

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 768 614**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.09.2014 PCT/US2014/057821**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.04.2015 WO15048520**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2014 E 14784169 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2019 EP 3049441**

54 Título: **Formulaciones de anticuerpos anti-PDL1**

30 Prioridad:

27.09.2013 US 201361883953 P

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

23.06.2020

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**YANG, YING y
ALAVATTAM, SREEDHARA**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 768 614 T3

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

DESCRIPCIÓN

Formulaciones de anticuerpos anti-PDL1

5 CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a formulaciones farmacéuticas acuosas estables que comprenden anticuerpos anti-PDL1.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 La provisión de dos señales distintas a los linfocitos T es un modelo ampliamente aceptado para la activación de los linfocitos T en reposo por parte de células presentadoras de antígenos (APC). Lafferty *et al.*, Aust. J. Exp. Biol. Med. ScL 53: 27-42 (1975). Este modelo proporciona además la discriminación entre la tolerancia autoinmunitaria y no autoinmunitaria. Bretscher *et al.*, Science 169: 1042-1049 (1970); Bretscher, P.A., P.N.A.S. USA 96: 185-190 (1999); Jenkins *et al.*, J. Exp. Med. 165: 302-319 (1987). La señal primaria, o señal específica de antígeno, se transduce a través del receptor de linfocitos T (TCR) después del reconocimiento del péptido del xenoantígeno presentado en el contexto del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). La segunda señal o señal coestimuladora se envía a los linfocitos T a través de moléculas coestimuladoras expresadas en células presentadoras de antígenos (APC), e induce a los linfocitos T a promover la expansión clonal, la secreción de citocinas y la función efectora. Lenschow *et al.*, Ann. Rev. Immunol. 14:233 (1996). En ausencia de coestimulación, los linfocitos T se pueden volver resistentes a la estimulación antigénica, no generan una respuesta inmunitaria eficaz y además pueden dar como resultado un agotamiento o tolerancia a xenoantígenos.

25 En el modelo de dos señales, los linfocitos T reciben señales coestimuladoras secundarias positivas y negativas. La regulación de dichas señales positivas y negativas es fundamental para maximizar las respuestas inmunitarias protectoras del huésped, mientras se mantiene la tolerancia inmunológica y se previene la autoinmunidad. Las señales secundarias negativas parecen necesarias para la inducción de la tolerancia de linfocitos T, mientras que las señales positivas promueven la activación de linfocitos T. Si bien el modelo simple de dos señales aún proporciona una explicación válida para los linfocitos indiferenciados, la respuesta inmunitaria de un huésped es un proceso dinámico, y también se pueden proporcionar señales coestimuladoras a linfocitos T expuestos al antígeno. El mecanismo de coestimulación es de interés terapéutico porque la manipulación de las señales coestimuladoras ha demostrado proporcionar un medio para potenciar o terminar la respuesta inmunitaria basada en células. Recientemente se ha descubierto que la disfunción de los linfocitos T o anergia se produce simultáneamente con una expresión inducida y sostenida del receptor inhibitor, el polipéptido de muerte programada 1 (PD-1). Como resultado, las dianas terapéuticas de PD-1 y otras moléculas que envían señales a través de interacciones con PD-1, tales como el ligando de muerte programada 1 (PD-L1) y el ligando de muerte programada 2 (PD-L2), son un área de gran interés.

40 El PD-L1 está sobreexpresado en muchos tipos de cáncer y a menudo se asocia con un mal pronóstico (Okazaki T *et al.*, Intern. Immun. 2007 19(7):813) (Thompson RH *et al.*, Cancer Res 2006, 66(7):3381). De forma interesante, la mayoría de los linfocitos T infiltrantes de tumores expresan predominantemente PD-1, en contraste con los linfocitos T en tejidos normales y los linfocitos T de sangre periférica, lo que indica que la regulación por incremento de PD-1 en linfocitos T reactivos al tumor puede contribuir al deterioro de las respuestas inmunitarias antitumorales (Blood 2009 114(8): 1537). Esto se puede deber a la explotación de la señalización de PD-L1 mediada por células tumorales que expresan PD-L1 que interactúan con los linfocitos T que expresan PD-1 para dar como resultado la atenuación de la activación de los linfocitos T y la evasión de la vigilancia inmunológica (Sharpe *et al.*, Nat Rev 2002) (Keir ME *et al.*, 2008 Annu. Rev. Immunol. 26:677). Por lo tanto, la inhibición de la interacción PD-L1/PD-1 puede potenciar la muerte de tumores mediada por linfocitos T CD8+.

50 Las dianas terapéuticas de PD-1 y otras moléculas que envían señales a través de interacciones con PD-1, tales como el ligando de muerte programada 1 (PD-L1) y el ligando de muerte programada 2 (PD-L2), son un área de gran interés. La inhibición de la señalización de PD-L1 se ha propuesto como un medio para potenciar la inmunidad de los linfocitos T para el tratamiento del cáncer (por ejemplo, inmunidad tumoral) y la infección, incluida la infección aguda y crónica (por ejemplo, persistente). Sin embargo, dado que aún no se ha comercializado una terapia óptima dirigida a una diana en esta vía, existe una importante necesidad médica no cubierta. El documento WO2013/019906 divulga anticuerpos anti-PD-L1. El documento WO2013/093809 divulga una composición que comprende hasta 20 mg/ml de anticuerpo, acetato de sodio y polisorbato 80 a un pH que varía de aproximadamente 5 a 6.

60 SUMARIO DE LA INVENCION

En el presente documento se proporcionan formulaciones farmacéuticas acuosas estables que comprenden un anticuerpo. La formulación comprende un anticuerpo monoclonal anti-PDL1 en una concentración de 40 mg/ml a 125 mg/ml, acetato de histidina o acetato de sodio en una concentración de 15 mM a 25 mM, sacarosa en una concentración de 60 mM a 240 mM, polisorbato en una concentración de 0,005 % (p/v) a 0,06 % (p/v), y pH 5,0 a 6,3; en la que dicho anticuerpo monoclonal comprende una región variable de cadena ligera que comprende la

ES 2 768 614 T3

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7, y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:32; y en la que dicho anticuerpo monoclonal es un anticuerpo IgG1 humanizado.

5 En algunos modos de realización, el anticuerpo monoclonal en la formulación está en de 40 mg/ml a 80 mg/ml. En algunos modos de realización, el anticuerpo monoclonal en la formulación está en de 54 mg/ml a 66 mg/ml. En algunos modos de realización, el anticuerpo monoclonal en la formulación está en 60 mg/ml. En algunos modos de realización, el anticuerpo monoclonal en la formulación está en de 60 mg/ml a 125 mg/ml. En algunos modos de realización, el anticuerpo monoclonal en la formulación está en 125 mg/ml.

10 En algunos modos de realización, dicho acetato de histidina o acetato de sodio en la formulación está en una concentración de 17 mM a 22 mM. En algunos modos de realización, dicho acetato de histidina o acetato de sodio en la formulación está en una concentración de 20 mM.

15 En algunos modos de realización, dicha sacarosa en la formulación está en de 60 mM a 180 mM. En algunos modos de realización, dicha sacarosa en la formulación está en 120 mM. En algunos modos de realización, dicha sacarosa en la formulación está en 240 mM.

20 En algunos modos de realización, la formulación tiene un pH de 5,5 a 6,1. En algunos modos de realización, la formulación tiene un pH de 5,5 o 5,8.

En algunos modos de realización, dicho polisorbato en la formulación es polisorbato 20. En algunos modos de realización, dicho polisorbato (por ejemplo, polisorbato 20) en la formulación está en del 0,02 % al 0,04 %.

25 En algunos modos de realización, dicho anticuerpo monoclonal en la formulación está en 60 mg/ml, la sacarosa en la formulación está en 120 mM y el pH es 5,8. En algunos modos de realización, dicho anticuerpo monoclonal en la formulación está en 125 mg/ml, la sacarosa en la formulación está en 240 mM y el pH es 5,5.

30 En algunos modos de realización, la formulación comprende un anticuerpo anti-PDL1 descrito en el presente documento en una cantidad de 60 mg/ml, acetato de histidina en una concentración de 20 mM, sacarosa en una concentración de 120 mM y polisorbato que es polisorbato 20 en una concentración del 0,04 % (p/v), y la formulación tiene un pH de 5,8.

35 En algunos modos de realización, la formulación comprende dicho anticuerpo monoclonal en una cantidad de 125 mg/ml, acetato de histidina en una concentración de 20 mM, sacarosa en una concentración de 240 mM y polisorbato que es polisorbato 20 en una concentración del 0,02 %, y la formulación tiene un pH de 5,5.

En algunos modos de realización, dicho anticuerpo monoclonal en la formulación no se somete a liofilización previa.

40 En algunos modos de realización de la divulgación, dicho anticuerpo monoclonal en la formulación comprende

(a) una región variable de cadena ligera que comprende:

(1) HVR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:1);

45 (2) HVR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos SASFLYS (SEQ ID NO:2);

(3) HVR-L3 comprende la secuencia de aminoácidos QQYLYHPAT (SEQ ID NO:3); y

(b) y una región variable de cadena pesada que comprende:

50 (1) HVR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos GFTFSDSWIH (SEQ ID NO:4);

(2) HVR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos AWISPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:5);

55 (3) HVR-H3 comprende la secuencia de aminoácidos RHWPGGFY (SEQ ID NO:6).

60 En algunos modos de realización, dicho anticuerpo monoclonal en la formulación comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:32. En algunos modos de realización, dicho anticuerpo monoclonal en la formulación comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10.

65 En algunos modos de realización, la formulación que comprende el anticuerpo se almacena en un vial de vidrio o un recipiente de aleación metálica. En algunos modos de realización, la aleación metálica es acero inoxidable 316L o Hastelloy. En algunos modos de realización, la formulación es estable a 2-8 °C durante al menos 6 meses, al menos

12 meses, al menos 18 meses o al menos 24 meses. En algunos modos de realización, el anticuerpo en la formulación retiene, después del almacenamiento, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 % de la actividad biológica que tenía antes del almacenamiento. En algunos modos de realización, la actividad biológica se mide mediante la unión del anticuerpo a PD-L1.

En algunos modos de realización, la formulación descrita en el presente documento es estéril. En algunos modos de realización, la formulación descrita en el presente documento es adecuada para administrarse a un sujeto. En algunos modos de realización, la formulación descrita en el presente documento es para administración intravenosa (i.v.).

En otro aspecto, se proporciona en el presente documento un artículo de fabricación o kit que comprende un recipiente que contiene cualquiera de las formulaciones farmacéuticas acuosas estables descritas anteriormente y en el presente documento. En algunos modos de realización, el recipiente es un vial de vidrio o un recipiente de aleación metálica. En algunos modos de realización, la aleación metálica es acero inoxidable 316L o Hastelloy.

En otro aspecto, se describe en el presente documento un procedimiento para tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de la formulación descrita en el presente documento, en el que la enfermedad o trastorno se selecciona del grupo que consiste en infección, cáncer y enfermedad inflamatoria.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **FIG. 1** es una serie de gráficos que muestran análisis estadísticos de datos de estabilidad de formulaciones de α -PDL1 a 40 °C por iCIEF usando el programa informático JMP. **A)** Pérdida de velocidad promedio del pico principal del diseño de experimentos (DOE) factorial fraccionado. **B)** Análisis del pico principal del DOE factorial fraccionado. El pico principal contiene especies cargadas de α -PDL1 con el mismo pH que el pI (punto isoeléctrico) de la molécula.

La **FIG. 2** es una serie de gráficos que muestran análisis estadísticos de datos de estabilidad de formulaciones de α -PDL1 a 25 °C por iCIEF usando el programa informático JMP. **A)** Pérdida de velocidad promedio del pico principal del diseño de experimentos (DOE) factorial fraccionado. **B)** Análisis del pico principal del DOE factorial fraccionado. El pico principal contiene especies cargadas de α -PDL1 con el mismo pH que el pI (punto isoeléctrico) de la molécula.

La **FIG. 3** es una serie de gráficos que muestran análisis estadísticos de datos de estabilidad de formulaciones de α -PDL1 a 40 °C por SE-HPLC usando el programa informático JMP. **A)** Pérdida de velocidad promedio del pico principal del diseño de experimentos (DOE) factorial fraccionado. **B)** Análisis del pico principal del DOE factorial fraccionado. El pico principal contiene monómero de α -PDL1.

La **FIG. 4** es una serie de gráficos que muestran análisis estadísticos de datos de estabilidad de formulaciones de α -PDL1 a 25 °C por SE-HPLC usando el programa informático JMP. **A)** Pérdida de velocidad promedio del pico principal del diseño de experimentos (DOE) factorial fraccionado. **B)** Análisis del pico principal del DOE factorial fraccionado. El pico principal contiene monómero de α -PDL1.

La **FIG. 5** es un gráfico que muestra la ausencia de degradación significativa de PS20 de diversas formulaciones de α -PDL1 almacenadas a diversas temperaturas y tiempos. Gráfico del porcentaje (%) de PS20 restante en la formulación detectado por el detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD) en las formulaciones F1 a F10. a es el tiempo cero (T0); b es 40 °C, 1 M; c es 25 °C, 2 M; d es 5 °C, 2 M; e es 5 °C, 6 M; f es 5 °C, 6 M, vial de vidrio (GV) de 20 cc, alto llenado; y g es 5 °C, 6 M, vial de vidrio (GV) de 20 cc, bajo llenado.

La **FIG. 6** es una serie de gráficos que muestran la estabilidad de las formulaciones de α -PDL1 almacenadas a -20 °C o 5 °C durante hasta 6 meses en un vial de vidrio (GV). **A)** Gráfico del porcentaje (%) de monómero en las formulaciones después de cinco ciclos de congelación-descongelación durante el almacenamiento a -20 °C durante el tiempo indicado. **B)** Gráfico del porcentaje (%) de monómero en las formulaciones almacenadas a 5 °C durante el tiempo indicado. **C)** Gráfico del porcentaje (%) del pico principal obtenido de la formulación después de cinco ciclos de congelación-descongelación durante el almacenamiento a -20 °C durante el tiempo indicado. **D)** Gráfico del porcentaje (%) del pico principal obtenido de la formulación almacenada a 5 °C durante el tiempo indicado.

La **FIG. 7** es una serie de gráficos que muestran la estabilidad de una formulación de α -PDL1 después de tres ciclos de congelación-descongelación y almacenamiento en un minican de acero inoxidable o Hastelloy. **A)** Gráfico del porcentaje (%) de monómero en la formulación después del almacenamiento a la temperatura indicada durante 3 meses. **B)** Gráfico del porcentaje (%) del pico principal en la formulación después del almacenamiento a la temperatura indicada durante 3 meses.

La **FIG. 8** es una serie de gráficos que muestran la estabilidad de una formulación de α -PDL1 almacenada en un vial

de 20 cc. **A)** Gráfico del porcentaje (%) de monómero en la formulación después del almacenamiento a la temperatura indicada durante 3 meses. **B)** Gráfico del porcentaje (%) del pico principal en la formulación después del almacenamiento a la temperatura indicada durante 3 meses.

5 La **FIG. 9** es una serie de gráficos que muestran la estabilidad de formulaciones de α -PDL1 que contienen diversas concentraciones de PS20 cuando se agitan en viales de vidrio. **A)** Gráfico del porcentaje (%) de monómero en las formulaciones después de la agitación durante el tiempo indicado a temperatura ambiente. **B)** Gráfico de turbidez medida por absorbancia a 350 nm después de la agitación durante el tiempo indicado a temperatura ambiente.

10 La **FIG. 10** es un gráfico que muestra la estabilidad de las formulaciones de α -PDL1 almacenadas en viales de vidrio durante un periodo de tiempo a las temperaturas indicadas y a continuación sometidas a agitación. El porcentaje de cambio de monómero en las formulaciones se midió por SEC.

15 La **FIG. 11** es una serie de gráficos que muestran la comparabilidad de la velocidad de pérdida de α -PDL1 por semana con el incremento del pH. **A)** Gráfico del porcentaje (%) de pérdida de monómero por semana en la formulación después del almacenamiento a 40 °C. **B)** Gráfico del porcentaje (%) de pérdida del pico principal por semana en la formulación después del almacenamiento a 40 °C.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

20

I. Definiciones

25 Antes de describir la invención en detalle, se debe entender que la presente invención no se limita a composiciones o sistemas biológicos particulares, que pueden, por supuesto, variar. Se debe entender también que la terminología usada en el presente documento se utiliza para el propósito de describir únicamente modos de realización particulares y no pretende ser limitante. Como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno/a" y "el/la" incluyen las referencias plurales a menos que el contenido lo indique claramente de otro modo. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "una molécula" incluye opcionalmente una combinación de dos o más de dichas moléculas, y similares.

30

El término "aproximadamente" como se usa en el presente documento se refiere al intervalo de error habitual para el valor respectivo fácilmente conocido por el experto en este campo técnico. La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en el presente documento incluye (y describe) modos de realización que están dirigidos a ese valor o parámetro *per se*.

35

Se entiende que los aspectos y modos de realización de la invención descrita en el presente documento incluyen "que comprende", "que consiste en" y "que consiste esencialmente en" aspectos y modos de realización.

40 El término "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que está en una forma tal que permite que la actividad biológica del ingrediente activo sea eficaz y que no contiene ningún componente adicional que sea inaceptablemente tóxico para un sujeto al que se administraría la formulación. Dichas formulaciones son estériles. Los excipientes (vehículos, aditivos) "farmacéuticamente aceptables" son aquellos que se pueden administrar razonablemente a un sujeto mamífero para proporcionar una dosis eficaz del ingrediente activo empleado.

45 Una formulación "estéril" es aséptica o está libre o esencialmente libre de todos los microorganismos vivos y sus esporas.

50 Una formulación "congelada" es una que está a una temperatura inferior a 0 °C. En general, la formulación congelada no está liofilizada ni se somete a liofilización previa o posterior. En determinados modos de realización, la formulación congelada comprende una sustancia farmacéutica congelada para almacenamiento (en un depósito de acero inoxidable) o un producto farmacéutico congelado (en la configuración final del vial).

55 Una formulación "estable" es una en la que la proteína en la misma retiene esencialmente su estabilidad física y/o estabilidad química y/o estabilidad biológica tras el almacenamiento. Preferentemente, la formulación retiene esencialmente su estabilidad física y química, así como su actividad biológica tras el almacenamiento. El periodo de almacenamiento se selecciona en general en base a la vida útil prevista de la formulación. Diversas técnicas analíticas para medir la estabilidad de las proteínas están disponibles en la técnica y se revisan en *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., Pubs. (1991) y Jones, A. *Adv. Drug Delivery Rev.* 10: 29-90 (1993), por ejemplo. La estabilidad se puede medir a una temperatura seleccionada durante un periodo de tiempo seleccionado. La estabilidad se puede evaluar cualitativa y/o cuantitativamente de una variedad de maneras diferentes, incluida la evaluación de la formación de agregados (por ejemplo, usando la cromatografía de exclusión por tamaño, midiendo la turbidez y/o mediante inspección visual); mediante la evaluación de la heterogeneidad de carga usando cromatografía de intercambio catiónico, isoelectroenfoque capilar por imágenes (icIEF) o electroforesis capilar en zona; análisis de secuencia aminoterminal o carboxiterminal; análisis por espectrometría de masas; análisis SDS-PAGE para comparar anticuerpos reducidos e intactos; análisis por mapa de péptidos (por ejemplo, tríptico o LYS-C); evaluación de la actividad biológica o de la

65

- función de unión a antígeno del anticuerpo; etc. La inestabilidad puede implicar uno o más de: agregación, desamidación (por ejemplo, desamidación de Asn), oxidación (por ejemplo, oxidación de Met), isomerización (por ejemplo, isomerización de Asp), recorte/hidrólisis/fragmentación (por ejemplo, fragmentación de región bisagra), formación de succinimida, cisteína(s) no emparejada(s), extensión N terminal, procesamiento C terminal, diferencias de glucosilación, etc.
- Una proteína "retiene su estabilidad física" en una formulación farmacéutica si no muestra signos o muestra escasos signos de agregación, precipitación y/o desnaturalización después del examen visual del color y/o la claridad, o según lo medido por dispersión de luz UV o por cromatografía de exclusión por tamaño.
- Una proteína "retiene su estabilidad química" en una formulación farmacéutica si la estabilidad química en un momento dado es tal que se considera que la proteína aún retiene su actividad biológica como se define a continuación. La estabilidad química se puede evaluar detectando y cuantificando formas químicamente alteradas de la proteína. La alteración química puede implicar la modificación del tamaño (por ejemplo, recorte) que se puede evaluar usando cromatografía de exclusión por tamaño, SDS-PAGE y/o espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por matriz/tiempo de vuelo (MALDI/TOF MS), por ejemplo. Otros tipos de alteración química incluyen la alteración de carga (por ejemplo, que se produce como resultado de la desamidación), que se puede evaluar mediante cromatografía de intercambio iónico o icIEF, por ejemplo.
- Un anticuerpo "retiene su actividad biológica" en una formulación farmacéutica si la actividad biológica del anticuerpo en un momento dado es al menos aproximadamente un 60 % (dentro de los errores del ensayo) de la actividad biológica exhibida en el momento en que se preparó la formulación farmacéutica preparado como se determina en un ensayo (por ejemplo, un ensayo de unión a antígeno). A continuación en el presente documento se elaboran otros ensayos de "actividad biológica" para anticuerpos.
- Como se usa en el presente documento, la "actividad biológica" de un anticuerpo monoclonal indica la capacidad del anticuerpo para unirse a un antígeno, dando como resultado una respuesta biológica que se puede medir *in vitro* e *in vivo*.
- Un anticuerpo monoclonal "desamidado" en el presente documento es uno en el que uno o más residuos de asparagina del mismo se han derivatizado, por ejemplo, a un ácido aspártico o un ácido isoaspártico.
- Un anticuerpo monoclonal "oxidado" en el presente documento es uno en el que uno o más restos de triptófano y/o una o más metioninas del mismo se han oxidado.
- Un anticuerpo monoclonal "glucosilado" en el presente documento es uno en el que uno o más residuos de lisina del mismo se han glucosilado.
- Un anticuerpo que es "susceptible a la desamidación" es uno que comprende uno o más residuos que se ha encontrado que son propensos a la desamidación.
- Un anticuerpo que es "susceptible a la oxidación" es uno que comprende uno o más residuos que se ha encontrado que son propensos a la oxidación.
- Un anticuerpo que es "susceptible a la agregación" es uno que se ha encontrado que se agrega a otra(s) molécula(s) de anticuerpo, especialmente tras su congelación y/o agitación.
- Un anticuerpo que es "susceptible a la fragmentación" es uno que se ha encontrado que se escinde en dos o más fragmentos, por ejemplo en una región bisagra del mismo.
- La "reducción de la desamidación, oxidación, agregación o fragmentación" pretende prevenir o disminuir la cantidad de desamidación, oxidación, agregación o fragmentación en relación con el anticuerpo monoclonal formulado en una formulación diferente.
- El anticuerpo que se formula es preferente y esencialmente puro y de forma deseable esencialmente homogéneo (es decir, libre de proteínas contaminantes). Anticuerpo "esencialmente puro" significa una composición que comprende al menos aproximadamente un 90 % en peso del anticuerpo, en base al peso total de proteínas en la composición, preferentemente al menos aproximadamente un 95 % en peso. Anticuerpo "esencialmente homogéneo" significa una composición que comprende al menos aproximadamente un 99 % en peso de anticuerpo, en base al peso total de proteínas en la composición.
- Por "isotónico" se entiende que la formulación de interés tiene esencialmente la misma presión osmótica que la sangre humana. Las formulaciones isotónicas tienen en general una presión osmótica de aproximadamente 250 a 350 mOsm. La isotonicidad se puede medir usando un osmómetro de tipo presión de vapor o de congelación de hielo, por ejemplo.

Como se usa en el presente documento, "tampón" se refiere a una solución tamponada que resiste los cambios en el pH por la acción de sus componentes conjugados ácido-base. El tampón de esta divulgación tiene preferentemente un pH en el intervalo de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 7,0, preferentemente de aproximadamente 5,6 a aproximadamente 7,0, por ejemplo de 5,6 a 6,9, de 5,7 a 6,8, de 5,8 a 6,7, de 5,9 a 6,6, de 5,9 a 6,5, de 6,0, de 6,0 a 6,4 o de 6,1 a 6,3. En un modo de realización, el tampón tiene un pH de 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 o 7,0. Por ejemplo, el fosfato de sodio es un ejemplo de tampones que controlarán el pH en este intervalo.

Como se usa en el presente documento, un "tensioactivo" se refiere a un agente activo en la superficie, preferentemente un tensioactivo no iónico. Los ejemplos de tensioactivos en el presente documento incluyen polisorbato (por ejemplo, polisorbato 20 y polisorbato 80); poloxámero (por ejemplo, poloxámero 188); Tritón; dodecilsulfato de sodio (SDS); laurilsulfato de sodio; octil-glucósido de sodio; lauril-, miristil-, linoleil- o estearil-sulfobetaína; lauril-, miristil-, linoleil- o estearil-sarcosina; linoleil-, miristil- o cetil-betaína; lauroamidopropil-, cocamidopropil-, linoleamidopropil-, miristamidopropil-, palmidopropil- o isoestearamidopropil-dimetilamina; metil cocoil-taurato de sodio o metil oleil-taurato de disodio; y la serie MONAQUAT™ (Mona Industries, Inc., Paterson, NJ, EE. UU.); polietilenglicol, polipropilglicol y copolímeros de etilenglicol y propilenglicol (por ejemplo, Pluronic, PF68, etc.); etc. En un modo de realización, el tensioactivo en el presente documento es polisorbato 20.

En un sentido farmacológico, en el contexto de la invención, una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un anticuerpo se refiere a una cantidad eficaz en la prevención o el tratamiento de un trastorno para el tratamiento del cual el anticuerpo es eficaz. Un "trastorno" es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento con el anticuerpo. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas, incluyendo las afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión.

Un "conservante" es un compuesto que se puede incluir opcionalmente en la formulación para reducir esencialmente la acción bacteriana en la misma, facilitando así la producción de una formulación de múltiples usos, por ejemplo. Los ejemplos de conservantes potenciales incluyen cloruro de octadecildimetilbencilamonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio (una mezcla de cloruros de alquilbencildimetilamonio en los que los grupos alquilo son compuestos de cadena larga) y cloruro de bencetonio. Otros tipos de conservantes incluyen alcoholes aromáticos tales como fenol, alcohol butílico y bencílico, alquilparabenos tales como metil o propilparabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol y m-cresol. En un modo de realización, el conservante en el presente documento es alcohol bencílico.

Como se usa en el presente documento, el término "tratamiento" se refiere a la intervención clínica diseñada para alterar la evolución natural del individuo o la célula que se está tratando durante la evolución de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen disminuir la tasa de progresión de la enfermedad, mejorar o paliar el estado de enfermedad, y la remisión o mejora del pronóstico. Por ejemplo, a un individuo se le "trata" con éxito si uno o más síntomas asociados con el cáncer se mitigan o eliminan, lo que incluye, pero no se limita a, reducir la proliferación de (o destruir) las células cancerosas, disminuir los síntomas resultantes de la enfermedad, incrementar la calidad de vida de quienes padecen la enfermedad, disminuir la dosis de otros medicamentos necesarios para tratar la enfermedad, retrasar la progresión de la enfermedad y/o prolongar la supervivencia de los individuos.

Como se usa en el presente documento, "retrasar la progresión de una enfermedad" significa diferir, dificultar, ralentizar, retardar, estabilizar y/o posponer el desarrollo de la enfermedad (tal como el cáncer). Este retraso puede tener duraciones de tiempo variables dependiendo de los antecedentes de la enfermedad y/o del individuo que se trata. Como es evidente para un experto en la técnica, un retraso suficiente o significativo puede, en efecto, englobar la prevención, en tanto que el individuo no desarrolla la enfermedad. Por ejemplo, se puede retrasar un cáncer en estadio tardío, tal como el desarrollo de metástasis.

Una "cantidad eficaz" es al menos la cantidad mínima requerida para conseguir una mejora o prevención medibles de un trastorno particular. Una cantidad eficaz en el presente documento puede variar de acuerdo con factores tales como la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del paciente, y la capacidad del anticuerpo de provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad eficaz también es una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del tratamiento se compensa con los efectos terapéuticamente beneficiosos. Para uso profiláctico, los resultados beneficiosos o deseados incluyen resultados tales como eliminar o reducir el riesgo, disminuir la gravedad o retrasar la aparición de la enfermedad, incluyendo los síntomas bioquímicos, histológicos y/o de comportamiento de la enfermedad, sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad. Para uso terapéutico, los resultados beneficiosos o deseados incluyen resultados clínicos tales como la disminución de uno o más síntomas que resultan de la enfermedad, el incremento de la calidad de vida de los que padecen la enfermedad, la disminución de la dosis de otros medicamentos requeridos para tratar la enfermedad, la potenciación del efecto de otro medicamento, tal como por medio de la selección como diana, el retraso de la progresión de la enfermedad y/o la prolongación de la supervivencia. En el caso de cáncer o tumor, una cantidad eficaz del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, ralentizar en cierta medida o de forma deseable detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar en cierta medida y de forma deseable detener) la metástasis tumoral; inhibir en cierta medida el crecimiento tumoral; y/o aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas asociados con el trastorno. Se

puede administrar una cantidad eficaz en una o más administraciones. Para los propósitos de la presente invención, una cantidad eficaz de fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para conseguir un tratamiento profiláctico o terapéutico directa o indirectamente. Como se entiende en el contexto clínico, una cantidad eficaz de un fármaco, compuesto o composición farmacéutica se puede lograr o no junto con otro fármaco, compuesto o composición farmacéutica. Por tanto, se puede considerar una "cantidad eficaz" en el contexto de la administración de uno o más agentes terapéuticos, y se puede considerar que un único agente se administre en una cantidad eficaz si, junto con uno o más de otros agentes, se puede lograr o se logra un resultado deseable.

Como se usa en el presente documento, "junto con" se refiere a la administración de una modalidad de tratamiento además de otra modalidad de tratamiento. Como tal, "junto con" se refiere a la administración de una modalidad de tratamiento antes, durante o después de la administración de la otra modalidad de tratamiento al individuo.

Un "trastorno" es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento, incluidos, pero sin limitarse a, trastornos o enfermedades crónicas y agudas, incluidas aquellas afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión.

Los términos "trastorno proliferativo celular" y "trastorno proliferativo" se refieren a trastornos que se asocian con algún grado de proliferación celular anómala. En un modo de realización, el trastorno proliferativo celular es cáncer. En un modo de realización, el trastorno proliferativo celular es un tumor.

"Tumor", como se usa en el presente documento, se refiere a todo crecimiento y proliferación de células neoplásicas, ya sea maligno o benigno, y a todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos. Los términos "cáncer", "canceroso", "trastorno proliferativo celular", "trastorno proliferativo" y "tumor" no son mutuamente excluyentes como se hace referencia en el presente documento.

