1,232		118,94		112	2,09E+12	0,53
									99,691	0,309			13,772	85,024	1,204		122,88		100	1,86E+12	0,56
	LA_09_28B Patrón RSND151	T: 3 semanas +5ºC			81,6	5,6	14,2	16,3	99,476	0,476		0,048	14,56	84,112	1,328						
									99,481	0,519			14,278	84,346	1,377				N/A		
	LA_09_28B Patrón RSND151	T:3 semanas -20ºC			81,6	5,7	14,2	16,2	99,411	0,497		0,092	14,174	84,403	1,423		N/A		112	2,09E+12	0,53
									99,481	0,519			14,278	84,346	1,377				100	1,86E+12	0,56
	LA_09_28B Patrón RSND151	T: 3 semanas +40ºC			81,6	5,6	14,8	16,2	97,322	2,039		0,639	14,243	82,977	2,78						
									99,481	0,519			14,278	84,346	1,377						
	LA_09_28B Patrón RSND151	T: 6 semanas +5ºC			81,6	5,7	14,3	16,7	99,510	0,49			13,844	84,829	1,327				N/A		
									99,460	0,545			13,864	85,048	1,088						
	LA_09_28B Patrón RSND151	T: 6 semanas -20ºC			81,6	5,7	14,6	17,4	99,590	0,47			13,755	84,949	1,302						
									99,460	0,545			13,864	85,048	1,088						
	LA_09_28B Patrón RSND151	T: 6 semanas +40ºC			81,6	5,7	15,4	16,7	94,807	3,574	0,776	1,043	14,485	80,651	4,864		203,14	66, 28, 14 kDa		N/A	
									99,460	0,545			13,864	85,048	1,088		189,54				
	LA_09_28B Patrón RSND151	T: 6 semanas -80ºC			N/A	5,7	14,5	17,2	99,536	0,464			13,98	84,747	1,273						
									99,460	0,545			13,864	85,048	1,088						
	LA_09_28B Patrón RSND151	T:3 meses +5ºC T: 3			82,1	5,7	14,04	16,9	99,446	0,554			14,511	83,408	2,081						
									99,421	0,579			14,618	83,409	1,973				N/A		
	LA_09_28B Patrón RSND151	T: 3 meses -20ºC			81,9	5,7	14,1	16,8	99,548	0,452			15,255	82,643	2,103						
									99,421	0,579			14,618	83,409	1,973						
	LA_09_28B Patrón RSND151	T: 3 meses +40ºC			81,9	5,7	16,3	16,8	90,598	6,155	1,664	1,383	19,819	71,010	9,177						
									99,421	0,579			14,616	83,409	1,973						

Tabla 56 – Resultados - formulación prototipo LA_09_28C

Tampón	Número de formulación	Punto temporal	Condición de almacenamiento	pH	PSD				ASD													
					Tm	pH	DLS	UV		SEC			WCX				SDS-PAGE no red.		Elisa		
					[°C]		[nm]	[mg/ml]	Monómero [%]	Di-/oligomero [%]	HMW [%]	NP [%]	% ácidas	% neutras	% básicas	comentario	Banda principal	cometario	CE50%	CE50	pendiente
Acetato 10 mM, 6 g de NaCl, 0,01 de polisorbato 20	LA_09_28C	T0	N/A		80,5	N/A	11,9	18,0	99,561	0,439			14,329	84,427	1,244		130,69		142	1,52E+12	0.87
	Patrón: RSN0151								99,691	0,309			13,772	85,024	1,204		122,88		100	1,07E+12	0,81
	LA_09_28C	T: 3 semanas +5ºC T:			80.5	5,6	11,9	17,1	99,560	0,44			14,581	84,001	1,418						
	Patrón: RSN0151								99,481	0,519			14,278	84,346	1,377						
	LA_09_28C	3 semanas -20ºC T: 3			80.7	5,6	11,8	16,3	99,611	0,389			14,478	84,192	1,330						
	Patrón: RSN0151								99,481	0,519			14,278	84,346	1,377						
	LA_09_28C	semanas +40ºC T: 6			80.7	5,5	13,46+A	16,4	84,940	1,282	1,912	0,831	14,989	83,971	3,04				N/A		
	Patrón: RSN0151								99,481	0,519			14,278	84,346	1,377						
	LA_09_28C	semanas +50ºC T: 6			80.5	5,6	12,1	17,7	99,586	0,414			13,913	84,88	1,207						
	Patrón: RSN0151								99,460	0,545			13,864	85,048	1,088						
	LA_09_28C	semanas -20ºC T: 6			80.7	5,6	12,1	17,6	99,584	0,416			13,975	84,683	1,332						
	Patrón: RSN0151			5,5					99,460	0,545			13,864	85,048	1,088						
	LA_09_28C	semanas +40ºC T: 6			80.5	5,7	14,34+A	17,2	94,81	1,975	2,35	0,834	14,449	82,466	4,085		203,41	66, 28, 14 kDa		N/A	
	Patrón: RSN0151								99,460	0,545			13,864	85,048	1,088		189,54				
	LA_09_28C	semanas -80ºC T:3			N/A	5,6	12,1	16,1	99,524	0,476			13,949	84,815	1,235						
	Patrón: RSN0151								99,460	0,545			13,864	85,048	1,088						
	LA_09_28C	meses +5ºC T: 3			80.5	5,660	11,64	17,2	99,522	0,478			14,849	83,298	1,853						
	Patrón: RSN0151								99,421	0,579			14,618	83,409	1,973				N/A		
	LA_09_28C	meses -20ºC T: 3			80.5	5,6	11,7	17,2	99,565	0,435			14,827	92,896	2,277						
	Patrón: RSN0151								99,421	0,579			14,518	83,409	1,973						
	LA_09_28C	meses +40ºC T: 3			80.5	5,7	15,17+A	17,2	91,992	3,777	2,953	1,278	18,279	74,293	7,488						
									99,421	0,579			11,618	83,409	1,973						

Tabla 57 – Resultados - formulación prototipo LA_09_28D

Tampón	Número de formulación	Punto temporal	Condición de almacenamiento	pH	PSD				ASD												
					Tm [ºC]	pH	DLS [nm]	UV [mg/ml]	SEC				WCX				SDS-PAGE no red.		Elisa		
									Monómero [%]	Di-/oligomero [%]	HMW [%]	NP [%]	% ácidas	% neutras	% básicas	comentario	Banda principal	cometario	CE50%	CE50	pendiente
Acetato 10 mM, 50 mg de trehalosa, 20 mM de arginina HCl, 0,01% de polisorbato 20	LA_09_28D	T0	N/A	5,5	81,7	N/A	14,3	16,2	99,231	0,336			14,335	84,478	1,186		131,16		91	9,75E+12	0,60
	Patrón: RSN0151								99,691	0,309			13,772	85,024	1,204		122,88		100	1,07E+12	0,81
	LA_09_28D	T: 3 semanas +5ºC T:			81.7	5,6	14,1	15,9	99,603	0,363		0,039	14,309	84,351	1,34						
	Patrón: RSN0151								99,481	0,519			14,278	84,346	1,377						
	LA_09_28D	3 semanas -20ºC T: 3			81.5	5,6	14,1	15,5	99,558	0,395		0,047	14,048	84,700	1,252						
	Patrón: RSN0151								99,481	0,519			14,278	84,346	1,377						
	LA_09_28D	semanas +40ºC T: 6			81.7	5,6	14,8	15,7	96,904	1,403	0,957	0,736	14,872	83,307	2,821				N/A		
	Patrón: RSN0151								99,481	0,519			14,278	84,346	1,377						
	LA_09_28D	semanas +50ºC T: 6			81.5	5,6	14,3	16,5	99,603	0,4			13,991	84,894	1,175						
	Patrón: RSN0151								99,460	0,545			13,864	85,048	1,088						
	LA_09_28D	semanas -20ºC T: 6			81.5	5,6	14,4	16,5	99,633	0,367			13,683	84,139	1,179						
	Patrón: RSN0151								99,460	0,545			13,864	85,048	1,088		203,72	66, 28, 14 kDa		N/A	
	LA_09_28D	semanas +40ºC T: 6			81.8	5,7	16,0	16,4	55,067	2,24	1,578	1,095	14,794	82,051	4,155		189,54				
	Patrón: RSN0151								99,460	0,545			13,864	85,048	1,088						
	LA_09_28D	semanas -80ºC T:3			N/A	5,6	14,4	15,5	99,616	0,384			13,795	84,888	1,323						
	Patrón: RSN0151								99,460	0,545			13,864	85,048	1,088						
	LA_09_28D	meses +5ºC T: 3			81.8	5,7	13,8	16,3	99,446	0,416			14,089	83,957	1,954						
	Patrón: RSN0151								99,421	0,579			14,618	83,409	1,973		N/A				
	LA_09_28D	meses -20ºC T: 3			81.7	5,7	14,1	15,8	99,548	0,380			14,488	83,570	1,942						
	Patrón: RSN0151								99,421	0,579			14,618	83,409	1,973						
	LA_09_28D	meses +40ºC T: 3			81.5	5,7	16,9	16,4	90,910	4,506	2,69	1,894	19,018	74,345	8,697						
									99,421	0,579			14,618	83,409	1,973						

Tabla 58 – Resultados - formulación prototipo LA_09_29A

Tampón	Número de formulación	Punto temporal	Condición de almacenamiento	pH	PSD				ASD												
										SEC				WCX				SDS-PAGE no red.		Elisa		
					Tm [ºC]	pH	DLS [nm]	UV [mg/ml]	Monómero [%]	Di-/oligomero [%]	HMW [%]	NP [%]	% ácidas	% neutras	% básicas	comentario	Banda principal	cometario	CE50%	CE50	pendiente
Histidina 10 mM, 3 mg/ml de NaCl, 25 mg/ml de trehalosa, 20 mM de arginina HCl, 0,01% de polisorbato 20	LA_09_29A	T0	N/A	5,0	79,4	N/A	12,5	20,3	99,748	0,252			13,946	84,881	1,174		123,08		174	1,71E+12	0.77
	Patrón: RSN0151								99,691	0,309			13,755	85,045	1,2		122,88		100	9,84E+13	0,64
	LA_09_29A	T: 3 semanas +5ºC T:			79.7	5,1	12,5	18,1	99,690	0,31			14,304	84,625	1,077						
	Patrón: RSN0151								99,504	0,496											
	LA_09_29A	3 semanas -20ºC T: 3			79.3	5,2	12,5	17,9	99,625	0,338		0,037	14,252	84,531	1,217						
	Patrón: RSN0151								99,504	0,496											
	LA_09_29A	semanas +40ºC T: 6			78.4	5,0	19,45+A	18,6	95,224	5,159	9,048	0,569		50,132	7,197				N/A		
	Patrón: RSN0151								99,504	0,496											
	LA_09_29A	semanas +50ºC T: 6			78.3	5,1	12,3	18,9	99,664	0,336			13,962	84,777	1,261						
	Patrón: RSN0151								99,461	0,539			13,982	84,916	1,102						
	LA_09_29A	semanas -20ºC T: 6			78.9	5,1	12,6	18,7	99,683	0,317			16,596	85,942	1,061						
	Patrón: RSN0151								99,461	0,539			13,982	84,916	1,102						
	LA_09_29A	semanas +40ºC T: 6			75.8	4,9	29,13+A	17,9	67,868	8,317	22,58	1,237	12,029	89,19	18,78		205,8	90, 14 kDa		N/A	
	Patrón: RSN0151								99,461	0,539			13,982	84,916	1,102		189,54				
	LA_09_29A	semanas -80ºC T:3			N/A	5,2	12,5	19,3	99,666	0,334			13,621	85,201	1,177						
	Patrón: RSN0151								99,461	0,539			13,982	94,916	1,102						
	LA_09_29A	meses +5ºC T: 3			79.2				99,642	0,358			14,401	83,691	1,908						
	Patrón: RSN0151								99,424	0,576			14,922	83,041	2,037				N/A		
	LA_09_29A	meses -20ºC T: 3			79.2		N/A		99,684	0,313			14,189	83,583	2,228						
	Patrón: RSN0151								99,424	0,576			14,922	83,041	2,037						
	LA_09_29A	meses +40ºC T: 3			77.3				46,856	0,905	39,125	3,104	26,766	41,194	32,04						
									99,424	0,576			14,822	83,041	2,037						

Tabla 59 – Resultados - formulación prototipo LA_09_29B

Tampón	Número de formulación	Punto temporal	Condición de almacenamiento	pH	PSD				ASD												
					Tm [ºC]	pH	DLS [nm]	UV [mg/ml]	SEC				WCX				SDS-PAGE no red.		Elisa		
									Monómero [%]	Di-/oligomero [%]	HMW [%]	NP [%]	% ácidas	% neutras	% básicas	comentario	Banda principal	cometario	CE50%	CE50	pendiente
Histidina 10 mM, 50 mg de trehalosa, 0,01 % de polisorbato 20	LA_09_29B	T0	N/A		81,0	N/A	10,7	20,2	99,679	0,321			13,891	84,907	1,202		122,26		118	1,16E+12	0.73
	Patrón: RSN0151								99,691	0,309			13,755	85,045	1,2		122,88		100	9,84E+13	0,64
	LA_09_29B	T: 3 semanas +5ºC			81.3	5,0	10,5	19,3	99,622	0,351			14,145	84,674	1,182						
	Patrón: RSN0151								99,504	0,496			14,208	84,672	1,22						
	LA_09_29B	T:3 semanas -20ºC			N/A	5,1	10,4	17,6	99,623	0,342			14,369	84,470	1,162						
	Patrón: RSN0151								99,504	0,496			14,208	84,672	1,22						
	LA_09_29B	T: 3 semanas +40ºC			N/A	4,9	11,2	18,2	93,06	4,186	2,448	0,368	35,551	59,191	5,247				N/A		
	Patrón: RSN0151								99,504	0,496			14,208	84,672	1,22						
	LA_09_29B	T: 6 semanas +50ºC			81.0	5,1	10,4	19,9	99,613	0,387			13,622	85,381	0,988						
	Patrón: RSN0151								99,461	0,539			13,982	84,916	1,102						
	LA_09_29B	T: 6 semanas -20ºC				5,1	10,4	19,2	99,653	0,347			13,758	86,184	1,058						
	Patrón: RSN0151			5,0					99,461	0,539			13,982	84,916	1,102						
	LA_09_29B	T: 6 semanas +40ºC				4,9	11,98 + A	19,4	85,502	7,644	6,093	0,761	45,568	42,961	11,071		200,33	90,14 kDa		N/A	
	Patrón: RSN0151								99,461	0,539			13,982	84,916	1,102		189,54				
	LA_09_29B	T: 6 semanas -80ºC				5,1	10,3	19,0	99,654	0,346			13,454	83,382	1,164						
	Patrón: RSN0151								99,461	0,539			13,982	84,916	1,102						
	LA_09_29B	T:3 meses +5ºC T: 3			N/A				99,603	0,397			14,238	83,852	1,910						
	Patrón: RSN0151						N/A		99,424	0,576			14,922	83,041	2,037				N/A		
	LA_09_29B	T: 3 meses -20ºC							99,650	0,350			14,108	83,764	2,128						
	Patrón: RSN0151								99,424	0,576			14,922	83,041	2,037						
	LA_09_29B	T: 3 meses +40ºC							87,612	11,218	18,161	3,009	41,575	42,311	16,113						
	Patrón: RSN0151								99,424	0,576			14,922	83,041	2,037						

Tabla 60 – Resultados - formulación prototipo LA_09_29C

Tampón	Número de formulación	Punto temporal	Condición de almacenamiento	pH	Tm [°C]	pH	PSD DLS [nm]	PSD UV [mg/ml]	SEC Monómero [%]	SEC Di-/oligomero [%]	SEC HMW [%]	SEC NP [%]	WCX % ácidas	WCX % neutras	WCX % básicas	WCX comentario	SDS-PAGE no red Banda principal	SDS-PAGE no red cometario	CE50 %	Elisa CE50	Elisa pendiente
Histidina 10 mM, 6 mg de NaCl, 0,01 % de polisorbato 20	LA_09_29C Patrón: RSN0151	T0	N/A		76,9	N/A	11,9	19,4	99,741	0,259			14,119	84,681	1,2		122,43				
									99,691	0,309			13,755	85,045	1,2		122,88				
	LA_09_29C Patrón: RSN0151	T: 3 semanas +5ºC T:			79,0	5,1	11,9	19,0	99,643	0,357			14,046	84,796	1,158						
									99,504	0,496			14,208	84,672	1,22						
	LA_09_29C Patrón: RSN0151	3 semanas -20ºC T: 3			78,4	5,2	12,0	18,6	99,674	0,326			14,171	84,763	1,076						
									99,504	0,496			14,208	84,672	1,22						
	LA_09_29C Patrón: RSN0151	semanas +40ºC T: 6			77,4	5,0	19,67+A	18,7	84,940	6,173	9,325	0,562	14,068	47,301	11,631				N/A		
									99,504	0,496			14,208	84,672	1,22						
	LA_09_29C Patrón: RSN0151	semanas +50ºC T: 6			78,1	5,2	11,8	19,7	99,627	0,373			13,871	84,916	1,213						
									99,461	0,539			13,982	84,916	1,102						
	LA_09_29C Patrón: RSN0151	semanas -20ºC T: 6		5,0	77,8	5,2	12,0	20,8	99,661	0,339			13,764	85,153	1,083						
									99,461	0,539			13,982	84,916	1,102						
	LA_09_29C Patrón: RSN0151	semanas +40ºC T: 6			76,6	4,9	34,92+A	19,2	61,257	7,789	29,585	1,369	43,325	85,038	21,636		199,58	90,14 kDa			
									99,461	0,539			13,982	84,916	1,102		189,54			N/A	
	LA_09_29C Patrón: RSN0151	semanas -80ºC T:3			N/A	5,2	11,9	19,9	99,663	0,337			13,521	85,426	1,053						
									99,461	0,539			13,982	85,916	1,102						
	LA_09_29C Patrón: RSN0151	meses +5ºC T: 3			78,4				99,594	0,406			14,214	83,772	1,984						
									99,424	0,576			14,922	83,041	2,037				N/A		
	LA_09_29C Patrón: RSN0151	meses -20ºC T: 3			78,5		N/A		99,680	0,32			14,199	83,324	1,977						
									99,424	0,576			14,922	83,041	2,037						
	LA_09_29C Patrón: RSN0151	meses +40ºC T: 3			76,6				36,901	9,237	50,322	3,54	25,809	37,193	37,198						
									99,424	0,576			14,922	83,041	2,037						

Tabla 61 – Resultados - formulación prototipo LA_09_29D

Tampón	Número de formulación	Punto temporal	Condición de almacenamiento	pH	PSD				ASD												
					Tm [ºC]	pH	DLS [nm]	UV [mg/ml]	SEC				WCX				SDS-PAGE no red.		Elisa		
									Monómero [%]	Di-/oligomero [%]	HMW [%]	NP [%]	% ácidas	% neutras	% básicas	comentario	Banda principal	cometario	CE50%	CE50	pendiente
Histidina 10 mM, 50 mg de trehalosa, 20 mM de arginina HCl, 0,01% de polisorbato 20	LA_09_29D	T0	N/A		80,7	N/A	13,1	19,4	99,789	0,211			14,446	84,366	1,189		124,60		169	1,66E+12	0.66
	Patrón: RSN0151								99,691	0,309			13,755	85,045	1,2		122,88		100	9,84E+13	0,64
	LA_09_29D	T: 3 semanas +5ºC T:			80.3	5,1	12,6	17,8	99,670	0,33			14,168	84,691	1,141						
	Patrón: RSN0151								99,504	0,496			14,208	84,672	1,22						
	LA_09_29D	3 semanas -20ºC T: 3			75.5	5,1	12,8	17,1	99,663	0,337			14,366	84,473	1,161						
	Patrón: RSN0151								99,504	0,496			14,208	84,672	1,22						
	LA_09_29D	semanas +40ºC T: 6			78.6	4,9	15,59+A	17,2	87,165	6,56	3,72	0,553	14,697	83,391	10,712				N/A		
	Patrón: RSN0151								99,504	0,496			14,208	84,672	1,22						
	LA_09_29D	semanas +5ºC T: 6			80.0	5,1	12,6	18,7	99,655	0,345			13,796	84,86	1,344						
	Patrón: RSN0151								99,461	0,539			13,982	84,916	1,102						
	LA_09_29D	semanas -20ºC T: 6			72.1	5,1	12,6	18,9	99,687	0,313			13,806	84,995	1,2						
	Patrón: RSN0151			5,0					99,461	0,539			13,982	84,916	1,102						
	LA_09_29D	semanas +40ºC T: 6			72.7	4,9	20,47+A	17,9	76,511	8,167	14,268	1,054	14,302	41,575	14,124		198,81	90, 14 kDa		N/A	
	Patrón: RSN0151								99,461	0,539			13,982	84,916	1,102		189,54				
	LA_09_29D	semanas -80ºC T:3			N/A	5,1	12,5	18,5	99,680	0,32			13,995	84,985	1,020						
	Patrón: RSN0151								99,461	0,539			13,982	84,916	1,102						
	LA_09_29D	meses +5ºC T: 3			80.0				99,632	0,368			14,623	83,446	1,931						
	Patrón: RSN0151								99,424	0,576			14,922	83,041	2,037				N/A		
	LA_09_29D	meses -20ºC T: 3			80.0		N/A		99,677	0,323			14,150	83,575	2,276						
	Patrón: RSN0151								99,424	0,576			14,922	83,041	2,037						
	LA_09_29D	meses +40ºC T: 3			78.0				56, 956	11,325	29,509	2,8	30,907	41,914	27,279						
									99,424	0,576			14,922	83,041	2,037						

Estudios de formulación anti-CXCR5 (20 mg/ml)

Los datos en los Ejemplos 13-16 se recogieron durante los estudios de formulación para el Anticuerpo CXCR5 Inicial y su producto farmacológico para administración intravenosa y subcutánea. El objetivo de los estudios de formulación fue proporcionar una solución de inyección de Anticuerpo CXCR5 Inicial carente de partículas visuales, estable, transparente o ligeramente opalescente e incolora o ligeramente amarilla, para la fase I.

