

**FORMULACIONES DE ANTICUERPOS
ANTI-LAG3 Y COFORMULACIONES DE ANTICUERPOS ANTI-LAG3 Y
ANTICUERPOS ANTI-PD-1**

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere en general a formulaciones de anticuerpos terapéuticos y su uso en el tratamiento de diversos trastornos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Los anticuerpos pueden diferir en cierta medida en la secuencia de aminoácidos de sus dominios constantes, o en sus secuencias marco dentro de sus dominios variables pero, en general, la diferencia principal radica en las secuencias de CDR. Incluso aquellos anticuerpos que se fijan a la misma proteína, el mismo polipéptido o incluso, potencialmente, al mismo epítipo pueden comprender secuencias de CDR completamente diferentes. Los anticuerpos
15 terapéuticos para su uso en seres humanos también se pueden obtener a partir de secuencias de anticuerpo germinal humano o a partir de secuencias de anticuerpo germinal no humano (por ejemplo, de roedor), tal como en anticuerpos humanizados, lo que genera una diversidad incluso mayor en las potenciales secuencias. Estas diferencias en las secuencias pueden producir estabilidades potencialmente diferentes en la solución y diferente sensibilidad a los parámetros
20 de la solución. Además, pequeños cambios en la disposición de los aminoácidos o cambios en uno o algunos residuos de aminoácidos pueden producir una estabilidad y susceptibilidad de anticuerpo a vías de degradación específicas de la secuencia drásticamente diferentes. Como consecuencia, en la actualidad no es posible predecir las condiciones de la solución necesarias para optimizar la estabilidad del anticuerpo. Cada anticuerpo se debe estudiar individualmente
25 para determinar la formulación óptima de la solución. Bhambhani *et al.* (2012) *J. Pharm. Sci.* 101:1120.

Los anticuerpos además son proteínas relativamente grandes (~150.000 Da), por ejemplo, en comparación con otras proteínas terapéuticas, tales como hormonas y citocinas. Los fármacos de anticuerpos deben ser estables durante el almacenamiento para asegurar la eficacia y
30 la dosis adecuada, de modo que es importante que la formulación elegida soporte las propiedades deseadas, tales como alta concentración, claridad y viscosidad aceptable, y que, además, mantenga estas propiedades y la eficacia como fármaco durante una vida útil razonablemente larga en condiciones de almacenamiento habituales.

LAG3 (CD223) es una molécula de superficie celular expresada en linfocitos T
35 activados (Huard *et al.* Immunogenetics 39:213–217, 1994), células NK (Triebel *et al.* J Exp

Med 171:1393–1405, 1990), linfocitos B (Kisielow *et al.* Eur J Immunol 35:2081–2088, 2005) y células dendríticas plasmocitoides (Workman *et al.* J Immunol 182:1885–1891, 2009) que es importante para la función de estos subconjuntos de linfocitos. Además, se cree que la interacción entre LAG3 y su ligando principal, MHC Clase II, tiene una función importante en la modulación de las células dendríticas (Andreae *et al.* J Immunol 168:3874–3880, 2002). Estudios preclínicos recientes documentaron una función de LAG-3 en el agotamiento de los linfocitos T CD8 (Blackburn *et al.* Nat Immunol 10:29–37, 2009).

Al igual que en la infección viral crónica, los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ específicos contra el antígeno tumoral presentan una función efectora alterada y un fenotipo agotado caracterizado por la producción reducida de citocinas proinflamatorias e hiposensibilidad a la reestimulación antigénica. Esto está mediado por mecanismos extrínsecos a la célula, tales como linfocitos T reguladores (Treg), y mecanismos intrínsecos a la célula, tales como moléculas inhibitoras reguladas de manera ascendente sobre linfocitos que infiltran tumores (TIL) agotados. Estos mecanismos inhibidores representan una barrera formidable para la inmunidad antitumoral eficaz.

LAG se expresa en TIL tolerados, lo que sugiere que pueden contribuir a la inmunodepresión mediada por tumores. La inhibición de LAG3 puede llevar a un aumento en la activación de los linfocitos T específicos contra antígeno, lo puede producir un beneficio terapéutico.