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia o neoplasias malignas linfocíticas. Ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen, pero no se limitan a, cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón incluyendo el carcinoma de pulmón microcítico, carcinoma de pulmón no microcítico, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma pulmonar de células escamosas, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago incluyendo cáncer gastrointestinal y cáncer gastrointestinal del estroma, cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de las vías urinarias, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón o cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma peniano, melanoma, melanoma de extensión superficial, melanoma sobre lentigo maligno, melanomas lentiginosos acros, melanomas nodulares, mieloma múltiple y linfoma de linfocitos B (incluyendo linfoma no Hodgkin (LNH) folicular/de grado bajo; LNH linfocítico pequeño (LP); LNH folicular/de grado intermedio; LNH difuso de grado intermedio; LNH inmunoblástico de grado alto; LNH linfoblástico de grado alto; LNH de células pequeñas no escindidas de grado alto; LNH voluminoso; linfoma de células de manto; linfoma relacionado con el SIDA; y macroglobulinemia de Waldenstrom); leucemia linfocítica crónica (LLC); leucemia linfocítica aguda (LLA); leucemia de células pilosas; leucemia mieloblástica crónica; y trastorno linfoproliferativo postrasplante (TLPT), así como proliferación vascular anómala asociada con facomatosis, edema (tal como el asociado con tumores cerebrales), el síndrome de Meigs, cáncer cerebral, así como cáncer de cabeza y cuello, y metástasis asociadas. En determinados modos de realización, los cánceres susceptibles de tratamiento por los anticuerpos de la invención incluyen cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer rectal, carcinoma de pulmón no microcítico, glioblastoma, linfoma no Hodgkin (LNH), cáncer de células renales, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, sarcoma de tejidos blandos, sarcoma de Kaposi, carcinoma carcinoide, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, mesotelioma y mieloma múltiple. En algunos modos de realización, el cáncer se selecciona de: carcinoma de pulmón microcítico, glioblastoma, neuroblastomas, melanoma, carcinoma de mama, cáncer gástrico, cáncer colorrectal (CCR) y carcinoma hepatocelular. Aún, en algunos modos de realización, el cáncer se selecciona de: carcinoma de pulmón no microcítico, cáncer colorrectal, glioblastoma y carcinoma de mama, incluyendo las formas metastásicas de esos cánceres.

Un "agente quimioterápico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterápicos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN[®]); sulfonatos de alquilo tales como busulfano, improsulfano y piposulfano; aziridinas tales como benzodopa, carbocadona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas, incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilfosforamida y trimetilmelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); delta-9-tetrahidrocanabinol (dronabinol, MARINOL[®]); beta-lapachona; lapachol; colquicinas; ácido betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán) (HYCAMTIN[®]), CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR[®]), acetilcamptotecina, escopolectina y 9-aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (en particular, criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas nitrogenadas tales como

5 clorambucilo, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, uramustina; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos enodinos (por ejemplo, calicheamicina, especialmente calicheamicina gamma 11 y calicheamicina omega 11 (véase, por ejemplo, Nicolaou *et al.*, *Angew. Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)); CDP323, un inhibidor oral de integrina alfa-4; dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; así como el cromóforo neocarzinostatina y cromóforos afines de antibióticos de la cromoproteína enedina), aclacinomicinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinornicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluyendo ADRIAMICINA®, morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina, doxorubicina HCl liposoma inyectable (DOXIL®), doxorubicina liposómica TLC D-99 (MYOCET®), doxorubicina liposómica pegilada (CAELYX®) y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos tales como metotrexato, gemcitabina (GEMZAR®), tegafur (UFTORAL®), capecitabina (XELODA®), una epotilona y 5-fluoruracilo (5-FU); combretastatinam, análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, encitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestano, mepitioestano, testolactona; antiadrenales tales como la aminoglutetimida, mitotano, trilostano; rellenos de ácido fólico tales como ácido frolinico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquna; elformitina; acetato de eliptino; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinan; lonidainina; maitanosinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazona; el complejo de polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofurano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (en especial, toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitósina; arabinósidos ("Ara-C"); tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), formulación de paclitaxel en nanopartículas genomanipuladas con albúmina (ABRAXANE™) y docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); cloranbucilo; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; agentes de platino tales como cisplatino, oxaliplatino (por ejemplo, ELOXATIN®) y carboplatino; vincas, que impiden que la polimerización de tubulina pueda formar microtúbulos, incluyendo vinblastina (VELBAN®), vincristina (ONCOVINA®), vindesina (ELDISIN®, FILDESIN®) y vinorelbina (NAVELBINE®); etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; leucovovina; novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico, incluyendo bexaroteno (TARGRETIN®); bisfosfonatos tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® u OSTAC®), etidronato (DIDROCAL®), NE-58095, ácido zoledrónico/zoledronato (ZOMETA®), alendronato (FOSAMAJX®), pamidronato (ARELIA®), tiludronato (SKELID®) o risedronato (ACTONEL®); troxacitabina (un análogo 1,3-dioxolano-nucleósido de citosina); oligonucleótidos antisentido, en particular los que inhiben la expresión de genes en vías de señalización que intervienen en la proliferación celular anómala tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras y receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); (por ejemplo, erlotinib (Tarceva™)); y VEGF-A que reducen la proliferación celular; vacunas tales como la vacuna THERATOPE™ y vacunas de tratamiento génico, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN® y vacuna VAXID®; inhibidor de la topoisomerasa 1 (por ejemplo, LURTOTECAN®); rmRH (por ejemplo, ABARELIX®); BAY439006 (sorafenib; Bayer); SU-11248 (sunitinib, SUTENT®, Pfizer); perifosina, inhibidor de COX-2 (por ejemplo, celecoxib o etoricoxib), inhibidor del proteosoma (por ejemplo, PS341); bortezomib (VELCADE®); CCI-779; tipifarnib (R11577); orafenib, ABT510; inhibidor de Bcl-2 tal como oblimersén sódico (GENA SENSE®); pixantrona; inhibidores del EGFR; inhibidores de tirosina-cinasa; inhibidores de serina-treonina cinasa tales como rapamicina (sirólimus, RAPAMUNE®); inhibidores de farnesiltransferasa tales como lonafarnib (SCH 6636, SARASAR™); y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores, tales como CHOP, una abreviatura del tratamiento combinado de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona; y FOLFOX, una abreviatura del régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y ácido folínico, y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores.

Los agentes quimioterápicos como se definen en el presente documento incluyen "agentes antihormonales" o "tratamientos endocrinos" que actúan para regular, reducir, bloquear o inhibir los efectos de las hormonas que pueden promover el crecimiento del cáncer. Pueden ser hormonas en sí mismas, incluyendo, pero sin limitarse a: antiestrógenos y moduladores selectivos de receptores de estrógenos (SERM), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno FARESTON; inhibidores de la aromatasas que inhiben la enzima aromatasas, que regula la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol MEGASE®, exemestano AROMASIN®, formestania, fadrozol, vorozol RIVISOR®, letrozol FEMARA® y anastrozol ARIMIDEX®; y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; así como troxacitabina (un análogo de nucleósido citosina de 1,3-dioxolano);

oligonucleótidos antisentido, en particular los que inhiben la expresión de genes en las vías de señalización implicadas en la proliferación celular anómala, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf y H-Ras; ribozimas, tales como un inhibidor de la expresión de VEGF (por ejemplo, ribozima ANGIOZYME®) y un inhibidor de la expresión de HER2; vacunas, tales como vacunas de tratamiento génico, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN® y vacuna VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; inhibidor de la topoisomerasa 1 LURTOTECAN®; rmRH ABARELIX®; vinorelbina y esperamicinas (véase la patente de EE. UU. n.º 4.675.187) y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores.

10 Un "agente inhibidor del crecimiento" cuando se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, ya sea *in vitro* o *in vivo*. En un modo de realización, el agente inhibidor del crecimiento es un anticuerpo inhibidor del crecimiento que previene o reduce la proliferación de una célula que expresa un antígeno al que se une el anticuerpo. En otro modo de realización, el agente inhibidor del crecimiento puede ser uno que reduce significativamente el porcentaje de células en fase S. Los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un lugar distinto de la fase S), tales como agentes que inducen la interrupción de G1 y la interrupción de la fase M. Los bloqueantes de fase M clásicos incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), taxanos e inhibidores de la topoisomerasa II tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido y bleomicina. Los agentes que interrumpen la G1 también actúan sobre la interrupción de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbacina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluoruracilo y Ara-C. Se puede encontrar información adicional en Mendelsohn and Israel, eds. "The Molecular Basis of Cancer", capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs", por Murakami *et al.* (W.B. Saunders, Filadelfia, 1995), por ejemplo, pág. 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos antineoplásicos derivados ambos del árbol del tejo. Docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo, es un análogo semisintético de paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). Paclitaxel y docetaxel promueven el ensamblaje de microtúbulos a partir de dímeros de tubulina y estabilizan los microtúbulos previniendo la despolimerización, lo que da como resultado la inhibición de mitosis en células.

30 Por "radioterapia" se quiere decir el uso de rayos beta o rayos gamma dirigidos para inducir suficiente daño a una célula como para limitar su capacidad de funcionar normalmente o para destruir la célula por completo. Se apreciará que existen muchas formas conocidas en la técnica para determinar la dosificación y duración del tratamiento. Los tratamientos típicos se dan como una administración en una sola dosis y las dosificaciones típicas varían de 10 a 200 unidades (Gy) por día.

35 Un "sujeto" o un "individuo" para propósitos de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja y animales de zoológico, para la práctica de deportes o mascotas, tales como perros, caballos, gatos, ganado bovino, etc. Preferentemente, el mamífero es un ser humano.

40 El término "anticuerpo" en el presente documento se usa en el sentido más amplio y abarca específicamente anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multispecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo, siempre que presenten la actividad biológica deseada.

45 Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían en usos de investigación, diagnóstico o terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En algunos modos de realización, un anticuerpo se purifica (1) hasta más de un 95 % en peso de anticuerpo como se determina mediante, por ejemplo, el procedimiento de Lowry, y en algunos modos de realización hasta más de un 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos N terminal o interna mediante el uso de, por ejemplo, un secuenciador de vaso giratorio o (3) hasta homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando, por ejemplo, tinción con azul de Coomassie o plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes, puesto que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Normalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

60 Los "anticuerpos naturales" son normalmente glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 dalton, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera se une a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro covalente, aunque el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de isotipos de inmunoglobulina diferentes. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracatenarios espaciados regularmente. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido de una serie de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera se alinea con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que residuos de aminoácidos particulares forman una interfase entre los dominios variables de cadena ligera y de cadena pesada.

El término "dominio constante" se refiere a la porción de una molécula de inmunoglobulina que tiene una secuencia de aminoácidos más conservada en relación con la otra porción de la inmunoglobulina, el dominio variable, que contiene el sitio de unión a antígeno. El dominio constante contiene los dominios C_{H1}, C_{H2} y C_{H3} (colectivamente, CH) de la cadena pesada y el dominio CHL (o CL) de la cadena ligera.

La "región variable" o "dominio variable" de un anticuerpo se refiere a los dominios aminoterminales de la cadena pesada o ligera del anticuerpo. El dominio variable de la cadena pesada se puede denominar "V_H". El dominio variable de la cadena ligera se puede denominar "V_L". Estos dominios son, en general, las partes más variables de un anticuerpo y contienen los sitios de unión a antígeno.

El término "variable" se refiere al hecho de que determinadas porciones de los dominios variables difieren extensamente en las secuencias entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente por los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos denominados regiones hipervariables (HVR), en los dominios variables tanto de cadena ligera como de cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se denominan regiones estructurales (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera naturales comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina β, que se conectan mediante tres HVR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β. Las HVR en cada cadena se mantienen unidas en estrecha proximidad mediante las regiones FR y, con las HVR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpos.

Las "cadenas ligeras" de los anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de mamífero se pueden asignar a uno de dos tipos claramente distintos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), basados en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

El término "isotipo" o "subclase" de IgG, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquiera de las subclases de inmunoglobulinas definidas por las características químicas y antigénicas de sus regiones constantes.

Dependiendo de las secuencias de aminoácidos de los dominios constantes de sus cadenas pesadas, los anticuerpos (inmunoglobulinas) se pueden asignar a clases diferentes. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Los dominios constantes de la cadena pesada que se corresponden con las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman α, γ, ε, γ y μ, respectivamente. Las estructuras de subunidades y configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas y se describen en general en, por ejemplo, Abbas *et al.*, *Cellular and Mol. Immunology*, 4.^a ed. (W.B. Saunders, Co., 2000). Un anticuerpo puede ser parte de una molécula de fusión más grande, formada por asociación covalente o no covalente del anticuerpo con una o más de otras proteínas o péptidos.

Los términos "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se usan en el presente documento de manera intercambiable para referirse a un anticuerpo en su forma sustancialmente intacta, no a fragmentos de anticuerpo como se define a continuación. Los términos se refieren en particular a un anticuerpo con cadenas pesadas que contienen una región Fc.

Un "anticuerpo no marcado" para los fines del presente documento es un anticuerpo que no está conjugado con un resto citotóxico o radiomarcador.

Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, que comprende preferentemente la región de unión a antígeno del mismo. En algunos modos de realización, el fragmento de anticuerpo descrito en el presente documento es un fragmento de unión a antígeno. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena simple; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión a antígeno, y un fragmento "Fc" residual, con un nombre que refleja su capacidad de cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación con antígeno y todavía se puede reticular con el antígeno.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de unión a antígeno completo. En un modo de realización, una especie de Fv bicatenario consiste en un dímero de un dominio variable de la cadena pesada y uno de la ligera en asociación estrecha no covalente. En una especie de Fv monocatenario (scFv), un dominio variable de la cadena pesada y uno de la ligera se pueden enlazar covalentemente por un conector peptídico flexible de

modo que las cadenas ligera y pesada se puedan asociar en una estructura "dimérica" análoga a la de una especie de Fv bicatenario. Es en esta configuración en la que las tres HVR de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Conjuntamente, las seis HVR confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres HVR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión completo.

El fragmento Fab contiene los dominios variables de cadena pesada y ligera, y contiene también el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxílico del dominio CH1 de la cadena pesada, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para un Fab' en el que el/los residuo(s) de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También son conocidos otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

Los fragmentos de anticuerpo "Fv monocatenarios" o "scFv" comprenden los dominios VH y VL del anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una cadena de polipéptido única. En general, el polipéptido scFv comprende además un conector polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de los scFv, véase, por ejemplo, Pluckthün, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, Nueva York, 1994), páginas 269-315.

El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, fragmentos que comprenden un dominio variable de la cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Al usar un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se fuerzan a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos pueden ser bivalentes o biespecíficos. Los diacuerpos se describen más en detallan, por ejemplo, en el documento EP 404.097; el documento WO 1993/01161; Hudson *et al.*, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); y Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993). También se describen triacuerpos y tetracuerpos en Hudson *et al.*, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003).

El término "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones, por ejemplo, mutaciones naturales, que pueden estar presentes en cantidades menores. Por tanto, el modificador "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo no es una mezcla de distintos anticuerpos. En determinados modos de realización, dicho anticuerpo monoclonal incluye típicamente un anticuerpo que comprende una secuencia polipeptídica que se une a una diana, en el que la secuencia polipeptídica de unión a la diana se obtuvo mediante un procedimiento que incluye la selección de una única secuencia polipeptídica de unión a la diana entre una pluralidad de secuencias polipeptídicas. Por ejemplo, el procedimiento de selección puede ser la selección de un clon único de una pluralidad de clones, tales como un grupo de clones de hibridoma, clones de fagos o clones de ADN recombinante. Se debe entender que una secuencia de unión a la diana seleccionada se puede alterar además, por ejemplo, para mejorar la afinidad por la diana, para humanizar la secuencia de unión a la diana, para mejorar su producción en un cultivo celular, para reducir su inmunogenicidad *in vivo*, para crear un anticuerpo multiespecífico, etc., y que un anticuerpo que comprende la secuencia de unión a la diana alterada es también un anticuerpo monoclonal de la presente divulgación. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen anticuerpos diferentes dirigidos frente a diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige frente a un único determinante en un antígeno. Además de por su especificidad, las preparaciones de anticuerpos monoclonales son ventajosas al no estar típicamente contaminadas por otras inmunoglobulinas.

El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se ha de interpretar como que requiere la producción del anticuerpo por cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con la invención se pueden producir mediante una variedad de técnicas, que incluyen, por ejemplo, el procedimiento del hibridoma (por ejemplo, Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495-97 (1975); Hongo *et al.*, *Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2.^a ed. 1988); Hammerling *et al.*, en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, patente de EE. UU. n.º 4.816.567), tecnologías de presentación de fagos (véase, por ejemplo, Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Sidhu *et al.*, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); y Lee *et al.*, *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132 (2004), y tecnologías para producir anticuerpos humanos o similares en animales que tienen parte o la totalidad de los loci de inmunoglobulina humana o genes que codifican secuencias de inmunoglobulina humana (véanse, por ejemplo, los

documentos WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, *Year in Immunol.* 7:33 (1993); las patentes de EE. UU. n.º 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425 y 5.661.016; Marks *et al.*, *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-813 (1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnol.* 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996); y Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995).

Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.816.567; y Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos incluyen anticuerpos PRIMATIZED® en los que la región de unión a antígeno del anticuerpo deriva de un anticuerpo producido, por ejemplo, por la inmunización de monos macacos con el antígeno de interés.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En un modo de realización, un anticuerpo humanizado es una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor) en la que los residuos de una HVR del receptor se reemplazan por residuos de una HVR de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano, que tiene la especificidad, afinidad y/o capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos estructurales ("FR") de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donador. Estas modificaciones se pueden elaborar para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase, por ejemplo, Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). Véase también, por ejemplo, Vaswani y Hamilton, *Ann. Alergia, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurler y Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994); y las patentes de EE. UU. n.º 6.982.321 y 7.087.409.

Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o se ha preparado usando cualquiera de las técnicas para preparar anticuerpos humanos como se divulga en el presente documento. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente a un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos. Los anticuerpos humanos se pueden producir usando diversas técnicas conocidas en la técnica, incluyendo colecciones de presentación en fagos. Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991). También están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos los procedimientos descritos en Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, pág. 77 (1985); Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991). Véase también van Dijk y van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001). Los anticuerpos humanos se pueden preparar administrando el antígeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir dichos anticuerpos en respuesta a la exposición antigénica, pero cuyos loci endógenos se han desactivado, por ejemplo, xenorratones inmunizados (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 6.075.181 y 6.150.584 con respecto a la tecnología XENOMOUSE™). Véase también, por ejemplo, Li *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006) con respecto a anticuerpos humanos generados a través de una tecnología de hibridoma de linfocitos B humanos.

Un "anticuerpo dependiente de la especie" es uno que tiene una afinidad de unión más fuerte por un antígeno de una primera especie de mamífero que por un homólogo de ese antígeno de una segunda especie de mamífero. Normalmente, el anticuerpo dependiente de la especie se "une específicamente" a un antígeno humano (por ejemplo, tiene un valor de afinidad de unión (Kd) de no más de aproximadamente 1×10^{-7} M, preferentemente de no más de aproximadamente 1×10^{-8} M y preferentemente no más de aproximadamente 1×10^{-9} M) pero tiene una afinidad de unión por un homólogo del antígeno de una segunda especie de mamífero no humano que es al menos aproximadamente 50 veces, o al menos aproximadamente 500 veces, o al menos aproximadamente 1000 veces, más débil que su afinidad de unión por el antígeno humano. El anticuerpo dependiente de la especie puede ser cualquiera de los diversos tipos de anticuerpos como se define anteriormente, pero es preferentemente un anticuerpo humanizado o humano.

La expresión "región hipervariable", "HVR" o "HV", cuando se usa en el presente documento, se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son de secuencia hipervariable y/o forman bucles estructuralmente definidos. En general, los anticuerpos comprenden seis HVR; tres en el VH (H1, H2, H3) y tres en el VL (L1, L2, L3). En anticuerpos naturales, H3 y L3 presentan la mayor diversidad de las seis HVR, y se cree que

H3 en particular desempeña un papel exclusivo al conferir una especificidad precisa a los anticuerpos. Véanse, por ejemplo, Xu *et al.*, *Immunity* 13:37-45 (2000); Johnson y Wu, en *Methods in Molecular Biology* 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, N.J., 2003). De hecho, los anticuerpos de camélido naturales que consisten en una cadena pesada solo son funcionales y estables en ausencia de cadena ligera. Véanse, por ejemplo, Hamers-Casterman *et al.*, *Nature* 363:446-448 (1993); Sheriff *et al.*, *Nature Struct. Biol.* 3:733-736 (1996).

Varias delineaciones de HVR están en uso y se engloban en el presente documento. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de Kabat se basan en la variabilidad de secuencia y son las más comúnmente usadas (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Chothia se refiere en cambio a la localización de los bucles estructurales (Chothia y Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Las HVR de AcM representan un término medio entre las HVR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y se usan en el programa informático de modelado de anticuerpos AcM de Oxford Molecular. Las HVR de "contacto" se basan en un análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles. Los residuos de cada una de estas HVR se indican a continuación.

Bucle	Kabat	AcM	Chothia	Contacto
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B (numeración de Kabat)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (numeración de Chothia)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

Las HVR pueden comprender "HVR extendidas" como sigue: 24-36 o 24-34 (L1), 46-56 o 50-56 (L2) y 89-97 o 89-96 (L3) en el VL y 26-35 (H1), 50-65 o 49-65 (H2) y 93-102, 94-102 o 95-102 (H3) en el VH. Los residuos del dominio variable se enumeran de acuerdo con Kabat *et al.*, *supra*, para cada una de estas definiciones.

Los residuos "estructurales" o "FR" son aquellos residuos del dominio variable diferentes de los residuos de HVR, como se definen en el presente documento.

El término "numeración de residuos de dominio variable según Kabat" o "numeración de posición de aminoácidos según Kabat", y las variaciones del mismo, se refieren al sistema de numeración usado para dominios variables de cadena pesada o dominios variables de cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat *et al.*, *supra*. Usando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales correspondientes a un acortamiento de o inserción en una FR o HVR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir un único inserto de aminoácido (residuo 52a de acuerdo con Kabat) después del residuo 52 de H2 y residuos insertados (por ejemplo, residuos 82a, 82b y 82c, etc. de acuerdo con Kabat) después del residuo 82 de FR de cadena pesada. La numeración de residuos de Kabat se puede determinar para un anticuerpo dado por alineación en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada según Kabat "estándar".

El sistema de numeración de Kabat se usa, en general, cuando se hace referencia a un residuo en el dominio variable (aproximadamente los residuos 1-107 de la cadena ligera y los residuos 1-113 de la cadena pesada) (por ejemplo, Kabat *et al.*, *Sequences of Immunological Interest*, 5.^a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). El "sistema de numeración EU" o "índice EU" se usa, en general, cuando se hace referencia a un residuo en una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo, el índice EU del que se informa en Kabat *et al.*, *supra*). El "índice EU según Kabat" se refiere a la numeración de residuos del anticuerpo humano IgG1 EU.

La expresión "anticuerpos lineales" se refiere a los anticuerpos descritos en Zapata *et al.*, 1995 *Protein Eng.* 8(10):1057-1062). En resumen, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos Fd en tándem (VH-CH1-VH-CH1) que, junto con polipéptidos de la cadena ligera complementarios, forman un par de regiones de unión a antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

Como se usa en el presente documento, el término "se une específicamente a" o "es específico para" se refiere a interacciones medibles y reproducibles, tal como la unión entre una diana y un anticuerpo, que es determinante de la presencia de la diana en presencia de una población heterogénea de moléculas, incluyendo moléculas biológicas. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a una diana (que puede ser un epítipo) es un anticuerpo que se une a esta diana con mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o durante mayor duración que con la que se une a otras dianas. En un modo de realización, el grado de unión de un anticuerpo a una diana no relacionada es inferior a aproximadamente un 10 % de la unión del anticuerpo a la diana medida, por ejemplo, mediante un radioinmunoanálisis (RIA). En determinados modos de realización, un anticuerpo que se une específicamente a una diana tiene una constante de disociación (Kd) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$ o $\leq 0,1 \text{ nM}$. En determinados

modos de realización, un anticuerpo se une específicamente a un epítipo en una proteína que se conserva entre la proteína de diferentes especies. En otro modo de realización, la unión específica puede incluir, pero no requiere, una unión exclusiva.

5 II. Formulaciones y preparación de anticuerpos

La presente invención se refiere a formulaciones acuosas estables que comprenden un anticuerpo anti-PDL1. En algunos modos de realización, un anticuerpo anti-PDL1 descrito en el presente documento en la formulación está en una cantidad de 40 mg/ml a 125 mg/ml. En algunos modos de realización, el tampón es acetato de histidina o acetato de sodio. En algunos modos de realización, el tampón en la formulación está en una concentración de 15 mM a 25 mM. En algunos modos de realización, la sacarosa en la formulación está en de 60 mM a 240 mM. En algunos modos de realización, el tensioactivo en la formulación es polisorbato (por ejemplo, polisorbato 20). En algunos modos de realización, el polisorbato en la formulación está en una concentración del 0,005 % (p/v) al 0,06 % (p/v). En algunos modos de realización, la formulación tiene un pH de 5,0 a 6,3. En algunos modos de realización, en el presente documento se proporciona una formulación farmacéutica acuosa estable, la formulación comprendiendo dicho anticuerpo monoclonal anti-PDL1 en una concentración de 40 mg/ml a 125 mg/ml, acetato de histidina o acetato de sodio en una concentración de 15 mM a 25 mM, sacarosa en una concentración de 60 mM a 240 mM, polisorbato en una concentración del 0,005 % (p/v) al 0,06 % (p/v), y pH de 5,0 a 6,3. En algunos modos de realización, la formulación comprende dicho anticuerpo monoclonal anti-PDL1 en una cantidad de 125 mg/ml, sacarosa en una concentración de 240 mM y pH de 5,5. En algunos modos de realización, la formulación comprende dicho anticuerpo monoclonal anti-PDL1 en una cantidad de 60 mg/ml, sacarosa en una concentración de 120 mM y pH de 5,8.

En algunos modos de realización, el anticuerpo en la formulación es estable a -20 °C durante al menos aproximadamente 6 meses, al menos aproximadamente 12 meses, al menos aproximadamente 18 meses, al menos dos años, al menos tres años o al menos cuatro años. En algunos modos de realización, el anticuerpo en la formulación es estable a 2-8 °C durante al menos aproximadamente 6 meses, al menos aproximadamente 12 meses, al menos aproximadamente 18 meses, al menos dos años o al menos tres años. En algunos modos de realización, después del almacenamiento, el anticuerpo retiene al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 65 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 % o al menos aproximadamente un 95 % de la actividad biológica (por ejemplo, unión a la diana o potencia terapéutica) que presentaba antes del almacenamiento, es decir, en el momento en que se preparó la formulación farmacéutica.

En determinados modos de realización, la formulación es estable a aproximadamente 40 °C durante al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21, 28 o más días. En determinados modos de realización, la formulación es estable a aproximadamente 40 °C durante al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más semanas. En determinados modos de realización, la formulación es estable a aproximadamente 25 °C durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o más meses. En determinados modos de realización, la formulación es estable a aproximadamente 5 °C durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o más meses. En determinados modos de realización, la formulación es estable a aproximadamente -20 °C durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 o más meses. En determinados modos de realización, la formulación es estable a 5 °C o -20 °C durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 o más meses. Además, la formulación es estable preferentemente después de congelar (por ejemplo, a -20 °C, -40 °C o -70 °C) y descongelar la formulación, por ejemplo después de 1, 2, 3, 4 o 5 ciclos de congelación y descongelación.

50 A. Anticuerpos (tales como los anticuerpos anti-PDL1)

En algunos modos de realización, el anticuerpo en la formulación es un anticuerpo anti-PDL1. PD-L1 (ligando 1 de muerte celular programada 1), también conocido como PDL1, B7-H1, B7-4, CD274 y B7-H, es una proteína transmembrana, y su interacción con PD-1 inhibe la activación de linfocitos T y la producción de citocinas. En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-PDL1 descrito en el presente documento se une a PD-L1 humano. Los ejemplos de anticuerpos anti-PDL1 que se pueden formular usando las formulaciones descritas en el presente documento se describen en la solicitud de patente PCT WO 2010/077634 A1 y el documento US 8.217.149.

En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-PDL1 puede inhibir la unión entre PD-L1 y PD-1 y/o entre PD-L1 y B7-1. En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-PDL1 es un anticuerpo monoclonal. En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-PDL1 es un anticuerpo humanizado.

En otro modo de realización más se proporciona un anticuerpo anti-PDL1 aislado que comprende una secuencia de cadena pesada y una de cadena ligera, en el que:

65 (a) la secuencia de la cadena pesada tiene:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGG
 STYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQG
 TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
 HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
 CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
 EVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
 AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
 PVLDSDDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID
 NO:10), o

5

(b) las secuencias de la cadena ligera tienen:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG
 VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKRTVAAPSV
 FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST
 YLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:9).

10

En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-PDL1 aislado es un anticuerpo monoclonal oxidado. En algunos modos de realización, el anticuerpo monoclonal oxidado en la formulación comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10. En algunos modos de realización, el anticuerpo monoclonal oxidado en la formulación comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10, en la que uno o más de W33, W50 o W101 están oxidados. En algunos modos de realización, el anticuerpo monoclonal oxidado en la formulación comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10, en la que uno o más de M253 y M429 están oxidados. En algunos modos de realización, el anticuerpo monoclonal oxidado retiene al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 65 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 % o al menos aproximadamente un 95 % de la actividad biológica (por ejemplo, unión a la diana o potencia terapéutica) que presentaba antes del almacenamiento, es decir, en el momento en que se preparó la formulación farmacéutica.

15

20

25

En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-PDL1 aislado es un anticuerpo monoclonal glucosilado. En algunos modos de realización, el anticuerpo monoclonal glucosilado en la formulación comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10. En algunos modos de realización, el anticuerpo monoclonal glucosilado en la formulación comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10, en la que una o más lisinas están glucosiladas. En algunos modos de realización, el anticuerpo monoclonal glucosilado en la formulación comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10, en la que K65 está glucosilada.

30

35

En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-PDL1 aislado no está glucosilado.

40

En cualquiera de los modos de realización en el presente documento, el anticuerpo anti-PDL1 aislado se puede unir a un PD-L1 humano, por ejemplo, un PD-L1 humano como se muestra en UniProtKB/Swiss-Prot, n.º de acceso Q9NZQ7,1, o una variante del mismo.

45

En otro modo de realización más, se divulga un ácido nucleico aislado que codifica cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento. En algunos modos de realización de la divulgación, el ácido nucleico comprende además un vector adecuado para la expresión del ácido nucleico que codifica cualquiera de los anticuerpos anti-PDL1 descritos previamente. En otro aspecto específico más de la divulgación, el vector está en una célula huésped adecuada para la expresión del ácido nucleico. En otro aspecto específico más de la divulgación, la célula huésped es una célula eucariota o una célula procariota. En otro aspecto específico más de la divulgación, la célula eucariota es una célula de mamífero, tal como de ovario de hámster chino (CHO).

El anticuerpo se puede preparar usando procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, por un procedimiento que comprende cultivar una célula huésped que contiene ácido nucleico que codifica cualquiera de los anticuerpos anti-PDL1 o fragmento de unión a antígeno descritos previamente en una forma adecuada para la expresión, en condiciones adecuadas para producir dicho anticuerpo o fragmento, y recuperar el anticuerpo o fragmento.

B. Preparación de anticuerpos

El anticuerpo en la formulación se prepara usando técnicas disponibles en la técnica para generar anticuerpos, cuyos procedimientos ejemplares se describen con más detalle en las siguientes secciones.

El anticuerpo se dirige contra un antígeno de interés (es decir, PD-L1, tal como PD-L1 humano). Preferentemente, el antígeno es un polipéptido biológicamente importante y la administración del anticuerpo a un mamífero que padece un trastorno puede dar como resultado un beneficio terapéutico en dicho mamífero.