MATERIALES

Sustancia farmacológica (DS)

Se utilizaron dos lotes de sustancias farmacológicas para estos estudios de formulación. Uno se formuló en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y el otro se formuló en tampón citrato. Véase la tabla 62.

Tabla 62 - Lotes de sustancias farmacológicas disponibles

Lote Nº	Cantidad	Concentración Ab Inicial	Tampón	valor de pH [-]
RSN0151	10 g	5,0 mg/ml	PBS 155 mM	7,2
SCB0001	20 g	20,30 mg/ml	citrato 10 mM	6,0

Excipientes

La Tabla 63 muestra los excipientes que se usaron durante los estudios de formulación.

Tabla 63 – Excipientes

Excipiente	Nº de material	Proveedor
Arginina	1.01587	Merck
Ácido cítrico	100241	Merck
Histidina	1.04352	Merck
Ácido clorhídrico	114027	H600
Sacarosa	S3929	Sigma-Aldrich
Acetato de sodio	1.06265	Merck
Cloruro de sodio	10158	H600
Citrato de sodio	114196	H600
Hidróxido de sodio	114076	H600
Polisorbato 20	139850	H600
α,α-Trehalosa	T9531	Sigma-Aldrich

PROCEDIMIENTOS

Preparación de la muestra

La ultrafiltración/diafiltración se realizó a pequeña escala utilizando dispositivos VivaSpin con una membrana Hydrosart y un límite de corte de 30 kDa. El material RSN se concentró de 5 mg/ml a 20 mg/ml, y el tampón de fosfato (PBS) se intercambió por tampón de citrato 10 mM, pH 6,0, tampón de acetato, pH 5,5, o tampón de histidina, pH 5,0. Las unidades VivaSpin se colocaron a temperatura ambiente (TA) en una centrifugadora de laboratorio común y se centrifugaron a 2000 rpm. La solución se filtró sobre un Minisart de 0,2 µm antes de las pruebas analíticas. Todas las muestras se almacenaron entre +2 º y +8 ºC, bien cerradas y protegidas de la luz, hasta las pruebas analíticas a T0 y después de una semana de estrés térmico a +40 ºC o después de estrés mecánico durante 2,5 horas, 300 rpm a temperatura ambiente (solo para evaluación de la concentración de polisorbato 20).

Procedimientos analíticos

Se utilizaron las siguientes técnicas para el análisis de muestras:

Tabla 64 - Técnicas analíticas utilizadas

Técnica (Empresa)	**Parámetro que se va a investigar**
Organoléptico (-)	Apariencia
Nefelómetro (Hach Lange)	Turbiedad
Medidor de pH (WTW)	Valor de pH
UV (Perkin Elmer)	Concentración de mAB
Densímetro (Paar)	Densidad
Osmómetro (Knauer)	Osmolalidad
Viscosímetro (Paar)	Viscosidad
Dispersión de luz dinámica (Malvern)	Diámetro hidrodinámico
SEC (N/A)	Mono/di-/oligómero y proteína de alto peso molecular (HMWP)/bajo peso molecular (LMW)
WCX (N/A)	Isoformas (ácidas/básicas/neutras)
ELISA * (N/A)	Potencia (aglutinación)
SDS-Page (red.) ** (N/A)	HC/LC, fragmentos de mAB
SDS-Page (no red.) ** (N/A)	Productos de agregación y degradación.
HIAC * (N/A)	Material particulado
* Algunas muestras se analizarán. ** SDS-Page se realizará en caso de que SEC muestre resultados inusuales.	

Ejemplo 13 - Optimización de pH adicional

Los estudios de preformulación identificaron un tampón de citrato 10 mM a pH 6,0 como el mejor tampón con menos tendencia a la agregación del Anticuerpo CXCR5 Inicial. Para obtener un perfil de pH en un tampón de citrato, se evaluó la estabilidad dependiente del pH por etapas de pH 5,0 a 7,0. Debido a la disponibilidad limitada de la sustancia farmacológica, la detección en profundidad del pH se realizó solo con tampón de citrato 10 mM. Se tomaron muestras a T0 y después de una semana de estrés térmico a +40 ºC. Véanse las Tablas 65-69.

Tabla 65 - Resumen de muestras

Lote Nº	***Valor de pH diana (-)***	***Valor de pH medido (-)***
LA_09_030	*5,0*	*5,1*
LA_09_031	*5,3*	*5,4*
LA_09_032	*5,5*	*5,6*
LA_09_033	*5,7*	*5,8*
LA_09_034	*6,0*	*6,1*
LA_09_035	*6,3*	*6,4*
LA_09_036	*6,5*	*6,6*
LA_09_037	*6,7*	*6,8*
LA_09_038	*7,0*	*7,1*

Tabla 66 - resultados T0

Lote Nº	***Apariencia***	***Valor de pH medido (-)***	***mAB conc. (mg/ml)***	***Diámetro hidrodinámico (nm)***
LA_09_030	*Transparente*	*5,1*	*23,35*	*15,42 + agr.*
LA_09_031	*Transparente*	*5,4*	*21,95*	*12,85*

Lote Nº	Apariencia	Valor de pH medido (-)	mAB conc. (mg/ml)	Diámetro hidrodinámico (nm)
LA_09_032	Transparente	5,6	23,00	12,98
LA_09_033	Transparente	5,8	21,21	12,99
LA_09_034	Transparente	6,1	22,77	12,83
LA_09_035	Transparente	6,4	23,87	13,22
LA_09_036	Transparente	6,6	23,74	13,04
LA_09_037	Transparente	6,8	22,85	13,00
LA_09_038	Transparente	7,1	21,96	13,32

Tabla 67 - resultados T1 semana + 40 ºC

Lote Nº	Apariencia	Valor de pH medido (-)	mAB conc. [mg/ml]	Diámetro hidrodinámico (nm)
LA_09_030	Transparente	5,2	15,62*	15,27 + agr.
LA_09_031	Transparente	5,5	21,91	16,74 + agr.
LA_09_032	Transparente	5,6	24,32	13,59
LA_09_033	Transparente	5,8	24,74	13,83
LA_09_034	Transparente	6,1	24,18	13,25
LA_09_035	Transparente	6,5	N/A	13,41
LA_09_036	Transparente	6,6	23,03	13,37
LA_09_037	Transparente	6,9	22,68	13,24
LA_09_038	Transparente	7,2	23,33	14,40
* Resultado inusual debido a error de dilución.				

Tabla 68 - Resultados de ASD T0

Lote Nº	% Monómero	% Di-/Oligómero	% HMWP	%	%	%	% básico
LA_09_030	99,63	0,37	-	-	13,60	85,18	1,22
LA_09_031	99,57	0,43	-	-	13,52	85,24	1,24
LA_09_032	99,48	0,52	-	-	13,71	85,04	1,25
LA_09_033	99,51	0,49	-	-	13,99	84,61	1,40
LA_09_034	99,41	0,59	-	-	13,62	85,17	1,21
LA_09_035	99,24	0,76	-	-	13,72	84,64	1,64
LA_09_036	98,72	1,28	-	-	13,72	84,45	1,83
LA_09_037	98,95	1,05	-	-	13,60	84,73	1,67
LA_09_038	98,58	1,42	-	-	13,84	84,13	2,03

Tabla 69 - resultados T1 semana +40 ºC

Lote Nº	% Monómero	% Di-/Oligómero	% HMWP	% LMW	% ácido	% neutro	% básico
LA_09_030	95,19	0,97	3,29	0,55	11,90	83,92	4,18
LA_09_031	96,47	0,89	2,14	0,50	12,19	84,70	3,11
LA_09_032	96,82	0,92	1,69	0,57	12,14	85,48	2,38
LA_09_033	97,13	0,94	1,48	0,45	12,41	85,04	2,55

Lote Nº	*% Monómero*	*% Di-/Oligómero*	*% HMWP*	*% LMW*	*% ácido*	*% neutro*	*% básico*
LA_09_034	*97,73*	*0,97*	*0,82*	*0,48*	*12,35*	*85,69*	*1,96*
LA_09_035	*97,58*	*1,12*	*0,89*	*0,41*	*11,93*	*85,74*	*2,33*
LA_09_036	*97,47*	*1,32*	*0,86*	*0,35*	*12,01*	*85,46*	*2,53*
LA_09_037	*97,35*	*1,41*	*0,87*	*0,37*	*12,08*	*85,28*	*2,64*
LA_09_038	*96,97*	*1,62*	*0,97*	*0,44*	*11,65*	*85,10*	*3,25*

En conclusión, los datos confirman los resultados ya generados durante los estudios de preformulación: el aumento del pH hace que el contenido de monómero disminuya y que la tasa de dímero aumente. Las muestras a +40 ºC mostraron con un valor de pH inferior una reducción en las HMW de hasta pH 6,0 y después un aumento hasta pH 5,0.

Ejemplo 14 - Optimización de tampón adicional

A continuación, los tampones de citrato, acetato e histidina (como tampón de reserva) se cribaron a 5/10/25/50 mM a los valores de pH seleccionados. Véanse las Tablas 70-84.

Tabla 70 - **Resumen de muestras** - **Tampón de citrato pH 6,0**

Lote Nº	*Conc. de tampón de citrato [mM]*
LA_09_040	*5*
LA_09_034	*10*
LA_09_041	*25*
LA_09_042	*50*

Tabla 71 - resultados después de T0

Lote Nº	*Apariencia*	*Valor de pH medido (-)*	*Conc. de mAB [mg/ml]*	*Diámetro hidrodinámico (nm)*
LA_09_040	*Transparente*	*6,1*	*20,05*	*13,47*
LA_09_034	*Transparente*	*6,1*	*22,77*	*12,83*
LA_09_041	*Transparente*	*6,2*	*20,48*	*11,91*
LA_09_042	*Transparente*	*6,1*	*22,19*	*11,87*

Tabla 72- resultados después de T1 semana +40 ºC

Lote Nº	*Apariencia*	*Valor de pH medido (-)*	*Conc. de mAB [mg/ml]*	*Diámetro hidrodinámico (nm)*
LA_09_040	*Transparente*	*6,3*	*21,62*	*13,78*
LA_09_034	*Transparente*	*6,1*	*24,18*	*13,25*
LA_09_041	*Transparente*	*6,2*	*18,37*	*12,50*
LA_09_042	*Transparente*	*6,2*	*20,59*	*12,07*

Tabla 73 - resultados T0

Lote Nº	*% Monómero*	*% Di-/Oligómero (RRT 0,84)*	*% HMWP (RRT 0,68)*	*%*	*%*	*%*	*% básico*
LA_09_040	***99,49***	*0,51*	-	-	*13,19*	*85,81*	*1,00*
LA_09_034	***99,41***	*0,59*	-	-	*13,62*	*85,17*	*1,21*
LA_09_041	***99,55***	*0,42*	*0,03*	-	*13,24*	*85,67*	*1,09*

Lote Nº	% Monómero	% Di-/Oligómero (RRT 0,84)	% HMWP (RRT 0,68)	%	%	%	% básico
LA_09_042	**99,60**	0,39	0,01	-	13,41	85,48	1,11

Tabla 74 - resultados después de estrés térmico 1 semana/+40 ºC

Lote Nº	% Monómero	% Di-/Oligómero (RRT 0,84)	% HMWP (RRT 0,68)	%	%	%	% básico
LA_09_040	98,58	0,86	0,17	0,39	12,52	85,95	1,53
LA_09_034	97,73	0,97	0,82	0,48	12,35	85,69	1,96
LA_09_041	98,81	0,65	0,21	0,33	12,54	86,07	1,38
LA_09_042	98,87	0,59	0,14	0,40	12,45	86,10	1,45

Tabla 75 - Resumen sobre muestras - tampón de histidina pH 5,0

Lote Nº	Conc. de tampón de histidina [mM]
LA_09_043	5
LA_09_044	10
LA_09_045	25
LA_09_046	50

Tabla 76 - resultados después de T0

Lote Nº	Apariencia hidrodinámica	Valor de pH medido (-)	Conc. de mAB [mg/ml]	diámetro (nm)
LA_09_043	Transparente	5,5	21,89	8,40 + agr.
LA_09_044	Transparente	N/A	6,95*	11,34
LA_09_045	Transparente	5,2	21,78	11,86 + agr.
LA_09_046	Transparente	5,1	20,04	11,86
* Datos reducidos debido a error de dilución de la muestra.				

Tabla 77 - resultados después de la semana T1 +40 ºC

Lote Nº	Apariencia	Valor de pH medido (-)	Conc. de mAB [mg/ml]	Diámetro hidrodinámico
LA_09_043	Transparente			
LA_09_044	Transparente	5,5	21,34	8,81
LA_09_045	Transparente	5,5	24,18	13,25
LA_09_046	Transparente	5,2	23,62	11,88
		5,1	21,41	12,50 + agr.

Tabla 78 - Resultados de ASD T0

Lote N º básico	%	% Di-	% HMWP	%	% ácido	%	%
LA_09_043	99,55	0,45	-	-	13,69	85,16	1,15
LA_09_044 *	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
LA_09_045	99,68	0,32	-	-	13,73	85,00	1,27

Lote N º básico	%	% Di-	% HMWP	%	% ácido	%	%
LA_09_046	99,70	0,30	-	-	13,43	85,49	1,08
* No analizado debido a error de dilución.							

Tabla 79 - resultados después de estrés térmico 1 semana/+40 ºC

Lote N º básico	%	% Di-	% HMWP	%	% ácido	%	%
LA_09_043	98,72	0,82	-	0,46	13,63	84,60	1,75
LA_09_044 *	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
LA_09_045	98,30	0,80	0,44	0,56	12,79	85,19	2,02
LA_09_046	97,79	0,68	1,07	0,46	12,61	84,75	2,64
* No analizado debido error de dilución.							

Tabla 80 - Resumen de las muestras - Tampón de acetato pH 5,5

Lote Nº	Conc. de tampón de acetato. [mM]
LA113244_09_053	5
LA113244_09_054	10
LA113244_09_055	25
LA113244_09_056	50

Tabla 81 - resultados después de T0

Lote Nº	Apariencia	Valor de pH medido (-)	Conc. de mAB [mg/ml]	Diámetro hidrodinámico
LA_09_053	Transparente	5,88	25,41	10,44
LA_09_054	Transparente	5,68	21,91	13,21 + agr.
LA_09_055	Transparente	5,56	21,53	14,06
LA_09_056	Transparente	5,56	22,08	13,54

Tabla 82 - resultados después de T0

Lote Nº	Apariencia	Valor de pH medido (-)	Conc. de mAB [mg/ml]	Diámetro hidrodinámico
LA_09_053	Transparente	5,88	26,43	11,48
LA_09_054	Transparente	5,69	23,40	13,44
LA_09_055	Transparente	5,61	21,53	14,46
LA_09_056	Transparente	5,56	21,68	13,71

Tabla 83 - resultados T0

Lote Nº	%	% Di-	% HMWP	%	% ácido	%	% básico
LA_09_053	98,89	0,99	0,02	0,10	14,44	83,67	1,89
LA_09_054	98,84	1,09	0,07	-	11,30	86,80	1,90
LA_09_055	98,91	0,99	0,07	0,03	11,30	86,77	1,93
LA_09_056	98,97	0,87	0,10	0,06	11,27	86,90	1,83

Tabla 84 - resultados después de estrés térmico 1 semana/+40 ºC

Lote Nº	*% Monómero*	*% Di-/Oligómero (RRT 0,84)*	*% HMWP (RRT 0,68)*	*%*	*% ácido*	*%*	*% básico*
LA_09_053	*97.68*	*1,96*	*0,04*	*0,32*	*14,53*	*81,50*	*3,91*
LA_09_054	*97.83*	*1,99*	*0,09*	*0,09*	*11,13*	*85,79*	*3,08*
LA_09_055	*97.88*	*2,00*	*0,09*	*0,09*	*11,09*	*85,76*	*3,15*
LA_09_056	*98.10*	*1,22*	*0,59*	*0,09*	*10,92*	*86,24*	*2,74*

En conclusión, los datos confirman los resultados generados durante los estudios de preformulación. Al utilizar citrato como agente tampón, el contenido de monómeros es ligeramente más alto que con el tampón de acetato y el tampón de histidina. Con histidina, se observa un comportamiento de agregación elevado, incluso en T0, lo que ocasiona dificultades en la preparación de muestras analíticas. No se puede medir una diferencia significativa entre las concentraciones de tampón analizadas, por lo que los tres tampones citrato, histidina y acetato se utilizarán con una concentración de 10 mM.

Ejemplo 15 - Optimización adicional de tensioactivo

Sobre la base de los ensayos de preformulación, la adición de tensioactivo no iónico polisorbato 20 (0,01%) mostró efectos beneficiosos sobre la estabilidad, por lo que se realizó una evaluación adicional de su concentración añadiendo las siguientes concentraciones de polisorbato 20 a los respectivos tampones: 0,0025%/0,005%/0,01%/0,02%. Véanse las Tablas 85-94.

Tabla 85 - **Resumen de muestras en tampón de acetato**

Lote Nº	*Polisorbato 20 en [mg/ml]*	*Concentración como porcentaje [%]*
LA_09_058	*0,2*	*0,02*
LA_09_059	*0,1*	*0,01*
LA_09_060	*0,05*	*0,005*
LA_09_061	*0,025*	*0,0025*

Tabla 86 - resultados después de T0

Lote Nº	*Apariencia*	*Valor de pH medido (-)*	*Conc. de mAB [mg/ml]*	*Diámetro hidrodinámico (nm)*
LA_09_058	*Transparente*	*5,61*	*23,71*	*12,50*
LA_09_059	*Transparente*	*5,64*	*22,76*	*12,94*
LA_09_060	*Transparente*	*5,63*	*23,89*	*12,83*
LA_09_061	*Transparente*	*5,64*	*25,79*	*12,88*

Tabla 87 - resultados después de estrés mecánico 300 rpm/150 min

Lote Nº	*Apariencia*	*Valor de pH medido (-)*	*Conc. de mAB [mg/ml]*	*Diámetro hidrodinámico (nm)*
LA_09_058	*Transparente*	*5,61*	*22,82*	*12,48*
LA_09_059	*Transparente*	*5,67*	*22,47*	*12,73*
LA_09_060	*Transparente*	*5,55*	*22,90*	*12,59*
LA_09_061	*Transparente*	*5,65*	*25,19*	*12,76*

Tabla 88 - resultados T0

Lote N º básico	*%*	*% Di-*	*% HMWP*	*%*	*% ácido*	*%*	*%*
LA_09_058	*99,17*	*0,80*	*0,03*	*-*	*11,25*	*86,94*	*1,81*
LA_09_059	*99,16*	*0,81*	*0,03*	*-*	*11,27*	*86,94*	*1,79*
LA_09_060	*99,17*	*0,81*	*0,03*	*-*	*11,44*	*86,80*	*1,76*
LA_09_061	*99,13*	*0,84*	*0,03*	*-*	*11,31*	*86,91*	*1,78*

Tabla 89 - resultados después de estrés mecánico 300 rpm/150 min

Lote Nº	*% Monómero*	*% Di-/Oligómero (RRT 0,84)*	*% HMWP (RRT 0,68)*	*%*	*% ácido*	*%*	*% básico*
LA_09_058	*99,16*	*0,81*	*0,03*	*-*	*11,27*	*86,95*	*1,78*
LA_09_059	*99,16*	*0,82*	*0,02*	*-*	*11,24*	*86,91*	*1,85*
LA_09_060	*99,17*	*0,81*	*0,03*	*-*	*11,46*	*86,77*	*1,77*
LA_09_061	*99,16*	*0,81*	*0,02*		*11,22*	*86,97*	*1,79*

Tabla 90 - Resumen de muestras en tampón de citrato

Lote Nº	*Polisorbato 20 en (mg/ml)*	*Concentración como porcentaje (%)*
LA_09_062	*0,2*	*0,02*
LA_09_063	*0,1*	*0,01*
LA_09_064	*0,05*	*0,005*
LA_09_065	*0,025*	*0,0025*

Tabla 91 - resultados después de T0

Lote Nº	*Apariencia*	*Valor de pH medido (-)*	*Conc. de mAB [mg/ml]*	*Diámetro hidrodinámico (nm)*
LA_09_062	*Transparente*	*6,05*	*23,72*	*12,67*
LA_09_063	*Transparente*	*6,03*	*25,18*	*12,73*
LA_09_064	*Transparente*	*6,04*	*23,85*	*12,47*
LA_09_065	*Transparente*	*6,04*	*22,65*	*12,46*

Tabla 92 - resultados después de T1 semana +40 ºC

Lote Nº	*Apariencia*	*Valor de pH medido (-)*	*Conc. de mAB [mg/ml]*	*Diámetro hidrodinámico (nm)*
LA_09_062	*Transparente*	*6,07*	*23,44*	*12,99*
LA_09_063	*Transparente*	*6,03*	*24,39*	*12,59*
LA_09_064	*Transparente*	*6,04*	*23,93*	*12,39*
LA_09_065	*Transparente*	*6,04*	*22,27*	*12,37*

Tabla 93 - resultados T0

Lote Nº	*% Monómero%*	*Di-/Oligómero*	*% HMWP*	*%*	*% ácido*	*%*	*% básico*
LA_09_062	*99,25*	*0,70*	*0,05*	*-*	*11,33*	*86,24*	*2,43*
LA_09_063	*99,28*	*0,68*	*0,04*	*-*	*22,00*	*86,36*	*2,64*
LA_09_064	*99,23*	*0,74*	*0,03*	*-*	*10,93*	*86,45*	*2,62*

Lote Nº	% Monómero%	Di-/Oligómero	% HMWP	%	% ácido	%	% básico
LA_09_065	99,28	0,69	0,03	-	10,97	86,25	2,77

Tabla 94 - resultados después de estrés mecánico 300 rpm/150 min

Lote Nº	% Monómero	% Di-/Oligómero	% HMWP	%	% ácido	%	% básico
LA_09_062	99,27	0,69	0,04	-	11,25	86,27	2,48
LA_09_063	99,32	0,65	0,03	-	10,87	86,59	2,54
LA_09_064	99,19	0,78	0,03	-	10,91	86,56	2,53
LA_09_065	99,16	0,80	0,04	-	10,79	86,51	2,70

En conclusión, no se pudieron medir diferencias significativas en las muestras que contenían tampón de acetato o de citrato con diversas concentraciones de polisorbato. Para garantizar la prevención de mAb contra el estrés mecánico durante un período de tiempo más largo que el analizado durante 150 min, la concentración de polisorbato se fijó en 0,2 mg/ml. Esta cantidad también fue propuesta en base a estudios de preformulación.