(i) Preparación de antígenos

Se pueden usar antígenos o fragmentos de los mismos solubles, opcionalmente conjugados con otras moléculas, como inmunógenos para generar anticuerpos. Para moléculas transmembranarias, tales como receptores, se pueden usar fragmentos de estos (por ejemplo, el dominio extracelular de un receptor) como inmunógeno. De forma alternativa, se pueden usar células que expresan la molécula transmembranaria como inmunógeno. Dichas células se pueden derivar de una fuente natural (por ejemplo, líneas de células cancerosas) o pueden ser células que se han transformado por técnicas recombinantes para expresar la molécula transmembranaria. Otros antígenos y formas de los mismos útiles para preparar anticuerpos serán evidentes para los expertos en la técnica.

(ii) Determinados procedimientos basados en anticuerpos

Los anticuerpos policlonales se generan preferentemente en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (s.c.) o intraperitoneales (i.p.) del antígeno pertinente y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno pertinente con una proteína que sea inmunógena en la especie que se va a inmunizar, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, seroalbúmina, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja, usando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster maleimidobenzoil sulfosuccinimida (conjugación a través de residuos de cisteína), *N*-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, donde R y R^1 son grupos alquilo diferentes.

Los animales se inmunizan contra el antígeno, conjugados inmunógenos o derivados combinando, por ejemplo, 100 μg o 5 μg de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la solución por vía intradérmica en múltiples sitios. Un mes más tarde, se administra a los animales una dosis de refuerzo con 1/5 a 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. De 7 a 14 días más tarde, se extrae sangre de los animales y el suero se somete a ensayo para determinar el valor de anticuerpos. Se administra una dosis de refuerzo a los animales hasta alcanzar una meseta del valor. Preferentemente, se administra una dosis de refuerzo al animal con el conjugado del mismo antígeno, pero conjugado con una proteína diferente y/o a través de un reactivo de reticulación diferente. También se pueden preparar conjugados en cultivo celular recombinante como fusiones de proteínas. Además, los agentes de agregación, como el alumbre, se usan adecuadamente para potenciar la respuesta inmunitaria.

Los anticuerpos monoclonales de la invención se pueden preparar usando el procedimiento de hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975), y descrito adicionalmente, por ejemplo, en Hongo *et al.*, *Hybridoma*, 14 (3): 253- 260 (1995), Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2.^a ed. 1988); Hammerling *et al.*, en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981), y Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006) con respecto a hibridomas humanos-humanos. Los procedimientos adicionales incluyen los descritos, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 7.189.826 con respecto a la producción de anticuerpos monoclonales humanos IgM naturales a partir de líneas celulares de hibridoma. La tecnología de hibridomas humanos (tecnología de triomas) se describe en Vollmers y Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) y en Vollmers y Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005).

Para diversas otras técnicas de hibridoma, véanse, por ejemplo, los documentos US 2006/258841; US 2006/183887 (anticuerpos completamente humanos), US 2006/059575; US 2005/287149; US 2005/100546; US 2005/026229; y las patentes de EE. UU. n.º 7.078.492 y 7.153.507. Un protocolo ejemplar para producir anticuerpos monoclonales usando el procedimiento de hibridoma se describe como sigue. En un modo de realización, un ratón u otro animal huésped apropiado, tal como un hámster, se inmuniza para producir linfocitos que producen o pueden producir anticuerpos que se unen específicamente a la proteína usada para la inmunización. Los anticuerpos se generan en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (s.c.) o intraperitoneales (i.p.) de un polipéptido de la invención o un fragmento del mismo, y un adyuvante, tal como el monofosforil lípido A (MPL)/dicirnomicolato de trehalosa (TDM) (Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, Mont.). Se puede preparar un polipéptido de la

invención (por ejemplo, antígeno) o un fragmento del mismo usando procedimientos bien conocidos en la técnica, tales como procedimientos recombinantes, algunos de los cuales se describen adicionalmente en el presente documento. El suero de los animales inmunizados se analiza para determinar la presencia de anticuerpos anti-antígeno, y se administran inmunizaciones de refuerzo opcionalmente. Se aíslan los linfocitos de animales que producen anticuerpos anti-antígeno. De forma alternativa, se pueden inmunizar linfocitos *in vitro*.

Los linfocitos se fusionan a continuación con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma. Ver, por ejemplo, Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, págs. 59-103 (Academic Press, 1986). Las células de mieloma que se pueden usar son las que se fusionan eficazmente, soportan una producción estable de alto nivel de anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio, tal como el medio HAT. Las células de mieloma ejemplares incluyen, pero no se limitan a, líneas de mieloma murino, tales como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles de Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, EE. UU., y células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles de la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, EE. UU. También se han descrito líneas celulares de heteromieloma ratón-humano y mieloma humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

Las células de hibridoma preparadas de este modo se siembran y cultivan en un medio de cultivo adecuado, por ejemplo, un medio que contenga una o más sustancias que inhiban el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma originales no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma originales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá típicamente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), evitando dichas sustancias el crecimiento de células carentes de HGPRT. Preferentemente, los procedimientos de cultivo de células de hibridoma sin suero se usan para reducir el uso de suero derivado de animales, tal como suero fetal bovino, como se describe, por ejemplo, en Even *et al.*, *Trends in Biotechnology*, 24(3), 105-108 (2006).

Los oligopéptidos como herramientas para mejorar la productividad de los cultivos de células de hibridoma se describen en Franek, *Trends in Monoclonal Antibody Research*, 111-122 (2005). Específicamente, los medios de cultivo estándar se enriquecen con determinados aminoácidos (alanina, serina, asparagina, prolina) o con fracciones de hidrolizado de proteínas, y la apoptosis se puede suprimir significativamente por oligopéptidos sintéticos, constituidos por tres a seis residuos de aminoácidos. Los péptidos están presentes en concentraciones milimolares o mayores.

El medio de cultivo en el que crecen las células de hibridoma se puede analizar para determinar la producción de anticuerpos monoclonales que se unen a un anticuerpo de la invención. La especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se puede determinar mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA). La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se puede determinar, por ejemplo, mediante análisis de Scatchard. Véase, por ejemplo, Munson *et al.*, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

Después de que se identifiquen células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitante y cultivar mediante procedimientos estándar. Véase, por ejemplo, Goding, *supra*. Los medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Adicionalmente, las células de hibridoma se pueden cultivar *in vivo* como tumores ascíticos en un animal. Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, líquido ascítico o suero mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales, tales como, por ejemplo, proteína A-sefariosa, cromatografía con hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad. Un procedimiento para el aislamiento de proteínas de células de hibridoma se describe en el documento US 2005/176122 y la patente de EE. UU. n.º 6.919.436. El procedimiento incluye el uso de sales mínimas, tales como sales liotrópicas, en el procedimiento de unión y preferentemente también el uso de pequeñas cantidades de disolventes orgánicos en el procedimiento de elución.

(iii) Determinados procedimientos de cribado de colecciones

Los anticuerpos de la invención se pueden preparar mediante el uso de colecciones combinatorias para cribar para determinar anticuerpos con la actividad o actividades deseadas. Por ejemplo, una variedad de procedimientos son conocidos en la técnica para generar colecciones de presentación en fagos y cribar dichas colecciones para determinar los anticuerpos que poseen las características de unión deseadas. Dichos procedimientos se describen en general en Hoogenboom *et al.* en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, N.J., 2001). Por ejemplo, un procedimiento para generar anticuerpos de interés es mediante el uso de una colección de anticuerpos en fagos como se describe en Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* (2004), 340 (5):1073-93.

En principio, los clones de anticuerpos sintéticos se seleccionan cribando colecciones de fagos que contienen fagos que muestran diversos fragmentos de la región variable del anticuerpo (Fv) fusionada a la proteína de la cubierta del fago. Dichas colecciones de fagos se analizan mediante cromatografía de afinidad contra el antígeno deseado. Los

clones que expresan fragmentos Fv capaces de unirse al antígeno deseado se adsorben en el antígeno y, por tanto, se separan de los clones de la colección que no se unen. Los clones de unión se eluyen a continuación del antígeno, y se pueden enriquecer adicionalmente mediante ciclos adicionales de adsorción/elución de antígeno. Cualquiera de los anticuerpos de la invención se puede obtener diseñando un procedimiento de cribado de antígenos adecuado para seleccionar el clon de fago de interés seguido de la construcción de un clon de anticuerpo de longitud completa usando las secuencias de Fv del clon de fago de interés y secuencias de la región constante (Fc) adecuadas descritas en Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3.

En determinados modos de realización, el dominio de unión a antígeno de un anticuerpo se forma a partir de dos regiones variables (V) de aproximadamente 110 aminoácidos, cada una de las cadenas ligera (VL) y pesada (VH), presentando ambas tres bucles hipervariables (HVR) o regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Los dominios variables se pueden presentar funcionalmente en fago, como fragmentos Fv monocatenarios (scFv) en los que VH y VL están enlazados covalentemente a través de un péptido corto y flexible, o bien como fragmentos Fab en los que están fusionados cada uno a un dominio constante e interaccionan no covalentemente, como se describe en Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Como se usa en el presente documento, los clones de fago que codifican scFv y los clones de fago que codifican Fab se denominan colectivamente "clones de fago Fv" o "clones Fv".

Los repertorios de genes de VH y VL se pueden clonar por separado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y recombinarse aleatoriamente en colecciones de fagos, que, a continuación, se pueden examinar para determinar clones de unión a antígeno como se describe en Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Las colecciones de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad por el inmunógeno sin el requisito de construir hibridomas. De forma alternativa, se puede clonar el repertorio sin exposición previa para proporcionar una única fuente de anticuerpos humanos para una amplia gama de antígenos propios y también no propios sin ninguna inmunización como se describe por Griffiths *et al.*, *EMBO J*, 12: 725-734 (1993). Finalmente, también se pueden preparar sintéticamente colecciones sin exposición previa clonando los segmentos génicos V no reordenados a partir de células madre y usando cebadores de PCR que contienen secuencias aleatorias para codificar las regiones CDR3 altamente variables y para conseguir el reordenamiento *in vitro*, como se describe por Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992).

En determinados modos de realización, el fago filamentoso se usa para presentar fragmentos de anticuerpos por fusión a la proteína de recubrimiento menor pIII. Los fragmentos de anticuerpos se pueden presentar como fragmentos Fv monocatenarios, en los que los dominios VH y VL están conectados en la misma cadena polipeptídica por un espaciador polipeptídico flexible, por ejemplo, como se describe en Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), o como fragmentos Fab, en los que una cadena se fusiona con pIII y la otra se secreta en el periplasma de la célula huésped bacteriana, donde el ensamblaje de una estructura de Fab-proteína de recubrimiento se presenta en la superficie del fago desplazando algunas de las proteínas de cubierta naturales, por ejemplo, como se describe en Hoogenboom *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 19: 4133-4137 (1991).

En general, los ácidos nucleicos que codifican fragmentos de genes de anticuerpos se obtienen de células inmunitarias recolectadas de humanos o animales. Si se desea una colección sesgada en favor de clones anti-antígeno, se inmuniza al sujeto con antígeno para generar una respuesta de anticuerpos, y se recuperan las células del bazo y/o linfocitos B en circulación u otros linfocitos de sangre periférica (LSP) para la construcción de colecciones. En un modo de realización se obtiene una colección de fragmentos de genes de anticuerpos humanos sesgada en favor de los clones anti-antígeno generando una respuesta de anticuerpos anti-antígeno en ratones transgénicos que portan una micromatriz genética de inmunoglobulina humana funcional (y que carecen de un sistema de producción de anticuerpos endógenos funcionales), de modo que la inmunización con antígeno dé lugar a linfocitos B que producen anticuerpos humanos frente al antígeno. La generación de ratones transgénicos que producen anticuerpos humanos se describe a continuación.

Se puede obtener un enriquecimiento adicional en cuanto a las poblaciones celulares reactivas anti-antígeno usando un procedimiento de cribado adecuado para aislar linfocitos B que expresan un anticuerpo unido a membrana específico de antígeno, por ejemplo, mediante separación celular usando cromatografía de afinidad por antígeno o adsorción de células sobre antígeno marcado con fluorocromo seguida de separación celular activada por flujo (FACS).

De forma alternativa, el uso de células del bazo y/o linfocitos B u otros LSP de un donante no inmunizado proporciona una mejor representación del posible repertorio de anticuerpos, y también permite la construcción de una colección de anticuerpos usando cualquier especie animal (humana o no humana) en la que el antígeno no es antigénico. Para colecciones que incorporan una construcción de genes de anticuerpos *in vitro*, se obtienen células madre del sujeto para proporcionar ácidos nucleicos que codifiquen segmentos de genes de anticuerpos no reordenados. Las células inmunitarias de interés se pueden obtener a partir de una variedad de especies animales, tales como las especies humana, ratón, rata, lagomorfa, luprina, canina, felina, porcina, bovina, equina y aviar, etc.

Los segmentos de genes variables de anticuerpos que codifican ácidos nucleicos (incluidos los segmentos VH y VL)

se recuperan de las células de interés y se amplifican. En el caso de las colecciones de genes de VH y VL reordenados, se puede obtener el ADN deseado aislando ADN genómico o ARNm de linfocitos, seguido de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores que coinciden con los extremos 5' y 3' de genes de VH y VL reordenados como se describe en Orlandi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86: 3833-3837 (1989), preparando de este modo diversos repertorios de genes V para expresión. Los genes V se pueden amplificar a partir de ADNc y ADN genómico, con los cebadores inversos en el extremo 5' del exón que codifica el dominio V maduro y los cebadores directos basados en el segmento J como se describe en Orlandi *et al.* (1989) y en Ward *et al.*, *Nature*, 341: 544-546 (1989). Sin embargo, para amplificación a partir de ADNc, los cebadores inversos también se pueden basar en el exón líder como se describe en Jones *et al.*, *Biotechnol.*, 9: 88-89 (1991), y cebadores directos dentro de la región constante como se describe en Sastry *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86: 5728-5732 (1989). Para maximizar la complementariedad, se puede incorporar redundancia en los cebadores como se describe en Orlandi *et al.* (1989) o Sastry *et al.* (1989). En determinados modos de realización, la diversidad de las colecciones se maximiza usando cebadores de PCR dirigidos a cada familia de genes V para amplificar todas las disposiciones de VH y VL disponibles presentes en la muestra de ácido nucleico de células inmunitarias, por ejemplo, como se describe en el procedimiento de Marks *et al.* *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) o como se describe en el procedimiento de Orum *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 21: 4491-4498 (1993). Para la clonación del ADN amplificado en vectores de expresión se pueden introducir sitios de restricción infrecuentes dentro del cebador de PCR como una marca en un extremo como se describe en Orlandi *et al.* (1989), o mediante amplificación por PCR adicional con un cebador marcado como se describe en Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991).

Los repertorios de genes V reordenados sintéticamente se pueden derivar *in vitro* de segmentos de genes V. La mayoría de los segmentos de genes VH humanos se han clonado y secuenciado (informado en Tomlinson *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 227: 776-798 (1992)), y mapeado (informado en Matsuda *et al.*, *Nature Genet.*, 3: 88-94 (1993)); estos segmentos clonados (incluidas todas las conformaciones principales de los bucles H1 y H2) se pueden usar para generar diversos repertorios de genes VH con cebadores de PCR que codifican bucles H3 de secuencia y longitud diversas como se describe en Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). También se pueden preparar repertorios de VH con toda la diversidad de secuencia enfocada en un bucle H3 largo de una única longitud como se describe en Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4457-4461 (1992). Los segmentos humanos Vk y Vl se han clonado y secuenciado (informado en Williams y Winter, *Eur. J. Immunol.*, 23: 1456-1461 (1993)) y se pueden usar para preparar repertorios de cadena ligera sintéticos. Los repertorios de genes V sintéticos, basados en una gama de pliegues VH y VL, y longitudes L3 y H3, codificarán anticuerpos de considerable diversidad estructural. Después de la amplificación de los ADN que codifican genes V, se pueden reordenar *in vitro* segmentos de genes V de la estirpe germinal de acuerdo con los procedimientos de Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 221: 381-388 (1992).

Los repertorios de fragmentos de anticuerpos se pueden construir combinando los repertorios de genes VH y VL juntos de varias maneras. Cada repertorio se puede crear en vectores diferentes y los vectores se pueden recombinar *in vitro*, por ejemplo, como se describe en Hogrefe *et al.*, *Gene*, 128: 119-126 (1993), o *in vivo* mediante infección combinatoria, por ejemplo, el sistema loxP descrito en Waterhouse *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 21: 2265-2266 (1993). El enfoque de recombinación *in vivo* explota la naturaleza bicatenaria de fragmentos Fab para superar el límite del tamaño de la colección impuesto por la eficacia de transformación de *E. coli*. Los repertorios de VH y VL sin exposición previa se clonan por separado, uno en un fagémido y el otro en un vector de fago. A continuación, se combinan las dos colecciones mediante infección por fagos de bacterias que contienen fagémidos, de modo que cada célula contenga una combinación diferente y el tamaño de la colección esté limitado únicamente por el número de células presentes (aproximadamente 10^{12} clones). Ambos vectores contienen señales de recombinación *in vivo* de modo que los genes VH y VL se recombinen en un único replicón y se coempaqueten en viriones de fago. Estas inmensas colecciones proporcionan grandes cantidades de diversos anticuerpos con buena afinidad (K_d^{-1} de aproximadamente 10^8 M).

De forma alternativa, los repertorios se pueden clonar secuencialmente en el mismo vector, por ejemplo, como se describe en Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 7978-7982 (1991), o se pueden ensamblar juntos por PCR y a continuación clonar, por ejemplo, como se describe en Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991). También se puede usar ensamblaje por PCR para unir los ADN de VH y VL con ADN que codifica un espaciador peptídico flexible para formar repertorios de Fv monocatenarios (scFv). En otra técnica más se usa "ensamblaje por PCR en células" para combinar genes VH y VL en linfocitos mediante PCR y, a continuación, repertorios de clones de genes enlazados como se describe en Embleton *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 20: 3831-3837 (1992).

Los anticuerpos producidos por las colecciones sin exposición previa (naturales o bien sintéticas) pueden ser de afinidad moderada (K_d^{-1} de aproximadamente 10^6 a 10^7 M⁻¹), pero la maduración de la afinidad también se puede imitar *in vitro* construyendo y reselectionando a partir de colecciones secundarias como se describe en Winter *et al.* (1994), *supra*. Por ejemplo, la mutación se puede introducir al azar *in vitro* usando polimerasa propensa a errores (informada en Leung *et al.*, *Technique* 1: 11-15 (1989)) en el procedimiento de Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 226: 889-896 (1992) o en el procedimiento de Gram *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 3576-3580 (1992). Adicionalmente, la maduración de la afinidad se puede realizar mutando aleatoriamente una o más CDR, por ejemplo, usando PCR con cebadores que portan secuencias aleatorias que abarcan la CDR de interés, en clones Fv individuales seleccionados y cribando para determinar clones de afinidad más alta. El documento WO 9607754 (publicado el 14

de marzo de 1996) describió un procedimiento para inducir mutagénesis en una región determinante de la complementariedad de una cadena ligera de inmunoglobulina para crear una colección de genes de cadena ligera. Otro enfoque eficaz es recombinar los dominios VH o VL seleccionados mediante presentación en fagos con repertorios de variantes de dominios V naturales obtenidas a partir de donantes no inmunizados y cribar para determinar la afinidad más alta en varias tandas de rebarajado de cadenas como se describe en Marks *et al.*, *Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992). Esta técnica permite la producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo con afinidades de aproximadamente 10^{-9} M o menos.

El cribado de las colecciones se puede lograr mediante diversas técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, el antígeno se puede usar para recubrir los pocillos de las placas de adsorción, se puede expresar en células huésped fijadas a placas de adsorción o usar en la separación celular, o se puede conjugar a biotina para la captura con microesferas recubiertas con estreptavidina o usar en cualquier otro procedimiento conocido en la técnica para seleccionar colecciones de presentación en fagos.

Las muestras de las colecciones en fagos se ponen en contacto con el antígeno inmovilizado en condiciones adecuadas para la unión de al menos una porción de las partículas de fago con el adsorbente. Normalmente, las condiciones, que incluyen pH, fuerza iónica, temperatura y similares, se seleccionan para imitar condiciones fisiológicas. Los fagos unidos a la fase sólida se lavan y a continuación se eluyen con ácido, por ejemplo, como se describe en Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 88: 7978-7982 (1991), o con álcali, por ejemplo, como se describe en Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), o por competencia antigénica, por ejemplo, en un procedimiento similar al procedimiento de competencia antigénica de Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991). Los fagos se pueden enriquecer 20-1.000 veces en una sola tanda de selección. Además, se pueden cultivar los fagos enriquecidos en cultivos bacterianos y someterse a nuevas tandas de selección.

La eficacia de la selección depende de muchos factores, incluyendo la cinética de disociación durante el lavado, y si múltiples fragmentos de anticuerpos en un solo fago pueden interactuar simultáneamente con el antígeno. Los anticuerpos con cinética de disociación rápida (y afinidades de unión débiles) se pueden retener mediante el uso de lavados cortos, presentación en fagos multivalente y alta densidad de recubrimiento de antígeno en fase sólida. La alta densidad no solo estabiliza el fago a través de interacciones multivalentes, sino que favorece la reunión del fago que se ha disociado. La selección de anticuerpos con cinética de disociación lenta (y buenas afinidades de unión) se puede promover mediante el uso de lavados largos y presentación en fagos monovalente como se describe en Bass *et al.*, *Proteins*, 8: 309-314 (1990) y en el documento WO 92/09690, y una baja densidad de recubrimiento de antígeno como se describe en Marks *et al.*, *Biotechnol.* 10: 779-783 (1992).

Es posible seleccionar entre anticuerpos en fagos de diferentes afinidades, incluso con afinidades que difieren ligeramente, por el antígeno. Sin embargo, es probable que la mutación aleatoria de un anticuerpo seleccionado (por ejemplo, como se realiza en algunas técnicas de maduración de afinidad) dé lugar a muchos mutantes, uniéndose la mayor parte al antígeno, y unos pocos con afinidad más alta. Con antígeno limitante, el fago de alta afinidad infrecuente podría quedar fuera. Para retener todos los mutantes de afinidad más alta, los fagos se pueden incubar con exceso de antígeno biotinilado, pero con el antígeno biotinilado a una concentración de molaridad más baja que la constante de afinidad molar diana por el antígeno. Los fagos de alta afinidad de unión pueden ser capturados a continuación por perlas paramagnéticas recubiertas con estreptavidina. Dicha "captura en equilibrio" permite que se seleccionen los anticuerpos de acuerdo con sus afinidades de unión, con una sensibilidad que permita el aislamiento de clones mutantes con una afinidad tan solo dos veces más alta a partir de un gran exceso de fagos con afinidad más baja. Las condiciones usadas en el lavado de fagos unidos a una fase sólida también se pueden manipular para discriminar en base a la cinética de disociación.

Los clones anti-antígeno se pueden seleccionar en base a la actividad. En determinados modos de realización, la invención proporciona anticuerpos anti-antígeno que se unen a células vivas que expresan naturalmente el antígeno o se unen al antígeno flotante libre o al antígeno unido a otras estructuras celulares. Los clones Fv correspondientes a dichos anticuerpos anti-antígeno se pueden seleccionar (1) aislando clones anti-antígeno a partir de una colección de fagos como se describe anteriormente, y opcionalmente, amplificando la población aislada de clones de fago cultivando la población en un huésped bacteriano adecuado; (2) seleccionando el antígeno y una segunda proteína frente a la que se desea actividad de bloqueo y de no bloqueo, respectivamente; (3) adsorbiendo los clones de fago anti-antígeno sobre el antígeno inmovilizado; (4) usando un exceso de la segunda proteína para eluir cualquier clon no deseado que reconozca determinantes de unión a antígeno que se solapan o se comparten con los determinantes de unión de la segunda proteína; y (5) eluyendo los clones que permanecen adsorbidos después de la etapa (4). Opcionalmente, los clones con las propiedades de bloqueo/no bloqueo deseadas se pueden enriquecer adicionalmente repitiendo una o más veces los procedimientos de selección descritos en el presente documento.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales derivados de hibridoma o los clones Fv de presentación en fagos de la invención se aísla y secuencía fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando cebadores oligonucleotídicos diseñados para amplificar específicamente las regiones codificantes de la cadena pesada y ligera de interés a partir de un molde de ADN de fago o hibridoma). Una vez aislado, el ADN se puede disponer en vectores de expresión, que, a continuación, se transfectan en células huésped tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma, que de otro modo no

producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de los anticuerpos monoclonales deseados en las células huésped recombinantes. Los artículos de revisión sobre expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica el anticuerpo incluyen Skerra *et al.*, *Curr. Opinion in Immunol.*, 5: 256 (1993) y Pluckthun, *Immunol. Revs.*, 130: 151 (1992).

El ADN que codifica los clones Fv de la invención se puede combinar con secuencias de ADN conocidas que codifican regiones constantes de la cadena pesada y/o cadena ligera (por ejemplo, las secuencias de ADN apropiadas se pueden obtener de Kabat *et al.*, *supra*) para formar clones que codifican las cadenas pesada y/o ligera de longitud parcial o completa. Se apreciará que se pueden usar regiones constantes de cualquier isotipo para este propósito, incluyendo las regiones constantes de IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, y que dichas regiones constantes se pueden obtener a partir de cualquier especie humana o animal. Un clon Fv derivado del ADN del dominio variable de una especie animal (tal como humana) y, a continuación, fusionado a ADN de la región constante de otra especie animal para formar secuencia(s) codificante(s) para la cadena pesada y/o cadena ligera de longitud completa "híbrida" se incluye en la definición de anticuerpo "quimérico" e "híbrido" como se usa en el presente documento. En determinados modos de realización, un clon Fv derivado de ADN variable humano se fusiona a ADN de la región constante humano para formar secuencia(s) codificante(s) para las cadenas pesadas y/o ligeras de longitud parcial o completa humanas.

También se puede modificar ADN que codifica anticuerpos anti-antígeno derivados de un híbrido de la invención, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante para dominios constantes de la cadena pesada y ligera humanos en lugar de secuencias murinas homólogas derivadas del clon de híbrido (por ejemplo, como en el procedimiento de Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)). Se puede modificar adicionalmente ADN que codifica un anticuerpo o fragmento derivado de clones Fv o híbrido mediante unión covalente a la secuencia codificante de inmunoglobulina de toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido no inmunoglobulínico. De esta manera, se preparan anticuerpos "quiméricos" o "híbridos" que tienen la especificidad de unión de los anticuerpos derivados de clones Fv o clones de híbrido de la invención.

(iv) Anticuerpos humanizados y humanos

Se conocen en la técnica diversos procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos aminoacídicos introducidos en el mismo desde una fuente que no es humana. Estos residuos aminoacídicos no humanos se denominan a menudo residuos de "importación", que se toman típicamente de un dominio variable de "importación". La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986), Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-327 (1988), Verhoeyen *et al.*, *Science*, 239:1534-1536 (1988)), sustituyendo las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano por CDR o secuencias de CDR de roedor. En consecuencia, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de EE. UU. n.º 4.816.567) en los que se ha sustituido sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR se sustituyen por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

La elección de los dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que se van a usar en la preparación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el llamado procedimiento de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba frente a toda la colección de secuencias de dominio variable humanas conocidas. A continuación, se acepta la secuencia humana que es la más próxima a la del roedor como la región estructural (FR) humana para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.*, *J. Immunol.* 151:2296 (1993); Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.* 196:901 (1987)). Otro procedimiento usa una región estructural particular derivada de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. Se puede usar la misma región estructural para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285 (1992); Presta *et al.*, *J. Immunol.* 151:2623 (1993)).

Es importante además que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, de acuerdo con un modo de realización del procedimiento, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un procedimiento de análisis de las secuencias originales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias originales y humanizadas. Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales están disponibles comúnmente y son conocidos por los expertos en la técnica. Están disponibles programas informáticos que ilustran y presentan estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del papel probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos de FR se pueden seleccionar y combinar a partir de las secuencias receptoras y de importación de modo que se logre la característica de anticuerpo deseada, tal como una afinidad incrementada por el(los) antígeno(s) diana. En general, los residuos de la región hipervariable están directa y lo más sustancialmente implicados en la influencia en la unión

a antígeno.

Los anticuerpos humanos de la divulgación se pueden construir combinando secuencia(s) del dominio variable de clones Fv seleccionadas de colecciones de presentación en fagos derivadas de seres humanos con secuencia(s) de dominio constante humanas conocidas como se describe anteriormente. De forma alternativa, se pueden preparar anticuerpos monoclonales humanos de la divulgación mediante el procedimiento de hibridoma. Las líneas celulares de heteromioma ratón-humano y mieloma humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos se han descrito, por ejemplo, por Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); y Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147: 86 (1991).

Es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que, tras la inmunización, pueden producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada (J_H) de anticuerpo en ratones mutantes quiméricos y de línea germinal da como resultado la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia de la micromatriz genética de inmunoglobulina de estirpe germinal humana a dichos ratones mutantes de estirpe germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición a antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggermann *et al.*, *Year in Immuno.*, 7:33 (1993); y Duchosal *et al.*, *Nature*, 355:258 (1992).

También se puede usar el barajado de genes para derivar anticuerpos humanos a partir de anticuerpos no humanos, por ejemplo, de roedor, donde el anticuerpo humano tiene afinidades y especificidades similares al anticuerpo no humano de partida. De acuerdo con este procedimiento, que también se llama "sellado de epítipo", la región variable de la cadena pesada o bien ligera de un fragmento de anticuerpo no humano obtenido mediante técnicas de presentación en fagos como se describe en el presente documento se reemplaza por un repertorio de genes de dominio V humanos, creando una población de quimeras de scFv o Fab de cadena humana/cadena no humana. La selección con antígeno da como resultado el aislamiento de un scFv o Fab quimérico de cadena humana/cadena no humana, en el que la cadena humana restablece el sitio de unión a antígeno destruido tras la eliminación de la cadena no humana correspondiente en el clon de presentación en fagos primario, es decir, el epítipo regula (sella) la elección del ligando de cadena humana. Cuando se repite el proceso para reemplazar la cadena no humana restante, se obtiene un anticuerpo humano (véase la publicación PCT WO 93/06213 publicada el 1 de abril de 1993). A diferencia de la humanización tradicional de anticuerpos no humanos por injerto de CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos, que no tienen residuos de FR o CDR de origen no humano.

(v) Fragmentos de anticuerpo

Se pueden generar fragmentos de anticuerpo mediante medios tradicionales, tales como digestión enzimática, o por técnicas recombinantes. En determinadas circunstancias, existen ventajas del uso de fragmentos de anticuerpo, en lugar de anticuerpos completos. El tamaño más pequeño de los fragmentos permite un aclaramiento rápido y puede dar lugar a un acceso mejorado a tumores sólidos. Para una revisión de determinados fragmentos de anticuerpo, véase Hudson *et al.* (2003) *Nat. Med.* 9:129-134.

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtenían por medio de digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto *et al.*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992); y Brennan *et al.*, *Science*, 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos se pueden producir ahora directamente mediante células huésped recombinantes. Los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y ScFv se pueden expresar en y secretar a partir de *E. coli*, permitiendo por tanto una fácil producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpo se pueden aislar de las colecciones de fagos de anticuerpos analizadas anteriormente. Como alternativa, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente de *E. coli* y acoplar químicamente para formar fragmentos $F(ab')_2$ (Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, se pueden aislar directamente fragmentos $F(ab')_2$ del cultivo de células huésped recombinantes. Se describen el fragmento Fab y $F(ab')_2$ con semividua *in vivo* incrementada que comprende residuos de epítipo de unión a receptor de rescate en la patente de EE. UU. n.º 5.869.046. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán evidentes para el experto en la técnica. En determinados modos de realización, el anticuerpo es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véanse el documento WO 93/16185 y las patentes de EE. UU. n.º 5.571.894 y 5.587.458. Fv y scFv son las únicas especies con sitios de combinación intactos que carecen de regiones constantes; por tanto, pueden ser adecuados para la unión no específica reducida durante el uso *in vivo*. Las proteínas de fusión de scFv se pueden construir para proporcionar la fusión de una proteína efectora en el extremo aminico o bien carboxílico de un scFv. Véase *Antibody Engineering*, ed. Borrebaeck, *supra*. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. n.º 5.641.870, por ejemplo. Dichos anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

(vi) Anticuerpos multiespecíficos

Los "anticuerpos multiespecíficos" tienen especificidades de unión a al menos dos epítomos diferentes, donde los epítomos son normalmente de diferentes antígenos. Si bien dichas moléculas normalmente solo se unirán a dos epítomos diferentes (es decir, anticuerpos biespecíficos, AcB), los anticuerpos con especificidades adicionales tales como anticuerpos trispecíficos están englobados en esta expresión cuando se usan en el presente documento. Se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos $F(ab')_2$).

En la técnica se conocen procedimientos para preparar anticuerpos biespecíficos. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen especificidades diferentes (Millstein *et al.*, *Nature* 305:537-539 (1983)). Debido a la variedad aleatoria de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las que solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se realiza normalmente mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante engorrosa y los rendimientos de producto son bajos. Se describen procedimientos similares en el documento WO 93/08829 y en Trauneker *et al.*, *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991).

De acuerdo con un enfoque diferente, los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan a secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión es preferentemente con un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Es típico que la primera región constante de la cadena pesada (CH1) contenga el sitio necesario para la unión a la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones con la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad al ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en modos de realización cuando proporciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en proporciones iguales da como resultado altos rendimientos o cuando las proporciones no tienen particular importancia.

En un modo de realización de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos se componen de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y un par cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se descubrió que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones indeseadas de cadenas de inmunoglobulina, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en solo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una manera fácil de separación. Este enfoque se divulga en el documento WO 94/04690. Para obtener más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

De acuerdo con otro enfoque descrito en el documento WO96/27011, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo se puede genomanipular para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. Una interfase comprende al menos una parte del dominio C_H3 de un dominio constante de anticuerpo. En este procedimiento, una o más cadenas laterales pequeñas de aminoácidos de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo se reemplazan por cadenas laterales mayores (p.ej. tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la(s) cadena(s) lateral(es) grande(s) en la interfase de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando las cadenas laterales de aminoácidos grandes por otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para incrementar el rendimiento del heterodímero frente a otros productos finales indeseados, tales como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos del heteroconjugado se puede acoplar a avidina, el otro a biotina. Por ejemplo, se han propuesto dichos anticuerpos para dirigir células del sistema inmunitario a células indeseadas (patente de EE. UU. n.º 4.676.980) y para el tratamiento de la infección por el VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 03089). Se pueden preparar anticuerpos heteroconjugados usando cualquier procedimiento de reticulación conveniente. Los agentes de reticulación adecuados son bien conocidos en la técnica y se divulgan en la patente de EE. UU. n.º 4.676.980, junto con varias técnicas de reticulación.

En la literatura también se han descrito técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos usando enlace químico. Brennan *et al.*, *Science*, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que los anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos $F(ab')_2$. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente que forma complejos con ditiol arsenito de sodio para estabilizar los ditiolos vecinos y prevenir la formación de disulfuro intermolecular. A continuación, los fragmentos Fab' generados se convierten en derivados de tionitrobenzoato (TNB). A continuación, uno de los derivados Fab'-TNB se reconvierte en Fab'-tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden usar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

Los recientes progresos han facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, que se pueden acoplar químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de F(ab')₂ de anticuerpo biespecífico completamente humanizado. Cada fragmento Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* formar el anticuerpo biespecífico.

También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpo biespecífico directamente del cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148(5):1547-1553 (1992). Los péptidos de cremalleras de leucina de las proteínas Fos y Jun se enlazaron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y, a continuación, se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este procedimiento también se puede utilizar para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpos" descrita por Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico. Los fragmentos comprenden un dominio variable de la cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (V_L) mediante un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena. En consecuencia, se obliga a que los dominios V_H y V_L de un fragmento se emparejen con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando de este modo dos sitios de unión a antígeno. También se ha informado de otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico mediante el uso de dímeros de Fv monocatenario (scFv). Véase Gruber *et al.*, *J. Immunol.* 152:5368 (1994).

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos trispecíficos. Tutt *et al.*, *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

(vii) Anticuerpos de dominio único

En algunos modos de realización de la divulgación, un anticuerpo de la invención es un anticuerpo de dominio único. Un anticuerpo de dominio único es una cadena polipeptídica única que comprende todo o una porción del dominio variable de la cadena pesada o todo o una porción del dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo. En determinados modos de realización de la divulgación, un anticuerpo de dominio único es un anticuerpo de dominio único humano (Domantis, Inc., Waltham, Mass.; véase por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.248.516 B1). En un modo de realización, un anticuerpo de dominio único consiste en todo o una parte del dominio variable de la cadena pesada de un anticuerpo.

(viii) Variantes de anticuerpo

En algunos modos de realización de la divulgación se contemplan modificaciones de la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos descritos en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo se pueden preparar introduciendo cambios apropiados en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo o mediante síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de y/o inserciones en y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se puede realizar cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Las alteraciones de aminoácidos se pueden introducir en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo del sujeto en el momento en que se realiza esa secuencia.

(ix) Derivados de anticuerpo

Los anticuerpos de la divulgación se pueden modificar además para contener restos no proteicos adicionales que son conocidos en la técnica y están fácilmente disponibles. En determinados modos de realización de la divulgación, los restos adecuados para la derivatización del anticuerpo son polímeros solubles en agua. Los ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o bien copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol), poli(alcohol vinílico) y mezclas de los mismos. El polietilenglicol-propionaldehído puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular y puede estar ramificado o no ramificado. El número de polímeros fijados al anticuerpo puede variar, y si se fija más de un polímero, pueden ser las mismas moléculas o diferentes. En general, se pueden determinar el número y/o el tipo de polímeros usados para la derivatización en base a consideraciones que incluyen, pero no se limitan a, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo que se va a mejorar, si el derivado del anticuerpo se usará en un tratamiento en condiciones definidas, etc.

(x) Vectores, células huésped y procedimientos recombinantes

Los anticuerpos también se pueden producir usando procedimientos recombinantes. Para la producción recombinante de un anticuerpo anti-antígeno, el ácido nucleico que codifica el anticuerpo se aísla y se inserta en un vector replicable para clonación adicional (amplificación del ADN) o para expresión. El ADN que codifica el anticuerpo se puede aislar y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que se pueden unir específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo). Están disponibles muchos vectores. Los componentes del vector en general incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción.

(a) Componente de secuencia señal

Un anticuerpo de la invención se puede producir recombinantemente no sólo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que es preferentemente una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína o polipéptido maduros. La secuencia señal heteróloga seleccionada preferentemente es una que es reconocida y procesada (por ejemplo, escindida por una peptidasa señal) por la célula huésped. Para las células huésped procariotas que no reconocen y procesan una secuencia señal natural del anticuerpo, la secuencia señal se sustituye por una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo que consiste en secuencias líder de fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp o enterotoxina II termoestable. Para la secreción de levadura, la secuencia señal natural se puede sustituir, por ejemplo, por la secuencia líder de invertasa de levadura, una secuencia líder de factor (incluyendo las secuencias líder de factor α de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*) o la secuencia líder de la fosfatasa ácida, la secuencia líder de la glucoamilasa de *C. albicans* o la secuencia señal descrita en el documento WO 90/13646. En la expresión de células de mamífero están disponibles secuencias señal de mamífero, así como secuencias líder secretoras víricas, por ejemplo, la señal gD del herpes simple.

(b) Origen de la replicación

Los vectores de expresión y de clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que permite que el vector se replique en una o más células huésped seleccionadas. En general, en los vectores de clonación, esta secuencia es una que permite que el vector se replique independientemente del ADN cromosómico del huésped, e incluye orígenes de replicación o secuencias de replicación autónoma. Dichas secuencias son bien conocidas para una variedad de bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias gramnegativas, el origen del plásmido 2 μ es adecuado para la levadura, y diversos orígenes víricos (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para clonar vectores en células de mamífero. En general, el componente de origen de replicación no es necesario para los vectores de expresión de mamífero (el origen de SV40 se puede usar típicamente solo porque contiene el promotor temprano).

(c) Componente del gen de selección

Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, también denominado un marcador seleccionable. Típicamente, los genes de selección codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles en medios complejos, por ejemplo, el gen que codifica la D-alanina racemasa de bacilos.

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula huésped. Las células que se transforman con éxito con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia a fármaco y, por tanto, sobreviven al régimen de selección. Los ejemplos de dicha selección dominante usan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Otro ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero son los que permiten la identificación de células competentes para aceptar el ácido nucleico que codifica el anticuerpo, tales como DHFR, glutamina sintetasa (GS), timidina cinasa, metalotioneína-I y -II, preferentemente genes de metalotioneína de primate, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc.

Por ejemplo, se identifican células transformadas con el gen DHFR cultivando todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. En estas condiciones, el gen DHFR se amplifica junto con cualquier otro ácido nucleico cotransformado. Se puede usar una línea celular de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en la actividad de DHFR endógena (por ejemplo, ATCC CRL-9096).

De forma alternativa, las células transformadas con el gen GS se identifican cultivando los transformantes en un medio de cultivo que contiene L-metionina sulfoximina (Mtx), un inhibidor de GS. En estas condiciones, el gen GS se amplifica junto con cualquier otro ácido nucleico cotransformado. El sistema de selección/amplificación de GS se puede usar en combinación con el sistema de selección/amplificación de DHFR descrito anteriormente.

De forma alternativa, se pueden seleccionar células huésped (en particular huéspedes naturales que contienen DHFR endógena) transformadas o cotransformadas con secuencias de ADN que codifican un anticuerpo de interés, el gen DHFR natural y otro marcador seleccionable tal como aminoglucósido 3'-fosfotransferasa (APH) por crecimiento celular en medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable tal como un antibiótico aminoglucosídico, por ejemplo, canamicina, neomicina o G418. Véase la patente de EE. UU. n.º 4.965.199.

Un gen de selección adecuado para uso en levaduras es el gen *trp1* presente en el plásmido de levadura YRp7 (Stinchcomb *et al.*, *Nature*, 282:39 (1979)). El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC n.º 44076 o PEP4-1. Jones, *Genetics*, 85:12 (1977). La presencia de la lesión de *trp1* en el genoma de la célula huésped de levadura proporciona entonces un entorno eficaz para detectar la transformación por crecimiento en ausencia de triptófano. De manera similar, las cepas de levadura deficientes en *Leu2* (ATCC 20.622 o 38.626) se complementan con plásmidos conocidos que portan el gen *Leu2*.

Además, los vectores derivados del plásmido circular de 1,6 µm pKD1 se pueden usar para la transformación de levaduras *Kluyveromyces*. De forma alternativa, se ha informado de un sistema de expresión para la producción a gran escala de quimosina de ternero recombinante para *K. lactis*. Van den Berg, *Bio/Technology*, 8:135 (1990). También se han divulgado vectores de expresión estables de múltiples copias para la secreción de seroalbúmina humana recombinante madura por cepas industriales de *Kluyveromyces*. Fleer *et al.*, *Bio/Technology*, 9:968-975 (1991).

(d) Componente de promotor

Los vectores de expresión y clonación contienen en general un promotor que es reconocido por el organismo huésped y está enlazado de forma funcional al ácido nucleico que codifica un anticuerpo. Los promotores adecuados para su uso con huéspedes procariotas incluyen el promotor *pho A*, los sistemas promotores de β-lactamasa y lactosa, el promotor de fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptófano (*trp*) y promotores híbridos tales como el promotor *tac*. Sin embargo, son adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Los promotores para su uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (SD) enlazada de forma funcional al ADN que codifica un anticuerpo.

Las secuencias de promotor son conocidas para eucariotas. Prácticamente todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente de 25 a 30 bases en dirección 5' del sitio donde se inicia la transcripción. Otra secuencia encontrada de 70 a 80 bases en dirección 5' desde el inicio de la transcripción de muchos genes es una región **CNCAAT**, donde N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucariotas hay una secuencia **AATAAA** que puede ser la secuencia señal para la adición de la cola poli A en el extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se insertan de forma adecuada en vectores de expresión eucariotas.

Los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para su uso con huéspedes de levadura incluyen los promotores para 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glucolíticas, tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexocinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructocinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato cinasa, triosefosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucocinasa.

Otros promotores de levadura, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de la transcripción controlada por las condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradativas asociadas con el metabolismo del nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Los vectores y promotores adecuados para su uso en la expresión de levaduras se describen adicionalmente en el documento EP 73.657. Los potenciadores de levadura también se usan ventajosamente con promotores de levadura.

La transcripción del anticuerpo a partir de vectores en células huésped de mamíferos se puede controlar, por ejemplo, mediante promotores obtenidos de los genomas de virus tales como el virus del poliovirus, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis-B, virus de simio 40 (SV40), o de promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, de promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células huésped.

Los promotores tempranos y tardíos del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación vírico de SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción HindIII E. En la patente de EE. UU. n.º 4.419.446 se divulga un sistema para expresar ADN en huéspedes de mamífero usando el papilomavirus bovino como un vector. Una modificación de este sistema se describe en la patente de EE. UU. n.º 4.601.978. Véase también Reyes *et al.*, *Nature* 297:598-601 (1982) sobre la expresión del ADNc de β-interferón

humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina cinasa del virus del herpes simple. De forma alternativa, se puede usar la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous como promotor.

(e) Componente de elemento potenciador

La transcripción de un ADN que codifica un anticuerpo de la presente invención por eucariotas superiores se incrementa a menudo mediante la inserción de una secuencia potenciadora en el vector. Muchas secuencias potenciadoras se conocen ahora a partir de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Típicamente, sin embargo, se usará un potenciador de un virus de célula eucariota. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el promotor/potenciador temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, *Nature* 297:17-18 (1982) sobre elementos potenciadores para la activación de promotores eucariotas. El potenciador se puede cortar y empalmar al vector en una posición 5' o 3' de la secuencia codificante de anticuerpo, pero se localiza preferentemente en un sitio 5' del promotor.

(f) Componente de terminación de la transcripción

Los vectores de expresión usados en células huésped eucariotas (levaduras, hongos, insectos, plantas, animales, humanos o células nucleadas de otros organismos multicelulares) contendrán también las secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias están comúnmente disponibles de regiones no traducidas 5' y, ocasionalmente, 3' de ADN o ADNc eucariotas o víricos. Estas regiones contienen segmentos nucleotídicos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm que codifica un anticuerpo. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Véase el documento WO94/11026 y el vector de expresión divulgado en el mismo.

(g) Selección y transformación de células huésped

Las células huésped adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores en el presente documento son las células procariotas, de levaduras o eucariotas superiores descritas anteriormente. Los procariotas adecuados para este propósito incluyen eubacterias, tales como organismos gramnegativos o grampositivos, por ejemplo, *Enterobacteriaceae* tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans* y *Shigella*, así como bacilos tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P divulgado en el documento DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa* y *Streptomyces*. Un huésped de clonación de *E. coli* preferente es *E. coli* 294 (ATCC 31.446), aunque otras cepas como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537) y *E. coli* W3110 (ATCC 27.325) son adecuadas. Estos ejemplos son ilustrativos en lugar de limitantes.

Los anticuerpos de longitud completa, proteínas de fusión de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo se pueden producir en bacterias, en particular cuando no se necesitan la glucosilación y la función efectora de Fc, tal como cuando el anticuerpo terapéutico está conjugado a un agente citotóxico (p.ej., una toxina) que por sí mismo muestra eficacia en la destrucción de las células tumorales. Los anticuerpos de longitud completa tienen una semivida mayor en circulación. La producción en *E. coli* es más rápida y más rentable. Para la expresión de fragmentos de anticuerpo y polipéptidos en bacterias, véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.648.237 (Carter *et al.*), la patente de EE. UU. n.º 5.789.199 (Joly *et al.*), la patente de EE. UU. n.º 5.840.523 (Simmons *et al.*), que describen la región de iniciación de la traducción (TIR) y las secuencias señal para optimizar la expresión y la secreción. Véase también Charlton, *Methods in Molecular Biology*, vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003), págs. 245-254, que describe la expresión de fragmentos de anticuerpo en *E. coli*. Después de la expresión, el anticuerpo se puede aislar de la pasta de células de *E. coli* en una fracción soluble y se puede purificar a través, p.ej., de una columna de proteína A o G dependiendo del isotipo. La purificación final se puede llevar a cabo de forma similar al procedimiento para purificar el anticuerpo expresado, p.ej., en células de CHO.

Además de los procariotas, los microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores codificantes de anticuerpos. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura de panadería común, es la más usada entre los microorganismos huésped eucariotas inferiores. Sin embargo, varios otros géneros, especies y cepas están comúnmente disponibles y son útiles en el presente documento, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; huéspedes de *Kluyveromyces* tales como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilum* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *yarrowia* (documento EP 402.226); *Pichia pastoris* (documento EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (documento EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, y huéspedes *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*. Para una revisión que analiza el uso de levaduras y hongos filamentosos para la producción de proteínas terapéuticas, véase, por ejemplo, Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004).

Se pueden seleccionar determinadas cepas de hongos y levaduras en las que las vías de glucosilación se han "humanizado", lo que resulta en la producción de un anticuerpo con un patrón de glucosilación parcial o totalmente humano. Véase, por ejemplo, Li *et al.*, *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006) (que describe la humanización de la vía de glucosilación en *Pichia pastoris*); y Gerngross *et al.*, *supra*.

5 Las células huésped adecuadas para la expresión del anticuerpo glucosilado también derivan de organismos pluricelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrado incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas y variantes baculovíricas y las correspondientes células huésped permisivas de insectos de huéspedes tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori*. Están públicamente disponibles una variedad de cepas víricas para transfección, por ejemplo, la variante L-1 de NPV de *Autographa californica* y la cepa Bm-5 de NPV de *Bombyx mori*, y dichos virus se pueden usar como el virus del presente documento de acuerdo con la invención, en particular para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

15 Los cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate lenteja de agua (*Leninaceae*), alfalfa (*M. truncatula*) y tabaco también se pueden utilizar como huéspedes. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978 y 6.417.429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en vegetales transgénicos).

20 Las células de vertebrados se pueden usar como huéspedes, y la propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo tisular) se ha convertido en un procedimiento de rutina. Ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para su cultivo en suspensión, Graham *et al.*, *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); células MRC 5; 25 células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2). Otras líneas de células huésped de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo células CHO DHFR (Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); y líneas de células de mieloma, tales como NS0 y Sp2/0. Para una revisión de determinadas líneas de células huésped de mamífero adecuadas para la producción de anticuerpos véase, por ejemplo, Yazaki y Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003), 30 págs. 255-268.

35 Las células huésped se transforman con los vectores de expresión o de clonación descritos anteriormente para la producción de anticuerpos y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

40 (h) Cultivo de las células huésped

45 Las células huésped usadas para producir un anticuerpo de la presente invención se pueden cultivar en una variedad de medios. Los medios comercialmente disponibles tales como F10 de Ham (Sigma), medio esencial mínimo (MEM, Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma) son adecuados para cultivar las células huésped. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham *et al.*, *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes *et al.*, *Anal. Biochem.* 102:255 (1980), patentes de EE. UU. n.º 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; documento WO 90/03430; documento WO 87/00195; o reedición de la patente de EE. UU. 30.985 se pueden usar como medios de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios se puede 50 complementar según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMYCIN™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos presentes normalmente en concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. Cualquier otro complemento necesario también se puede incluir en concentraciones apropiadas que serían conocidas por los expertos en la técnica. Las 55 condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son las usadas previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión, y serán evidentes para el experto en la técnica.

60 (xi) Purificación de anticuerpo

65 Cuando se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo se puede producir intracelularmente, en el espacio periplásmico, o se puede secretar directamente al medio. Si el polipéptido se produce intracelularmente, como una primera etapa, los restos de partículas, bien células huésped o bien fragmentos lisados, se retiran, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan al espacio periplásmico de *E. coli*. En resumen, se descongela la pasta de células en presencia de acetato de sodio (pH 3,5), EDTA y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) durante

aproximadamente 30 min. Los restos celulares se pueden retirar mediante centrifugación. Cuando el anticuerpo se secreta al medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión se concentran en primer lugar, en general, usando un filtro de concentración de proteína disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de proteasa, tal como PMSF, en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para prevenir el crecimiento de contaminantes casuales.

La composición de anticuerpo preparada a partir de las células se puede purificar usando, por ejemplo, cromatografía en hidroxilapatita, cromatografía de interacción hidrófoba, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad una de las etapas de purificación típicamente preferentes. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y del isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A se puede usar para purificar anticuerpos que se basan en cadenas pesadas humanas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ (Lindmark *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humana (Guss *et al.*, *EMBO J.* 5:1567-1575 (1986)). La matriz a la que se une el ligando de afinidad es muy a menudo agarosa, pero están disponibles otras matrices. Las matrices mecánicamente estables tales como vidrio de poro controlado o poli(estirenodivinil)benceno permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que los que se pueden lograr con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio C_{H3} , la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas tales como el fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, la precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina-SEPHAROSE™, cromatografía en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna con poli(ácido aspártico)), cromatografía de enfoque, SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio también están disponibles dependiendo del anticuerpo que se va a recuperar.

En general, diversas metodologías para preparar anticuerpos para su uso en investigación, prueba y clínica están bien establecidas en la técnica, consecuente con las metodologías descritas anteriormente y/o según lo considere apropiado un experto en la técnica para un anticuerpo particular de interés.

C. Selección de anticuerpos biológicamente activos

Los anticuerpos producidos como se describe anteriormente se pueden someter a uno o más ensayos de "actividad biológica" para seleccionar un anticuerpo con propiedades beneficiosas desde una perspectiva terapéutica o seleccionar formulaciones y condiciones que retengan la actividad biológica del anticuerpo. El anticuerpo puede someter a prueba para determinar su capacidad para unirse al antígeno contra el que se originó. Por ejemplo, para un anticuerpo anti-PDL1, las propiedades de unión al antígeno del anticuerpo se pueden evaluar en un ensayo que detecta la capacidad de unirse a PDL1. En algunos modos de realización, la unión del anticuerpo se puede determinar mediante ensayos de unión por saturación; ELISA; y/o competencia (por ejemplo, RIA), por ejemplo. Además, el anticuerpo se puede someter a otros ensayos de actividad biológica, por ejemplo, para evaluar su eficacia como agente terapéutico. Dichos ensayos son conocidos en la técnica y dependen del antígeno diana y del uso previsto del anticuerpo. Por ejemplo, los efectos biológicos del bloqueo de PD-L1 por el anticuerpo se pueden evaluar en linfocitos T CD8+, un modelo en ratón de virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) y/o un modelo de tumor singénico, por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. n.º 8.217.149.

Para detectar anticuerpos que se unen a un epítipo particular en el antígeno de interés (por ejemplo, aquellos que bloquean la unión del anticuerpo anti-PDL1 del ejemplo a PD-L1), se puede realizar un ensayo de bloqueo cruzado de rutina como el descrito en *Anticuerpos, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). De forma alternativa, el mapeo de epítopos, por ejemplo, como se describe en Champe *et al.*, *J. Biol. Chem* 270:1388-1394 (1995), se puede realizar para determinar si el anticuerpo se une a un epítipo de interés.

D. Preparación de las formulaciones

Después de la preparación del anticuerpo de interés (por ejemplo, las técnicas para producir anticuerpos que se pueden formular como se divulga en el presente documento se elaborarán a continuación y son conocidas en la técnica), se prepara la formulación farmacéutica que lo comprende. En determinados modos de realización, el anticuerpo que se va a formular no ha sido sometido a liofilización previa y la formulación de interés en el presente documento es una formulación acuosa. La cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpo presente en la formulación se determina teniendo en cuenta los volúmenes de dosis y el/los modo(s) de administración deseados, por ejemplo. De aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml, o de aproximadamente 30 mg/ml a aproximadamente 140 mg/ml, o de aproximadamente 35 mg/ml a aproximadamente 130 mg/ml, o de aproximadamente 40 mg/ml a aproximadamente 120 mg/ml, o de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 130 mg/ml, o de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 125 mg/ml, o de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 120 mg/ml, o de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 110 mg/ml, o de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, o de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 90 mg/ml, o de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 80 mg/ml, o de aproximadamente 54 mg/ml a aproximadamente 66 mg/ml es una concentración de anticuerpo ejemplar en la formulación de la divulgación.

aproximadamente 25 mM, pH 6,2. En un modo de realización de la divulgación, el tampón es acetato de histidina o acetato de sodio en una cantidad de aproximadamente 25 mM, pH 6,3.

5 La formulación comprende además sacarosa en una cantidad de 60 mM a 240 mM. En algunos modos de realización de la divulgación, la sacarosa en la formulación es de aproximadamente 60 mM a aproximadamente 230 mM, aproximadamente 60 mM a aproximadamente 220 mM, aproximadamente 60 mM a aproximadamente 210 mM, aproximadamente 60 mM a aproximadamente 200 mM, aproximadamente 60 mM a aproximadamente 190 mM, aproximadamente 60 mM a aproximadamente 180 mM, aproximadamente 60 mM a aproximadamente 170 mM, aproximadamente 60 mM a aproximadamente 160 mM, aproximadamente 60 mM a aproximadamente 150 mM, aproximadamente 60 mM a aproximadamente 140 mM, aproximadamente 80 mM a aproximadamente 240 mM, aproximadamente 90 mM a aproximadamente 240 mM, aproximadamente 100 mM a aproximadamente 240 mM, aproximadamente 110 mM a aproximadamente 240 mM, aproximadamente 120 mM a aproximadamente 240 mM, aproximadamente 130 mM a aproximadamente 240 mM, aproximadamente 140 mM a aproximadamente 240 mM, aproximadamente 150 mM a aproximadamente 240 mM, aproximadamente 160 mM a aproximadamente 240 mM, aproximadamente 170 mM a aproximadamente 240 mM, aproximadamente 180 mM a aproximadamente 240 mM, aproximadamente 190 mM a aproximadamente 240 mM, aproximadamente 200 mM a aproximadamente 240 mM, aproximadamente 80 mM a aproximadamente 160 mM, aproximadamente 100 mM a aproximadamente 140 mM, o aproximadamente 110 mM a aproximadamente 130 mM. En algunos modos de realización, la sacarosa en la formulación es de aproximadamente 60 mM, aproximadamente 70 mM, aproximadamente 80 mM, aproximadamente 90 mM, aproximadamente 100 mM, aproximadamente 110 mM, aproximadamente 120 mM, aproximadamente 130 mM, aproximadamente 140 mM, aproximadamente 150 mM, aproximadamente 160 mM, aproximadamente 170 mM, aproximadamente 180 mM, aproximadamente 190 mM, aproximadamente 200 mM, aproximadamente 210 mM, aproximadamente 220 mM, aproximadamente 230 mM o aproximadamente 240 mM.

25 En algunos modos de realización, la concentración de anticuerpo en la formulación es de 40 mg/ml a 125 mg/ml. En algunos modos de realización de la divulgación, la concentración de anticuerpo en la formulación es de aproximadamente 40 mg/ml a aproximadamente 120 mg/ml, aproximadamente 40 mg/ml a aproximadamente 110 mg/ml, aproximadamente 40 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 40 mg/ml a aproximadamente 90 mg/ml, aproximadamente 40 mg/ml a aproximadamente 80 mg/ml, aproximadamente 40 mg/ml a aproximadamente 70 mg/ml, aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 120 mg/ml, aproximadamente 60 mg/ml a aproximadamente 120 mg/ml, aproximadamente 70 mg/ml a aproximadamente 120 mg/ml, aproximadamente 80 mg/ml a aproximadamente 120 mg/ml, aproximadamente 90 mg/ml a aproximadamente 120 mg/ml, o aproximadamente 100 mg/ml a aproximadamente 120 mg/ml. En algunos modos de realización de la divulgación, la concentración de anticuerpo en la formulación es de aproximadamente 60 mg/ml. En algunos modos de realización de la divulgación, la concentración de anticuerpo en la formulación es de aproximadamente 65 mg/ml. En algunos modos de realización de la divulgación, la concentración de anticuerpo en la formulación es de aproximadamente 70 mg/ml. En algunos modos de realización de la divulgación, la concentración de anticuerpo en la formulación es de aproximadamente 75 mg/ml. En algunos modos de realización de la divulgación, la concentración de anticuerpo en la formulación es de aproximadamente 80 mg/ml. En algunos modos de realización de la divulgación, la concentración de anticuerpo en la formulación es de aproximadamente 85 mg/ml. En algunos modos de realización de la divulgación, la concentración de anticuerpo en la formulación es de aproximadamente 90 mg/ml. En algunos modos de realización de la divulgación, la concentración de anticuerpo en la formulación es de aproximadamente 95 mg/ml. En algunos modos de realización de la divulgación, la concentración de anticuerpo en la formulación es de aproximadamente 100 mg/ml. En algunos modos de realización de la divulgación, la concentración de anticuerpo en la formulación es de aproximadamente 110 mg/ml. En algunos modos de realización de la divulgación, la concentración de anticuerpo en la formulación es de aproximadamente 125 mg/ml.