Ejemplo 16 - Optimización de isotonicidad adicional

Durante los estudios de preformulación, se identificaron NaCl, trehalosa y arginina-HCl como aditivos con fines de isotonicidad y estabilidad. La arginina-HCl se eliminó debido a menos efectos de estabilidad del mAb. Según la concentración de tampón y el valor de pH, la cantidad de agente de isotonicidad/estabilizante se adapta para lograr una osmolalidad de al menos 240 mOsmol/kg según Ph.Eur.

El uso de trehalosa fue cuestionado ya que no es un excipiente de compendio y tiene un precio elevado. Durante los estudios de preformulación, la sacarosa causó un poco más de agregación, pero no se realizó un seguimiento ni se verificó en estudios posteriores. Por lo tanto, se diseñó un nuevo estudio de estabilidad a corto plazo durante cuatro semanas, que incluye trehalosa y sacarosa tanto en tampón de citrato como de acetato 10 mM con temperaturas de almacenamiento de +5 º, +25 º y +40 ºC. Véanse las Tablas 95-103.

El ajuste fino de la osmolalidad de al menos 240 mOsmol/kg se realizó con NaCl.

Tabla 95 - **Resumen de muestras**

Lote Nº	Tampón	Valor de pH diana [-]	Polisorbato 20	NaCl	Agente estabilizante
LA_09_051A	Citrato 10 mM	6,0	0,2 mg/ml	2 mg/ml	Sacarosa 60 mg/ml
LA_09_051B	Citrato 10 mM	6,0	0,2 mg/ml	2 mg/ml	Trehalosa 60 mg/ml
LA_09_0524	Citrato 10 mM	5,5	0,2 mg/ml	2 mg/ml	Sacarosa 60 mg/ml
LA_09_052B	Citrato 10 mM	5,5	0,2 mg/ml	2 mg/ml	Trehalosa 60 mg/ml

Tabla 96 - resultados T0

Lote Nº	Apariencia	Valor de pH medido (-)	Conc. de mAB (mg/ml)	Osmolalidad (mOsmol/kg)
LA_09_051A	Transparente	5,89	21,46	289
LA_09_051B	Transparente	5,94	21,46	268
LA_09_052A	Transparente	5,82	22,07	273
LA_09_052B	Transparente	5,80	22,07	256

Tabla 97 - resultados T 4 semanas, +5 ºC

Lote Nº	Valor de pH medido (-)	Conc. de mAB (mg/ml)	Diámetro hidrodinámico (nm)
LA_09_051A	6,02	21,81	13,58
LA_09_051B	5,95	22,10	13,35
LA_09_052A	5,86	21,70	15,12

Lote Nº	Valor de pH medido (-)	Conc. de mAB (mg/ml)	Diámetro hidrodinámico (nm)
LA_09_052B	N/A	N/A	N/A

Tabla 98 - resultados T 4 semanas, +25 ºC

Lote Nº	Valor de pH medido (-)	Conc. de mAB (mg/ml)	Diámetro hidrodinámico (nm)
LA_09_051A	6,06	22,30	13,57
LA_09_051B	6,02	22,09	13,41
LA_09_052A	5,91	21,98	15,14
LA_09_052B	N/A	N/A	N/A

Tabla 99 - resultados T 4 semanas, +40 ºC

Lote Nº	Valor de pH medido (-)	Conc. de mAB (mg/ml)	Diámetro hidrodinámico (nm)
LA_09_051A	6,04	22,21	14,73
LA_09_051B	5,95	21,86	14,11
LA_09_052A	5,91	22,23	16,37
LA_09_052B	5,89	22,84	16,02

Tabla 100 - resultados T0

Lote Nº	%	% Di-	%	%	%	Conc. de mAB (mg/ml)
LA_09_051A	99,53	0,47	13,78	83,85	2,37	23,45
LA_09_051B	99,54	0,46	13,73	84,83	1,94	22,91
LA_09_052A	99,44	0,56	13,83	83,99	2,18	22,54
LA_09_052B	99,44	0,56	14,39	83,38	2,23	23,19

Tabla 101 - Resultados después de estrés térmico 4 semanas/+ 5 ºC

Lote Nº	%	% Di- (RRT 0,84)	% HMWP (RRT 0,68)	%	%	%	%	Conc. de mAB (mg/ml)
LA_09_05 1A	99,21	0,38	-	0,41	11,34	87,11	1,55	24,24
LA_09_05 1B	98,97	0,46	-	0,57	11,26	87,17	1,58	23,71
LA_09_05 2A	98,81	0,54	-	0,65	11,47	86,86	1,67	22,63
LA_09_05 2B	99,00	0,55	-	0,45	11,46	86,90	1,64	23,17

Tabla 102 - resultados después de estrés térmico 4 semanas/+25 ºC

Lote Nº	%	% Di-	%	% LMW	%	%	%	Conc. de mAB (mg/ml)
LA_09_051A	98,87	0,46	-	0,67	11,01	87,31	1,69	26,16
LA_09_051B	98,72	0,53	-	0,75	11,02	87,29	1,70	23,63
LA_09_052A	98,25	0,83	-	0,92	11,69	86,35	1,96	24,27
LA_09_052B	98,52	0,74	-	0,74	11,46	86,62	1,92	23,52

Tabla 103 - resultados después de estrés térmico 4 semanas/+40 ºC

Lote Nº	*%*	*% Di-*	*%*	*% LMW*	*%*	*%*	*%*	*Conc. de mAB (mg/ml)*
LA_09_051A	*96,84*	*0,95*	*1,06*	*1,15*	*10,16*	*87,05*	*2,79*	*25,04*
LA_09_051B	*96,96*	*0,97*	*1,01*	*1,06*	*10,01*	*87,05*	*2,83*	*23,60*
LA_09_052A	*96,00*	*1,63*	*1,17*	*1,20*	*11,32*	*84,89*	*3,79*	*24,11*
LA_09_052B	*96,23*	*1,49*	*1,21*	*1,07*	*11,01*	*85,30*	*3,69*	*24,29*

En conclusión, no se midieron diferencias significativas entre el tampón de citrato y acetato, y no fue visible ninguna diferencia en condiciones aceleradas entre trehalosa y sacarosa. Se seleccionó el tampón de citrato con sacarosa para estudios adicionales.

Determinación de los parámetros del proceso de fabricación de DP

Se usó un lote de DS en tampón de citrato para determinar los parámetros del proceso de fabricación. Los estudios de preformulación indicaron que el DS no era tan susceptible a la oxidación, y que se requería protección contra la luz o cubierta o purga de nitrógeno durante la fabricación. Se utilizaron equipos de vidrio estándar y tubos de silicona (SaniTech65).

Orden de adición

Los experimentos que evaluaron el orden de adición de los excipientes fueron limitados debido al pequeño volumen de dilución de DS.

El DS se pesó en una botella de vidrio, el polisorbato 20 como primer excipiente, la sacarosa como segundo excipiente y el NaCl como tercer excipiente se añadieron y se enjuagaron con tampón de citrato 10 mM pH 6,0 para diluir el contenido de DS a 20 mg/ml.

Velocidad y tiempo de agitación

La velocidad de agitación se ajustó a 100 rpm para reducir el estrés mecánico para el DS. Debido al hecho de que todos los excipientes eran muy solubles en agua, el tiempo de agitación se ajustó a 5 minutos.

Parámetros de supervisión y IPC

Los parámetros de supervisión tales como el aspecto, la turbidez, la densidad y la viscosidad, y los IPC como el valor de pH y la osmolalidad se verificaron de forma rutinaria durante la producción de la muestra según la siguiente Tabla 104:

Tabla 104

	Antes de la filtración	**Después de la filtración**	**Despues de llenado**
Apariencia	incoloro a ligeramente amarillo	incoloro a ligeramente amarillo	incoloro a ligeramente amarillo
Densidad	1.006 mg/ml	No medida	No medida
Turbiedad	Transparente	Transparente	Transparente
Viscosidad	No medida	No medida	<5 mPa s
Valor de pH	6,0 ± 0,2 (20-25 ºC)	6,0 ± 0,2 (20-25 ºC)	No medido
Osmolalidad	290 ± 40 mOsmol/kg	290 ± 40 mOsmol/kg	No medida

No se observaron problemas durante la fabricación. Los límites para la osmolalidad se establecieron sobre la base de los datos medidos.

Proceso de filtracion

Según los estudios de preformulación, la polietersulfona era una membrana adecuada para la filtración estéril (Sartorius, 0,22 µm). No se pudieron observar cambios potenciales de pH después de la filtración, ya que la tasa de filtración y el tiempo mostraron valores estándar para la filtración de una solución acuosa. Los ensayos de integridad del filtro se realizaron de forma rutinaria sin problemas.

Proceso de llenado

Se investigaron equipos de dosificación estándar fabricados de acero inoxidable, tales como la bomba de llenado y la aguja de llenado. Asimismo, se supervisó la duración y la velocidad de llenado. Se determinó el volumen extraíble de DP lleno. Se requirió un sobrellenado de 0,2 ml para asegurar un volumen extraíble de 1,5 ml.

Compatibilidad de materiales

Todos los estudios de preformulación y formulación se realizaron en vidrio como equipo de fabricación estándar, que también es una recomendación para el equipo que se utilizará para la fabricación de GMP.

Agentes de limpieza

La limpieza del equipo de fabricación se realizó según los procedimientos operativos estándar respectivos utilizando el lavavajillas con el agente de limpieza estándar Neodisher®. Antes se realizó una limpieza manual con agua para inyección. No se observaron efectos nocivos de los agentes de limpieza.

Resumen de estudios de formulación adicionales para el Anticuerpo CXCR5 Inicial (20 mg/ml)

Para la selección de la formulación DP del Anticuerpo CXCR5 Inicial fase I, se seleccionó citrato 10 mM a pH 6,0 como el tampón antes que histidina y acetato. El valor de pH de la solución se estableció en 6,0, ya que aumentar o disminuir el valor de pH significa una reducción en el contenido de monómero. La concentración de tampón se ajustó a una concentración media de 10 mM, aunque no hubo diferencias significativas entre las concentraciones de 5-50 mM.

El polisorbato 20 se eligió como el tensioactivo con 0,2 mg/ml (0,02%), suficiente para estabilizar el DS contra el estrés mecánico.

La sacarosa se seleccionó como el estabilizador contra el estrés térmico por delante de la trehalosa. La concentración de sacarosa se fijó en 60 mg/ml (6%).

Se usará NaCl como agente isotonante en una concentración de 2,0 mg/ml (0,2%) para lograr una osmolalidad de DP de aproximadamente 300 mOsmol/kg.

ESTUDIOS DE FORMULACIÓN ANTI-CXCR5 (100 mg/ml)

Los datos de los Ejemplos 17-21 se recopilaron durante los estudios de formulación para el Anticuerpo CXCR5 Inicial y su producto farmacológico para administración intravenosa y subcutánea. El objetivo de los estudios de formulación fue proporcionar una solución de inyección de anticuerpo CXCR5 exenta de partículas visuales estable, transparente o ligeramente opalescente e incolora o ligeramente amarilla, para la fase I.

Procedimientos

Preparación de la muestra

Se realizó una UF/DF a pequeña escala utilizando dispositivos VivaSpin con una membrana Hydrosart y un valor de corte de 30 kDa. El material RSN se concentró a partir de aproximadamente 20 mg/ml a 100 mg/ml. Todas las soluciones ya estaban en el tampón de formulación final (tampón de citrato 10 mM a pH 6,0).

Las unidades VivaSpin se dispusieron a temperatura ambiente en una centrifugadora de laboratorio común y se centrifugaron a 2000 rpm. La solución se filtró sobre Minisart de 0,2 µm antes de los ensayos analíticos.

Todas las muestras se almacenaron entre +2 º y +8 ºC, bien cerradas y protegidas de la luz, hasta los ensayos analíticos a T0 y después de una semana de estrés térmico a +40 ºC o después de un estrés mecánico.

Procedimientos analíticos

Se utilizaron las siguientes técnicas para el análisis de muestras:

Tabla 105 - Técnicas analíticas utilizadas

Técnica	Parámetro que se va a investigar
Organoléptico	Apariencia
Nefelómetro	Turbiedad

Técnica	Parámetro que se va a investigar
Medidor de pH	Valor de pH
UV	Concentración de mAB
Densímetro	Densidad
Osmómetro	Osmolalidad
Viscosímetro	Viscosidad
DLS	Diámetro hidrodinámico
DSC *	Temperatura de desplegamiento
SEC	Contenido de Mono-/Di-/Oligómero/HMW
WCX	Isoformas (ácidas/básicas/neutras)
ELISA*	Potencia (aglutinación)
SDS-Page (red.)**	HC/LC, fragmentos mAB
SDS-Page (no red.)**	Productos de agregación y degradación.
HIAC*	Partículas subvisibles
* Algunas muestras serán analizadas. ** SDS-Page se realizará en caso de que SEC muestre resultados inusuales.	

Ejemplo 17 - Cribado de excipientes

Los estudios de preformulación identificaron un tampón de citrato 10 mM a pH 6,0 como el mejor tampón con menos tendencia a la agregación del Anticuerpo CXCR5 Inicial. En estudios previos a 20 mg/ml, se seleccionó una formulación que contenía tampón de citrato 10 mM, 60 mg/ml (6%) de sacarosa, 2 mg/ml (0,2%) de NaCl y 0,2 mg/ml (0,02%) de polisorbato 20 . Se analizaron esos excipientes y algunas alternativas para confirmar la idoneidad de la formulación seleccionada a una concentración más alta (100 mg/ml).

Las diferentes formulaciones se sometieron a estrés térmico a 40 ºC durante 7 días y mecánicamente a 100 rpm durante 5 horas. Adicionalmente, la temperatura de desplegamiento para las diferentes formulaciones se cribó a 100 mg/ml utilizando DSC (calorimetría diferencial de barrido).

Se sometieron a ensayo los excipientes siguientes:

Sacarosa → 60 mg/ml

Trehalosa → 60 mg/ml

Arginina → 30 mg/ml

Lisina → 30 mg/ml

Glicina → 30 mg/ml

Se añadió NaCl o manitol como agente de isotonicidad. No se necesitaron sales para la reducción de la viscosidad (alrededor de 2,1 cP).

Los resultados de los días T0 y T7 se muestran en la Tabla 106.

Tabla 106 - Cribado de excipientes

T	Formulación		SEC		Isoformas por WCX			Actividad potencia rel.	SDS-Page Condiciones
			HMW	Mono.	acidas	neutras	básicas		
	composition (mg/ml)	Nº	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	no reductoras
T cero	Sacarosa (60) + NaCl (2)	72_A1	2,7	97,0	11,7	84,2	4,0	165	comparable a la referencia
	Sacarosa (60) + Manitol (15)	72_A2	2,8	97,1	11,9	84,4	3,7	205	comparable a la referencia
	Trehalosa (60) + NaCl (2)	72_B1	2,8	97,0	11,7	84,8	3,6	110	comparable a la referencia
	Trehalosa (60) + Manitol (15)	72_B2	2,8	97,0	11,8	84,2	4,0	156	comparable a la referencia
	Arginina (30)	72_C1	2,5	97,2	11,9	84,3	3,8	160	comparable a la referencia
	Arginina (20) + NaCl (2)	72_C2	2,6	97,2	11,8	84,6	3,6	144	comparable a la referencia
	Arginina (20) + Manitol (15)	72_C3	2,6	97,2	12,2	83,8	3,9	117	comparable a la referencia
	Lisina (30) + NaCl (2)	72_D1	2,6	97,1	12,7	82,1	5,3	130	comparable a la referencia
	Lisina (30) + Manitol (15)	72_D21	2,6	97,1	12,6	82,2	5,3	88	comparable a la referencia
	Glicina (20)	72_E1	2,7	97,1	12,4	83,5	4,1	170	comparable a la referencia
	Glicina (20) + NaCl (2)	72_E2	2,7	97,1	12,4	83,5	4,1	174	comparable a la referencia
	Glicina (20) + Manitol (15)	72_E3	2,7	97,0	12,7	83,3	4,1	111	comparable a la referencia
T 7 días a 40 ºC.	Sacarosa (60) + NaCl (2)	72_A1	3,5	96,3	11,4	84,4	4,2	188	comparable a la referencia
	Sacarosa (60) + Manitol (15)	72_A2	3,5	96,3	11,3	84,6	4,2	243	comparable a la referencia
	Trehalosa (60) + NaCl (2)	72_B1	3,4	96,4	11,5	84,4	4,1	191	comparable a la referencia
	Trehalosa (60) + Manitol (15)	72_B2	3,5	96,3	11,4	84,3	4,3	266	comparable a la referencia
	Arginina (30)	72_C1	3,6	96,1	11,2	84,9	4,0	143	comparable a la referencia
	Arginina (20) + NaCl (2)	72_C2	3,4	96,4	11,6	84,5	3,9	164	comparable a la referencia
	Arginina (20) + Manitol (15)	72_C3	3,3	96,4	11,3	85,3	3,4	sin analizar	comparable a la referencia
	Lisina (30) + NaCl (2)	72_D1	6,5	93,1	30,9	48,0	21,1	264	comparable a la referencia
	Lisina (30) + Manitol (15)	72_D21	5,9	93,7	31,2	47,9	20,9	297	comparable a la referencia
	Glicina (20)	72_E1	3,2	96,6	11,3	84,4	4,3	180	comparable a la referencia
	Glicina (20) + NaCl (2)	72_E2	3,3	96,4	11,6	84,4	4,0	sin analizar	comparable a la referencia
	Glicina (20) + Manitol (15)	72_E3	3,2	96,6	11,2	84,6	4,2	sin analizar	comparable a la referencia

Estrés térmico

Ninguna de las muestras mostró turbidez antes o después del estrés.

La lisina mostró: un cambio de pH a 9,8, una tendencia muy alta a la agregación, un aumento muy alto de isoformas ácidas y básicas, y bandas de alto peso molecular en SDS-PAGE. Como resultado, se excluyó de una consideración posterior.

Las formulaciones con manitol mostraron una deficiente unión en un ensayo ELISA después del estrés. Como resultado, NaCl es el agente de isotonicidad favorecido.

La sacarosa mostró una estabilidad química ligeramente mejor que la trehalosa, pero se observaron bandas adicionales en SDS-PAGE después del estrés (para ambos).

La arginina (especialmente en presencia de NaCl) y la glicina tuvieron un perfil de SEC similar, pero no se observaron bandas adicionales en SDS-PAGE después del estrés.

Formación asociada a proteínas medida por dispersión dinámica de la luz (DLS)

El Anticuerpo CXCR5 Inicial mostró un aumento significativo en el diámetro hidrodinámico (promedio Z) al aumentar la concentración (**figura 34**). Este comportamiento fue completamente reversible después de una dilución. Para una investigación adicional de este efecto, se midieron las diferentes concentraciones de Anticuerpo CXCR5 Inicial mediante centrifugación ultraanalítica (AUC) y se excluyó la agregación. La conclusión del estudio AUC fue que este comportamiento se debió a la formación de asociados de proteínas.