50 En algunos modos de realización se agrega un tensioactivo a la formulación de anticuerpo. Los tensioactivos ejemplares incluyen tensioactivos no iónicos tales como polisorbatos (por ejemplo, polisorbatos 20, 80, etc.) o poloxámeros (por ejemplo, poloxámero 188, etc.). La cantidad de tensioactivo añadido es tal que reduce la agregación del anticuerpo formulado y/o minimiza la formación de partículas en la formulación y/o reduce la adsorción. Por ejemplo, el tensioactivo puede estar presente en la formulación en una cantidad de aproximadamente un 0,001 % a aproximadamente un 0,5 % (p/v). En algunos modos de realización de la divulgación, el tensioactivo (por ejemplo, polisorbato 20) está de aproximadamente un 0,005 % a aproximadamente un 0,2 %, de aproximadamente un 0,005 % a aproximadamente un 0,1 %, de aproximadamente un 0,005 % a aproximadamente un 0,09 %, de aproximadamente un 0,005 % a aproximadamente un 0,08 %, de aproximadamente un 0,005 % a aproximadamente un 0,07 %, de aproximadamente un 0,005 % a aproximadamente un 0,06 %, de aproximadamente un 0,005 % a aproximadamente un 0,05 %, de aproximadamente un 0,005 % a aproximadamente un 0,04 %, de aproximadamente un 0,008 % a aproximadamente un 0,06 %, de aproximadamente un 0,01 % a aproximadamente un 0,06 %, de aproximadamente un 0,02 % a aproximadamente un 0,06 %, de aproximadamente un 0,01 % a aproximadamente un 0,05 %, o de aproximadamente un 0,02 % a aproximadamente un 0,04 %. En determinados modos de realización de la divulgación, el tensioactivo (por ejemplo, polisorbato 20) está presente en la formulación en una cantidad de un 0,005 % o aproximadamente un 0,005 %. En determinados modos de realización de la divulgación, el tensioactivo (por ejemplo, polisorbato 20) está presente en la formulación en una cantidad de un 0,006 % o aproximadamente un 0,006 %. En determinados modos de realización de la divulgación, el tensioactivo (por ejemplo, polisorbato 20) está presente en la formulación en una cantidad de un 0,007 % o aproximadamente un

0,007 %. En determinados modos de realización de la divulgación, el tensioactivo (por ejemplo, polisorbato 20) está presente en la formulación en una cantidad de un 0,008 % o aproximadamente un 0,008 %. En determinados modos de realización de la divulgación, el tensioactivo (por ejemplo, polisorbato 20) está presente en la formulación en una cantidad de un 0,009 % o aproximadamente un 0,009 %. En determinados modos de realización de la divulgación, el tensioactivo (por ejemplo, polisorbato 20) está presente en la formulación en una cantidad de un 0,01 % o aproximadamente un 0,01 %. En determinados modos de realización de la divulgación, el tensioactivo (por ejemplo, polisorbato 20) está presente en la formulación en una cantidad de un 0,02 % o aproximadamente un 0,02 %. En determinados modos de realización de la divulgación, el tensioactivo (por ejemplo, polisorbato 20) está presente en la formulación en una cantidad de un 0,03 % o aproximadamente un 0,03 %. En determinados modos de realización de la divulgación, el tensioactivo (por ejemplo, polisorbato 20) está presente en la formulación en una cantidad de un 0,04 % o aproximadamente un 0,04 %. En determinados modos de realización de la divulgación, el tensioactivo (por ejemplo, polisorbato 20) está presente en la formulación en una cantidad de un 0,05 % o aproximadamente un 0,05 %. En determinados modos de realización de la divulgación, el tensioactivo (por ejemplo, polisorbato 20) está presente en la formulación en una cantidad de un 0,06 % o aproximadamente un 0,06 %. En determinados modos de realización de la divulgación, el tensioactivo (por ejemplo, polisorbato 20) está presente en la formulación en una cantidad de un 0,07 % o aproximadamente un 0,07 %. En determinados modos de realización de la divulgación, el tensioactivo (por ejemplo, polisorbato 20) está presente en la formulación en una cantidad de un 0,08 % o aproximadamente un 0,08 %. En determinados modos de realización de la divulgación, el tensioactivo (por ejemplo, polisorbato 20) está presente en la formulación en una cantidad de un 0,1 % o aproximadamente un 0,1 %. En determinados modos de realización de la divulgación, el tensioactivo (por ejemplo, polisorbato 20) está presente en la formulación en una cantidad de un 0,2 % o aproximadamente un 0,2 %. En determinados modos de realización de la divulgación, el tensioactivo (por ejemplo, polisorbato 20) está presente en la formulación en una cantidad de un 0,3 % o aproximadamente un 0,3 %. En determinados modos de realización de la divulgación, el tensioactivo (por ejemplo, polisorbato 20) está presente en la formulación en una cantidad de un 0,4 % o aproximadamente un 0,4 %. En determinados modos de realización de la divulgación, el tensioactivo (por ejemplo, polisorbato 20) está presente en la formulación en una cantidad de un 0,5 % o aproximadamente un 0,5 %.

En un modo de realización, la formulación contiene los agentes identificados anteriormente (por ejemplo, anticuerpo, tampón, sacarosa y/o tensioactivo) y está esencialmente libre de uno o más conservantes, tales como alcohol bencílico, fenol, m-cresol, clorobutanol y cloruro de bencetonio. En otro modo de realización se puede incluir un conservante en la formulación, en particular cuando la formulación es una formulación multidosis. La concentración de conservante puede estar en el intervalo de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 2 %, preferentemente de aproximadamente un 0,5 % a aproximadamente un 1 %. Uno o más vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables tales como los descritos en Remington's Pharmaceutical Sciences 16.^a edición, Osol, A. Ed. (1980) se puede incluir en la formulación siempre que no afecten de forma adversa las características deseadas de la formulación. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen; agentes tamponadores adicionales; codisolventes; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; agentes quelantes tales como EDTA; complejos de metal (por ejemplo, complejos Zn-proteína); polímeros biodegradables tales como poliésteres; y/o contraiones formadores de sales. Los vehículos farmacéuticamente aceptables ejemplares en el presente documento incluyen además agentes de dispersión de fármacos intersticiales tales como glucoproteínas hialuronidasas activas a pH neutro y solubles (sHASEGP), por ejemplo, glucoproteínas hialuronidasas PH-20 solubles humanas, tales como rHuPH20 (HYLENEX[®], Baxter International, Inc.). Determinadas sHASEGP ejemplares y procedimientos de uso, incluyendo rHuPH20, se describen en las publicaciones de patente de EE. UU. n.º 2005/0260186 y 2006/0104968. En un aspecto, una sHASEGP se combina con una o más glucosaminoglucanasas adicionales, tales como condroitinasas.

La formulación en el presente documento también puede contener más de una proteína según sea necesario para la indicación particular que se está tratando, preferentemente aquellas con actividades complementarias que no afecten de forma adversa a la otra proteína. Por ejemplo, cuando el anticuerpo es anti-PDL1, se puede combinar con otro agente (por ejemplo, un agente quimioterápico y un agente antineoplásico).

En algunos modos de realización se evalúa o mide la estabilidad física, la estabilidad química o la actividad biológica del anticuerpo en la formulación. Cualquier procedimiento conocido en la técnica y descrito en los ejemplos del presente documento se puede usar para evaluar la estabilidad y la actividad biológica del anticuerpo en la formulación. Por ejemplo, la estabilidad del anticuerpo en la formulación se puede medir mediante, pero no se limita a, cromatografía de exclusión por tamaño (SEC o SE-HPLC), isoelectroenfoque capilar por imágenes (iCIEF), mapeo de péptidos, ensayo de oscurecimiento de luz de pequeño volumen (HIAC) y técnicas de electroforesis capilar (CE) tales como análisis por CE con dodecilsulfato de sodio (CE-SDS) y análisis por CE con glucano. En algunos modos de realización, el anticuerpo en la formulación es estable a -20 °C durante al menos aproximadamente 6 meses, al menos aproximadamente 8 meses, al menos aproximadamente 10 meses, al menos aproximadamente 12 meses, al menos aproximadamente 14 meses, al menos aproximadamente 16 meses, al menos aproximadamente 18 meses, al menos aproximadamente 20 meses, al menos aproximadamente 21 meses, al menos aproximadamente 22 meses, al menos aproximadamente 23 meses, al menos aproximadamente 24 meses, al menos aproximadamente 3 años o al menos aproximadamente 4 años. En algunos modos de realización, el anticuerpo en la formulación es estable de 2 °C a 8 °C (por ejemplo, 5 °C) durante al menos aproximadamente 6

meses, al menos aproximadamente 8 meses, al menos aproximadamente 10 meses, al menos aproximadamente 12 meses, al menos aproximadamente 14 meses, al menos aproximadamente 16 meses, al menos aproximadamente 18 meses, al menos aproximadamente 20 meses, al menos aproximadamente 21 meses, al menos aproximadamente 22 meses, al menos aproximadamente 23 meses o al menos aproximadamente 24 meses. En algunos modos de realización, la estabilidad del anticuerpo (es decir, un monómero de anticuerpo) se mide mediante cromatografía de exclusión por tamaño en la formulación después del almacenamiento. En algunos modos de realización, la estabilidad del anticuerpo (es decir, un monómero de anticuerpo) se mide mediante isoelectroenfoque capilar por imágenes en la formulación después del almacenamiento. En algunos modos de realización, el porcentaje de monómero de anticuerpos en la formulación en comparación con la proteína total (por ejemplo, incluyendo el anticuerpo y agregados) es mayor de aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 65 %, aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 75 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 86 %, aproximadamente un 87 %, aproximadamente un 88 %, aproximadamente un 89 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 91 %, aproximadamente un 92 %, aproximadamente un 93 %, aproximadamente un 94 % o aproximadamente un 95 % después del almacenamiento a -20 °C durante al menos aproximadamente 6 meses, al menos aproximadamente 12 meses, al menos aproximadamente 18 meses o al menos aproximadamente 24 meses. En algunos modos de realización, el porcentaje de monómero de anticuerpos en la formulación en comparación con la proteína total (por ejemplo, incluyendo el anticuerpo y agregados) es mayor de aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 65 %, aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 75 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 86 %, aproximadamente un 87 %, aproximadamente un 88 %, aproximadamente un 89 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 91 %, aproximadamente un 92 %, aproximadamente un 93 %, aproximadamente un 94 % o aproximadamente un 95 % después del almacenamiento a entre 2 °C y 8 °C (por ejemplo, 5 °C) durante al menos aproximadamente 6 meses, al menos aproximadamente 12 meses, al menos aproximadamente 18 meses o al menos aproximadamente 24 meses. En algunos modos de realización, el porcentaje de monómero de anticuerpos en la formulación en comparación con la proteína total (por ejemplo, incluyendo el anticuerpo y agregados) es mayor de aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 65 %, aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 75 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 86 %, aproximadamente un 87 %, aproximadamente un 88 %, aproximadamente un 89 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 91 %, aproximadamente un 92 %, aproximadamente un 93 %, aproximadamente un 94 % o aproximadamente un 95 % después de la agitación a temperatura ambiente (por ejemplo, de aproximadamente 15 °C a 25 °C) durante al menos aproximadamente 2 horas, al menos aproximadamente 4 horas, al menos aproximadamente 6 horas, al menos aproximadamente 8 horas, al menos aproximadamente 10 horas, al menos aproximadamente 12 horas, al menos aproximadamente 14 horas, al menos aproximadamente 16 horas, al menos aproximadamente 18 horas, al menos aproximadamente 20 horas o al menos aproximadamente 24 horas. En algunos modos de realización, el porcentaje de agregados totales (por ejemplo, especies de alto peso molecular y especies de bajo peso molecular) en la formulación es menor que cualquiera de aproximadamente un 0,1 %, aproximadamente un 0,2 %, aproximadamente un 0,3 %, aproximadamente un 0,4 %, aproximadamente un 0,5 %, aproximadamente un 0,6 %, aproximadamente un 0,7 %, aproximadamente un 0,8 %, aproximadamente un 0,9 %, aproximadamente un 1 %, aproximadamente un 2 %, aproximadamente un 3 %, aproximadamente un 4 %, aproximadamente un 5 %, aproximadamente un 6 %, aproximadamente un 7 %, aproximadamente un 8 %, aproximadamente un 9 % o aproximadamente un 10 % después del almacenamiento a -20 °C durante al menos aproximadamente 6 meses, al menos aproximadamente 12 meses, al menos aproximadamente 18 meses o al menos aproximadamente 24 meses. En algunos modos de realización, el porcentaje de agregados totales (por ejemplo, especies de alto peso molecular y especies de bajo peso molecular) en la formulación es menor que cualquiera de aproximadamente un 0,1 %, aproximadamente un 0,2 %, aproximadamente un 0,3 %, aproximadamente un 0,4 %, aproximadamente un 0,5 %, aproximadamente un 0,6 %, aproximadamente un 0,7 %, aproximadamente un 0,8 %, aproximadamente un 0,9 %, aproximadamente un 1 %, aproximadamente un 2 %, aproximadamente un 3 %, aproximadamente un 4 %, aproximadamente un 5 %, aproximadamente un 6 %, aproximadamente un 7 %, aproximadamente un 8 %, aproximadamente un 9 % o aproximadamente un 10 % después del almacenamiento a entre 2 °C y 8 °C (por ejemplo, 5 °C) durante al menos aproximadamente 6 meses, al menos aproximadamente 12 meses, al menos aproximadamente 18 meses o al menos aproximadamente 24 meses. En algunos modos de realización, el porcentaje de agregados totales (por ejemplo, especies de alto peso molecular y especies de bajo peso molecular) en la formulación es menor que cualquiera de aproximadamente un 0,1 %, aproximadamente un 0,2 %, aproximadamente un 0,3 %, aproximadamente un 0,4 %, aproximadamente un 0,5 %, aproximadamente un 0,6 %, aproximadamente un 0,7 %, aproximadamente un 0,8 %, aproximadamente un 0,9 %, aproximadamente un 1 %, aproximadamente un 2 %, aproximadamente un 3 %, aproximadamente un 4 %, aproximadamente un 5 %, aproximadamente un 6 %, aproximadamente un 7 %, aproximadamente un 8 %, aproximadamente un 9 % o aproximadamente un 10 % después de la agitación a temperatura ambiente (por ejemplo, de aproximadamente 15 °C a 25 °C) durante al menos aproximadamente 2 horas, al menos aproximadamente 4 horas, al menos aproximadamente 6 horas, al menos aproximadamente 8 horas, al menos aproximadamente 10 horas, al menos aproximadamente 12 horas, al menos aproximadamente 14 horas, al menos aproximadamente 16 horas, al menos aproximadamente 18 horas, al menos aproximadamente 20 horas o al menos aproximadamente 24 horas. En cualquiera de los modos de realización en el presente documento, la formulación estable se puede almacenar en un vial de vidrio, un recipiente de aleación metálica o una bolsa intravenosa (i.v.). En algunos modos de realización, la aleación metálica es acero inoxidable 316L o Hastelloy.

Las formulaciones que se van a usar para su administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles, antes de o después de la preparación de la formulación.

III. Procedimientos de tratamiento y administración de formulaciones de anticuerpo

La formulación se administra a un mamífero que necesita tratamiento con el anticuerpo, preferentemente un ser humano, de acuerdo con procedimientos conocidos, tales como administración intravenosa (por ejemplo, como una inyección intravenosa rápida o por infusión continua durante un periodo de tiempo), por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intrarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o por inhalación. En un modo de realización, la formulación se administra al mamífero mediante administración intravenosa. Para dichos propósitos, la formulación se puede inyectar usando una jeringa o por medio de una línea i.v., por ejemplo. En un modo de realización, la formulación se administra al mamífero mediante administración subcutánea.

La dosificación apropiada ("cantidad terapéuticamente eficaz") del anticuerpo dependerá, por ejemplo, de la afección que se vaya a tratar, de la gravedad y evolución de la afección, de si el anticuerpo se administra para propósitos preventivos o terapéuticos, del tratamiento previo, de la anamnesis y respuesta del paciente al anticuerpo, del tipo de anticuerpo usado y del criterio del médico especialista. El anticuerpo se administra de forma adecuada al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos y se puede administrar al paciente en cualquier momento desde el diagnóstico en adelante. El anticuerpo se puede administrar como el tratamiento único o junto con otros fármacos o tratamientos útiles en el tratamiento de la afección en cuestión.

Como una propuesta general, la cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo administrada al ser humano estará en el intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal del paciente, ya sea mediante una o más administraciones. En algunos modos de realización, el anticuerpo usado es de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 45 mg/kg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 40 mg/kg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 35 mg/kg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 30 mg/kg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 25 mg/kg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 20 mg/kg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 15 mg/kg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5 mg/kg o de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1 mg/kg administrados diariamente, por ejemplo. En algunos modos de realización, el anticuerpo se administra a 15 mg/kg. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación. En un modo de realización, un anticuerpo anti-PDL1 descrito en el presente documento se administra a un ser humano a una dosis de aproximadamente 100 mg, aproximadamente 200 mg, aproximadamente 300 mg, aproximadamente 400 mg, aproximadamente 500 mg, aproximadamente 600 mg, aproximadamente 700 mg, aproximadamente 800 mg, aproximadamente 900 mg, aproximadamente 1000 mg, aproximadamente 1100 mg, aproximadamente 1200 mg, aproximadamente 1300 mg o aproximadamente 1400 mg el día 1 de ciclos de 21 días. La dosis se puede administrar como una dosis única o como dosis múltiples (por ejemplo, 2 o 3 dosis), tal como infusiones. La dosis del anticuerpo administrado en un tratamiento combinado se puede reducir en comparación con la de un tratamiento único. La evolución de este tratamiento se supervisa fácilmente por técnicas convencionales.

Las formulaciones que contienen el anticuerpo anti-PDL1 descrito en el presente documento se pueden usar en una variedad de aplicaciones diagnósticas y terapéuticas *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, la formulación que contiene el anticuerpo se puede administrar a un sujeto o un individuo para tratar una enfermedad o trastorno (por ejemplo, enfermedad o trastorno mediado por la interacción entre PD-1 y PD-L1).

En algunos modos de realización, la enfermedad o trastorno es cáncer. En algunos modos de realización, el cáncer es localmente avanzado o metastásico. En algunos modos de realización, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en un tumor sólido, un cáncer hemático, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, glioma, cáncer de cabeza, leucemia, cáncer de hígado, cáncer de pulmón (p. ej., carcinoma de pulmón no microcítico), linfoma, mieloma, cáncer de cuello, cáncer de ovario, melanoma, cáncer de páncreas, cáncer renal, cáncer de saliva, cáncer de estómago, cáncer epitelial tímico, cáncer de tiroides y carcinoma de células escamosas de la cabeza y cuello. En algunos modos de realización, el sujeto o individuo tratado tiene células cancerosas PD-L1 positivas (por ejemplo, detectadas por IHC).

En algunos modos de realización, la enfermedad o trastorno es una infección. En algunos modos de realización, la infección es una infección persistente. En algunos modos de realización, la infección es una infección vírica, una infección bacteriana, una micosis, una helmintosis o una infección por protozoos. En algunos modos de realización, la infección vírica se selecciona del grupo que consiste en citomegalovirus, virus de Epstein-Barr, virus de hepatitis B, virus de hepatitis C, virus del herpes, virus del sarampión, virus de la gripe, virus de inmunodeficiencia humana, virus linfotrópico T humano, virus de la coriomeningitis linfocítica, virus sincicial respiratorio y/o rinovirus. En algunos modos de realización, la infección bacteriana se selecciona del grupo que consiste en *Helicobacter spp.*, *Mycobacterium spp.*, *Porphyromonas spp.*, *Chlamydia spp.*, *Salmonella spp.*, *Listeria spp.*, *Streptococcus spp.*, *Haemophilus spp.*, *Neisseria spp.*, *Klebsiella spp.*, *Borrelia spp.*, *Bacterioides spp.* y *Treponema spp.* En algunos modos de realización, la infección por protozoos se selecciona del grupo que consiste en *Leishmania spp.*, *Plasmodium falciparum*, *Schistosoma spp.*, *Toxoplasma spp.*, *Trypanosoma spp.* y *Taenia spp.* En algunos modos de realización, la infección fúngica se selecciona del grupo que consiste en blastomycosis, coccidioidomycosis,

histoplasmosis, candidiasis, criptococosis, aspergilosis, mucormicosis y neumocistosis.

En algunos modos de realización, la enfermedad o trastorno es una enfermedad inflamatoria. En algunos modos de realización, la enfermedad inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en encefalomiелitis diseminada aguda, enfermedad de Addison, enfermedad de Alzheimer, espondilitis anquilosante, síndrome de anticuerpo antifosfolípido, aterosclerosis, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, artritis, enfermedad de Behcet, enfermedad de Berger, penfigoide ampolloso, enfermedad celíaca, enfermedad de Chagas, colangitis, enfermedad de Crohn, dermatomiositis, diabetes mellitus tipo 1, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, enfermedad de injerto contra huésped, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré, enfermedad de Hashimoto, urticaria, síndrome de hiper IgE, púrpura trombocitopénica idiopática, lupus eritematoso, nefritis lúpica, esclerosis múltiple, miastenia grave, rechazo de trasplante de órganos, enfermedad de Parkinson, penfigo, anemia perniciosa, polimiositis, cirrosis biliar primaria, psoriasis, síndrome de Raynaud, artritis reumatoide, escroderma, síndrome de Sjögren, arteritis temporal, tiroiditis, colitis ulcerosa, uveítis, vasculitis y granulomatosis de Wegener.

En algunos modos de realización, la formulación que contiene el anticuerpo se puede administrar junto con otro agente terapéutico a un sujeto o un individuo para tratar una enfermedad o trastorno. Por ejemplo, para tratar el cáncer, la formulación de anticuerpo anti-PDL1 descrita en el presente documento se puede administrar junto con otro tratamiento antineoplásico (por ejemplo, una quimioterapia o un tratamiento con un anticuerpo diferente).

IV. Artículos de fabricación o kits

En otro modo de realización de la invención se proporciona un artículo de fabricación o un kit que comprende un recipiente que contiene la formulación farmacéutica acuosa de la invención y opcionalmente proporciona instrucciones para su uso. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, bolsas y jeringas. El recipiente puede estar formado por una variedad de materiales tales como vidrio, plástico (tal como cloruro de polivinilo o poliolefina) o aleación metálica (tal como acero inoxidable o Hastelloy). Un recipiente ejemplar es un recipiente de aleación metálica de 300 cc (por ejemplo, para almacenamiento a -20 °C). Otro recipiente ejemplar puede ser un vial de vidrio de 10-50 cc (por ejemplo, para almacenamiento a 2-8 °C). Por ejemplo, el recipiente puede ser viales de vidrio de 10 cc, 15 cc, 20 cc o 50 cc. El recipiente contiene la formulación y la etiqueta colocada sobre, o asociada con, el recipiente puede indicar instrucciones de uso. El artículo de fabricación puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringuillas y prospectos del envase con instrucciones para su uso. En algunos modos de realización, el artículo de fabricación incluye además uno o más de otro agente (por ejemplo, un agente quimioterápico y un agente antineoplásico). Los recipientes adecuados para uno o más agentes incluyen, por ejemplo, botellas, viales, bolsas y jeringas.

EJEMPLOS

La invención se entenderá más completamente por referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, estos no se deben interpretar como limitantes del alcance de la invención.

Ejemplo 1: Desarrollo de la formulación de un anticuerpo anti-PDL1

El anticuerpo anti-PDL1 (α -PDL1) es un anticuerpo de IgG1 aglucosilada derivado de CHO destinado a restaurar la función de los linfocitos T mediante la inhibición de las interacciones PDL1/PD1. Los desafíos al comienzo del desarrollo incluyeron la potencial oxidación de Trp y glucación en o cerca de las regiones CDR y una cierta oxidación de metionina. Los estudios de consistencia previos indicaron que un pH más alto que el seleccionado previamente (pH 5,5) era óptimo. La dosis objetivo fue una dosis fija, pero también se consideró una dosis basada en el peso. Se llevaron a cabo estudios analíticos para analizar la estabilidad de diversas formulaciones y se seleccionó una formulación (60 mg/ml de α -PDL1, His-AcO 20 mM, pH 5,8, sacarosa 120 mM, PS20 al 0,04 %). Los estudios iniciales de la formulación respaldan hasta tres años de estabilidad en cuanto a la sustancia farmacéutica (Drug Substance, DS) y la especialidad farmacéutica (Drug Product, DP).

Procedimientos y materiales

Producción de formulaciones de α -PDL1

El material α -PDL1 que se había sometido a ultrafiltración/diafiltración se sometió a estudios de desarrollo de formulación. El material se dializó en diversos tampones de formulación usando cassettes de diálisis de 10000 Dalton. Después de la diálisis, las concentraciones de proteína se ajustaron para alcanzar las concentraciones objetivo y se añadió una solución madre de PS20 al 10 % para alcanzar las concentraciones de PS20 objetivo. Se llenaron asepticamente con el material formulado viales de vidrio Forma Vitrum de 2 cc con un volumen de llenado de 1 ml y se sellaron con un tapón Daikyo 777-1 de 13 mm. Las muestras se almacenaron en posición vertical a 5 °C, 25 °C o 40 °C.

Color, apariencia y claridad (CAC)

5 El color, la apariencia y la claridad de la muestra se determinaron mediante inspección visual bajo una luz fluorescente blanca con fondo blanco y negro a temperatura ambiente como se describe en los procedimientos de la Farmacopea Europea (EP) (Consejo de Europa. *Farmacopea Europea*, 2008, 7.^a ed., EP 2.2.2 y EP 2.2.1). Se llenó un vial de vidrio de 3 cc con 1 ml de cada muestra sometida a prueba. Se usó un control negativo (agua purificada) con el volumen de muestra correspondiente para la comparación.

Mediciones de concentración de proteína

10 La concentración de proteína se determinó midiendo la absorbancia UV en un espectrofotómetro Agilent 8453 (Santa Clara, CA.) mediante dilución volumétrica de muestra a aproximadamente 0,5 mg/ml con solución salina al 0,9 %. Las muestras se ajustaron frente a un blanco de solución salina al 0,9 % y se midió la absorbancia a la $A_{\text{máx}}$ de aproximadamente 280 nm y también a 320 nm. La diferencia entre $A_{\text{máx}}$ y A_{320} se calculó para obtener la $A_{\text{máx}}$ corregida utilizada para determinar la concentración final de proteína con una absortividad de $1,5 \text{ ml}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$.

Mediciones de turbidez

15 La densidad óptica promedio a 350 nm de las muestras se midió en una cubeta de cuarzo con una trayectoria de 1 cm en un espectrofotómetro Agilent 8453. Se usó agua purificada como blanco.

Procedimiento de oscurecimiento de luz para partículas subvisibles (ensayo HIAC)

20 Se realizaron recuentos de partículas de las muestras usando el oscurecimiento de la luz medido por el HIAC-Royco modelo 9703 (HACH, Loveland, CO.). Los valores acumulados promedio de partículas por mililitro $\geq 2 \mu\text{m}$, $\geq 5 \mu\text{m}$, $\geq 10 \mu\text{m}$ y $\geq 25 \mu\text{m}$ se tabularon para cada muestra utilizando PharmSpec v2.0. Se realizaron cuatro lecturas por prueba, que consumieron un total de 1,6 ml de cada muestra, con la primera lectura descartada y las 3 lecturas restantes promediadas.

Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC o SE-HPLC)

25 La distribución de la variante de tamaño se determinó mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) usando una columna G3000 SWXL de TosoHaas Bioscience (South San Francisco, CA.) a 30 °C en un HPLC Agilent 1200 (Santa Clara, CA., EE. UU.). Todas las muestras se inyectaron sin diluir a 50 μg en la columna y se eluyeron durante 60 minutos con absorción UV a 280 nm. Se utilizaron dos procedimientos SEC diferentes para las pruebas de las muestras. El procedimiento 1 usó fosfato de potasio 0,20 M, cloruro de potasio 0,25 M, pH 6,2, mientras que el procedimiento 2 usó fosfato de potasio 0,20 M, cloruro de potasio 0,25 M, pH 6,2 con isopropanol al 10 % (v/v) como la fase móvil. Los resultados se informan como porcentaje del área de pico con respecto al área total bajo la curva.

Isoelectroenfoque capilar por imágenes (iCIEF)

30 La distribución de las variantes de carga se evaluó mediante iCIEF utilizando un analizador iCE280 (ProteinSimple) con un cartucho capilar recubierto de fluorocarbono (100 μm x 5 cm). La solución de anfólito consistió en una mezcla de metilcelulosa (MC) al 0,35 %, anfólitos portadores Pharmalyte 3-10 al 0,75 %, anfólitos portadores Pharmalyte 8-10,5 al 4,2 % y marcador de pI 7,40 al 0,2 % y marcador de pI 9,77 al 0,15 % en agua purificada. El anfólito era ácido fosfórico 80 mM y el católito era hidróxido sódico 100 mM, ambos en metilcelulosa al 0,10 %. Las muestras se diluyeron en agua purificada y se añadió CpB a cada muestra diluida en una proporción de enzima a sustrato de 1:100, seguido de incubación a 37 °C durante 20 minutos. Las muestras tratadas con CpB se mezclaron con la solución de anfólito y, a continuación, se enfocaron introduciendo un potencial de 1500 V durante un minuto, seguido de un potencial de 3000 V durante 10 minutos. Se obtuvo una imagen de las variantes de carga de α -PDL1 enfocadas pasando luz ultravioleta de 280 nm a través del capilar y dentro de la lente de una cámara digital con dispositivo de carga acoplado. Esta imagen fue analizada a continuación para determinar la distribución de las diferentes variantes de carga.

Mapeo de péptidos

35 Se usó una técnica de mapeo de péptidos para controlar la oxidación de triptófano (W) y metionina (M). Para generar mapas de péptidos de α -PDL1, la proteína se digirió con tripsina después de exponer la proteína a ditioneitol (DTT) y ácido yodoacético (IAA), en un procedimiento que reduce los enlaces disulfuro y altera los tioles libres resultantes para producir derivados de carboximetilo. Los péptidos resultantes se separaron por cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa (RP-HPLC) y se monitorizaron a 214 nm. Las masas de los péptidos tripticos se determinaron mediante análisis LC-MS de la mezcla de digestión separada usando un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap de ThermoFisher Scientific.

Resultados

Selección del sistema de tampón

Durante el desarrollo de la formulación se evaluaron dos sistemas de tampón. Uno era acetato de histidina 20 mM con sacarosa 240 mM a pH 5,5, el otro era succinato de arginina 200 mM a pH 5,5. El estudio de estabilidad acelerada reveló que α -PDL1 tiene mayor estabilidad en el tampón de acetato de histidina en comparación con el tampón de succinato de arginina (tabla 1). Por lo tanto, se eligió acetato de histidina para el posterior desarrollo de formulaciones.

Tabla 1. Tasas de degradación de orden cero de α -PDL1 para el pico principal en iCIEF y SE-HPLC en tampones de acetato de histidina y succinato de arginina a 30 °C

Tampones	Tasa de % de disminución del pico principal al mes a 30 °C	
	iCIEF	SE-HPLC
Acetato de histidina*	5,7	1,0
Succinato de arginina**	17,6	1,5

Nota: Todas las formulaciones se almacenaron durante hasta 1 mes a 30 °C. El análisis se realizó usando iCIEF y SE-HPLC; * 150 mg/ml de α -PDL1 en acetato de L-histidina 20 mM, sacarosa 240 mM y polisorbato 20 al 0,02 % (p/v) a pH 5,5; ** 150 mg/ml de α -PDL1 en succinato de arginina 200 mM, polisorbato 20 al 0,02 % (p/v) a pH 5,5.

Selección del estabilizador

La sacarosa (120 mM) se seleccionó como el estabilizador para la formulación líquida de α -PDL1 en base a de su capacidad para proteger a la proteína de la agregación inducida por congelación/descongelación, así como para funcionar como un crioprotector durante el almacenamiento congelado a largo plazo de la sustancia farmacéutica (DS) y el posterior almacenamiento de la especialidad farmacéutica (DP) a 2 °C-8 °C.

Durante el desarrollo de la formulación, el α -PDL1 a 50 mg/ml en acetato de L-histidina 20 mM, pH 5,5, polisorbato 20 al 0,02 % (p/v) y diversas concentraciones de sacarosa que varían de 0 mM a 120 mM se sometieron a cinco ciclos de congelación/descongelación. La calidad del producto medida por SE-HPLC indicó que la sacarosa 60 mM era suficiente para evitar un incremento de HMWS de α -PDL1 inducido por congelación/descongelación (tabla 2). Además, se demostró que la sacarosa 120 mM mantiene la estabilidad de la sustancia farmacéutica cuando se almacena congelada a -20 °C durante al menos 6 meses (tabla 3). Por lo tanto, en base a los resultados de los estudios de congelación/descongelación, así como a la estabilidad a largo plazo de la sustancia farmacéutica almacenada a -20 °C, se eligió sacarosa a una concentración de 120 mM como el crioprotector para la formulación líquida de α -PDL1.