Se estudió el efecto del excipiente mencionado anteriormente en este comportamiento y los resultados se muestran en la **figura 35**. El promedio Z se midió antes y después del estrés térmico. El efecto estabilizador fue similar a todos los excipientes sometidos a ensayos, pero el aumento en promedio Z generalmente se redujo utilizando aminoácidos como estabilizantes (arginina, lisina o glicina). La lisina se excluyó debido a un mayor contenido de agregados después del estrés. La arginina mostró un mejor efecto que la glicina. Ambos aminoácidos se consideraron para el diseño final del experimento para elegir la mejor combinación de excipientes.

Estrés mecanico

Se excluyeron las formulaciones de lisina, así como todas las formulaciones que contienen manitol. Los datos de SEC no mostraron ningún efecto del estrés en las muestras analizadas. Véase la Tabla 107.

Tabla 107 - Estrés mecánico

Composición de la formulación (mg/ml)	Formulación Nº	SEC antes de estrés mecánico		SEC después de estrés mecánico	
		HMW [%]	monómero [%]	HMW [%]	monómero [%]
Sacarosa (60) + NaCl (2)	080_A	2,6	97,3	2,7	97,2
Trehalosa (60) + NaCl (2)	080_B	2,7	97,2	2,6	97,3
Arginina (30)	080_C1	2,5	97,5	2,3	97,6
Arginina (20) + NaCl (2)	080_C2	2,5	97,4	2,5	97,4
Glicina (20)	080_D1	2,5	97,5	2,4	97,5
Glicina (20) + NaCl (2)	080_D2	2,5	97,5	2,4	97,5

Se observó la misma reducción en promedio Z en presencia de aminoácidos. La sacarosa tuvo un mejor efecto protector que la trehalosa contra el estrés mecánico. La arginina y la glicina se desempeñaron mejor en combinación con NaCl. **Véase la figura 36**.

Cribado mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Se realizó un estudio de cribado para determinar la temperatura de desplegamiento del Anticuerpo CXCR5 Inicial utilizando calorimetría diferencial de barrido (DSC). Se seleccionaron sacarosa, trehalosa, argenina y glicina.

Los resultados de Tm se enumeran en la Tabla 108.

Tabla 108: Efecto de diferentes excipientes en los valores de Tm del Anticuerpo CXCR5 Inicial. Todas las formulaciones estaban en tampón de citrato 10 mM a pH 6

Excipiente cribado	Tm1	Tm2	Tm3
Sacarosa + NaCl	**65,3**	**73,6**	**83,8**

Excipiente cribado	**Tm1**	**Tm2**	**Tm3**
Trehalosa + NaCl	**65,5**	**73,9**	**83,9**
Arginina	**63,8**	**72,2**	**82,6**
Arginina + NaCl	**64,3**	**72,8**	**82,6**
Glicina	**64,8**	**74,1**	**84,2**
Glicina + NaCl	**64,9**	**73,6**	**83,8**

Sobre la base de Tm1, la sacarosa y la trehalosa mostraron los valores más altos. La arginina se desempeñó mejor en combinación con NaCl.

En conclusión, los datos recopilados sugieren que la formulación final del Anticuerpo CXCR5 Inicial 100 mg/ml contendría una combinación de azúcar (en algunas formas de realización, sacarosa) y un aminoácido (en algunas formas de realización, arginina o glicina) en presencia de NaCl como el agente de isotonicidad.

Ejemplo 18 - Cribado de tensioactivo

El polisorbato como estabilizador se evaluó para la protección del Anticuerpo CXCR5 Inicial contra las tensiones térmicas y mecánicas.

Se sometieron a ensayo polisorbato 20 y 80 en dos concentraciones diferentes: 0,1 y 0,2 mg/ml.

Estrés térmico

La DLS no mostró ningún efecto mediante la adición de polisorbato después del estrés térmico. La formación de HMW y fragmentos después de 7 días de almacenamiento a 40 ºC se observó en todas las muestras, detectada por SEC. No se detectaron bandas adicionales en SDS-PAGE. Se observaron cambios leves después del estrés térmico, pero no se observaron diferencias entre PS20 y PS80, así como entre las 2 concentraciones (datos no mostrados).

Estrés mecánico

La DLS no mostró cambios después de estrés mecánico. El polisorbato 20 no mostró agregaciones después del estrés mecánico. El polisorbato 80 mostró formación de agregados después del estrés mecánico. No se observaron bandas adicionales en SDS-PAGE (datos no mostrados).

En conclusión, el polisorbato 20 fue el tensioactivo deseado debido a la superioridad en la estabilización mecánica del Anticuerpo CXCR5 Inicial.

Ejemplo 19 - Preselección de formulación prototipo utilizando DSC

Sobre la base del cribado de excipientes y los estudios de detección de tensioactivos, se sugirieron 12 combinaciones diferentes de excipientes (ver tablas 109 y 110)

La temperatura de desplegamiento para todas las formulaciones se determinó mediante DSC y las Tm resultantes, así como la osmolalidad para cada formulación, se enumeran en las Tablas 109 y 110.

Tabla 109: Combinaciones de excipientes para el estudio de preselección de formulaciones prototipo (arginina) con DSC. Los valores de Tm y la osmolalidad se enumeran también

Formulación	Composición mg/ml				DSC			Osmo (mosmol/kg)
	Sacarosa	Arginina	NaCl	PS 20	Tm1	Tm2	Tm3	
LA_10_087_A	60	20	2	0,1	65,2	73,3	83,2	495
LA_10_087_C	60	20	2	0,2	65,1	73,0	83,2	486
LA_10_087_E	30	10	2	0,1	64,5	72,8	83,0	304
LA_10_087_G	30	10	2	0,2	64,4	72,7	83,0	304
LA_10_087_L	45	10	2	0,1	64,7	73	83,2	349
LA_10_087_M	45	10	2	0,2	64,6	72,8	83,1	357

Tabla 110: Combinaciones de excipientes para el estudio de preselección de formulaciones prototipo (glicina) con DSC. Los valores de Tm y la osmolalidad se enumeran también

Formulación	Composición mg/ml				DSC			Osmo (mosmol/kg)
	Sacarosa	Glicina	NaCl	PS 20	Tm1	Tm2	Tm3	
LA_10_087_B	60	15	2	0,1	66,2	74,1	84,3	539
LA_10_087_D	60	15	2	0,2	65,8	74,1	84,3	533
LA_10_087_F	30	7.5	2	0,1	65,0	73,3	83,5	330
LA_10_087_H	30	7.5	2	0,2	64,8	73,1	83,4	320
LA_10_090_A	45	7.5	2	0,1	65,3	73,7	83,6	408
LA_10_090_B	45	7.5	2	0,2	65,3	73,7	83,9	391

Las formulaciones no mostraron grandes diferencias en Tm, pero la osmolalidad varió mucho. La preselección de las formulaciones de prototipos se realizó en base a Tm y osmolalidad. En consecuencia, en cada grupo de excipientes (arginina y glicina), se seleccionó la Tm más alta (independientemente de la osmolalidad). Además, también se seleccionó la Tm más alta en la región isotónica.

Ejemplo 20 - Estudio de estabilidad exploratoria del prototipo

La selección del prototipo anterior dio como resultado 4 formulaciones prototipo, que se enumeran en la Tabla 111. Dichas formulaciones se analizaron para determinar el estrés mecánico (100 rpm durante 5 horas), 5 ciclos de congelación/descongelación y estrés isotérmico a 5, 20 y 40 ºC.

Tabla 111: Formulaciones prototipo para la formulación del Anticuerpo CXCR5 Inicial de 100 mg/ml

Formulación	Composición					Osmo (mosmol/kg)
	Sacarosa	Arginina	Glicina	NaCl	PS 20	
LA_10_102_A	60	20		2	0,1	518
LA_10_102_B	45	10		2	0,1	374
LA_10_102_C	60		15	2	0,1	550
LA_10_102_D	30		7,5	2	0,1	325

Estabilidad mecánica

El Anticuerpo CXCR5 Inicial en tampón de citrato 10 mM a pH 6, sin adición de ningún excipiente (formulación DS), también se sometió a estrés en paralelo con las formulaciones prototipo. Se midió una especie de peso molecular elevado por DLS después del estrés mecánico de DS (**figura 37**), estrés en el que no se han observado cambios en todas las formulaciones analizadas después del estrés mecánico. La formación de agregados después del estrés mecánico se midió mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y los resultados se muestran en la Tabla 112. En general, las 4 formulaciones fueron igualmente estables al estrés mecánico, excepto la formulación A, donde la SEC encontró más HMW después del estrés mecánico. Véase la **figura 38**.

Tabla 112: Resultados de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) de las formulaciones prototipo antes y después del estrés mecánico

	SEC			
	For_A	For_B	For_C	For_D
	% Mon.	% Mon.	% Mon.	% Mon.
	-20 ºC			
Antes	99,6	99,5	99,5	99,5
Después	98,1	99,5	99,3	99,4

Estabilidad de congelación/descongelación

No se detectaron diferencias significativas, ni en DS ni en DP, después de 5 ciclos de congelación/descongelación.

Por lo tanto, no debe haber problemas de inestabilidad por congelación y descongelación (los datos no se muestran).

Estudio de estabilidad del prototipo exploratorio

Las formulaciones prototipo se almacenaron a -20, 5, 20 y 40 ºC. Se analizaron al inicio del estudio, después de 1 mes, después de 3 meses y después de 6 meses. Las formulaciones se seleccionaron en base a los resultados de 3 meses (Tablas 113-115). Los resultados mostraron que la formulación B se comportó mejor con respecto a SEC, WCX y partículas subvisibles, especialmente a 40 ºC.

Tabla 113: Resultados de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) de las formulaciones prototipo después de 3 meses

SEC				
	For_A	For_B	For_C	For_D
	% Mon.	% Mon.	% Mon.	% Mon.
-20 ºC				
T0	99,6	99,5	99,5	99,5
T1 mes	N/A	N/A	N/A	N/A
T3 meses	99,1	99,1	99	99,5
5 ºC				
T0	99,6	99,5	99,5	99,5
T1 mes	99,3	99,4	99,5	99,5
T3 meses	99	99,4	98,8	99,4
20 ºC				
T0	99,6	99,5	99,5	99,5
T1 mes	99,5	99,5	99,4	99,4
T3 meses	99,	98,9	98,6	99,1
40 ºC				
T0	99,6	99,5	99,5	99,5
T1 mes	96,9	96,7	96,5	96,3
T3 meses	91,5	91,6	89,5	90,2

Tabla 114: Resultados de cromatografía de intercambio catiónico débil (WCX) de las formulaciones propotipo después de 3 meses

WCX				
	For_A	For_B	For_C	For_D
	% Básico	% Básico	% Básico	% Básico
-20 ºC				
T0	2	2,2	2,1	2,2
T1 mes	N/A	N/A	N/A	N/A
T3 meses	1,6	1,6	1,6	1,6
5 ºC				
T0	2,2	2,1	2,2	2,2
T1 mes	1,2	1,2	1,3	1,3
T3 meses	1,6	1,7	1,6	1,6
20 ºC				
T0	2,2	2,1	2,2	2,2
T1 mes	1,3	1,4	1,3	1,3

T3 meses	1,9	2	2	2
40 ºC				
T0	2,2	2,1	2,2	2,2
T1 mes	2,2	2,7	2,5	2,5
T3 meses	5,1	8,6	8,2	8,2

Tabla 115: Partículas subvisibles medidas mediante bloqueo de la luz en T cero y después de 3 meses (5 ºC)

	For_A		For_B		For_C		For_D	
	> 10 µm	> 25 µm	> 10 µm	> 25 µm	> 10 µm	> 25 µm	> 10 µm	> 25 µm
T0	4	3	4	4	5	4	4	3
T2	8	1	5	1	34	14	6	2

En conclusión, los estudios mostraron mejores resultados para la formulación LA_10_102_B. Este formulado tenía una concentración de 100 mg/ml de Anticuerpo CXCR5 Inicial en tampón de citrato 10 mM a pH 6 y contenía los siguientes excipientes:

Sacarosa	45 mg/ml (4,5%);
Arginina	10 mg/ml (1%);
NaCl	2 mg/ml (0,2%); y
Polisorbato 20	0,1 mg/ml (0,01%).

Ejemplo 21 - Datos de estabilidad de apoyo para la formulación de 100 mg/ml

Se realizaron estudios de estabilidad adicionales en la formulación del Anticuerpo CXCR5 Inicial de 100 mg/ml identificada en el Ejemplo 20. Los estudios adicionales se realizaron a -20, 5 y 25 ºC. Los resultados se muestran en las Tablas 116-118.

Tabla 116 - Datos de estabilidad para 100 mg/ml de formulación de Anticuerpo CXCR5 Inicial a -20 ºC

Producto farmacológico:	**Anticuerpo CXCR5 Inicial solución para inyección 100 mg/ml**				**Lote Nº:**	**11_106/LST0008**		
Fuerza de dosificación:					**Nº de lote del fabricante:**	**11_106**		
Condición de almacenamiento:	-20 ºC ± 5 ºC							
Orientación de almacenamiento:	Invertida							
Elemento de ensayo	**Tiempo**							
	Resultados iniciales	**1 mes**	**3 meses**	**6 meses**	**9 meses**	**12 meses**	**18 meses**	**24 meses**
Aspecto de la solución								
- transparencia	I	<I	<I	<I	II	<IV (20NTU)	<IV (19 NTU)	
- Color	Y7	Y7	Y7	Y7	Y7	Y6	Y6	
Ensayo								
- Potencia (ELISA de antígeno)	75%	107%	84%	96%	101%	96%	127%	
- Valor de EC_{50} (en comparación con la referencia)								
- Contenido total de proteínas (UV)	103 mg/ml	101 mg/ml	101 mg/ml	101 mg/ml	102 mg/ml	101 mg/ml	102 mg/ml	
Integridad molecular								

Producto farmacológico:	**Anticuerpo CXCR5 Inicial solución para inyección 100 mg/ml**				**Lote Nº:**	**11_106/LST0008**		
Fuerza de dosificación:					**Nº de lote del fabricante:**	**11_106**		
Condición de almacenamiento:	-20 ºC ± 5 ºC							
Orientación de almacenamiento:	Invertida							
Elemento de ensayo	**Tiempo**							
	Resultados iniciales	**1 mes**	**3 meses**	**6 meses**	**9 meses**	**12 meses**	**18 meses**	**24 meses**
Aspecto de la solución								
- SDS-PAGE en condiciones no reductoras (patrón de banda)	Se ajusta a la referencia	Se ajusta a la referencia	Se ajusta a la referencia	Se ajusta a la referencia	Se ajusta a la referencia	Se ajusta a la referencia	Se ajusta a la referencia	
Pureza								
- HPLC (SEC)								
- Monómero (% área)	99,1%	99,0%	99,0%	98,8%	98,9%	98,8%	98,9%	
- Proteínas de alto peso molecular (% área)	0,8%	0,8%	0,8%	0,8%	0,8%	0,8%	0,8%	
- SDS-PAGE en condiciones no reductoras.	<1,0%	<1,0%	<1,0%	<1,0%	<1,0%	<1,0%	<1,0%	
- Medias moléculas (%)								
- SDS-PAGE en condiciones reductoras.	99%	97%	99%	97%	99%	98%	97%	
- Pureza relativa (%)								
Heterogeneidad de carga								
- HPLC (intercambio catiónico débil)	4%/94%/	4%/94%/	4%/94%/	4%/94%/	4%/	4%/	4%/	
- Isoformas (ácido ic/neutro/básico) (% de área)	2%	2%	2%	2%	94%/2%	94%/2%	95%/2%	
- IEF	Se ajusta a la referencia	Se ajusta a la referencia	Se ajusta a la referencia	Se ajusta a la referencia	Se ajusta a la referencia	Se ajusta a la referencia	Se ajusta a la referencia	
pH (potenciometría)	5,9	5,8	6,0 Cumple	5,9 Cumple	5,9 Cumple	5,9 Cumple	5,9 Cumple	
Material particulado (partículas visibles)	Prácticamente exento de partículas,	Cumple						
Material particulado (partículas subvisibles)								
- Número de partículas por vial ≥10 µm	20					71		
- Número de partículas por vial ≥25 µm								
Contaminación microbiana	<1 ufc/2 mL							
Integridad de cierre	No hay rastro de coloración visible,					No hay rastro de coloración visible,		
Dispersión dinámica de la luz	promedio z: 8,1 r,nm Pdl: 0,05	promedio z: 8,0 r,nm Pdl: 0,05	promedio z: 8,0 r,nm Pdl: 0,05	promedio z: 8,1 r,nm Pdl: 0,05	promedio z: 8,1 r,nm Pdl: 0,05	promedio z: 8,1 r,nm Pdl: 0,07	promedio z: 8,1 r,nm Pdl: 0,05	

Tabla 117 - Datos de estabilidad para 100 mg/ml de formulación de Anticuerpo CXCR5 Inicial a 5 ºC

Producto farmacológico:	**Anticuerpo CXCR5 Inicial - solución para inyección 100 mg/ml**				**Lote Nº:**		**11_106/LST0008**		
Fuerza de dosificación:					**Nº de lote del fabricante:**		**11/106**		
Condición de almacenamiento:	+ 5 ºC ± 3 ºC								
Orientación de almacenamiento:	Invertida								
Elemento de ensayo	**Tiempo**								
	Resultados iniciales	**1 mes**	**3 meses**	**6 meses**	**9 meses**	**12 meses**	**15 meses**	**18 meses**	**24 meses**
Aspecto de la solución									
- transparencia	I	<I	<I	<I	yo	<IV (22 NTU)	<IV (22 NTU)	<IV (21 NTU)	
- Color	Y7	Y7	Y7	Y7	Y7	Y6	Y6	Y6	
Ensayo									
- Potencia (ELISA de antígeno)									
- Valor de EC_{50} (en comparación con la referencia)	75%	105%	95%	97%	92%	93%	114%	119%	
- Contenido total de proteínas (UV)	103 mg/ml	101 mg/ml	102 mg/ml	101 mg/ml	102 mg/ml	102 mg/ml	101 mg/ml	102 mg/ml	
Integridad molecular									
- SDS-PAGE en condiciones no reductoras (patrón de banda)	Se ajusta a la referencia	Se ajusta a la referencia	Se ajusta a la referencia	Se ajusta a la referencia	Se ajusta a la referencia	Se ajusta a la referencia	Se ajusta a la referencia	Se ajusta a la referencia	
Pureza									
- HPLC (SEC)									
- Monómero (% área)	99,1%	99,0%	99,1%	98,8%	98,8%	98,7%	98,9%	98,8%	
- Proteínas de alto peso molecular (% área)	0,8%	0,7%	0,7%	0,7%	0,8%	0,8%	0,9%	0,9%	
- SDS-PAGE en condiciones no reductoras.	<1,0%	<1,0%	<1,0%	<1,0%	<1,0%	<1,0%	<1,0%	<1,0%	
- Medias moléculas (%)									
- SDS-PAGE en condiciones reductoras.	99%	98%	99%	95%	99%	97%	99%	98%	
- Pureza relativa (%)									
Heterogeneidad de carga									
- HPLC (intercambio catiónico débil)	4%/94	4%/94	3%/94	4%/94	4%/94	4%/94	4%/94	4%/94	
- Isoformas (ácidas/neutras/básicas) (% de área)	%/2%	%/2%	%/2%	%/2%	%/2%	%/2%	%/2%	%/2%	
- IEF	Se ajusta a la referencia	Se ajusta a la referencia	Se ajusta a la referencia	Se ajusta a la referencia	Se ajusta a la referencia	Se ajusta a la referencia	Se ajusta a la referencia	Se ajusta a la referencia	
pH (potenciometría)	5,9	5,9	6,0	5,9	5,9	5,9	5,9	5,9	
Material particulado (partículas visibles)	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	
Material particulado (partículas subvisibles)									
- Número de partículas por vial. ≥10 µm	2 0					14 2	2 0	16 0	
- Número de partículas por vial ≥25 µm									
Contaminación microbiana	<1 ufc/2 ml								
Integridad de cierre	No hay rastro de coloración visible					No hay rastro de coloración visible			

Producto farmacológico:	**Anticuerpo CXCR5 Inicial - solución para inyección 100 mg/ml**				**Lote Nº:**			**11_106/LST0008**	
Fuerza de dosificación:					**Nº de lote del fabricante:**			**11/106**	
Condición de almacenamiento:	+ 5 ºC ± 3 ºC								
Orientación de almacenamiento:	Invertida								
Elemento de ensayo	**Tiempo**								
	Resultados iniciales	**1 mes**	**3 meses**	**6 meses**	**9 meses**	**12 meses**	**15 meses**	**18 meses**	**24 meses**
Dispersión dinámica de la luz	promedio z: 8,1 r,nm Pdl: 0,05	promedio z: 8,0 r,nm Pdl: 0,05	promedio z: 7,9 r,nm Pdl: 0,04	promedio z: 8,0 r,nm Pdl: 0,04	promedio z: 8,1 r,nm Pdl: 0,06	promedio z: 8,1 r,nm Pdl: 0,06	promedio z: 8,0 r,nm Pdl: 0,05	promedio z: 8,1 r,nm Pdl: 0,05	

Tabla 118 - Datos de estabilidad para 100 mg/ml de formulación de Anticuerpo CXCR5 Inicial a 25 ºC

Producto farmacológico:	**Anticuerpo CXCR5 Inicial Solución para inyección**	**Lote Nº:**		**11_106/LST0008**
Fuerza de dosificación:	**100 mg/ml**	**Número de lote del fabricante:**		**11_106**
Condición de almacenamiento:	+ 25 ºC ± 2 ºC/60% ± 5% de HR			
Orientación de almacenamiento:	Invertida			
Elemento de ensayo	**Tiempo**			
	Resultados iniciales	**1 mes**	**3 meses**	**6 meses**
Aspecto de la solución				
- Transparencia	I	<I	<I	<I
- Color	Y7	Y7	Y7	Y7
Ensayo				
- Potencia (ELISA de antígeno)				
- Valor de EC_{50} (en comparación con la referencia)	75%	121%	96%	104%
- Contenido total de proteínas (UV)	103 mg/ml	101 mg/ml	102 mg/ml	102 mg/ml
Integridad molecular				
- SDS-PAGE en condiciones no reductoras (patrón de banda)	Se ajusta a la referencia	Se ajusta a la referencia	Se ajusta a la referencia	Se ajusta a la referencia
Pureza				
- HPLC (SEC)				
- Monómero (% área)	99,1%	98,9%	98,8%	98,2%
- Proteínas de alto peso molecular (% área)	0,8%	0,8%	1,0%	1,2%
- SDS-PAGE en condiciones no reductoras.	<1,0%	<1,0%	<1,0%	<1,0%
- La mitad de las moléculas (%)				
- SDS-PAGE en condiciones reductoras.	99%	96%	99%	96%
- Pureza relativa (%)				
Heterogeneidad de carga				
- HPLC (intercambio catiónico débil)	4%/94%/2%	4%/94%/2%	4%/94%/3%	4%/93%/3%
- Isoformas (ácido/neutro/básico) (% de área)				
-IEF	Se ajusta a la referencia	Se ajusta a la referencia	Se ajusta a la referencia	Se ajusta a la referencia
pH (potenciometría)	5,9	5,9	6,0	6,1
Partículas (partículas visibles)	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Material particulado (partículas subvisibles)				
- Número de partículas por vial.	2			17
≥10 µm	0			1
- Número de partículas por vial ≥25				

Producto farmacológico:	**Anticuerpo CXCR5 Inicial Solución para inyección**	**Lote Nº:**		**11_106/LST0008**
Fuerza de dosificación:	**100 mg/ml**	**Número de lote del fabricante:**		**11_106**
Condición de almacenamiento:	+ 25 ºC ± 2 ºC/60% ± 5% de HR			
Orientación de almacenamiento:	Invertida			
Elemento de ensayo	**Tiempo**			
	Resultados iniciales	**1 mes**	**3 meses**	**6 meses**
µm				
Contaminación microbiana Integridad de cierre	<1 ufc/2 ml No hay rastro de coloración visible			<1 ufc/2 ml No hay rastro de coloración visible
Dispersión dinámica de la luz	promedio z: 8,1 r,nm; Pdl: 0,05	promedio z: 8,0 r,nm Pdl: 0,05	promedio z: 8,1 r,nm Pdl: 0,05	promedio z: 8,1 r,nm Pdl: 0,06

REIVINDICACIONES

1. Una formulación que comprende:

- de 5 mg/ml a 280 mg/ml de un anticuerpo IgG4,

en la que el anticuerpo se une al receptor de quimiocinas CXC tipo 5 (CXCR5) y comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en la que el anticuerpo es una IgG4 anti-CXCR5 humanizada que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26,

- de 5 a 50 mM de citrato como agente tampón;

- del 0,001% al 0,1% p/v de polisorbato 20;

siendo el pH de la formulación de pH 5 a pH 6; y

en la que el anticuerpo monomérico tiene una pureza del 90% después del almacenamiento durante al menos 6 meses a +5 ºC.

2. La formulación de la reivindicación 1, que además comprende del 0,1 al 10% p/v de un agente de tonicidad.

3. La formulación de la reivindicación 1 o 2, que además comprende del 0,1% al 5% p/v de aminoácido.

4. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la formulación es una formulación líquida.

5. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la formulación es una formulación liofilizada.

6. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el monómero de anticuerpo tiene una pureza del 90% después del almacenamiento durante al menos 9 meses a +5ºC.

7. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, formulación que muestra una cantidad reducida de al menos un subproducto seleccionado del grupo que consiste en agregados, medias moléculas, productos de degradación, proteínas de bajo peso molecular, proteínas de alto peso molecular y reordenamientos de isoformas ácidas/básicas/neutras del anticuerpo en comparación con una formulación de referencia anti-CXCR5 que comprende un anticuerpo anti-CXCR5 en solución salina tamponada con fosfato a pH 7,3.

8. La formulación de la reivindicación 1, que comprende:

a) 20 mg/ml de un anticuerpo IgG4 anti-CXCR5 (receptor de quimiocina CXC tipo 5) humanizado que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26;

b) tampón de citrato 10 mM;

c) el 0,02% de polisorbato 20; y

que comprende además d) el 6% de sacarosa; y

e) el 0,2% de cloruro de sodio;

siendo el pH de la formulación pH 6,0.

9. La formulación de la reivindicación 1, que comprende:

a) 100 mg/ml de un anticuerpo IgG4 anti-CXCR5 (receptor de quimiocina CXC tipo 5) humanizado que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26;

b) tampón de citrato 10 mM;

c) el 0,01% de polisorbato 20; y

que comprende además d) el 4,5% de sacarosa;

e) el 0,2% de cloruro de sodio; y

f) el 1% de arginina;

siendo el pH de la formulación pH 6,0.

10. Un dispositivo precargado o un recipiente precargado, tal como una jeringa, cartucho, vial, ampolla o autoinyector que comprende la formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9.

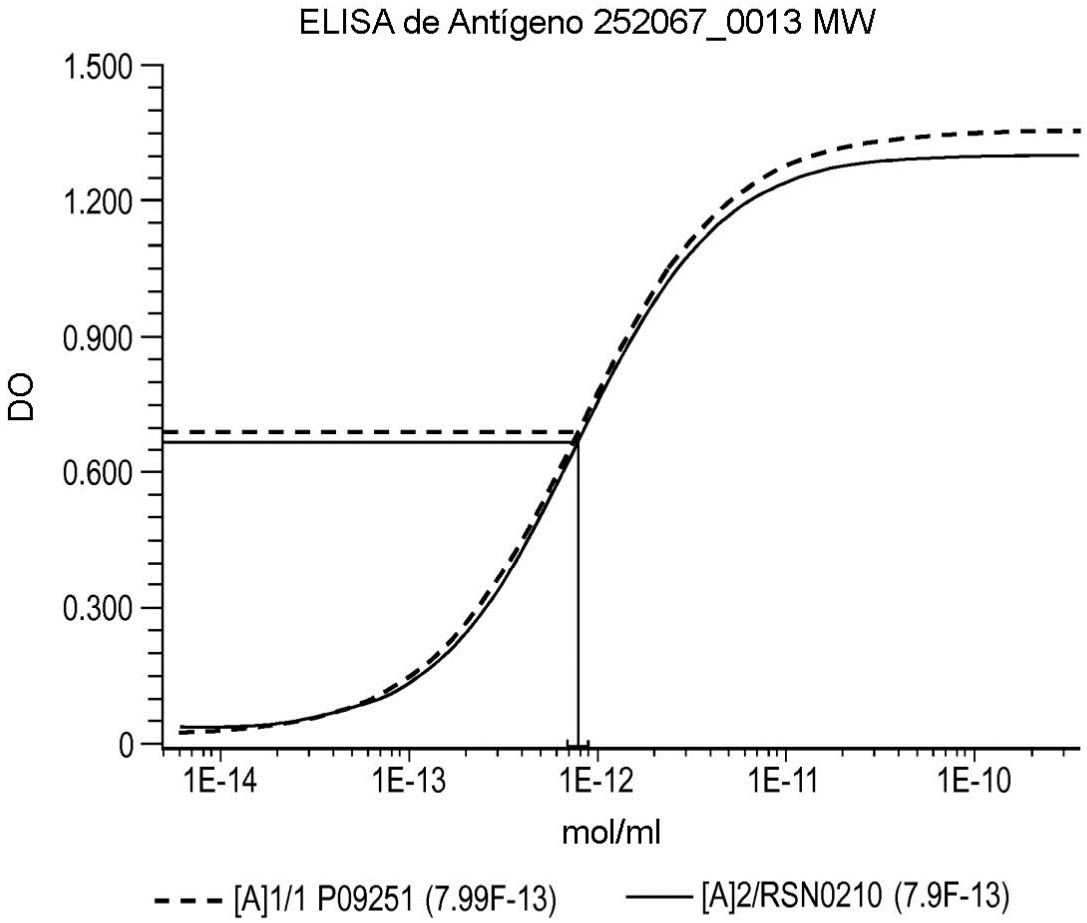

ELISA de Antígeno 252067_0013 MW
1.500
1.200
0.900
0.600
0.300
0
DO
1E-14
1E-13
1E-12
1E-11
1E-10
mol/ml
[A]1/1 P09251 (7.99F-13)
[A]2/RSN0210 (7.9F-13)

Fig. 3

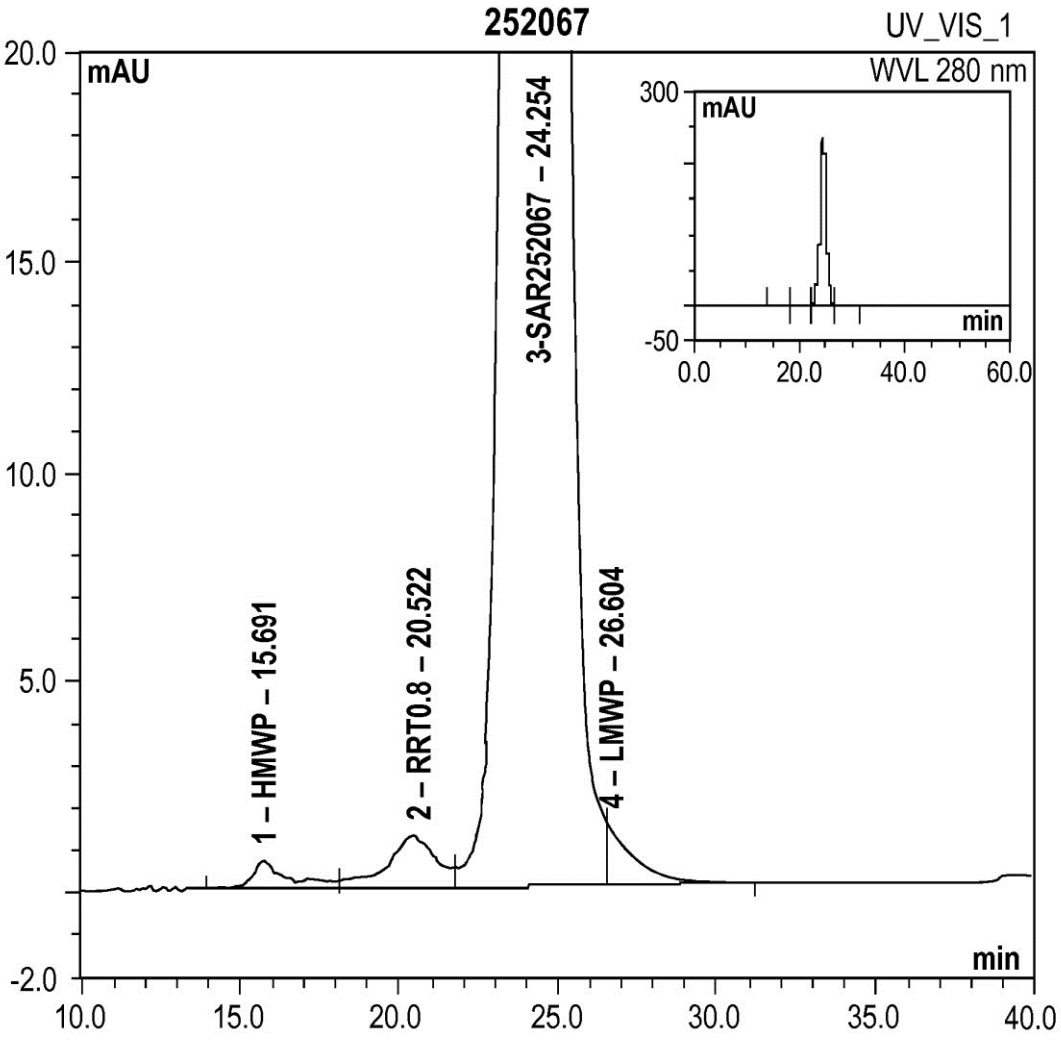
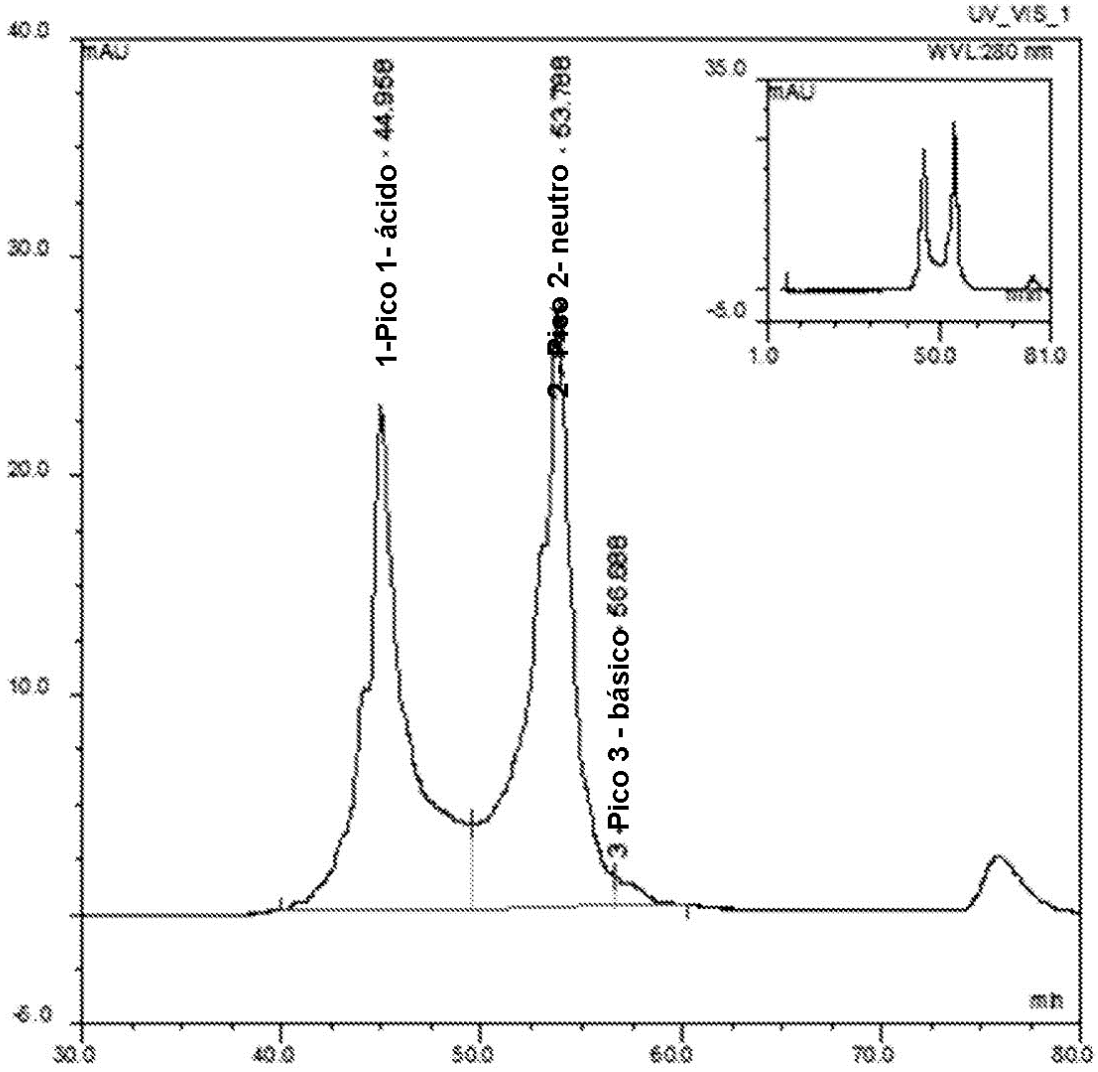

252067
UV_VIS_1
WVL 280 nm
mAU
min
1 – HMWP – 15.691
2 – RRT0.8 – 20.522
3-SAR252067 – 24.254
4 – LMWP – 26.604
20.0
15.0
10.0
5.0
-2.0
10.0
15.0
20.0
25.0
30.0
35.0
40.0
300
-50
0.0
20.0
40.0
60.0

Fig. 4

Figura 5


UV_VIS_1
WVL:280 nm
mAU
1-Pico 1- ácido
2- Pico 2- neutro
3 -Pico 3 - básico
min

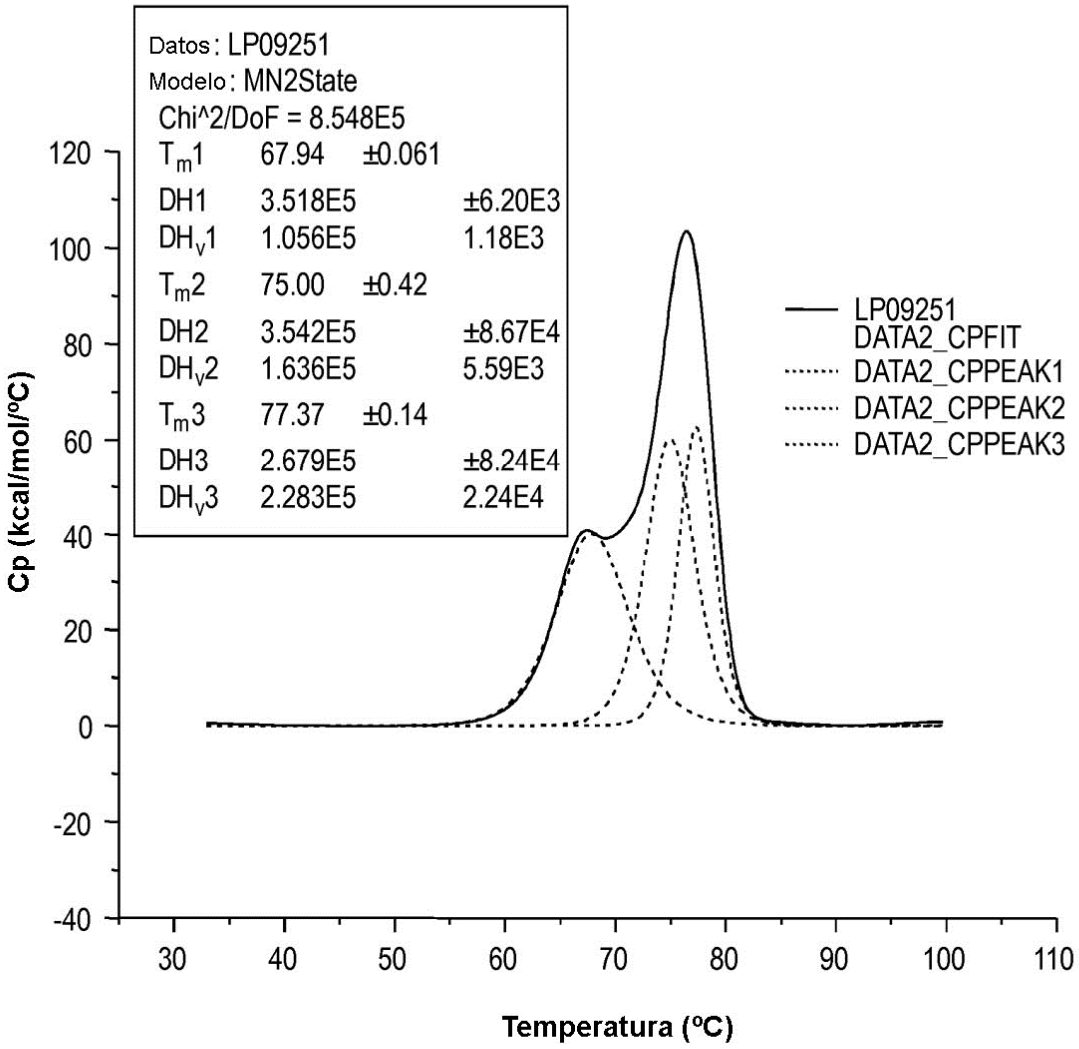

Datos: LP09251
Modelo: MN2State
Chi^2/DoF = 8.548E5
Tm1 67.94 ±0.061
DH1 3.518E5 ±6.20E3
DHv1 1.056E5 1.18E3
Tm2 75.00 ±0.42
DH2 3.542E5 ±8.67E4
DHv2 1.636E5 5.59E3
Tm3 77.37 ±0.14
DH3 2.679E5 ±8.24E4
DHv3 2.283E5 2.24E4
LP09251
DATA2_CPFIT
DATA2_CPPEAK1
DATA2_CPPEAK2
DATA2_CPPEAK3
Cp (kcal/mol/ºC)
Temperatura (ºC)
120
100
80
60
40
20
0
-20
-40
30
40
50
60
70
80
90
100
110