Tabla 2. Efecto de la concentración de sacarosa sobre la estabilidad del porcentaje en SE-HPLC de especies de alto peso molecular de α -PDL1 durante la congelación y descongelación

Conc. sacarosa (mM)	Ciclos F/T	SE-HPLC		CAC	pH
		% de HMWS	% de monómero		
T0	NA	1,2	98,8	SY, CL, PFVP	5,6
0 mM	5	1,4	98,6	SY, CL, PFVP	5,7
60 mM	5	1,2	98,8	SY, CL, PFVP	5,7
120 mM	5	1,2	98,8	SY, CL, PFVP	5,6

Nota: Todas las formulaciones contenían 50 mg/ml de α -PDL1, acetato de L-histidina 20 mM, polisorbato 20 al 0,02 % (p/v), pH 5,5. El análisis se realizó usando SE-HPLC; F/T = congelación/descongelación; HMWS = especies de alto peso molecular; SY = ligeramente amarillo; CL = transparente; PFVP = prácticamente libre de partículas visibles.

Tabla 3. Datos de estabilidad a largo plazo para el lote de desarrollo de la sustancia farmacéutica α-PDL1

Temp. (°C)	Tiempo (días/meses)	Q12005 CAC	Q12003 pH	Q12398 Concentración (mg/ml)	Q12631 ICIEF			Q12589 SEC			Q12695 CE-SDS-NGS (no reducido)			Q12708 Potencia (potencia relativa en %)
					Región ácida (% área)	Pico principal (% área)	Región básica (% área)	Suma de formas de HMW (% área)	Pico monómero (% área)	Suma de formas de LMW (% área)	Suma de pre-picos (% CPA)	Pico principal (% CPA)	Suma de post-picos (% CPA)	
NA	T = 0/0	SY, CL, PFVP	5,9	60,1	17,3	79,7	3,0	0,7	99,2	0,1	2,7	97,0	0,3	107
-20 °C	30/1	SY, CL, PFVP	5,9	62,9	16,9	80,2	2,9	0,6	99,3	0,1	2,8	97,0	0,2	109
-20 °C	61/2	SY, CL, PFVP	5,9	61,4	16,5	80,8	2,7	0,6	99,4	0,1	2,5	97,3	0,3	NT
-20 °C	91/3	SY, CL, PFVP	5,9	62,5	18,1	79,0	3,0	0,6	99,3	0,1	2,8	97,1	0,2	96
-20 °C	183/6	SY, CL, PFVP	5,9	61,1	17,9	79,0	3,1	0,6	99,4	0,1	3,1	96,6	0,3	100
5 °C	30/1	SY, CL, PFVP	5,9	61,1	18,1	79,0	2,9	0,7	99,2	0,1	2,6	97,0	0,4	101
5 °C	61/2	SY, CL, PFVP	5,9	62,3	17,4	79,8	2,8	0,8	99,2	0,1	2,9	96,7	0,4	NT
5 °C	91/3	SY, CL, PFVP	5,9	63,9	17,4	80,1	2,5	0,9	99,0	0,1	3,0	96,5	0,5	107
5 °C	183/6	SY, CL, PFVP	5,9	59,5	19,7	77,4	3,0	1,1	98,8	0,1	3,3	95,9	0,8	102

Nota: Todas las formulaciones contenían 60 mg/ml de α-PDL1 en acetato de L-histidina 20 mM, sacarosa 120 mM, PS20 al 0,04 %, pH 5,8. Se utilizaron minicaps de acero inoxidable 316L de 25 cc para este estudio; NA = no aplicable; CAC = color, apariencia y claridad; SY = ligeramente amarillo, CL = transparente, PFVP = prácticamente libre de partículas visibles; HMW = alto peso molecular; LMW = bajo peso molecular; ICIEF = isoelectroforesis capilar por imágenes; CE-SDS = electroforesis capilar con dodecilsulfato de sodio; NT = no sometido a prueba; TBD = por determinar.

Estudios de consistencia previos a la formulación: Selección de concentración de proteínas, pH y concentración de polisorbato 20

Se utilizó un diseño de experimentos (DOE) factorial fraccionado para examinar adicionalmente los efectos de los parámetros de la formulación de α -PDL1 sobre la estabilidad de las proteínas. Se sometieron a prueba un total de doce formulaciones diferentes de α -PDL1 (diez experimentos y dos puntos centrales). Los tres factores modificados en el estudio fueron el intervalo de pH de 5,0 a 6,0 con intervalos de 0,5 unidades, el intervalo de concentración de proteína de 40 a 120 mg/ml y el intervalo de concentración de polisorbato 20 de 0,005 % a 0,06 % (p/v) (tabla 4). Todas las formulaciones se tamponaron con acetato de histidina 20 mM con sacarosa 120 mM, excepto las dos últimas formulaciones como se indica en la tabla 4. Se evaluó la formulación con acetato de histidina 25 mM, ya que se consideraba el peor de los casos en términos de riesgo de oxidación. El tampón de acetato de sodio 20 mM se evaluó como un sistema de tampón de respaldo y se comparó con el tampón de acetato de histidina. Las formulaciones se almacenaron a 25 °C durante 2 meses y a 40 °C durante 1 mes. Los datos de estabilidad de los estudios anteriores se analizaron estadísticamente para evaluar las interacciones entre los parámetros de la formulación utilizando el software JMP (JMP, Versión 9, SAS Institute Inc., Cary, NC).

Tabla 4. Formulaciones de sustancia farmacéutica y especialidad farmacéutica de α -PDL1 evaluadas en el estudio DOE

Formulación	anti-PDL1 (mg/ml)	pH de solución	PS20 (% p/v)	Acetato de histidina (mM)	Sacarosa (mM)
F1 ^a	50	5,5	0,04	20	120
F2 ^a	100	5,5	0,04	20	120
F3	40	6,0	0,06	20	120
F4	120	5,0	0,06	20	120
F5	120	6,0	0,005	20	120
F6	40	5,0	0,06	20	120
F7	120	5,0	0,005	20	120
F8	40	6,0	0,005	20	120
F9	40	5,0	0,005	20	120
F10	120	6,0	0,06	20	120
F11 ^b	50	5,5	0,06	25	120
F12 ^c	50	5,5	0,04	20 (AcONa)	120

Nota: ^a puntos centrales; ^b El peor de los casos: baja concentración de proteínas, alta concentración de PS20, alta concentración de histidina; ^c Se sometió a prueba un tampón de acetato de sodio 20 mM (AcONa).

En comparación con el pH 5,0 y 5,5, la formulación a pH 6,0 tiene una tasa de pérdida del pico principal ligeramente más lenta, según lo determinado por iCIEF a 40 °C y a 25 °C (FIG. 1A-B y FIG. 2A-B, respectivamente). El iCIEF no observó un impacto significativo de la concentración sobre la pérdida del pico principal. El análisis de la formulación F1 mostró que un incremento de la variante ácida contribuyó principalmente a la pérdida del pico principal en iCIEF, mientras que la contribución a la pérdida del pico por una variante de carga básica no fue significativa. En las mismas condiciones de almacenamiento, la formulación a pH 6,0 también tenía una tasa de pérdida del pico de monómero más lenta, medida por SE-HPLC a 40 °C y a 25 °C (FIG. 3A-B y FIG. 4A-B, respectivamente). El análisis de la formulación F1 mostró que tanto la formación de HMWS como de LMWS contribuyeron a la pérdida de monómero en SEC a temperaturas elevadas (es decir, 40 °C y 25 °C). Los perfiles de tasa de pH tanto en SEC como en iCIEF revelaron que el pH 5,5-6,0 es el intervalo de pH óptimo para α -PDF1. Para estar dentro de una estabilidad óptima de las proteínas por encima de pH 5,5 y permitir un intervalo de $\pm 0,3$ unidades de pH en la sustancia farmacéutica y la especialidad farmacéutica formuladas, se eligió un objetivo de pH de 5,8.

Los estudios de formulación anteriores también revelaron que las formulaciones de 120 mg/ml de α -PDL1 en un intervalo de pH de 5,0 a 6,0 tenían una tasa de pérdida del pico de monómero ligeramente mayor pero no significativa debido a una mayor tasa de formación de HMWS en comparación con las formulaciones de 40 mg/ml al mismo pH, determinado por SE-HPLC (FIG. 3A-B y FIG. 4A-B). En base a estos datos y para respaldar una formulación con una estabilidad mejorada del producto y facilitar la dosificación del paciente, se seleccionó α -PDL1 a una concentración de 60 mg/ml.

No se observó impacto sobre la estabilidad de proteínas con concentraciones de polisorbato 20 (PS20) que varían del 0,005 % al 0,06 % (p/v) como se indica en el análisis estadístico anterior (FIG. 1-4).

Se sabe que la impureza de peróxido de hidrógeno contenida en la materia prima de polisorbato 20 puede causar oxidación de triptófano (W) y de metionina (M). La L-histidina también puede incrementar el riesgo de oxidación

anterior. Las muestras de formulaciones del peor de los casos seleccionadas que contenían concentraciones más altas de polisorbato 20 y L-histidina se analizaron mediante mapeo de péptidos. Los resultados del análisis mostraron que incluso la combinación de una mayor concentración de histidina (tampón de acetato de histidina 25 mM) y una mayor cantidad de PS20 (PS20 al 0,06 %) no demostró un riesgo de oxidación significativo (tabla 5) y que el tampón de histidina es adecuado para su uso para formular α -PDL1.

Tabla 5. Porcentaje de oxidación de Trp y M²⁵³ en formulaciones seleccionadas mediante mapa de péptidos

	Formulaciones seleccionadas				% de oxidación			
	Conc. (mg/ml)	Tampón (mM)	PS20 (%)	Puntos temporales	W CDR HC2	W CDR HC4	W CDR HC10	LC27 M253
F1	50	His-AcO 20 mM	0,04	T0	0,1	0,1	0,1	5,5
F3	40	His-AcO 20 mM	0,06	25 °C, 2 meses	0,2	0,2	0,2	6,4
F10	120	His-AcO 20 mM	0,06	25 °C, 2 meses	0,2	0,1	0,2	6,7
F11	50	His-AcO 25 mM	0,06	25 °C, 2 meses	0,2	0,2	0,2	6,6

10 Nota: Todas las formulaciones se almacenaron durante hasta 1 mes a 40 °C. El análisis se realizó utilizando el mapa de péptidos.

W = triptófano; M = metionina

15 Para evaluar la posible degradación de PS20 en la formulación tras el almacenamiento, las formulaciones F1 a F10 (tabla 4) se almacenaron a 40 °C durante 1 mes, 25 °C durante 2 meses, 5 °C durante 2 meses o 5 °C durante 6 meses. No se observó degradación de PS20 en las formulaciones evaluadas a ninguna de las temperaturas de almacenamiento elevadas (es decir, 40 °C y 25 °C) y 5 °C. Alterar el volumen de llenado de las formulaciones seleccionadas (es decir, F1, F2, F3 y F6) hasta 7 ml (llenado alto) o 4 ml (llenado bajo) y a continuación almacenar a 5 °C durante 6 meses tampoco tuvo un impacto significativo sobre la tasa de degradación de PS20 (FIG. 5).

20 El ensayo HIAC evaluó la formación de partículas subvisibles (SbVP) en las diferentes formulaciones cuando se almacenaron a 5 °C durante 6 meses como una medida de estabilidad (tabla 6). No se observó ningún cambio medible en SbVP en la formulación sometida a prueba.

Tabla 6. Datos de HIAC para la formación de SbVP después de 6 meses de almacenamiento a 5 °C

Muestra	Punto temporal (mes)	Tamaño de partícula (recuentos acumulados/ml)			
		2 μ M	5 μ M	10 μ M	25 μ M
F1	0	802	193	61	5
	6	1190	278	80	6
F2	0	799	146	43	12
	6	370	112	29	2
F3	0	485	133	34	4
	6	163	52	14	2
F4	0	211	65	31	8
	6	181	48	8	1
F5	0	872	359	195	79
	6	340	89	23	1
F6	0	233	61	16	3
	6	116	34	16	3
F7	0	134	29	13	4
	6	144	42	9	0
F8	0	433	118	34	1
	6	564	98	23	2
F9	0	498	114	17	1
	6	144	21	6	0

Muestra	Punto temporal (mes)	Tamaño de partícula (recuentos acumulados/ml)			
		2 µM	5 µM	10 µM	25 µM
F10	0	610	124	23	0
	6	248	75	28	3

Nota: Se combinaron dos viales con 1 ml de formulación para realizar un ensayo HIAC de pequeño volumen.

5 La estabilidad de las formulaciones se investigó adicionalmente con un experimento de congelación/descongelación. Las formulaciones F1 a F10 (tabla 4) se sometieron a cinco ciclos de congelación/descongelación durante el almacenamiento a -20 °C o se almacenaron a una temperatura de almacenamiento elevada de 5 °C de 0 a 6 meses y posteriormente se analizaron por SEC e iCIEF para determinar el porcentaje de monómero de α-PDL1 (FIG. 6A y B) y porcentaje del pico principal en la formulación (FIG. 6C y D). No se observó ningún cambio significativo en el porcentaje de monómero y el porcentaje de pico principal después de los ciclos de congelación/descongelación y del almacenamiento en los puntos temporales indicados.

10 La estabilidad de la sustancia farmacéutica en la formulación F2 (tabla 4) se evaluó llevando a cabo cinco ciclos de congelación/descongelación durante el almacenamiento en un minican de acero inoxidable a -20 °C durante hasta 6 meses, seguido de la medición de estabilidad por CAC, SEC e iCIEF (tabla 7). No se observaron cambios después de 6 meses de almacenamiento a -20 °C.

Tabla 7. Estabilidad de la sustancia farmacéutica en un minican de acero inoxidable almacenado a -20 °C

Puntos temporales	Ciclos F/T	Q12005 CAC Claridad	Q12589 SEC (% de monómero)	Q12631 iCIEF (% de pico principal)
T0	0	CL/SY	98,6	80,1
1 mes	1	CL/SY	98,6	79,1
2 meses	2	CL/SY	98,7	80,2
3 meses	3	CL/SY	98,8	80,9
6 meses	5	CL/SY	98,6	80,2

20 Nota: F/T = congelación/descongelación; SY = ligeramente amarillo; CL = transparente.

25 La estabilidad de la sustancia farmacéutica en una formulación que contenía 100 mg/ml de α-PDL1, acetato de histidina 20 mM, sacarosa 120 mM, PS20 al 0,04 %, pH 5,6 se evaluó mediante llevando a cabo tres ciclos de congelación/descongelación seguidos de almacenamiento en un minican de acero inoxidable o Hastelloy a -20 °C, 5 °C o 25 °C durante hasta 3 meses, seguido de la medición de estabilidad por SEC (FIG. 7A y B). No se observó diferencia entre el almacenamiento en minicans de acero inoxidable y de Hastelloy a pH 5,6. La sustancia farmacéutica fue estable durante hasta 3 meses a -20 °C después de tres ciclos de congelación/descongelación. A pesar de las ligeras diferencias en los minicans de acero inoxidable y Hastelloy, ambos fueron apropiados para su uso para el almacenamiento de la sustancia farmacéutica.

30 La estabilidad de la especialidad farmacéutica en una formulación que contenía 50 mg/ml de α-PDL1, acetato de histidina 20 mM, sacarosa 120 mM, PS20 al 0,04 %, pH 5,6 se evaluó cuando se almacenaron 16 ml en un vial de 20 cc a -5 °C, 25 °C, o 40 °C durante hasta 3 meses, seguido de medición de la estabilidad con SEC e iCIEF (FIG. 8A y B). No se observaron cambios a 5 °C después de tres meses de almacenamiento. La tasa de degradación a pH 5,6 por mes a 40 °C fue de un 0,66 % y de un 22 % por análisis SEC e iCIEF, respectivamente.

35 La evaluación del tampón en la formulación de F12 indicó que el tampón de acetato de sodio proporcionó una estabilidad de las proteínas similar a la del tampón de acetato de histidina, en base a las tasas de degradación del pico principal medidas por SE-HPLC e iCIEF (tabla 8). Las dos formulaciones sometidas a prueba fueron 50 mg/ml de α-PDL1 en acetato de L-histidina 20 mM, sacarosa 120 mM y polisorbato 20 al 0,04 % (p/v) a pH 5,5 y 0 mg/ml de α-PDL1 en acetato de sodio 20 mM, sacarosa 120 mM y polisorbato 20 al 0,04 % (p/v) a pH 5,5.

Tabla 8. Tasas de degradación de orden cero de α-PDL1 para el pico principal en iCIEF y SE-HPLC en tampones de acetato de histidina y acetato de sodio a 40 °C

Concentración de α-PDL1 (mg/ml)	Tasa de % de disminución del pico principal al mes	
	iCIEF	SE-HPLC
Acetato de histidina	23	0,67
Acetato de sodio	21	0,74

Nota: Todas las formulaciones se almacenaron durante hasta 1 mes a 40 °C.

En general, los estudios de estabilidad diseñados por DoE revelaron que, a 40 °C, no se observó por iCIEF un impacto significativo de la concentración sobre la pérdida del pico principal, mientras que un pH más bajo tiene una pérdida ligeramente más rápida del pico principal (FIG. 1A-B). A 40 °C tampoco se observaron interacciones significativas por SE-HPLC; sin embargo, las formulaciones de mayor concentración muestran una pérdida de monómero más rápida (FIG. 3A-B). También se descubrió que un pH más bajo tiene una pérdida de monómero más rápida. Se observaron resultados similares a 25 °C (FIG. 2A-B y FIG. 4A-B). El análisis estadístico no reveló interacciones (enlaces) prácticamente significativas entre ninguno de los parámetros de formulación sometidos a prueba.

Estudios de estrés por agitación y estrés térmico

Se investigó la estabilidad de la especialidad farmacéutica en presencia de concentraciones crecientes de PS20 cuando se sometía a estrés por agitación en viales de vidrio. Se evaluó una formulación que contenía 57 mg/ml en acetato de histidina 20 mM, sacarosa 120 mM, pH 5,5 en viales de vidrio de 2 cc llenados hasta 1 ml con diversas concentraciones de PS20 que variaban del 0,005 % al 0,06 %. Los viales de vidrio se agitaron a 70 rpm durante 3 días a temperatura ambiente antes de la medición de la estabilidad por SEC (FIG. 9A) y mediciones de turbidez (FIG. 9B). La formulación con niveles de PS20 entre 0,005 y 0,06 % no mostró cambios en la estabilidad durante la agitación. Sin embargo, las formulaciones que carecían de PS20 mostraron una mayor pérdida de monómero debido a un incremento de HMWS. En este experimento, el uso de PS20 al 0,005 % fue suficiente para proteger la proteína del estrés por agitación en viales de vidrio.

Se investigó la estabilidad de las formulaciones de la especialidad farmacéutica (tabla 4) cuando se almacenaron a diversas temperaturas y durante diversos tiempos y, a continuación, se sometió a estrés por agitación en viales de vidrio. Las formulaciones F1 - F10 se evaluaron cada una en un vial de vidrio de 2 cc con 1 ml de relleno. Los viales de vidrio se agitaron a 70 rpm durante 1 día a temperatura ambiente antes de la medición de la estabilidad por SEC (FIG. 10). En este experimento, la agitación no tiene ningún impacto sobre la estabilidad de la especialidad farmacéutica cuando se almacena durante un período de tiempo a 40 °C, 25 °C o 5 °C.

Con el fin de respaldar el transporte en bolsas i.v. que a menudo ocurre en entornos hospitalarios, se realizó un estudio de agitación de bolsas i.v. con α-PDL1 formulado en acetato de histidina 20 mM, sacarosa 240 mM, pH 5,5 con polisorbato 20 al 0,005 % - 0,02 % (p/v). Las bolsas i.v. de cloruro de polivinilo (PVC) o poliolefina (PO) de 250 ml más comúnmente disponibles que contenían solución isotónica de cloruro de sodio (NaCl al 0,9 %) se evaluaron inyectando 400-600 mg de soluciones de α-PDL1 y se agitaron usando un agitador orbital a 100 rpm a 5 °C durante hasta 6 horas. Los resultados del estudio respaldaron la dosificación basada en el peso y demostraron que se necesita un mínimo del 0,015 % (p/v) de polisorbato 20 en solución de proteínas para evitar la formación de partículas visibles (relacionadas con la precipitación de proteínas) durante el transporte (tabla 9). Además, para mitigar el riesgo de degradación del polisorbato 20 durante el tiempo de vida útil, la concentración de polisorbato 20 se incrementó del 0,02 % (p/v) al 0,04 % (p/v).

Tabla 9. Estudio de agitación de bolsas i.v. con una cantidad diferente de PS20 en una especialidad farmacéutica (PD) de α-PDL1

% de PS20 en DP	Muestras	CAC	SE-HPLC		Partículas subvisibles (ppml)	
			% de HMWS	% de monómero	≥10 µm	≥25 µm
0,005 %	Bolsa de PO de 250 ml, T0	CO, CL, PFVP	NT	NT	NT	NT
	Bolsa de PO de 250 ml, agitación a 5 °C durante 2 horas	Partículas visibles observadas Experimento detenido	NT	NT	NT	NT
	Bolsa de PVC de 250 ml, T0	CO, CL, PFVP	NT	NT	NT	NT
	Bolsa de PVC de 250 ml, agitación a 5 °C durante 2 horas	Partículas visibles observadas Experimento detenido	NT	NT	NT	NT

0,01 %	Bolsa de PO de 250 ml, T0	CO, CL, PFVP	NT	NT	NT	NT
	Bolsa de PO de 250 ml, agitación a 5 °C durante 2 horas	Partículas visibles observadas Experimento detenido	NT	NT	NT	NT
	Bolsa de PVC de 250 ml, T0	CO, CL, PFVP	NT	NT	NT	NT
	Bolsa de PVC de 250 ml, agitación a 5 °C durante 4 horas	CO, CL, PFVP	NT	NT	NT	NT
0,015 %	Bolsa de PO de 250 ml, T0	CO, CL, PFVP	1,2	98,8	21	2
	Bolsa de PO de 250 ml, agitación a 5 °C durante 4 horas	CO, CL, PFVP	1,3	98,7	195	19
	Bolsa de PVC de 250 ml, T0	CO, CL, PFVP	1,2	98,8	16	0
	Bolsa de PVC de 250 ml, agitación a 5 °C durante 4 horas	CO, CL, PFVP	1,2	98,8	24	2

Nota: Todas las formulaciones contenían 50 mg/ml de α -PDL1 en acetato de L-histidina 20 mM, sacarosa 240 mM a pH 5,5. El análisis se realizó utilizando SE-HPLC. NT = no sometido a prueba; CAC = color, apariencia y claridad; CO = incoloro; CL = transparente; PFVP = Prácticamente libre de partículas visibles.

5

Evaluación de estabilidad de las formulaciones de α -PDL1

Se realizó una prueba de pH adicional en los materiales producidos a partir de un Banco de Células Maestro y un Banco de Células de Trabajo en un intervalo de pH de 5,2 a 6,3 en una formulación que contenía acetato de histidina 20 mM, sacarosa 120 mM y PS20 al 0,04 % (tabla 10). El análisis por SE-HPLC e iCIEF mostró que un pH de 5,7 a 6,3 era química y físicamente bastante estable y que era apropiado un intervalo permitido de pH de 5,5 a 6,3 en la formulación (FIG. 11A y B). Un pH más alto redujo las tasas de degradación del monómero y del pico principal, con tasas que se estabilizan entre aproximadamente pH 5,7 y 6,3.

15 **Tabla 10.** Prueba de pH de las formulaciones

Concentración (mg/ml)	pH	Recipiente	Temperatura (°C)	Puntos temporales
120	5,2, 5,7, 6,0, 6,3	1 ml de relleno en vial de 2 cc	40	T0, 1 semana, 2 semanas, 1 mes
40	5,2, 5,7, 6,0, 6,3	1 ml de relleno en vial de 2 cc	40	T0, 1 semana, 2 semanas, 1 mes

Se investigó el efecto de los excipientes de la formulación sobre la oxidación de triptófano (W) y metionina (M) en formulaciones de α -PDL1. El mapeo de péptidos mostró que no hubo un incremento significativo de la oxidación. Las formulaciones que contenían acetato de histidina 20 mM, sacarosa 120 mM, PS20 al 0,04 % con un pH de solución de 5,8 no mostraron un incremento aparente de la oxidación de triptófano y metionina cuando la formulación se almacenó durante un mes a temperaturas elevadas tanto para la especialidad farmacéutica como para la sustancia farmacéutica (tabla 11).

25 **Tabla 11.** Porcentaje de oxidación de Trp, M²⁵³ y M⁴²⁹ en formulaciones seleccionadas mediante mapa de péptidos

Muestra	% de oxidación				
	W CDR H2	W CDR H4	W CDR H10	M ²⁵³	M ⁴²⁹
DP, 50 mg/ml, T0	0,35	0,26	0,12	4,86	0,92
DP, 50 mg/ml, 40 °C, T = 1 mes	0,63	0,26	0,31	5,85	1,10
DS, 100 mg/ml, SS, 25 °C, T = 1 mes	0,52	0,27	0,28	5,61	1,17

Nota: Todas las formulaciones de α -PDL1 contenían acetato de L-histidina 20 mM, sacarosa 120 mM, PS20 al 0,04 %, pH 5,8.

30

En base a los resultados de estos estudios de formulación y del análisis estadístico, se seleccionó para estudios clínicos una formulación líquida que consistía en 60 mg/ml de α -PDL1 en acetato de histidina 20 mM, sacarosa 120 mM, polisorbato 20 al 0,04 % con un pH objetivo de 5,8.

ES 2 768 614 T3

La dosificación para los ensayos clínicos se realizará como una dosis fija de 1200 mg de α -PDL1 por paciente. Se seleccionó una configuración de vial con un llenado nominal de 20 ml (1200 mg de α -PDL1) en un vial de vidrio de 20 cc para cumplir con el perfil de producto objetivo.

- 5 Los estudios de congelación/descongelación se realizaron con la formulación prevista que contenía 60 mg/ml de α -PDL1 en acetato de L-histidina 20 mM, sacarosa 120 mM y polisorbato 20 al 0,02 % (p/v) a pH 5,8. Los resultados del ensayo después de cinco ciclos de congelación/descongelación confirmaron que la sacarosa a una concentración 120 mM protegía al α -PDL1 contra la agregación inducida por congelación/descongelación (tabla 12). De forma similar, la estabilidad a largo plazo de la formulación líquida prevista indicó que es estable durante más de
- 10 6 meses a 2-8 °C (tabla 13). Se está realizando una monitorización continua durante 36 meses para esta formulación. La formulación objetivo y los intervalos de estudio sometidos a prueba para la sustancia farmacéutica y la especialidad farmacéutica de α -PDL1 se muestran en la tabla 14.

Tabla 12. Datos representativos de estabilidad de congelación/descongelación para el lote de desarrollo de la sustancia farmacéutica α -PDL1

N.º de ciclos de congelación/descongelación	CAC	Concentración (mg/ml)	pH	iCIEF			SE-HPLC				CE-SDS NGS (no reducido)			Potencia (% de actividad específica)
				Región ácida (% área)	Pico principal (% área)	Región básica (% área)	Suma de formas de HMW (% área)	Monómero (% área)	Suma de formas de LMW (% área)	Suma de pre-picos (% CPA)	Pico principal (% CPA)	Suma de post-picos (% CPA)		
NA	CL/SY/PFVP	60,1	5,9	19	78	3	0,5	99,4	0,1	2,9	97,0	0,1	107	
5	CL/SY/PFVP	62,0	5,9	20	77	3	0,5	99,4	0,1	2,7	97,1	0,2	111	

Nota: El lote PP400L-02142013 contenía 60 mg/ml de α -PDL1 en acetato de L-histidina 20 mM, sacarosa 120 mM y polisorbato 20 al 0,04 % (p/v) a pH 5,8.

Tabla 13. Datos de estabilidad para el lote de desarrollo de fármacos de α -PDL1

Temp. (°C)	Tiempo (días/meses)	CAC	pH	Concentración (mg/ml)	CIEF por imágenes			SE-HPLC			CE-SDS NGS (no reducido)			Partículas subvisibles ^a (ppml)		
					Región ácida (% área)	Pico principal (% área)	Región básica (% área)	Suma de formas de HMW (% área)	Pico monómero (% área)	Suma de formas de LMW (% área)	Suma de pre-picos (% CPA)	Pico principal (% CPA)	Suma de post-picos (% CPA)	Potencia (% de actividad específica)	≥ 10 μm	≥ 25 μm
NA	T = 0/0	SY/CL/ PFVP	5,9	59,9	18,1	78,9	2,9	0,6	99,3	0,1	2,7	97,0	0,3	99	37	30
5	30/1	SY/CL/ PFVP	5,9	59,9	18,3	78,6	3,1	0,6	99,3	0,1	2,7	96,9	0,4	NT	26	2
5	61/2	SY/CL/ PFVP	5,9	61,7	18,4	78,9	2,7	0,7	99,3	0,1	2,8	96,9	0,4	NT	3	0
5	91/3	SY/CL/ PFVP	5,9	61,7	17,1	80,1	2,8	0,7	99,2	0,1	2,7	97,0	0,4	102	18	3
5	183/6	SY/CL/ PFVP	5,9	60,8	18,4	78,6	3,0	0,7	99,2	0,1	3,1	96,5	0,4	101	3	0

El lote PP400L-02142013-DP contenía 60 mg/ml de α -PDL1 en acetato de L-histidina 20 mM, sacarosa 120 mM y polisorbato 20 al 0,04 % (p/v) a pH 5,8. NA = no aplicable; CAC = color, apariencia y claridad; SY = ligeramente amarillo, CL = transparente, PFVP = prácticamente libre de partículas visibles; HMW = alto peso molecular; LMW = bajo peso molecular; iCIEF = isoelectrofoque capilar por imágenes; CE-SDS = electroforesis capilar con dodecilsulfato de sodio; NT = no sometido a prueba.

Tabla 14. Formulación objetivo e intervalos de estudio sometidos a prueba para la sustancia farmacéutica y la especialidad farmacéutica de α -PDL1

Parámetro	Objetivo	Intervalo de formulación sometido a prueba
Concentración de α -PDL1	60 mg/ml	40-120 mg/ml
Concentración de acetato de L-histidina	20 mM	20 mM
pH de solución	5,8	5,0-6,0
Concentración de sacarosa	120 mM	0-240 mM
Concentración de polisorbato 20 (p/v)	0,04 %	0,005 %-0,06 % ^a

5 Dado que la especialidad farmacéutica de α -PDL1 (60 mg/ml) se administrará por infusión después de la dilución en solución isotónica de cloruro de sodio (NaCl al 0,9 %), la compatibilidad y la estabilidad del ingrediente activo se sometieron a prueba en las siguientes condiciones de preparación y administración simuladas: 1) Dilución de la especialidad farmacéutica de α -PDL1 en bolsas de infusión que contienen NaCl al 0,9 % en el intervalo de 2,4 - 10 9,6 mg/ml (concentración nominal después de la dilución) para cubrir el intervalo de dosis en el estudio clínico; 2) Exposición a corto plazo a bolsas de infusión que contienen solución isotónica de cloruro de sodio (material de la superficie de contacto con el producto de la bolsa que consiste en PVC o poliolefina); 3) Uso de líneas de infusión i.v. con superficies en contacto con el producto de PVC o poliolefina; y 4) Uso de filtros en línea de 0,2 μ m (membrana de filtro de PES).

15 Las muestras se sometieron a prueba después de 24 horas de almacenamiento a 2 °C-8 °C o después de 24 horas a 30 °C con exposición a luz difusa. Las muestras se sometieron a prueba utilizando procedimientos indicativos de estabilidad apropiados que incluyen: pureza por SE-HPLC e iCIEF, concentración de proteínas (por UV), partículas subvisibles por oscurecimiento de la luz, color, claridad/opalescencia y pH (tabla 15).