Fig. 6

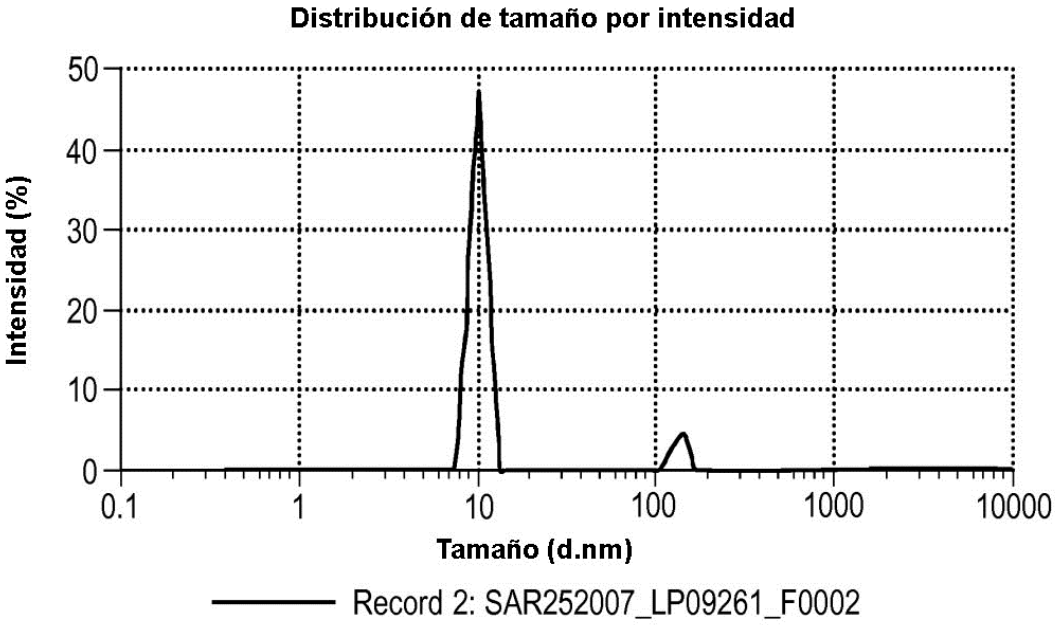

Distribución de tamaño por intensidad
Intensidad (%)
50
40
30
20
10
0
0.1
1
10
100
1000
10000
Tamaño (d.nm)
Record 2: SAR252007_LP09261_F0002

Fig. 7

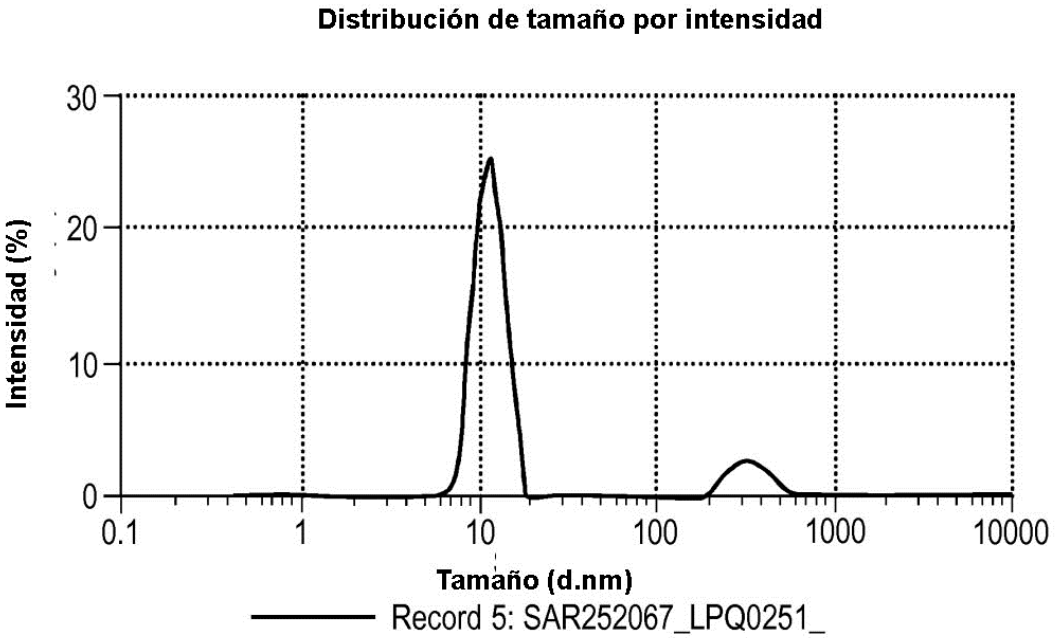

Distribución de tamaño por intensidad
Intensidad (%)
30
20
10
0
0.1
1
10
100
1000
10000
Tamaño (d.nm)
Record 5: SAR252067_LPQ0251_

Fig. 8

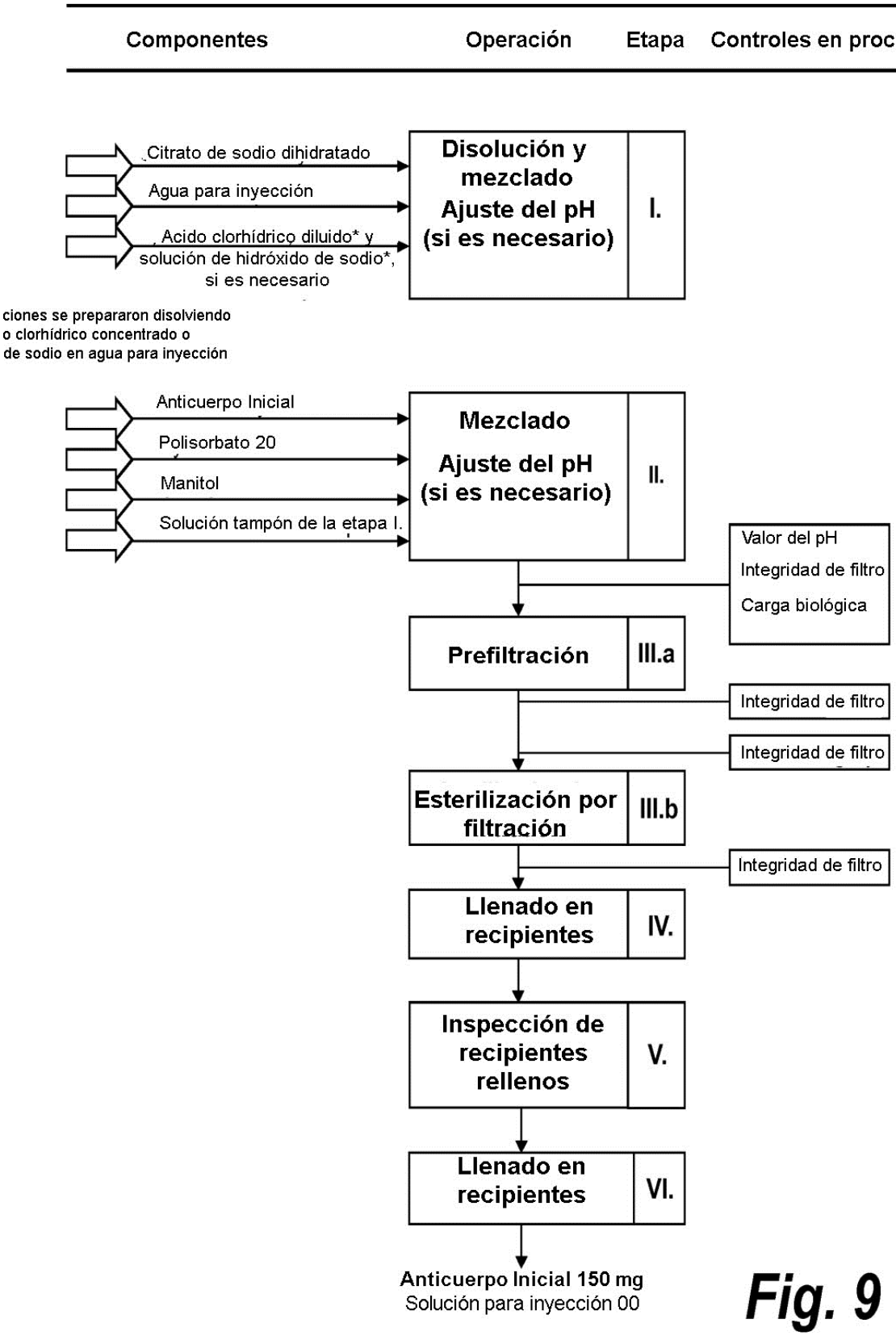

Componentes
Operación
Etapa
Controles en proceso
Citrato de sodio dihidratado
Agua para inyección
Acido clorhídrico diluido* y solución de hidróxido de sodio*, si es necesario
Disolución y mezclado
Ajuste del pH (si es necesario)
I.
ciones se prepararon disolviendo
o clorhídrico concentrado o
de sodio en agua para inyección
Anticuerpo Inicial
Polisorbato 20
Manitol
Solución tampón de la etapa I.
Mezclado
Ajuste del pH (si es necesario)
II.
Valor del pH
Integridad de filtro
Carga biológica
Prefiltración
III.a
Integridad de filtro
Integridad de filtro
Esterilización por filtración
III.b
Integridad de filtro
Llenado en recipientes
IV.
Inspección de recipientes rellenos
V.
Llenado en recipientes
VI.
Anticuerpo Inicial 150 mg
Solución para inyección 00

Fig. 9

Figura 10

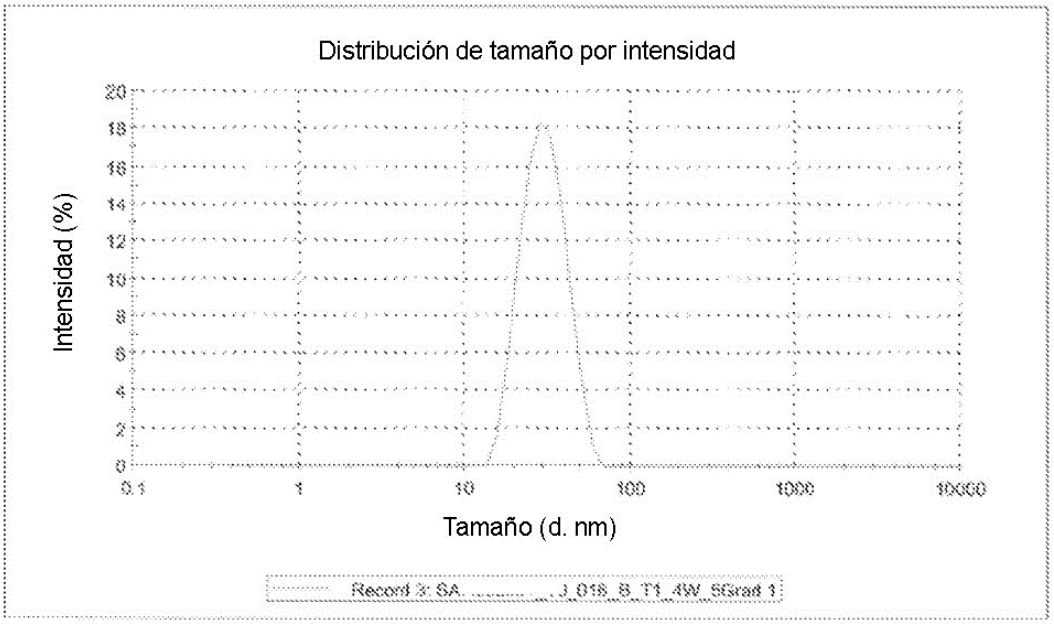


Figura 11

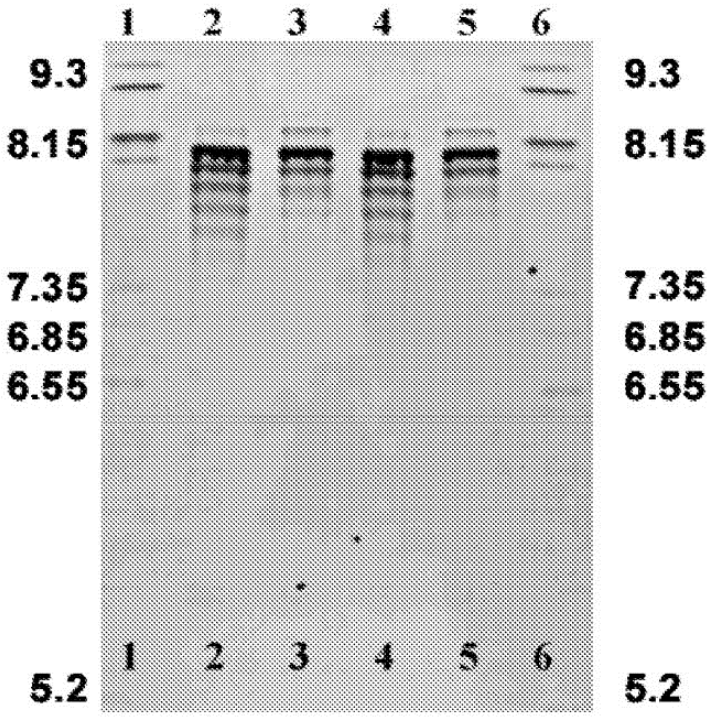


Figura 12

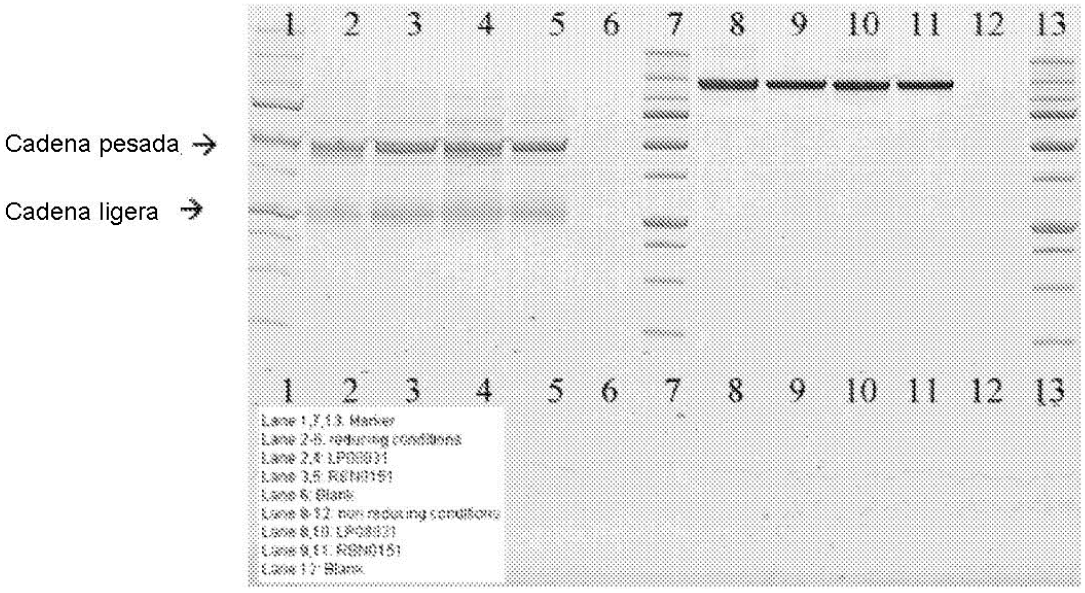


Figura 13

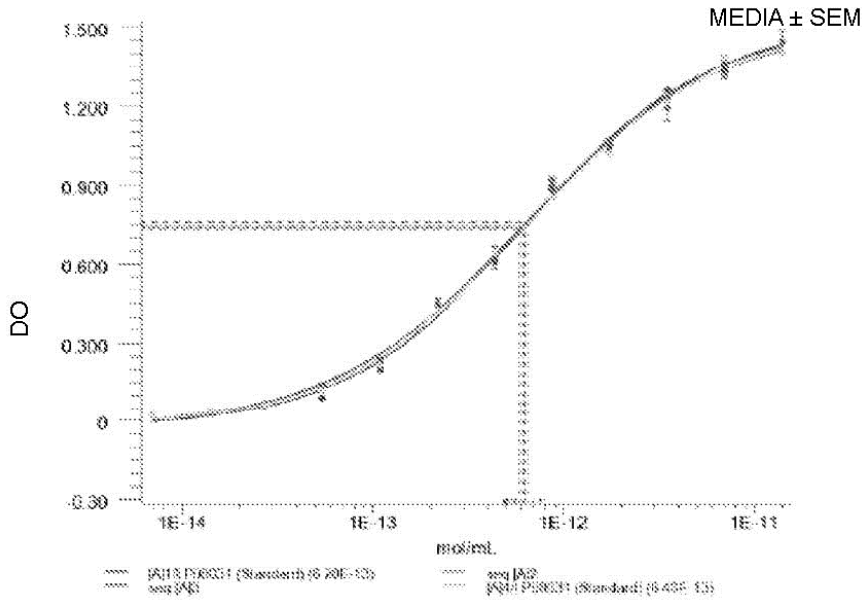


Figura 14

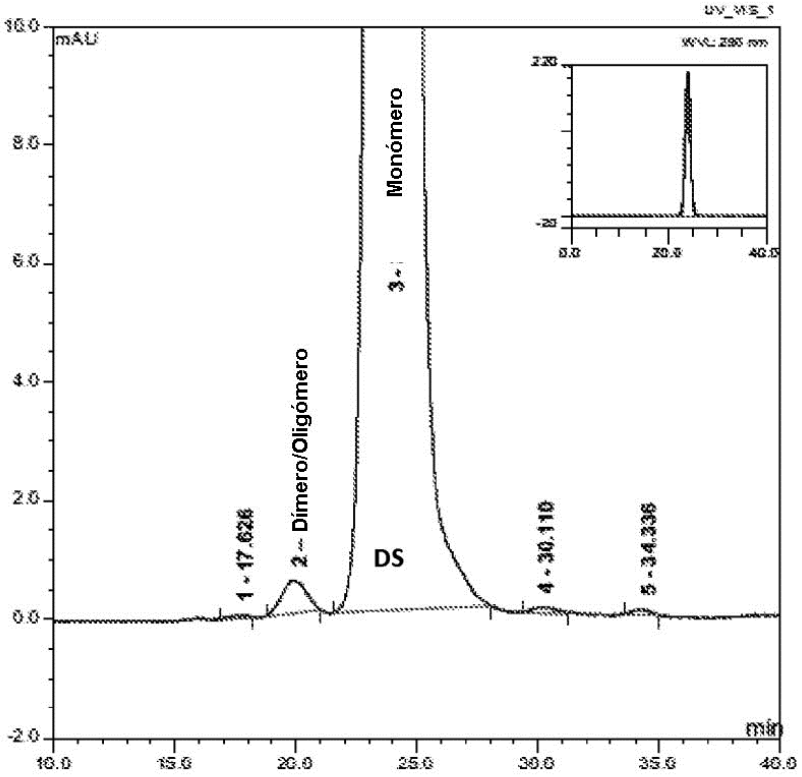

mAU
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
-2.0
1 - 17.626
2 - Dímero/Oligómero
3 - Monómero
DS
4 - 30.110
5 - 34.336
min
10.0
15.0
20.0
25.0
30.0
35.0
40.0