20

Tabla 15. Estabilidad de α-PDL1 diluido y almacenado a 5 °C o 30 °C durante 24 horas en bolsas de infusión con NaCl al 0,9 % con y sin filtros en línea de 0,2 μm

Muestra	CAC	Concentración (mg/ml)	Turbidez A ₃₅₀	% ácida	% de pico principal	% básica	% de HMWS	SE-HPLC		Partículas (recuentos/ml)		
								% de HMWS	% de monómero	LMWS	pH	≥10 μm
2,4 mg/ml en bolsa de PVC, T0	CL, CO, PFVP	2,1	0,01	19,5	75,7	4,8	0,4	99,5	0,1	5,9	25	1
2,4 mg/ml en bolsa de PVC, t = 5 °C, 24 horas antes de infusión	CL, CO, PFVP	2,2	0,02	19,6	75,5	4,9	0,4	99,5	0,1	5,8	32	0
2,4 mg/ml en bolsa de PVC, t = 30 °C, 24 horas antes de infusión	CL, CO, PFVP	2,2	0,01	19,3	76,6	4,1	0,3	99,5	0,1	5,8	32	0
2,4 mg/ml en bolsa de PVC, t = 5 °C, 24 horas pasando a través del equipo de infusión sin filtro en línea	CL, CO, PFVP	2,1	0,04	19,5	76,4	4,1	0,4	99,5	0,1	5,8	44	1
2,4 mg/ml en bolsa de PVC, t = 5 °C, 24 horas pasando a través del equipo de infusión con filtro en línea	CL, CO, PFVP	2,1	0,01	19,3	76,7	4,1	0,3	99,5	0,1	5,9	4	0
2,4 mg/ml en bolsa de PVC, t = 30 °C, 24 horas pasando a través del equipo de infusión sin filtro en línea	CL, CO, PFVP	2,1	0,02	20,0	75,7	4,3	0,3	99,6	0,1	5,9	29	0
2,4 mg/ml en bolsa de PVC, t = 30 °C, 24 horas pasando a través del equipo de infusión con filtro en línea	CL, CO, PFVP	2,0	0,04	19,5	76,4	4,1	0,3	99,6	0,1	6,0	5	0

Tabla 15 (cont.): Estabilidad de α -PDL1 diluido y almacenado a 5 °C o 30 °C durante 24 horas en bolsas de infusión con NaCl al 0,9 % con y sin filtros en línea de 0,2 μ m

Muestra	CAC	Concentración (mg/ml)	Turbidez A ₃₅₀	iCIEF				SE-HPLC			Partículas (ppml)	
				% ácida	% de pico principal	% básica	% de HMWS	% de HMWS	% de monómero	L _{MWS}	pH	≥10 μ m
2,4 mg/ml en bolsa de PO, T0	CL, CO, PFVP	2,1	0,01	18,6	77,3	4,1	0,4	99,5	0,1	6,1	5	0
2,4 mg/ml en bolsa de PO, t = 5 °C, 24 horas antes de infusión	CL, CO, PFVP	2,1	0,03	17,8	77,8	4,4	0,4	99,5	0,1	5,9	3	0
2,4 mg/ml en bolsa de PO, t = 30 °C, 24 horas antes de infusión	CL, CO, PFVP	2,1	0,02	20,6	75,3	4,1	0,3	99,5	0,1	5,9	8	0
2,4 mg/ml en bolsa de PO, t = 5 °C, 24 horas pasando a través del equipo de infusión sin filtro en línea	CL, CO, PFVP	2,1	0,01	20,5	75,3	4,2	0,4	99,5	0,1	5,9	48	0
2,4 mg/ml en bolsa de PO, t = 5 °C, 24 horas pasando a través del equipo de infusión con filtro en línea	CL, CO, PFVP	2,1	0,02	21,0	74,8	4,3	0,4	99,5	0,1	5,9	1	0
2,4 mg/ml en bolsa de PO, t = 30 °C, 24 horas pasando a través del equipo de infusión sin filtro en línea	CL, CO, PFVP	2,1	0,01	18,7	76,9	4,4	0,3	99,5	0,1	5,9	22	0
2,4 mg/ml en bolsa de PO, t = 30 °C, 24 horas pasando a través del equipo de infusión con filtro en línea	CL, CO, PFVP	2,1	0,01	21,2	73,9	4,9	0,4	99,5	0,1	6,0	0	0

CO = incoloro, CL = transparente, PFVP = prácticamente libre de partículas visibles, A₃₅₀ = absorbancia a 350 nm

Tabla 15 (cont.): Estabilidad de α -PDL 1 diluido y almacenado a 5 °C o 30 °C durante 24 horas en bolsas de infusión con NaCl al 0,9 % con y sin filtros en línea de 0,2 μ m

Muestra	CAC	Concentración (mg/ml)	Turbidez A ₃₅₀	% ácida	% de pico principal	iCIEF			SE-HPLC			Partículas (ppm)		
						% básica	% HMWS	% de monómero	% LMWS	pH	≥10 μ m	≥25 μ m		
9,6 mg/ml en bolsa de PVC, T0	CL, CO, PFVP	8,7	0,05	18,3	77,3	4,4	0,4	99,5	0,1	5,9	35	0		
9,6 mg/ml en bolsa de PVC, t = 5 °C, 24 horas antes de infusión	CL, CO, PFVP	8,6	0,03	19,0	76,8	4,2	0,4	9,5	0,1	5,9	6	1		
9,6 mg/ml en bolsa de PVC, t = 30 °C, 24 horas antes de infusión	CL, CO, PFVP	8,5	0,05	18,9	77,0	4,1	0,4	99,5	0,2	5,9	10	0		
9,6 mg/ml en bolsa de PVC, t = 5 °C, 24 horas pasando a través del equipo de infusión sin filtro en línea	CL, CO, PFVP	8,8	0,03	19,2	76,4	4,4	0,3	99,6	0,1	6,0	29	1		
9,6 mg/ml en bolsa de PVC, t = 5 °C, 24 horas pasando a través del equipo de infusión con filtro en línea	CL, CO, PFVP	8,7	0,06	19,0	77,1	3,9	0,3	99,6	0,1	5,9	18	0		
9,6 mg/ml en bolsa de PVC, t = 30 °C, 24 horas pasando a través del equipo de infusión sin filtro en línea	CL, CO, PFVP	8,1	0,04	19,1	76,6	4,3	0,4	99,5	0,2	6,0	8	0		
9,6 mg/ml en bolsa de PVC, t = 30 °C, 24 horas pasando a través del equipo de infusión con filtro en línea	CL, CO, PFVP	8,8	0,04	19,6	76,4	4,0	0,3	99,6	0,1	5,9	19	2		

Tabla 15 (cont.): Estabilidad de α -PDL1 diluido y almacenado a 5 °C o 30 °C durante 24 horas en bolsas de infusión con NaCl al 0,9 % con y sin filtros en línea de 0,2 μ m

Muestra	CAC	Concentración (mg/ml)	Turbidez A_{350}	iCIEF				SE-HPLC			Partículas (recuentos/ml)	
				% de ácido	% de pico principal	% básica	% HMWS	% de monómero	LMWS	pH	$\geq 10 \mu$ m	$\geq 25 \mu$ m
9,6 mg/ml en bolsa de PO, T0	CL, CO, PFVP	8,4	0,03	18,6	78,0	3,4	0,4	99,5	0,1	5,8	33	2
9,6 mg/ml en bolsa de PO, t = 5 °C, 24 horas antes de infusión	CL, CO, PFVP	8,6	0,04	19,2	76,4	4,4	0,4	9,5	0,1	5,9	32	0
9,6 mg/ml en bolsa de PO, t = 30 °C, 24 horas antes de infusión	CL, CO, PFVP	8,7	0,04	19,3	76,7	4,0	0,4	99,5	0,1	5,9	18	0
9,6 mg/ml en bolsa de PO, t = 5 °C, 24 horas pasando a través del equipo de infusión sin filtro en línea	CL, CO, PFVP	8,5	0,05	19,8	75,8	4,5	0,4	99,5	0,1	5,9	38	1
9,6 mg/ml en bolsa de PO, t = 5 °C, 24 horas pasando a través del equipo de infusión con filtro en línea	CL, CO, PFVP	8,2	0,04	18,6	77,2	4,3	0,3	99,5	0,1	5,8	8	0
9,6 mg/ml en bolsa de PO, t = 30 °C, 24 horas pasando a través del equipo de infusión sin filtro en línea	CL, CO, PFVP	8,5	0,03	19,4	76,0	4,6	0,4	99,5	0,1	5,9	48	7
9,6 mg/ml en bolsa de PO, t = 30 °C, 24 horas pasando a través del equipo de infusión con filtro en línea	CL, CO, PFVP	8,0	0,05	19,7	76,1	4,2	0,3	99,5	0,1	5,8	10	0

CO = incoloro, CL = transparente, PFVP = prácticamente libre de partículas visibles, A_{350} = absorbancia a 350 nm

Tabla 16. Estabilidad frente a agitación de α -PDL1 diluido en bolsas de infusión con NaCl al 0,9 % a 5 °C durante hasta 6 horas

Muestra	CAC	Concentración (mg/ml)	Turbidez A ₃₅₀	iCIEF				SE-HPLC			Partículas (recuentos/ ml)	
				% ácida	% de pico principal	% básica	% de HMWS	% de monómero	% LMWS	pH	≥10 µm	≥25 µm
2,4 mg/ml en bolsa de PO, T0	CL, CO, PFVP	2,13	0,02	17,5	79,1	3,4	0,8	99,1	0,1	5,9	3	0
2,4 mg/ml en bolsa de PO, 2 h de agitación	CL, CO, PFVP	2,09	0,01	17,1	79,8	3,1	0,8	99,1	0,1	5,9	113	2
2,4 mg/ml en bolsa de PO, 4 h de agitación	CL, CO, PFVP	2,12	0,02	17,3	79,6	3,1	0,8	99,1	0,1	5,9	31	0
2,4 mg/ml en bolsa de PO, 6 h de agitación	CL, CO, PFVP	2,02	0,02	16,8	79,6	3,6	0,8	99,1	0,1	5,9	4	1
2,4 mg/ml en bolsa de PVC, T0	CL, CO, PFVP	2,42	0,02	17,9	78,6	3,5	0,8	99,1	0,1	5,9	6	0
2,4 mg/ml en bolsa de PVC, 2 h de agitación	CL, CO, PFVP	2,04	0,02	17,6	79,2	3,2	0,8	99,1	0,1	5,9	22	1
2,4 mg/ml en bolsa de PVC, 4 h de agitación	CL, CO, PFVP	2,10	0,03	18,5	78,0	3,6	0,8	99,1	0,1	5,9	22	1
2,4 mg/ml en bolsa de PVC, 6 h de agitación	CL, CO, PFVP	2,05	0,01	18,6	78,2	3,3	0,8	99,1	0,1	5,9	10	0

CO = incoloro, CL = transparente, PFVP = prácticamente libre de partículas visibles, A₃₅₀ = absorbancia a 350 nm

El producto sometido a prueba en estudios de administración simulados como se describe anteriormente fue física y químicamente estable en las condiciones sometidas a prueba. Las bolsas de infusión, el equipo de infusión, los filtros y/o las ayudas para administración i.v. compuestas de diferentes materiales en contacto con el producto se agregan después de una calificación exitosa.

5 Además de la estabilidad estática, se realiza un estudio de agitación en bolsa i.v. con α -PDL1 formulado en acetato de histidina 20 mM, sacarosa 120 mM, pH 5,8 con PS20 al 0,02 %, que es potencialmente el nivel más bajo de PS20 que se podría observar en la especialidad farmacéutica durante el tiempo de vida útil. La agitación se realiza a 2-8 °C con agitador orbital a una velocidad de 100 rpm. Los datos sugieren que con un 0,02 % de PS20 en la especialidad farmacéutica, el α -PDL1 es estable tras la agitación a 5 °C después de diluir en bolsas i.v. (tabla 16).

Secuencias del anticuerpo usado en los ejemplos

Región variable de la cadena ligera de α -PDL1

15 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTTCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPS
RFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR₂ ID NO: 7)

Región variable de la cadena pesada de α -PDL1

20 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGST
YYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLT
VSSASTK (SEQ ID NO: 8)

Cadena ligera completa de α -PDL1

25 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTTCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPS
RFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTL
TLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 9)

Cadena pesada completa de α -PDL1

30 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGST
YYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLT
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYASTYRVVSVLTVQLHWDWLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 10)

35

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Genentech, Inc.

5 <120> FORMULACIONES DE ANTICUERPOS ANTI-PDL1

<130> 146392022040

<140> Aún sin asignar

10 <141> Conjuntamente con la presente

<150> US 61/883.953

<151> 27/09/2013

15 <160> 36

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

20 <211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Construcción sintética

<400> 1

Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Ser	Thr	Ala	Val	Ala
1				5					10	

30 <210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Construcción sintética

<400> 2

Ser	Ala	Ser	Phe	Leu	Tyr	Ser
1				5		

40 <210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> Construcción sintética

<400> 3

Gln	Gln	Tyr	Leu	Tyr	His	Pro	Ala	Thr
1				5				

50 <210> 4

<211> 10

<212> PRT

55 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

60 <400> 4

Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Ser	Trp	Ile	His
1				5				10	

ES 2 768 614 T3

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

 <220>
 <223> Construcción sintética

 10 <400> 5
Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15
Lys Gly

 <210> 6
 <211> 9
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Construcción sintética

 20 <400> 6
Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr
1 5

 <210> 7
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 30 <223> Construcción sintética

 <400> 7
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

 35 <210> 8
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 40 <223> Construcción sintética

 <400> 8

ES 2 768 614 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
 20 25 30
 Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 115 120

<210> 9
 <211> 214
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

10 <400> 9
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

15 <210> 10
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 20 <223> Construcción sintética

ES 2 768 614 T3

<400> 10
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
 20 25 30
 Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350
 Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

5 <210> 11
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 768 614 T3

<220>
 <223> Construcción sintética

5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 6
 <223> Xaa = D o G

10 <400> 11
 Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Ser Trp Ile His
 1 5 10

<210> 12
 <211> 18
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

20 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 4
 <223> Xaa = S o L

25 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 10
 <223> Xaa = T o S

30 <400> 12
 Ala Trp Ile Xaa Pro Tyr Gly Gly Ser Xaa Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15
 Lys Gly

<210> 13
 35 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 40 <223> Construcción sintética

<400> 13
 Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr
 1 5

45 <210> 14
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 14
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25

55 <210> 15

ES 2 768 614 T3

<211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 15
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 1 5 10
 10 <210> 16
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 16
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
 1 5 10 15
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 20 25 30
 <210> 17
 <211> 11
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Construcción sintética
 30 <400> 17
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 1 5 10
 <210> 18
 <211> 11
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Construcción sintética
 40 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 5
 <223> Xaa = D o V
 45 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 6
 <223> Xaa = V o I
 50 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 7
 <223> Xaa = S o N
 55 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 9
 <223> Xaa = A o F
 60

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 10
 <223> Xaa = V o L
 5
 <400> 18
Arg Ala Ser Gln Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Ala
1 5 10
 <210> 19
 10 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Construcción sintética
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 4
 20 <223> Xaa = F o T
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 6
 25 <223> Xaa = Y o A
 <400> 19
Ser Ala Ser Xaa Leu Xaa Ser
1 5
 30 <210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Construcción sintética
 <220>
 <221> VARIANTE
 40 <222> 3
 <223> Xaa = Y, G, F o S
 <220>
 <221> VARIANTE
 45 <222> 4
 <223> Xaa = L, Y, F o W
 <220>
 <221> VARIANTE
 50 <222> 5
 <223> Xaa = Y, N, A, T, G, F o I
 <220>
 <221> VARIANTE
 55 <222> 6
 <223> Xaa = H, V, P, T o I
 <220>
 <221> VARIANTE
 60 <222> 8
 <223> Xaa = A, W, R, P o T
 <400> 20

ES 2 768 614 T3

Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Thr
 1 5
 <210> 21
 <211> 23
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Construcción sintética
 10 <400> 21
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20
 <210> 22
 15 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Construcción sintética
 <400> 22
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15
 25 <210> 23
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 23
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30
 35 <210> 24
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 24
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 45 1 5 10
 <210> 25
 <211> 10
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Construcción sintética
 55 <400> 25

ES 2 768 614 T3

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser Trp Ile His
1 5 10

5 <210> 26
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 26
Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15
Lys Gly

15 <210> 27
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 27
Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

25 <210> 28
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 28
Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

35 <210> 29
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 29
Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala Thr
1 5

45 <210> 30
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Construcción sintética

55 <400> 30

ES 2 768 614 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
 20 25 30
 Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

5 <210> 31
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 31
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

15 <210> 32
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 32
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
 20 25 30
 Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

ES 2 768 614 T3

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

5 <210> 33
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 33
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

15 <210> 34
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 34
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30

25 <210> 35
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 35
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 1 5 10

35 <210> 36
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 36
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

45

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una formulación farmacéutica acuosa estable, la formulación comprendiendo un anticuerpo monoclonal anti-PDL1 en una concentración de 40 mg/ml a 125 mg/ml, acetato de histidina o acetato de sodio en una concentración de 15 mM a 25 mM, sacarosa en una concentración de 60 mM a 240 mM, polisorbato en una concentración de 0,005 % (p/v) a 0,06 % (p/v), y pH 5,0 a 6,3; en la que dicho anticuerpo monoclonal comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7, y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:32; y en la que dicho anticuerpo monoclonal es un anticuerpo IgG1 humanizado.
- 10 2. La formulación de la reivindicación 1, en la que dicho anticuerpo monoclonal en la formulación está en de 40 mg/ml a 80 mg/ml, de 54 mg/ml a 66 mg/ml, de 60 mg/ml a 125 mg/ml, 60 mg/ml o 125 mg/ml.
- 15 3. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que dicho acetato de histidina o acetato de sodio está en una concentración de 17 mM a 22 mM o 20 mM.
- 20 4. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que dicha sacarosa en la formulación está en de 60 mM a 180 mM o 120 mM.
- 25 5. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la formulación tiene un pH de 5,5 a 6,1, un pH de 5,5 o un pH de 5,8.
- 30 6. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que dicho polisorbato en la formulación es polisorbato 20.
- 35 7. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que dicho polisorbato en la formulación está en del 0,02 % al 0,04 %.
- 40 8. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que dicho anticuerpo monoclonal en la formulación está en 60 mg/ml, la sacarosa en la formulación es 120 mM y el pH es 5,8; dicho anticuerpo monoclonal en la formulación está en 125 mg/ml, la sacarosa en la formulación está en 240 mM y el pH es 5,5; dicho anticuerpo monoclonal está en una cantidad de 60 mg/ml, dicho acetato de histidina está en una concentración de 20 mM, dicha sacarosa está en una concentración de 120 mM y dicho polisorbato es polisorbato 20 en una concentración del 0,04 % (p/v), y dicha formulación tiene un pH de 5,8; o dicho anticuerpo monoclonal está en una cantidad de 125 mg/ml, dicho acetato de histidina está en una concentración de 20 mM, dicha sacarosa está en una concentración de 240 mM y dicho polisorbato es polisorbato 20 en una concentración del 0,02 %, y dicha formulación tiene un pH de 5,5.
- 45 9. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que dicho anticuerpo monoclonal no se somete a liofilización previa.
- 50 10. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que dicho anticuerpo monoclonal comprende: una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10.
- 55 11. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en la que dicho anticuerpo monoclonal se almacena en un vial de vidrio o en un recipiente de aleación metálica, opcionalmente en la que la aleación metálica es acero inoxidable 316L o Hastelloy.
- 60 12. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en la que la formulación es estable a 2-8 °C durante al menos 6 meses, al menos 12 meses, al menos 18 meses o al menos 24 meses.
- 65 13. La formulación de la reivindicación 12, en la que el anticuerpo en la formulación retiene al menos un 80 % de su actividad biológica después del almacenamiento.
14. La formulación de la reivindicación 13, en la que la actividad biológica se mide mediante la unión de anticuerpos a PD-L1.
15. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14 que es estéril.
16. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15 que es adecuada para administrarse a un sujeto, opcionalmente para administración intravenosa (i.v.).

17. Un artículo de fabricación que comprende un recipiente que contiene la formulación farmacéutica acuosa estable de una cualquiera de las reivindicaciones 1-16.

5 18. El artículo de la reivindicación 17, en el que el recipiente es un vial de vidrio o un recipiente de aleación metálica, opcionalmente en el que la aleación metálica es acero inoxidable 316L o Hastelloy.

10 19. Una composición para su uso en un procedimiento para tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto que comprende una cantidad eficaz de la formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en la que la enfermedad o trastorno se selecciona del grupo que consiste en infección, cáncer y enfermedad inflamatoria.

15 20. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en la que el anticuerpo monoclonal comprende una sustitución N297A o D265A/N297A en la región constante, la numeración del residuo es la del índice EU como en Kabat.

FIG. 1A

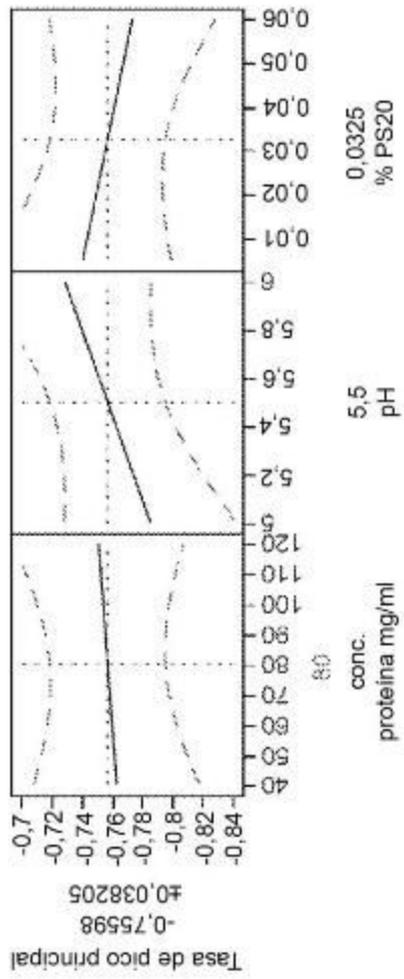


FIG. 1B

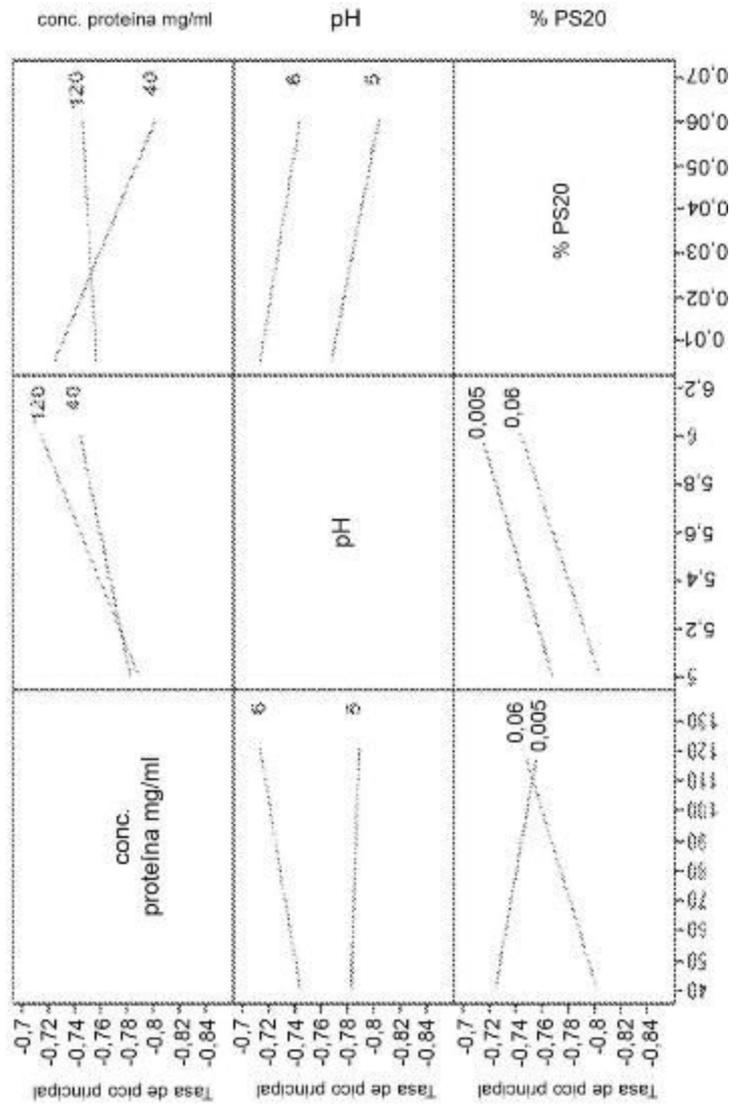


FIG. 2A

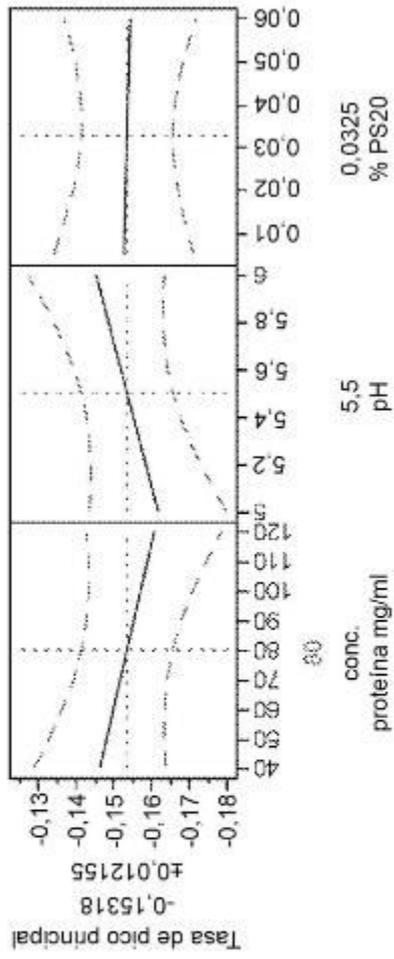


FIG. 2B

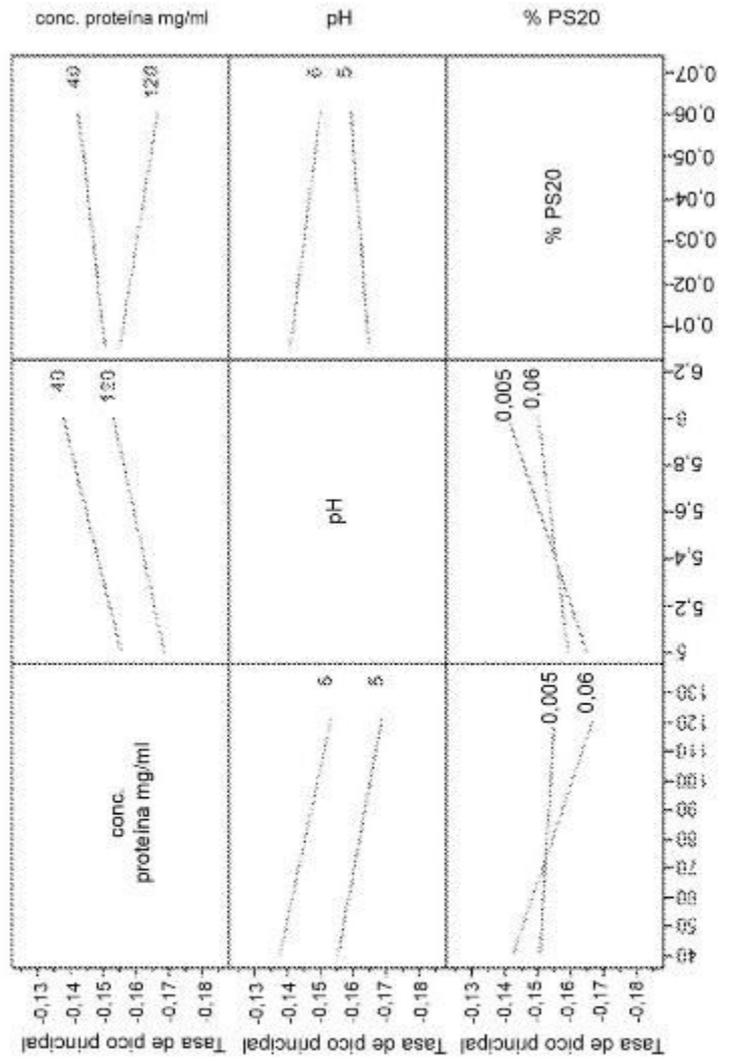


FIG. 3A

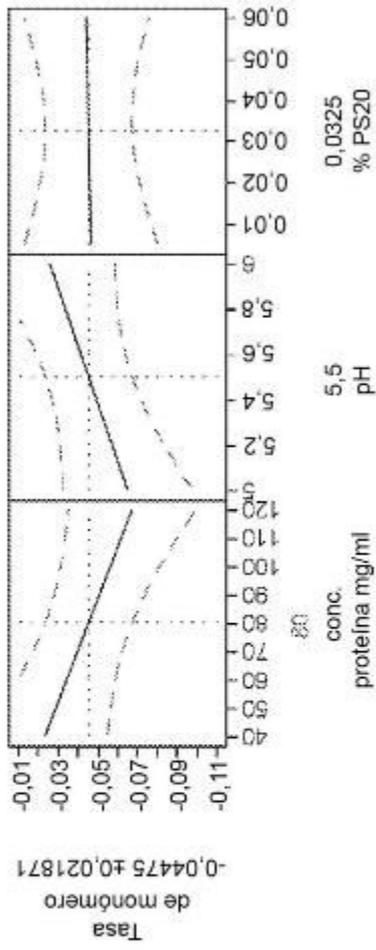


FIG. 3B

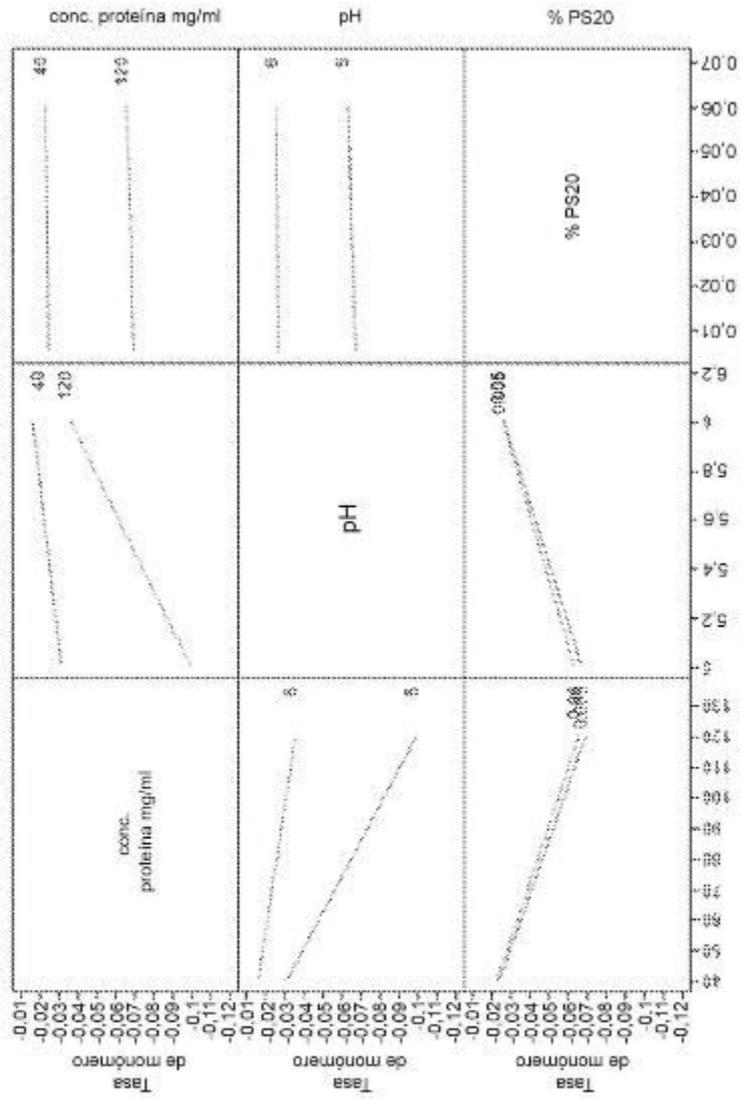


FIG. 4A

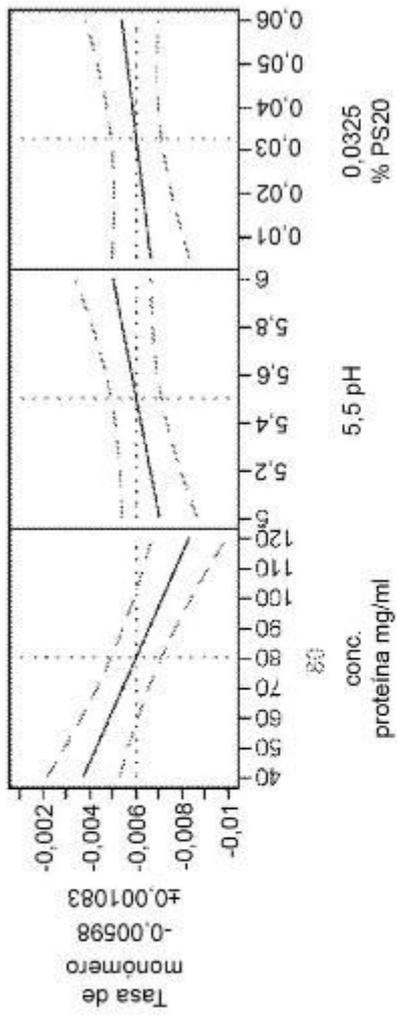


FIG. 4B

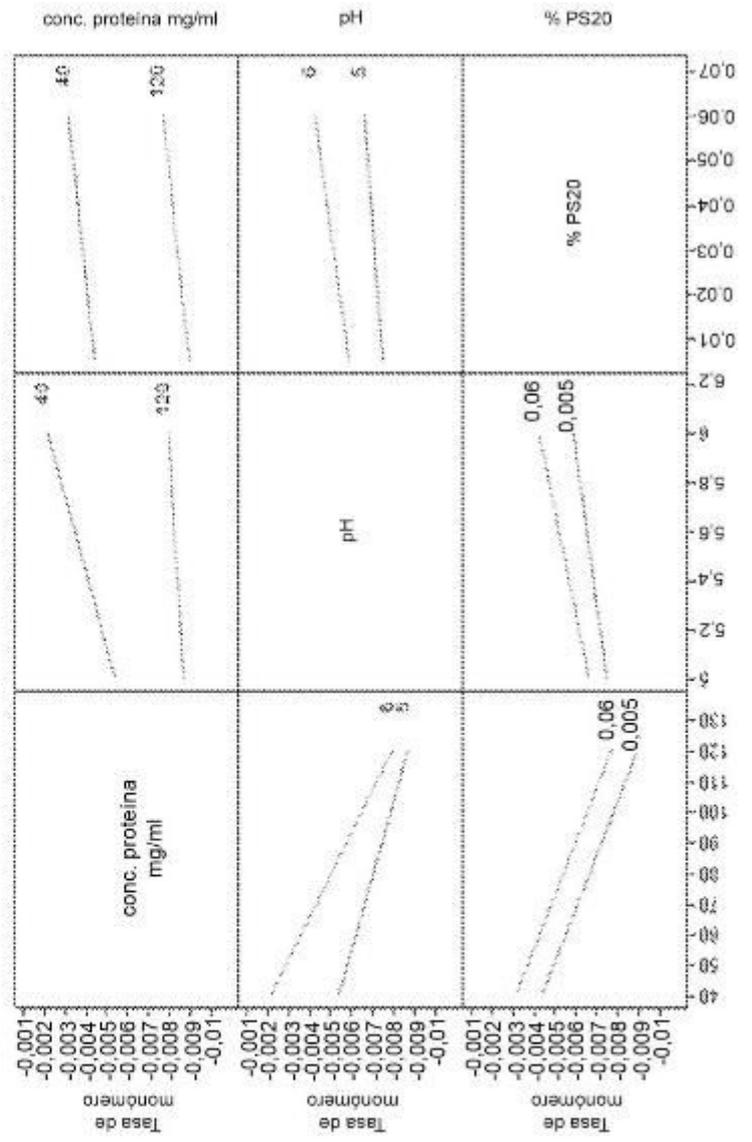


FIG. 5

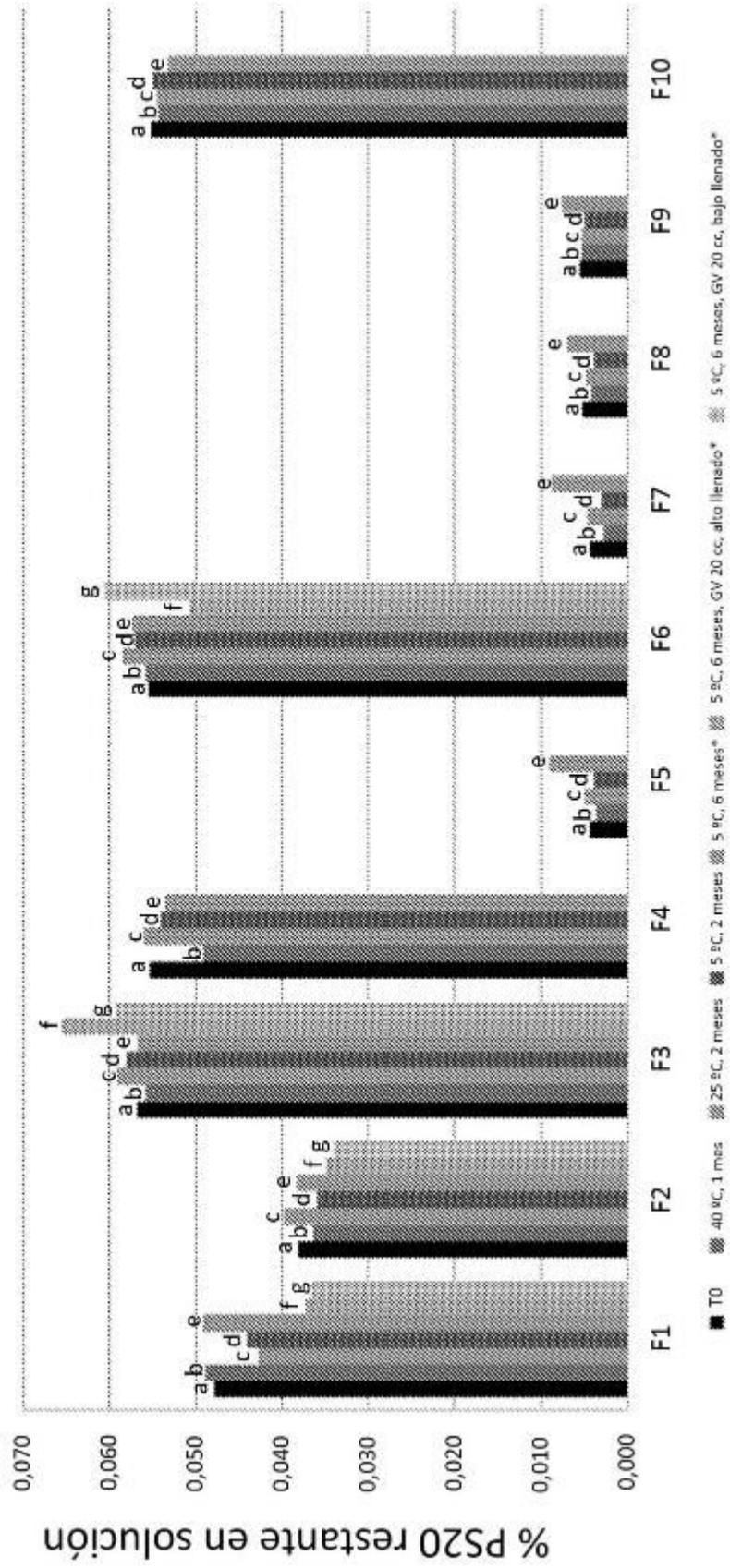


FIG. 6A

% de monómero a -20 °C (en GV)

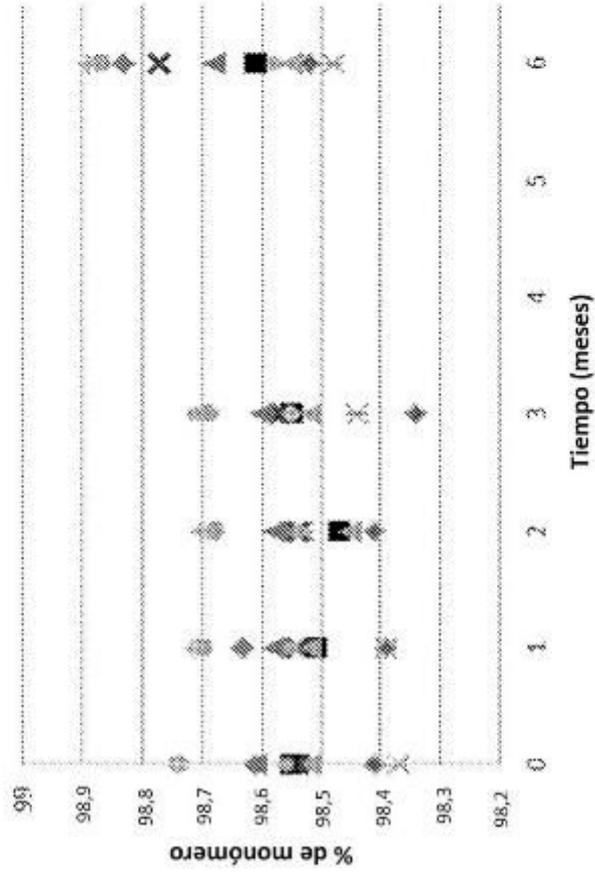


FIG. 6B

% de monómero a 5 °C

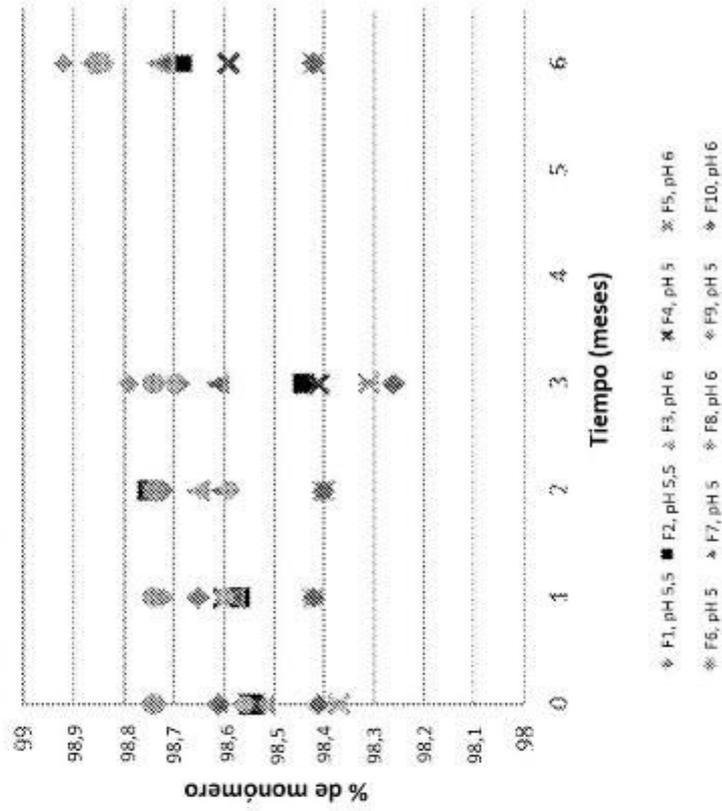


FIG. 6C

% de pico principal a -20 °C en GV

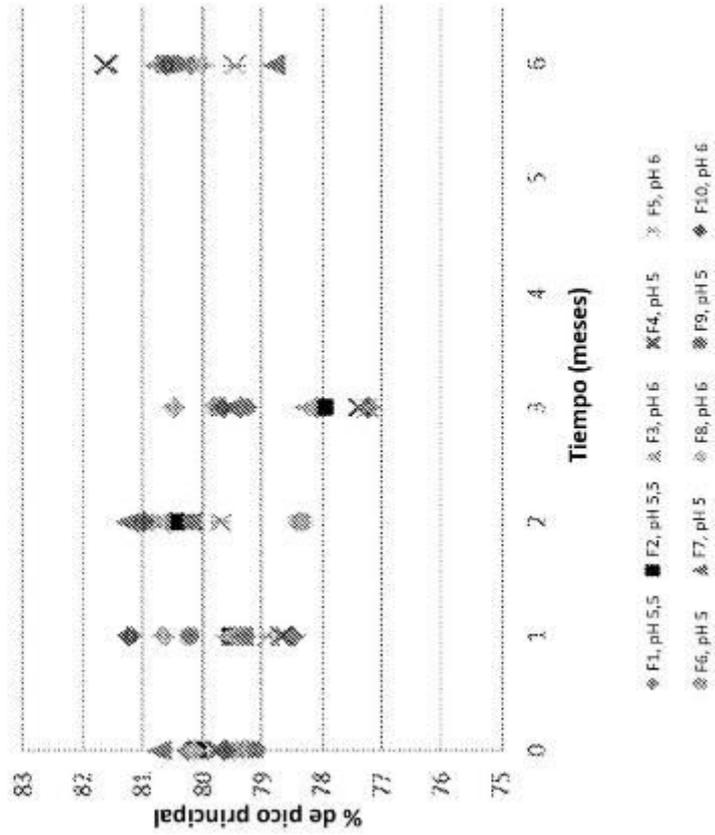


FIG. 6D

% de pico principal a 5 °C

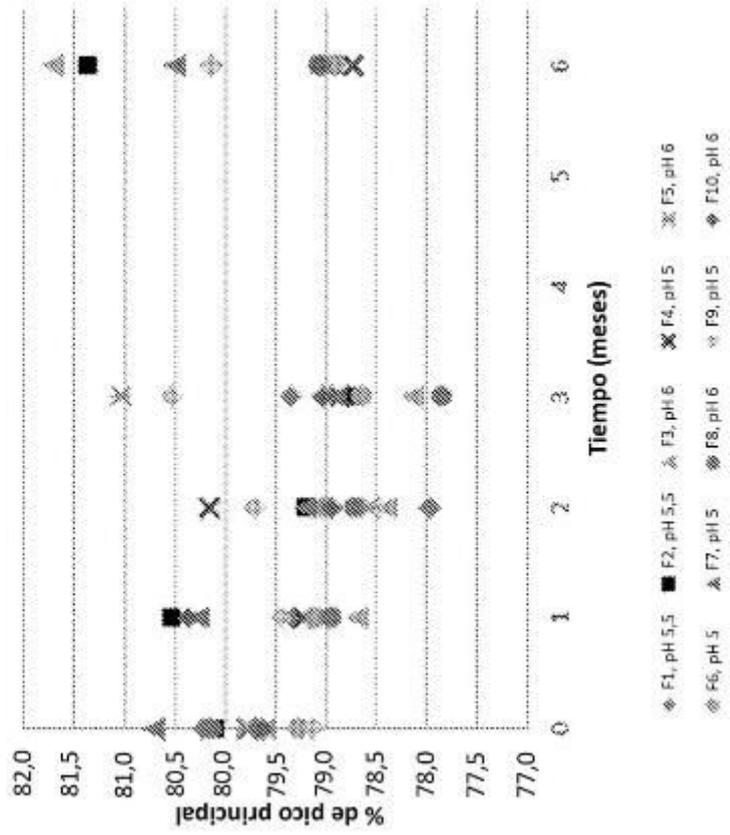


FIG. 7A

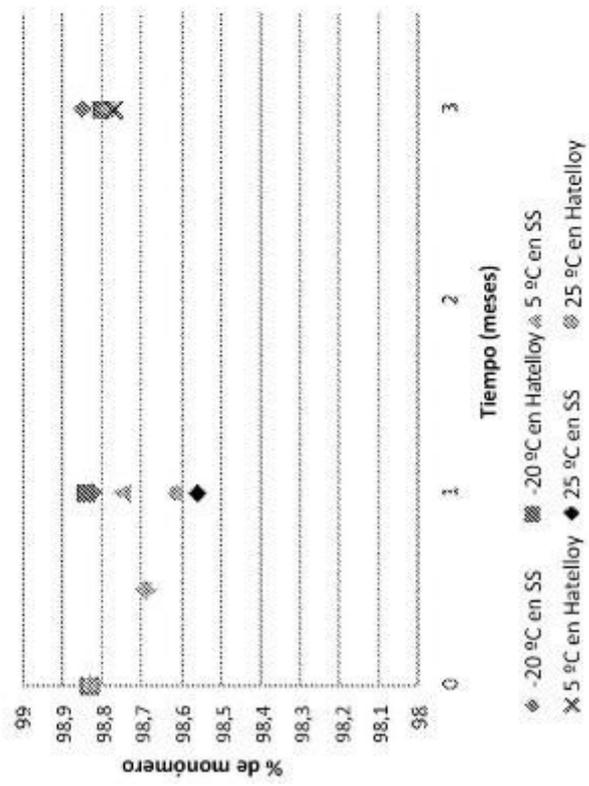


FIG. 7B

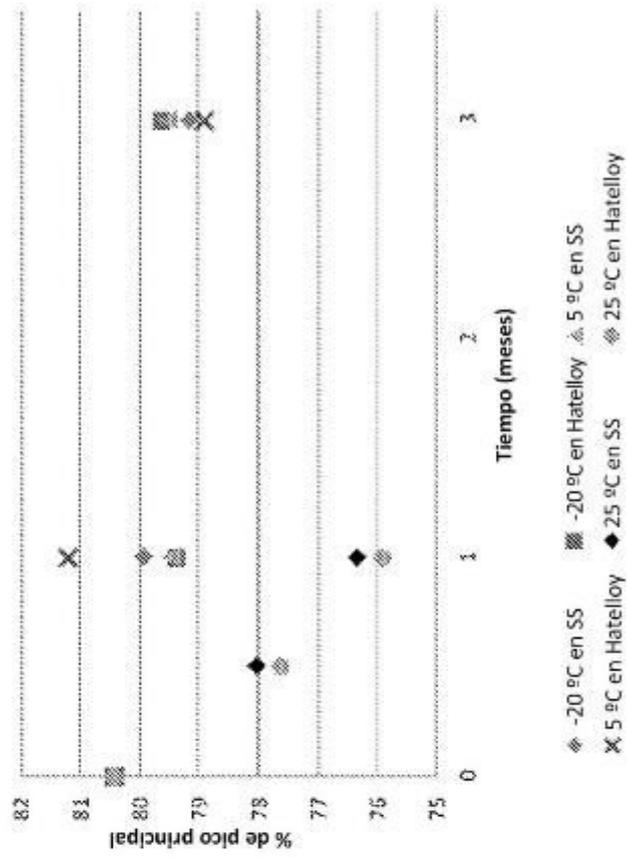


FIG. 8A

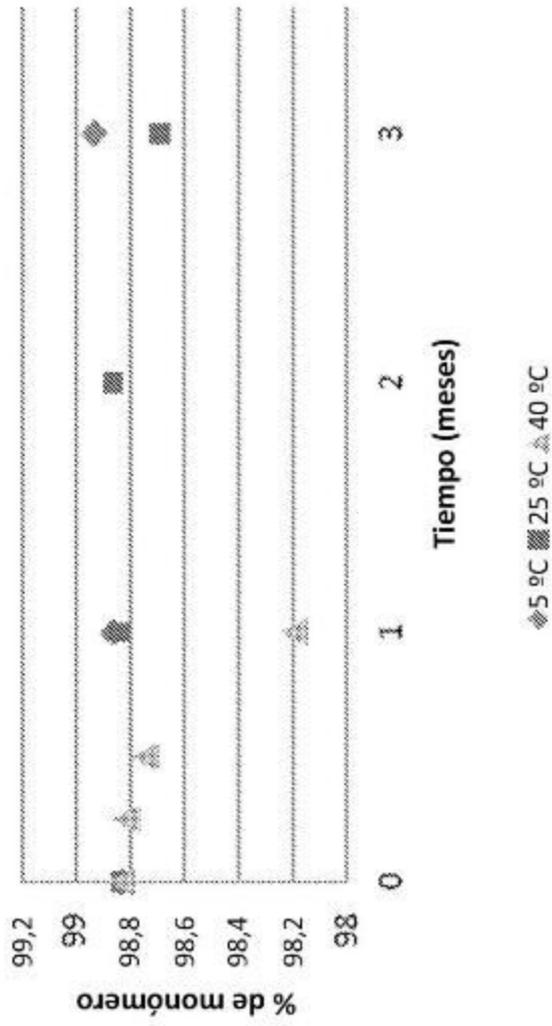


FIG. 8B

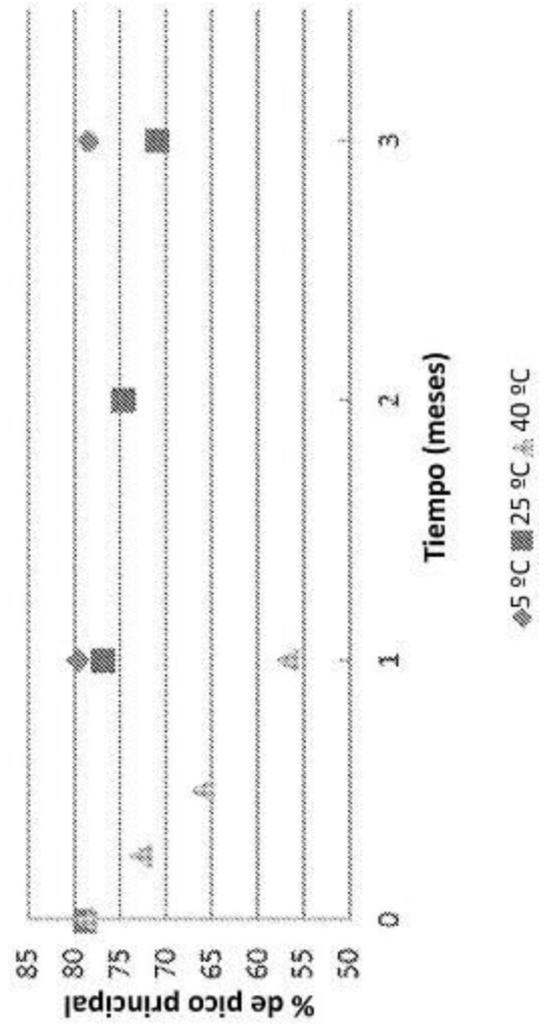


FIG. 9A

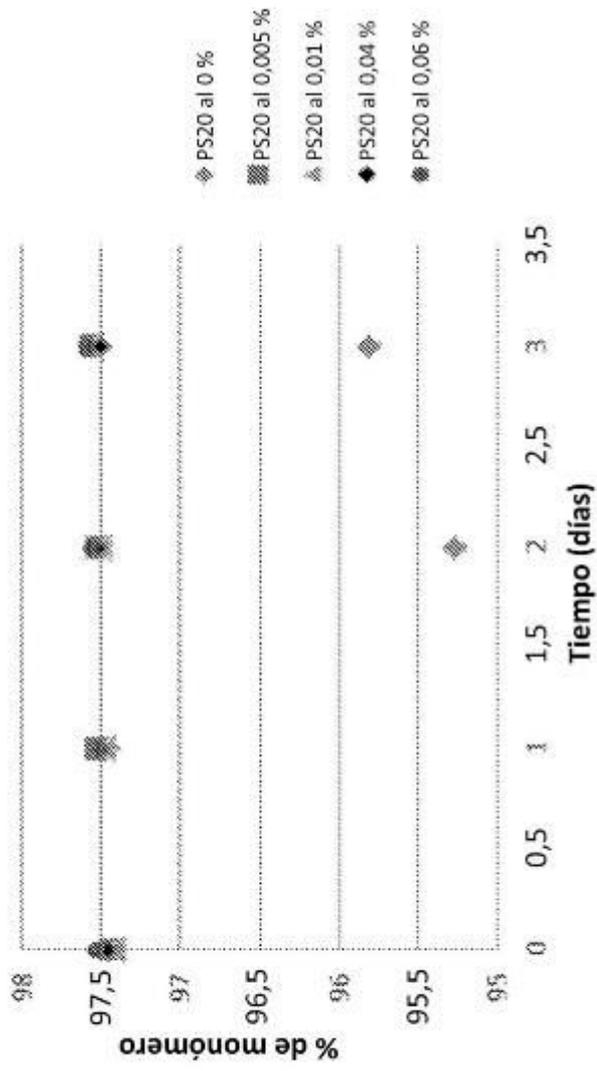


FIG. 9B

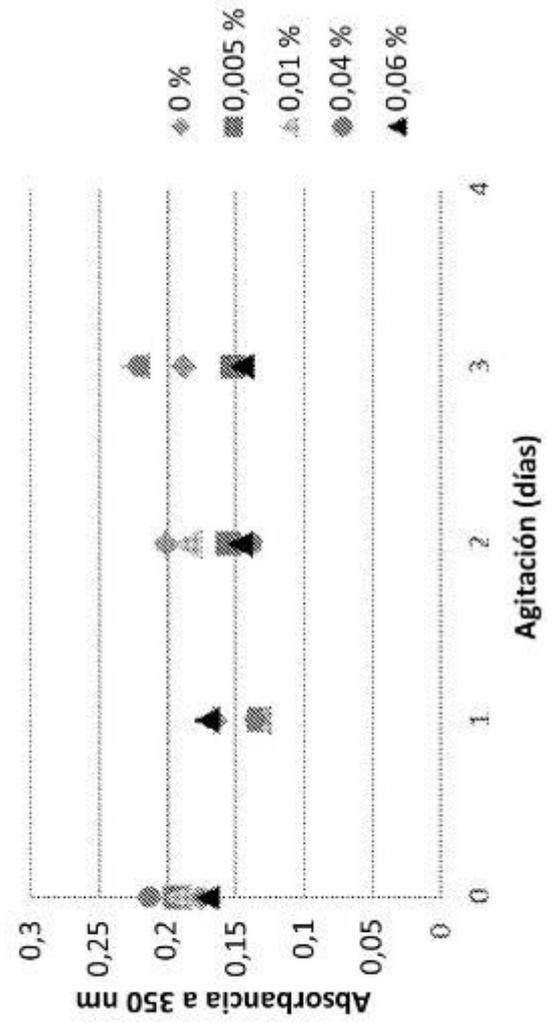


FIG. 10

% de cambio de monómero
 ■ antes de agitación ■ después de agitación

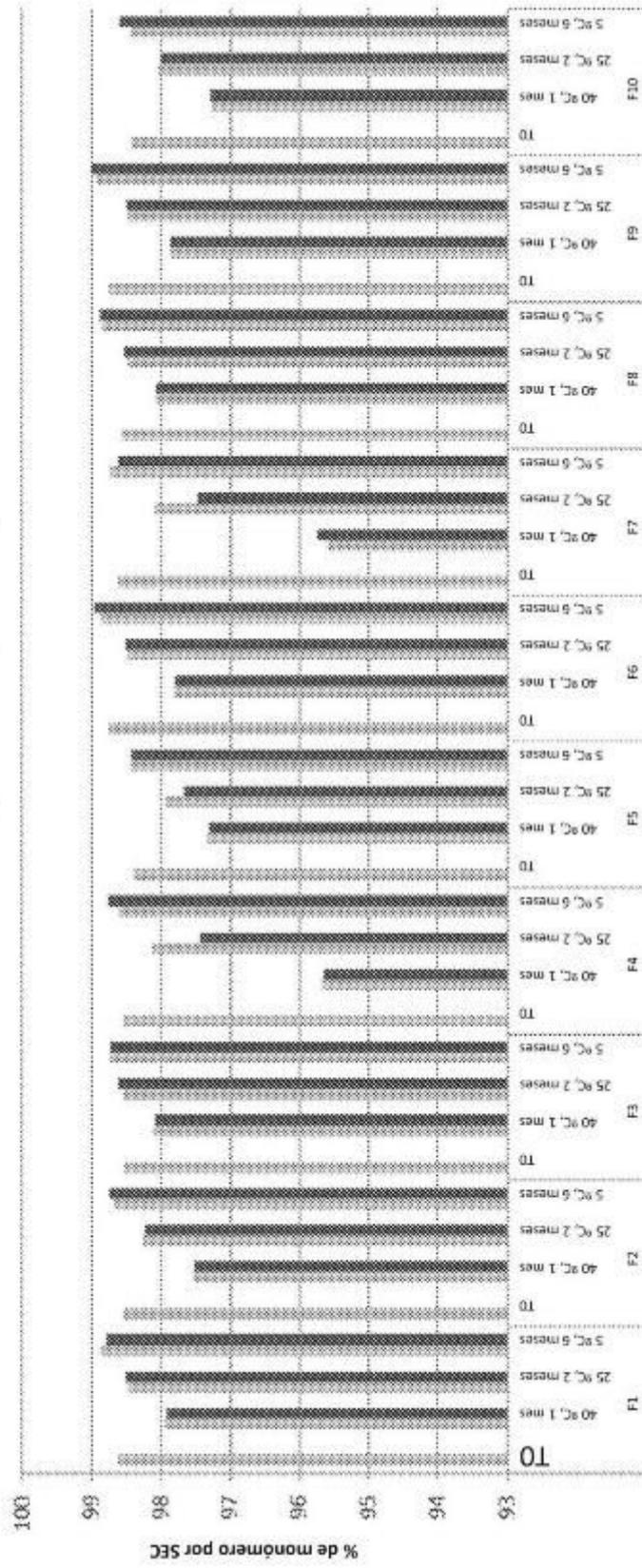


FIG. 11B

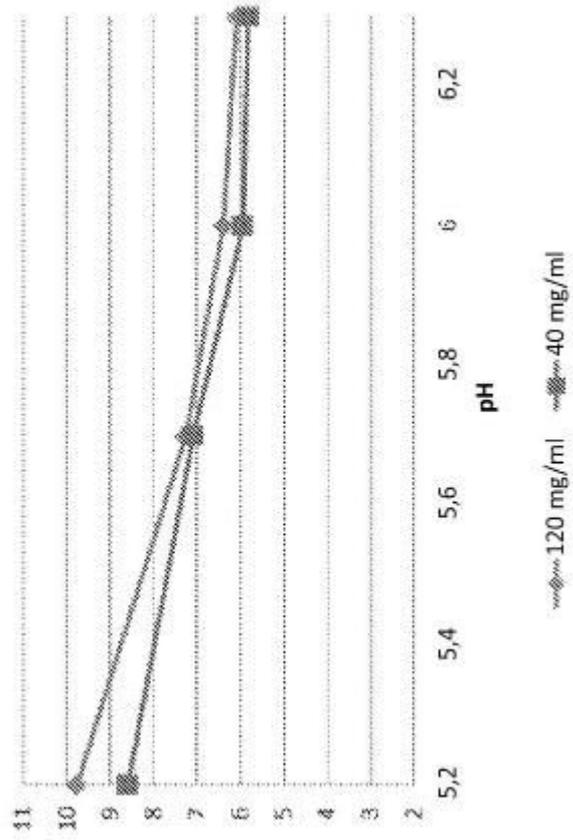


FIG. 11A