Figura 15

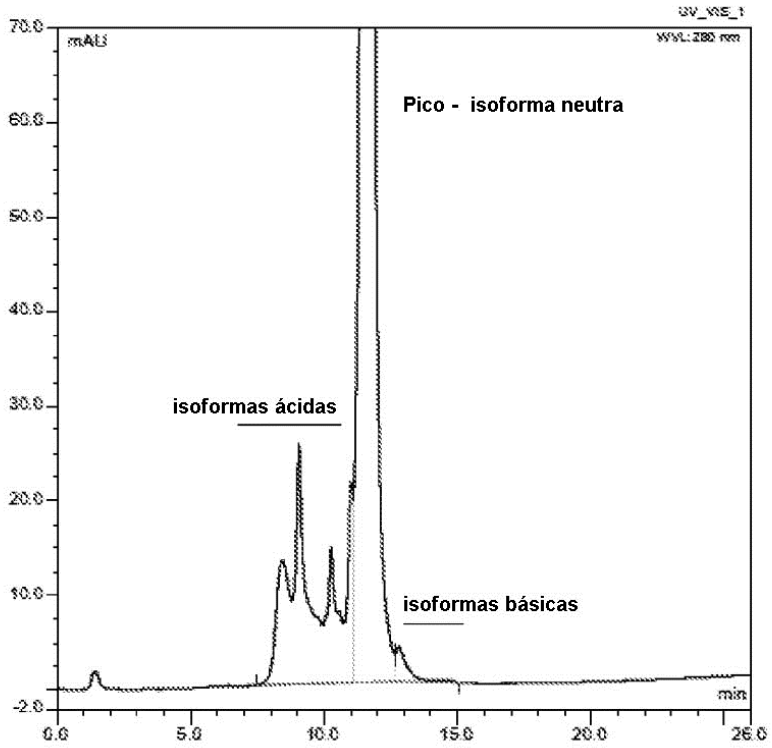


Figura 16

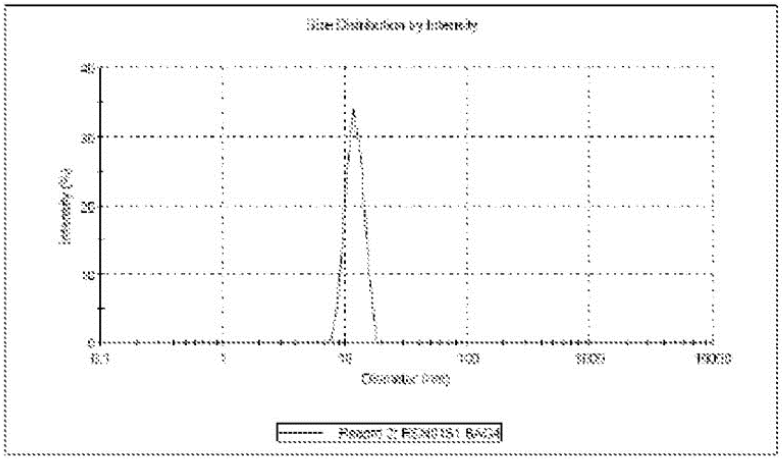


Figura 17

Figura 18

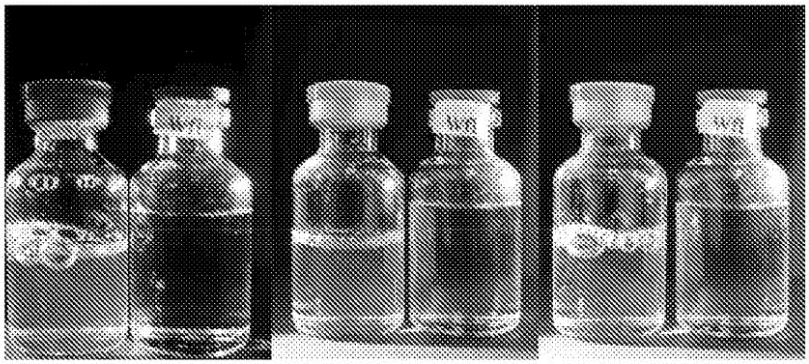


Figura 19

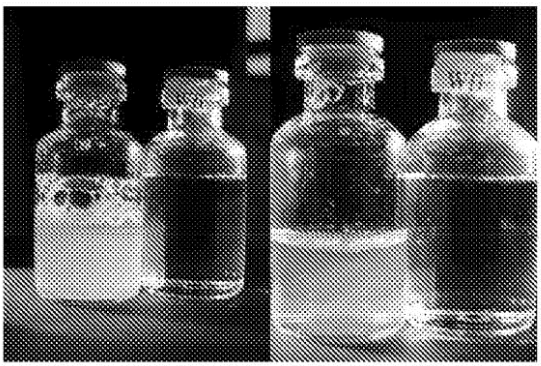


Figura 20

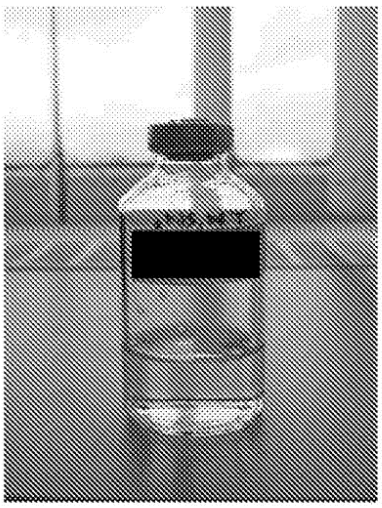


Figura 21

Figura 22

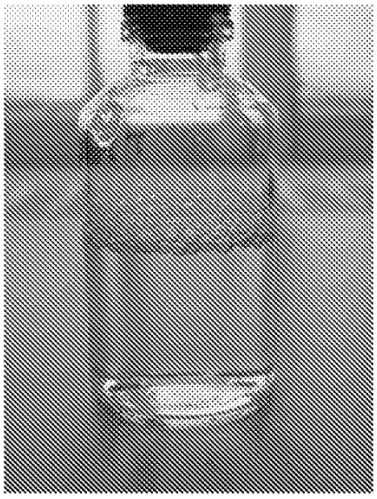
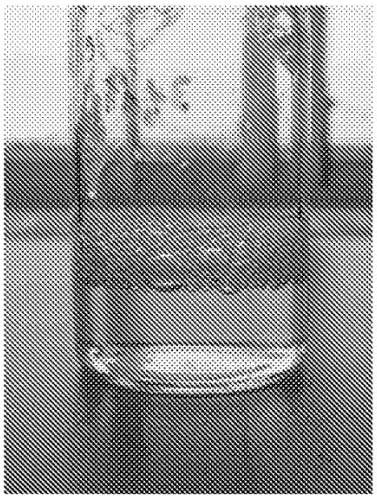


Figura 23



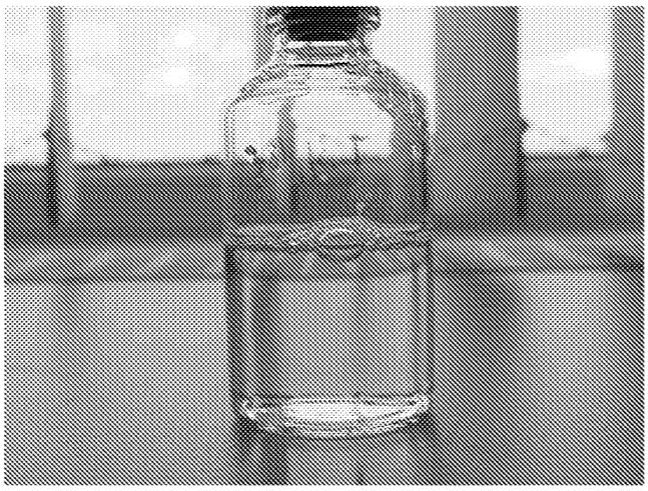


Fig. 24

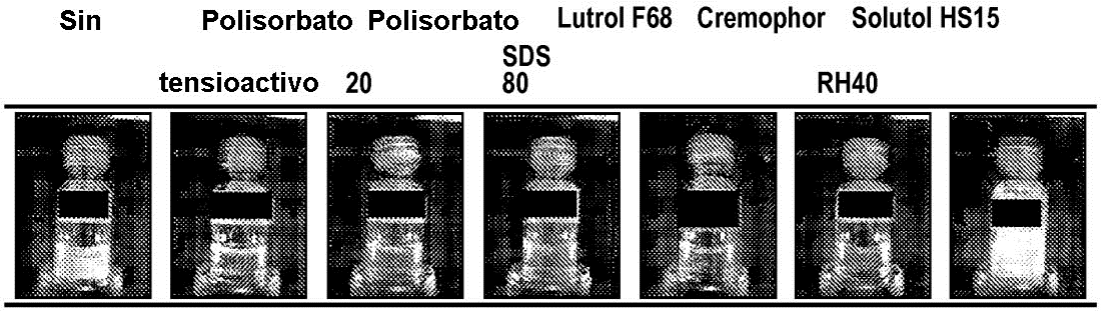
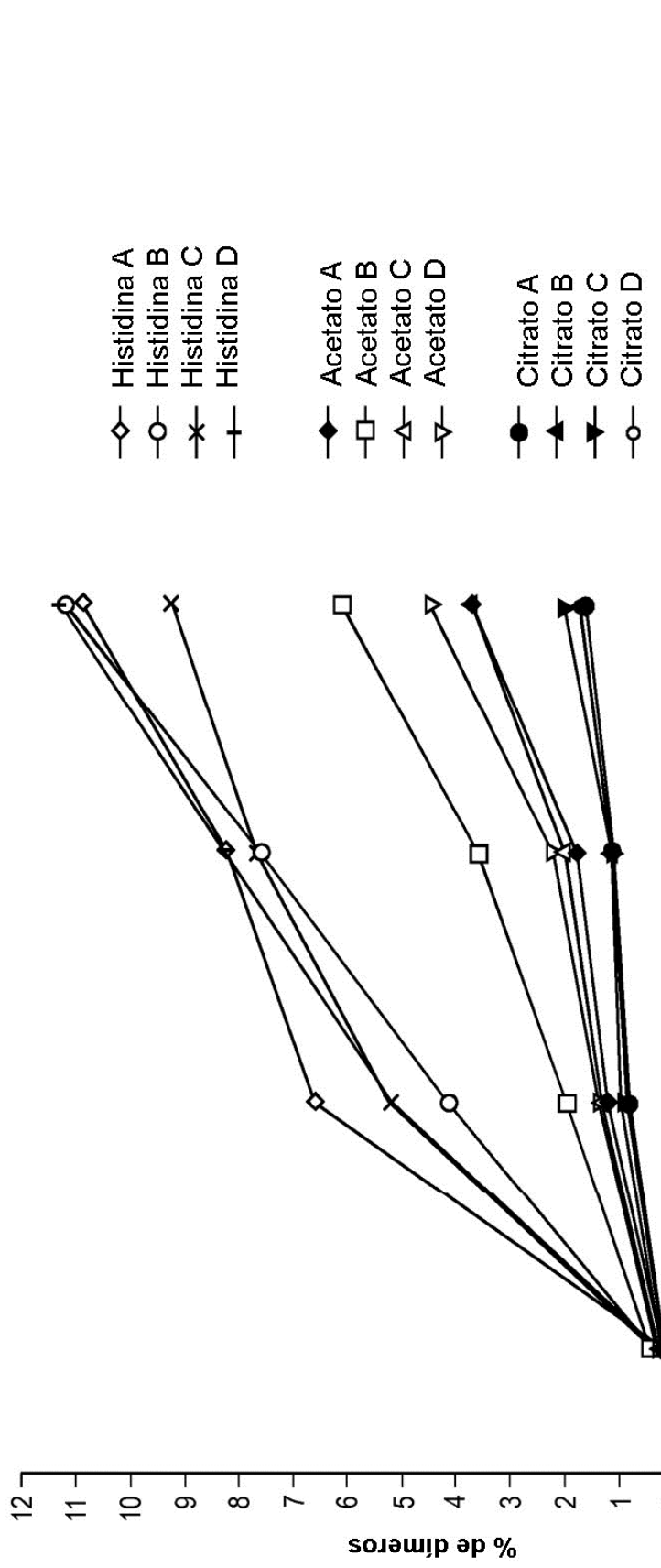
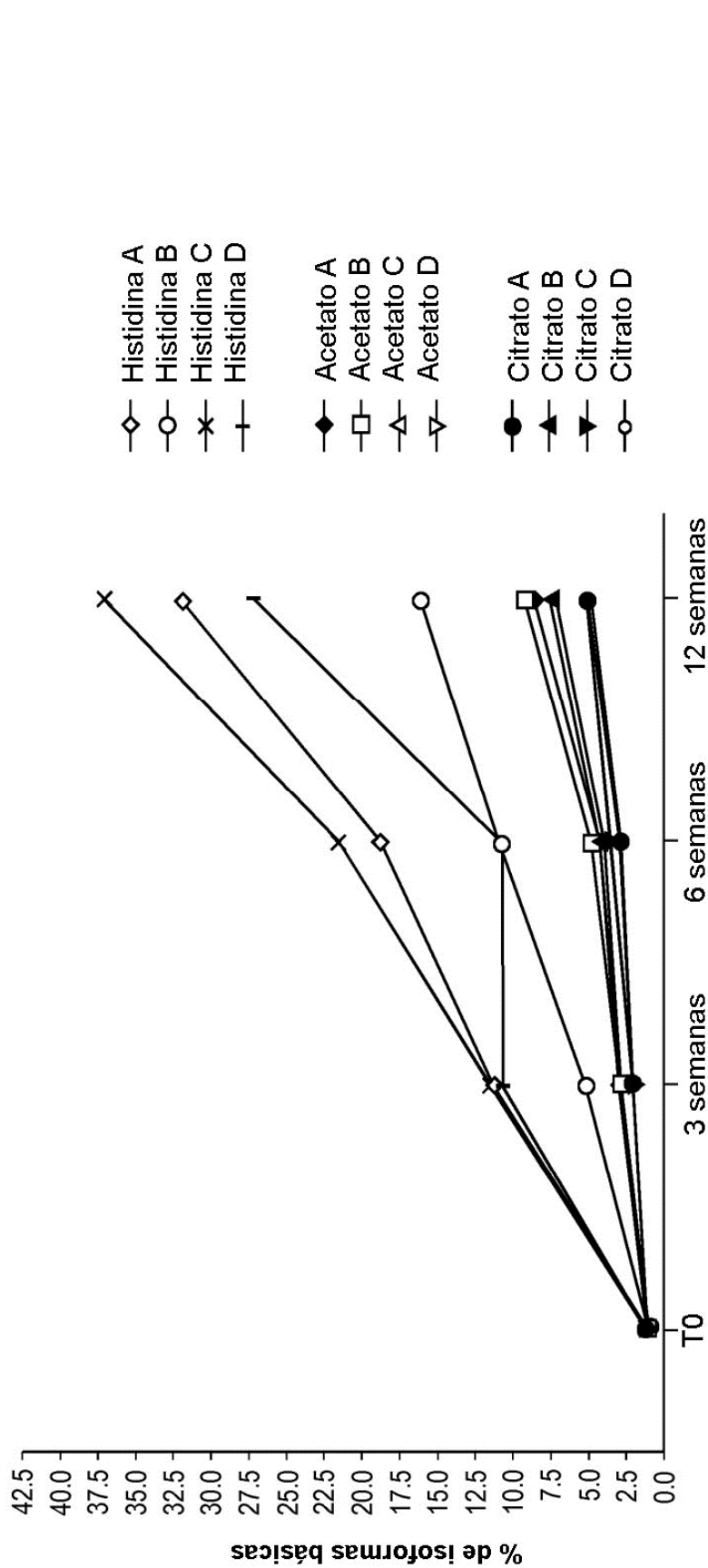

Sin
Polisorbato
tensioactivo
20
Polisorbato
80
SDS
Lutrol F68
Cremophor
RH40
Solutol HS15

Fig. 25



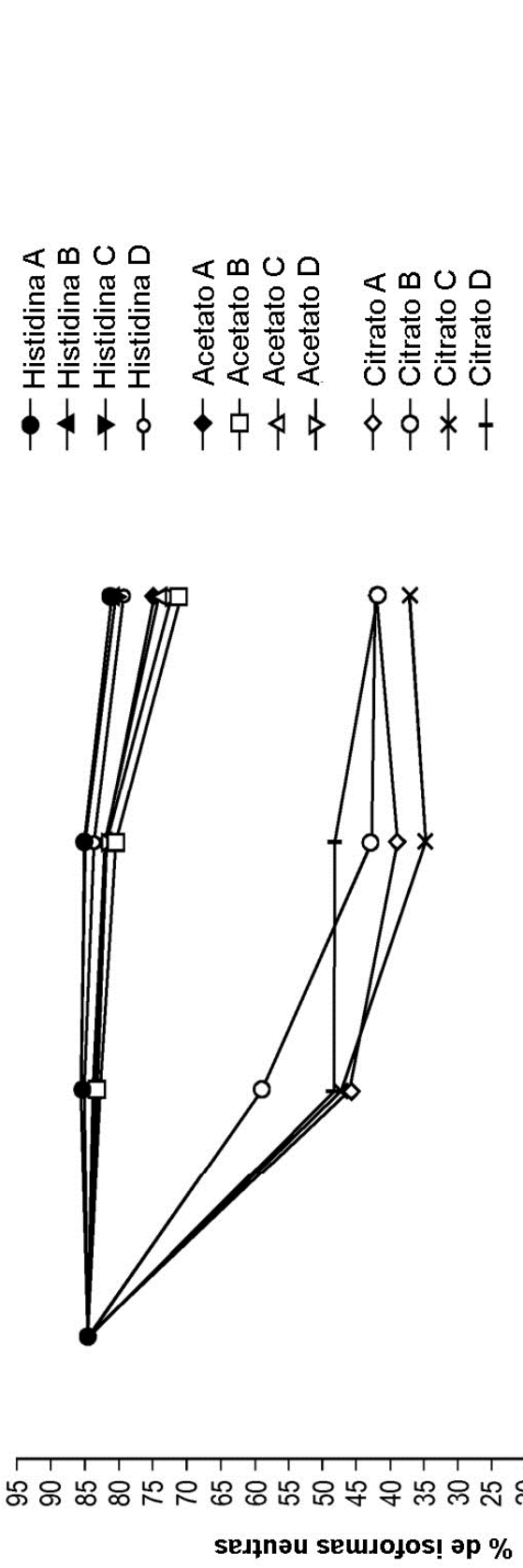
duración	Citrato A	Citrato B	Citrato C	Citrato D	Acetato A	Acetato B	Acetato C	Acetato D	Histidina A	Histidina B	Histidina C	Histidina D
T0	0.217	0.223	0.312	0.283	0.200	0.410	0.139	0.336	0.252	0.321	0.259	0.211
3 semanas	0.800	1.000	0.900	0.800	1.200	2.000	1.300	1.400	5.200	4.200	5.200	6.500
6 semanas	1.100	1.200	1.200	1.100	1.800	3.600	2.000	2.200	8.300	7.600	7.700	8.200
12 semanas	2.006	1.730	1.785	1.634	3.603	6.155	3.777	4.500	10.905	11.218	9.232	11.326

Fig. 26



duración	Citrato A	Citrato B	Citrato C	Citrato D	Acetato A	Acetato B	Acetato C	Acetato D	Histidina A	Histidina B	Histidina C	Histidina D
T0	1.151	1.170	1.194	1.114	1.211	1.232	1.249	1.186	1.174	1.200	1.200	1.189
3 semanas	2.000	2.100	2.200	2.100	2.700	2.800	3.000	2.800	11.200	5.200	11.600	10.700
6 semanas	2.890	2.840	3.480	2.990	3.950	4.880	4.090	4.160	18.780	11.070	21.640	10.710
12 semanas	4.843	4.923	5.250	4.823	7.147	9.177	7.488	8.637	32.040	16.113	37.198	27.279

Fig. 27



duración	Citrato A	Citrato B	Citrato C	Citrato D	Acetato A	Acetato B	Acetato C	Acetato D	Histidina A	Histidina B	Histidina C	Histidina D
T0	84.860	85.037	85.089	84.912	84.626	84.511	84.427	84.478	84.881	84.907	84.881	84.368
3 semanas	85.800	85.300	85.400	85.600	83.900	83.000	84.000	83.000	46.300	59.200	47.300	48.400
6 semanas	85.290	84.990	83.830	85.100	82.450	80.650	82.470	82.050	39.190	42.960	35.040	48.390
12 semanas	80.287	81.163	79.378	81.003	74.736	71.010	74.233	72.345	41.940	42.311	37.193	41.914

Fig. 28

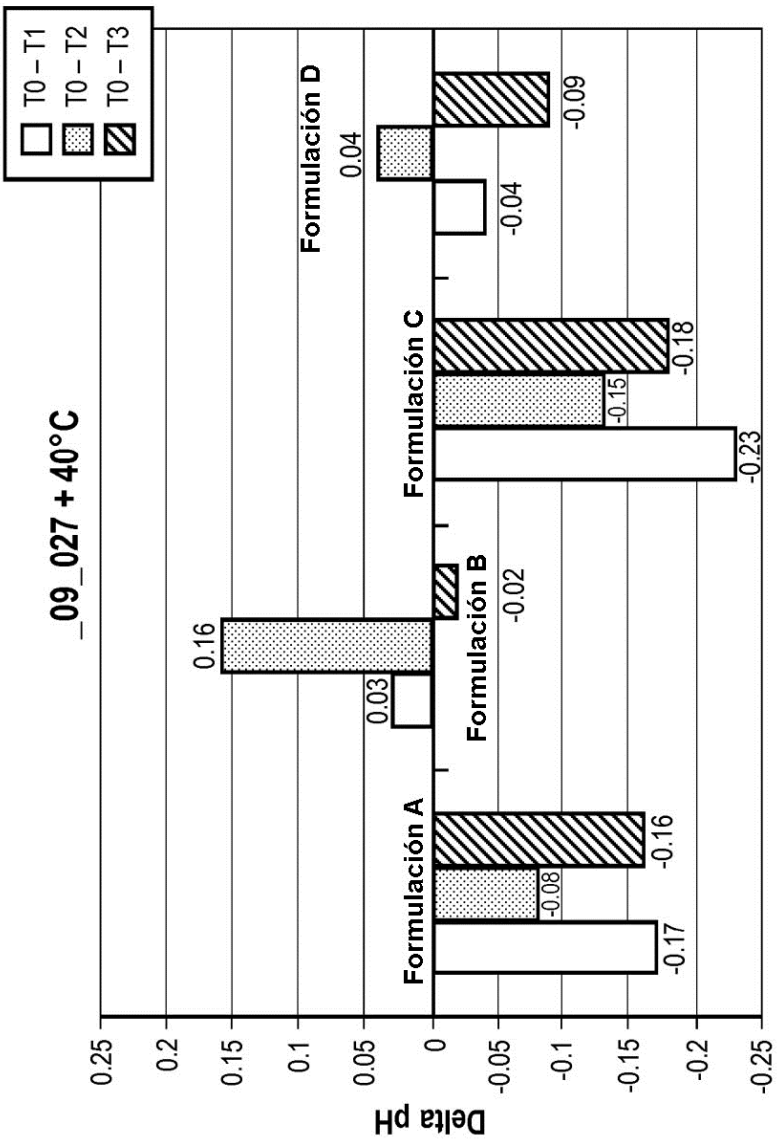

T0 – T1
T0 – T2
T0 – T3
_09_027 + 40°C
Delta pH
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
-0.05
-0.1
-0.15
-0.2
-0.25
Formulación A
0.03
0.16
-0.17
-0.08
-0.16
Formulación B
-0.02
Formulación C
-0.23
-0.15
-0.18
Formulación D
0.04
-0.04
-0.09

Fig. 29

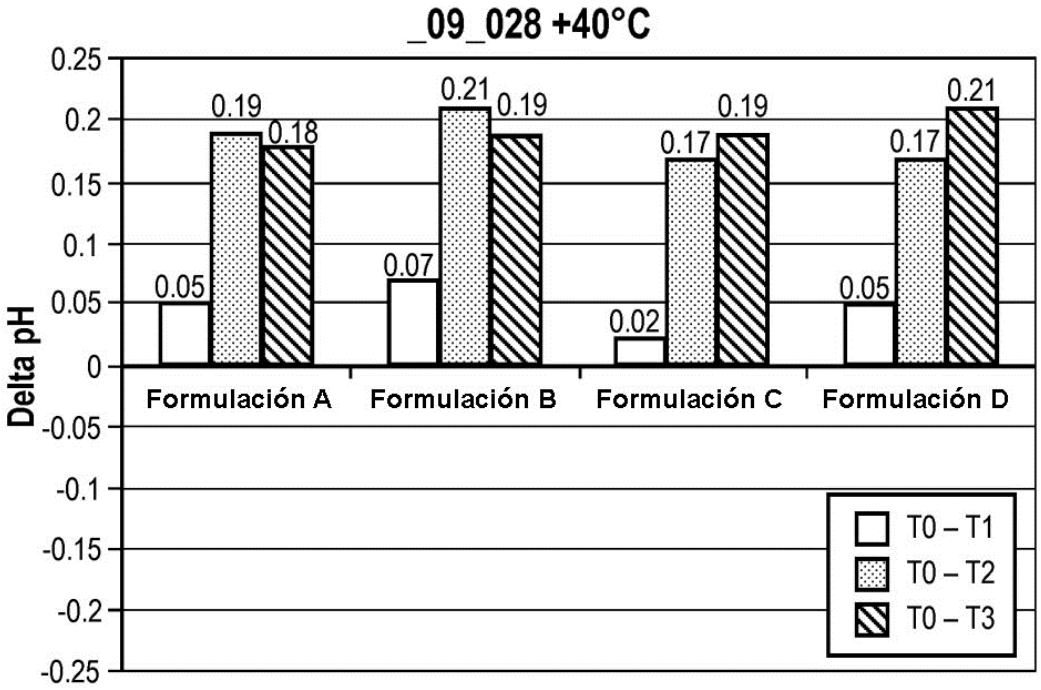

_09_028 +40°C
Delta pH
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
-0.05
-0.1
-0.15
-0.2
-0.25
0.05
0.19
0.18
0.07
0.21
0.19
0.02
0.17
0.19
0.05
0.17
0.21
Formulación A
Formulación B
Formulación C
Formulación D
T0 – T1
T0 – T2
T0 – T3

Fig. 30

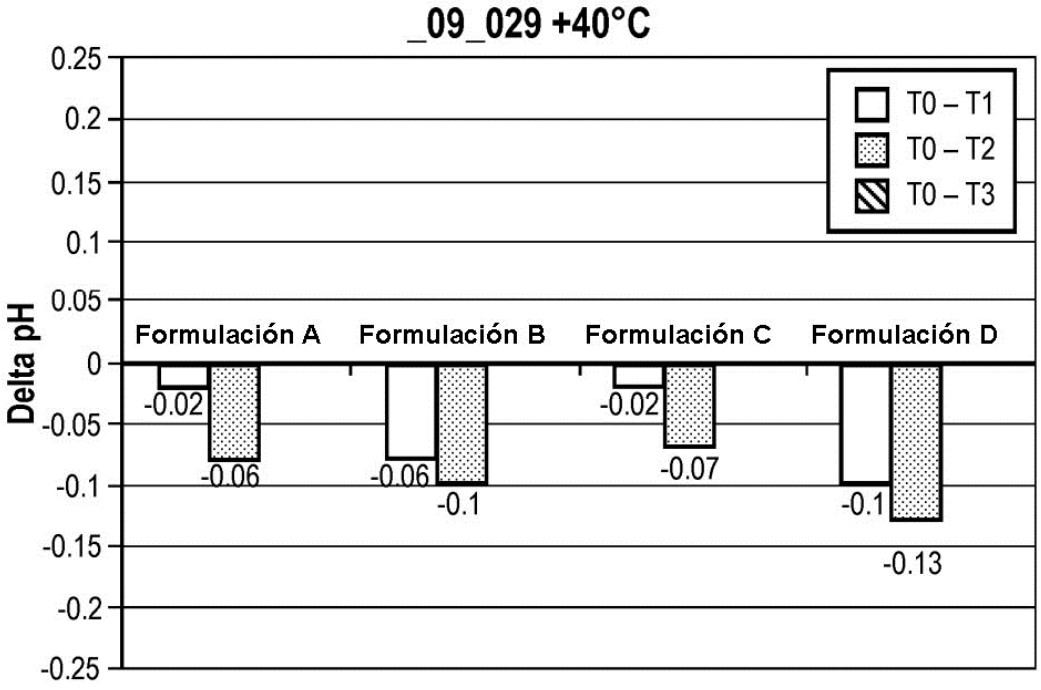

_09_029 +40°C
Delta pH
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
-0.05
-0.1
-0.15
-0.2
-0.25
-0.02
-0.06
-0.06
-0.1
-0.02
-0.07
-0.1
-0.13
Formulación A
Formulación B
Formulación C
Formulación D
T0 – T1
T0 – T2
T0 – T3

Fig. 31

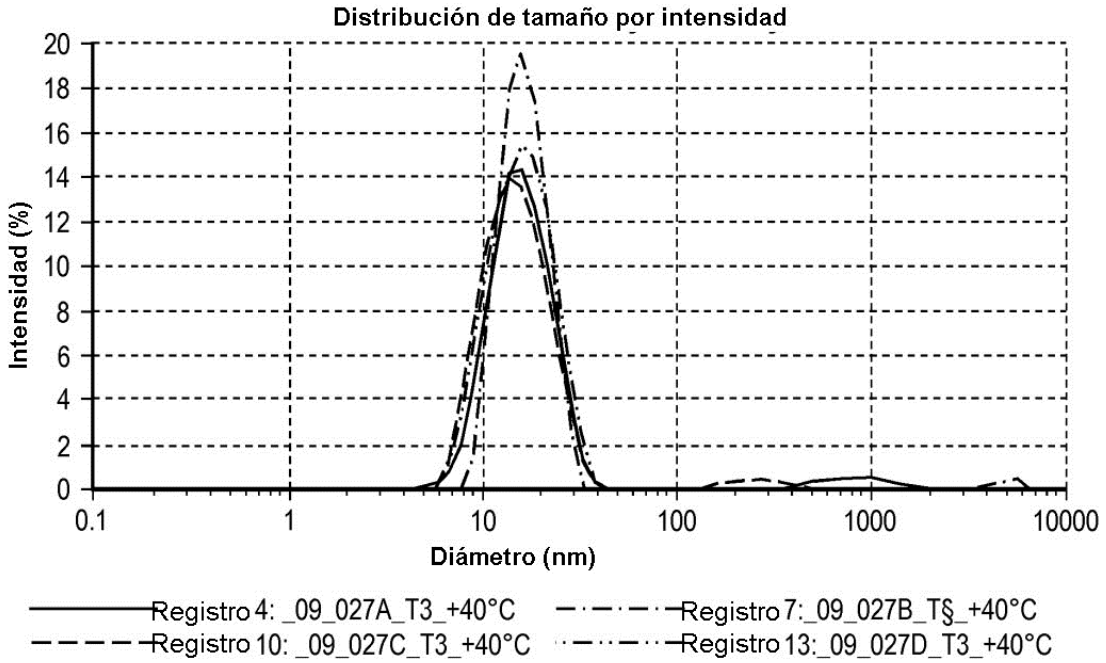

Distribución de tamaño por intensidad
Intensidad (%)
Diámetro (nm)
Registro 4: _09_027A_T3_+40°C
Registro 7:_09_027B_T§_+40°C
Registro 10: _09_027C_T3_+40°C
Registro 13:_09_027D_T3_+40°C

Fig. 32

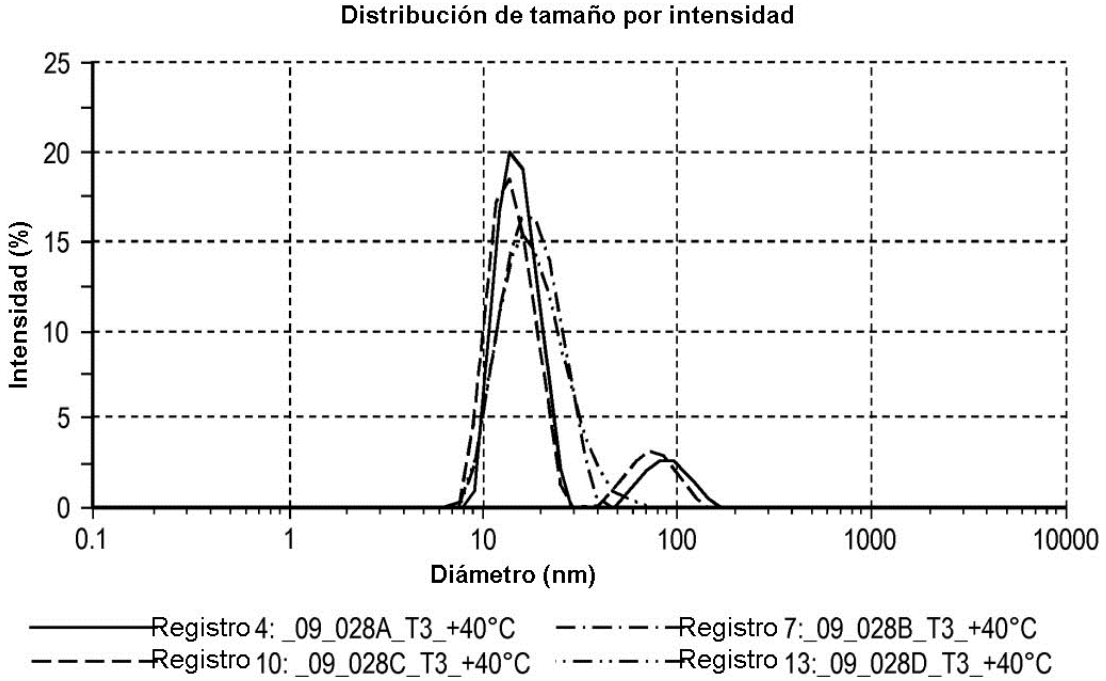

Distribución de tamaño por intensidad
Intensidad (%)
Diámetro (nm)
Registro 4: _09_028A_T3_+40°C
Registro 7:_09_028B_T3_+40°C
Registro 10: _09_028C_T3_+40°C
Registro 13:_09_028D_T3_+40°C

Fig. 33

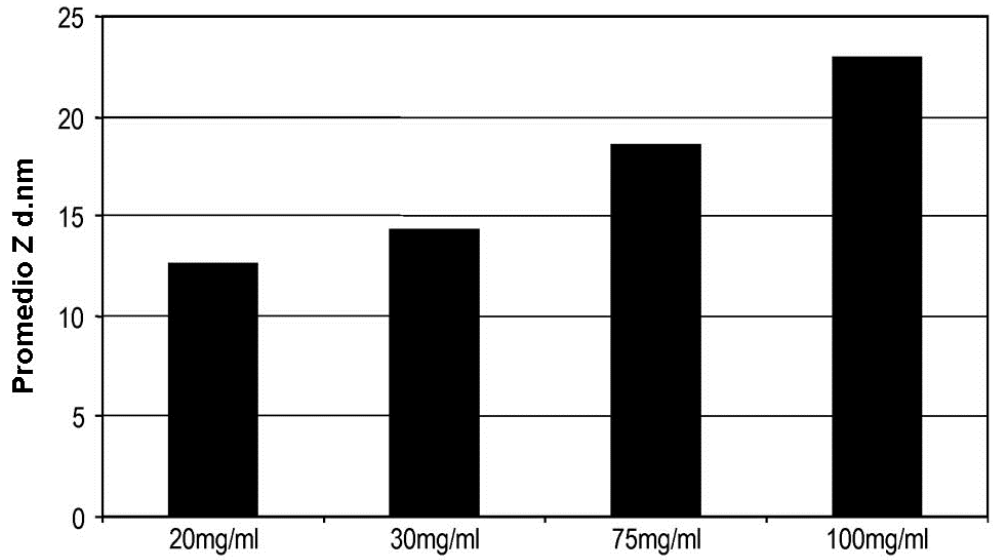

Promedio Z d.nm
25
20
15
10
5
0
20mg/ml
30mg/ml
75mg/ml
100mg/ml

Fig. 34

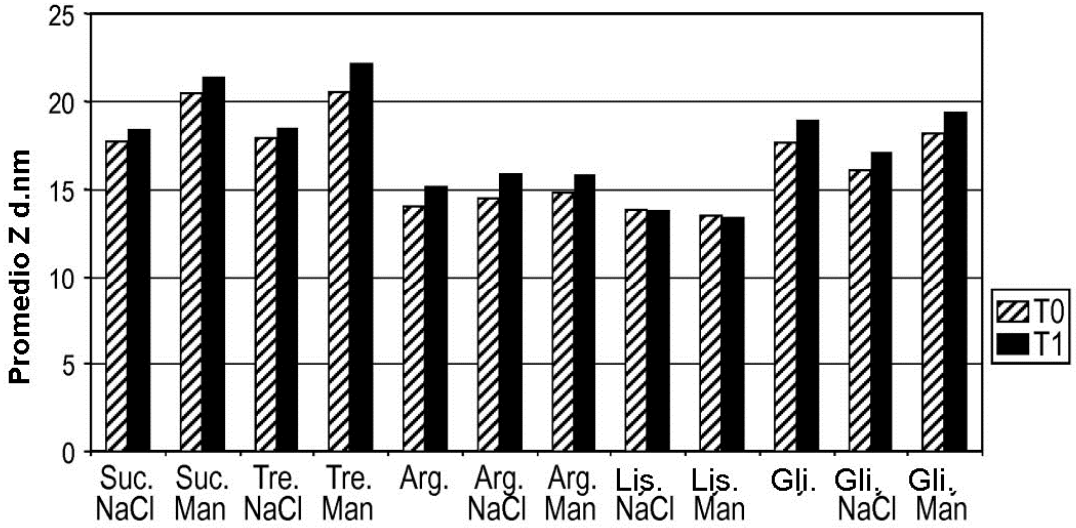

Promedio Z d.nm
25
20
15
10
5
0
Suc. NaCl
Suc. Man
Tre. NaCl
Tre. Man
Arg.
Arg. NaCl
Arg. Man
Lis. NaCl
Lis. Man
Gli.
Gli. NaCl
Gli. Man
T0
T1

Fig. 35

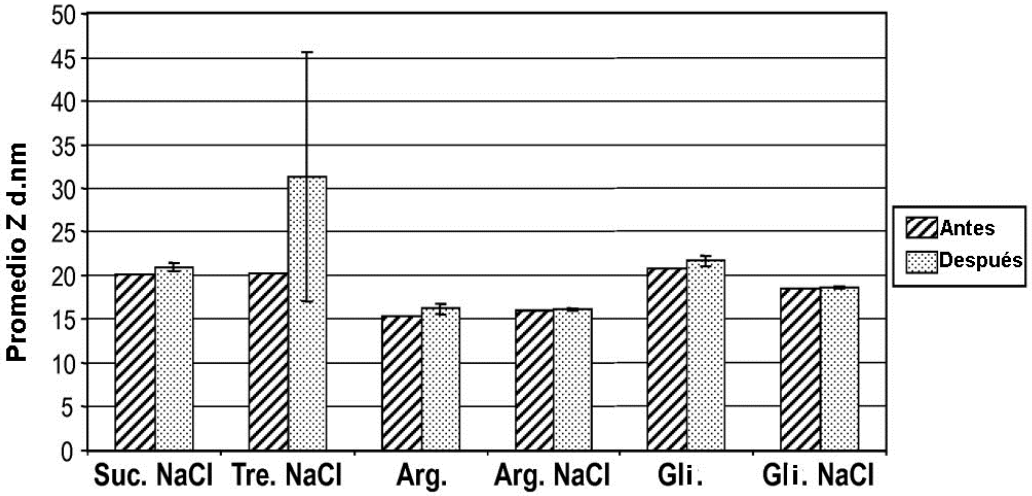


Fig. 36

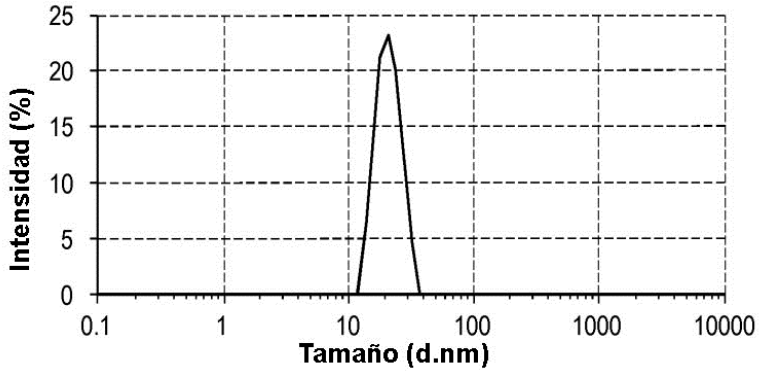


Fig. 37A

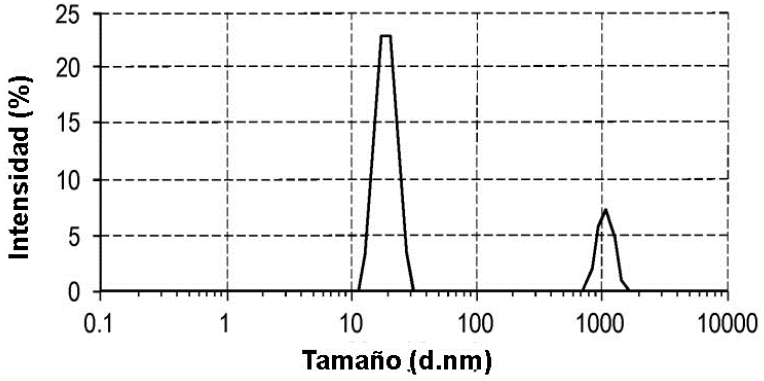
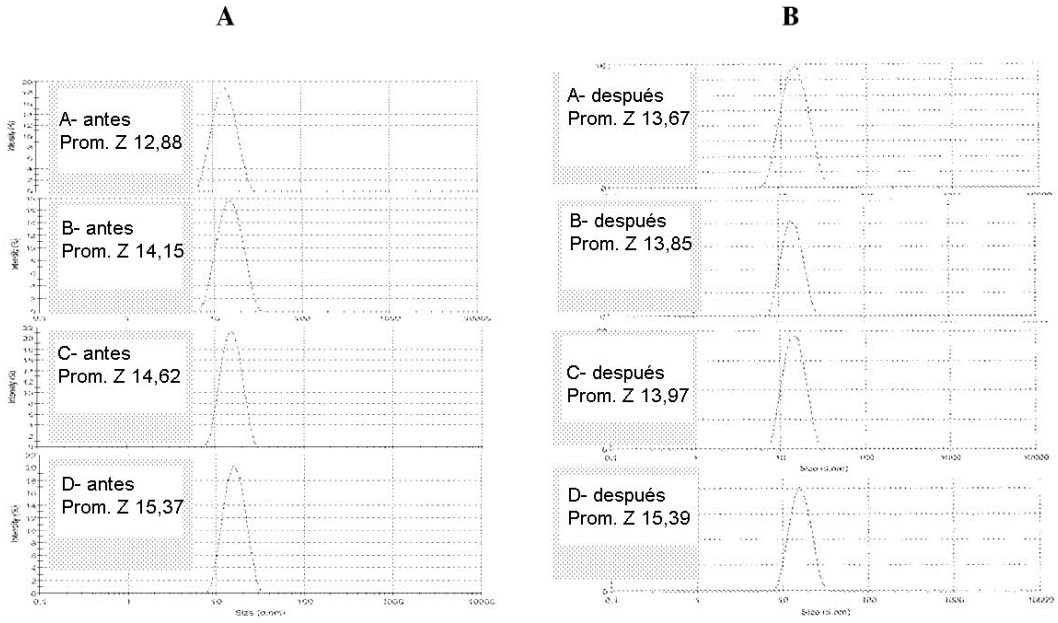


Fig. 37B

Figura 38


A
B
A- antes
Prom. Z 12,88
B- antes
Prom. Z 14,15
C- antes
Prom. Z 14,62
D- antes
Prom. Z 15,37
A- después
Prom. Z 13,67
B- después
Prom. Z 13,85
C- después
Prom. Z 13,97
D- después
Prom. Z 15,39