Se reconoce que PD-1 tiene es una molécula importante en la regulación inmunitaria y el mantenimiento de la tolerancia periférica. PD-1 se expresa moderadamente en linfocitos T, B y NKT indiferenciados y se regula de forma ascendente mediante la señalización del receptor de linfocitos T/B en los linfocitos, monocitos y células mieloides. Dos ligandos conocidos para PD-1, PD-L1 (B7-H1) y PD-L2 (B7-DC) se expresan en cáncer de diversos tejidos en seres humanos. En conjuntos de pruebas grandes de, por ejemplo, cáncer de ovario, renal, colorrectal, pancreático, de hígado, y melanoma, se demostró que la expresión de PD-L1 se correlacionaba con un mal pronóstico y una supervivencia general reducida independientemente del tratamiento posterior. De manera similar, se descubrió que la expresión de PD-1 en los linfocitos que infiltran tumores marcaban linfocitos T disfuncionales en el cáncer de mama y melanoma y se correlacionaban con un mal pronóstico en el cáncer renal. Por ende, se propuso que células tumorales que expresan PD-L1 interactúan con linfocitos T que expresan PD-1 para atenuar la activación de linfocitos T y la evasión de la vigilancia inmunitaria, y contribuyen así a una respuesta inmunitaria alterada contra el tumor.

Diversos anticuerpos monoclonales que inhiben la interacción entre PD-1 y uno o ambos de sus ligandos PD-L1 y PD-L2 se encuentran en desarrollo clínico para tratar el cáncer. Se ha propuesto que la eficacia de dichos anticuerpos se puede mejorar si se administran en combinación con otros tratamientos para el cáncer aprobados o experimentales, por ejemplo,

5 radiación, cirugía, agentes quimioterapéuticos, tratamientos dirigidos, agentes que inhiben otras vías de señalización que están desregulados en tumores, y otros agentes de mejora inmunitaria.

En consecuencia, existe la necesidad de formulaciones estables de anticuerpos terapéuticos, tales como anticuerpos que se fijan a LAG-3 humana, así como coformulaciones estables de un anticuerpo anti-LAG3 y un anticuerpo anti-PD-1. Dichas formulaciones estables,

10 preferentemente, exhiben estabilidad a lo largo de los meses o años en condiciones típicas de almacenamiento de fármacos para autoadministración, es decir, a una temperatura de refrigerador en una jeringa, lo que genera una larga vida útil para el producto del fármaco correspondiente.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona formulaciones de anticuerpos anti-LAG3 o fragmentos de fijación al antígeno. Los solicitantes descubrieron determinados excipientes que mitigan la separación de fases de anti-LAG3 en solución. En un aspecto, la invención proporciona uno o más de un excipiente seleccionado del grupo que consiste en histidina,

20 aspartato, glutamina, glicina, prolina, metionina, arginina o una sal de estos farmacéuticamente aceptable, NaCl, KCl, LiCl, CaCl₂, MgCl₂, ZnCl₂ y FeCl₂, a una concentración total de 10-1000 mM, y un amortiguador a pH alrededor de 5-8. En un aspecto, la presente invención proporciona una formulación que comprende un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de fijación al antígeno de este y un amortiguador a pH alrededor de 5-8, y una o más de arginina, histidina o una sal de

25 estas farmacéuticamente aceptable, o NaCl a una concentración total de 15-250 mM. En una forma de realización, la formulación comprende un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de fijación al antígeno de este, un azúcar o poliol; un tensioactivo no iónico, un amortiguador a pH alrededor de 5-8, arginina 25-200 mM o una sal de esta farmacéuticamente aceptable. En otra forma de realización, la formulación comprende alrededor de 25 mg/ml de anticuerpo anti-

30 LAG3; alrededor de 50 mg/ml de sacarosa; alrededor de 0,2 mg/ml de polisorbato 80; amortiguador de L-histidina a alrededor de 10 mM a pH alrededor de 5,8-6,0; L-arginina-HCl a alrededor de 70 mM de esta; y, opcionalmente, L-metionina a alrededor de 10 mM. De manera opcional, la formulación comprende un anticuerpo anti-PD-1.

En otros aspectos, la invención proporciona una coformulación de anticuerpos anti-LAG3 o fragmentos de fijación al antígeno y anticuerpos anti-PD-1 o fragmentos de fijación al antígeno con arginina o una sal de esta farmacéuticamente aceptable a una concentración total de 10-1000 mM, y un amortiguador a pH alrededor de 5-8, y, opcionalmente, 3-100 mM de metionina. En una forma de realización, la formulación comprende alrededor de 25 mg/ml de anticuerpo anti-LAG3 y alrededor de 25 mg/ml de anticuerpo anti-PD-1; alrededor de 50 mg/ml de sacarosa; alrededor de 0,2 mg/ml de polisorbato 80; amortiguador de L-histidina a alrededor de 10 mM a pH alrededor de 5,8-6,0; L-arginina-HCl a alrededor de 70 mM de esta; y L-metionina a alrededor de 10 mM. De manera sorprendente, las coformulaciones de anti-LAG3/anti-PD-1 presentan mejor estabilidad que las formulaciones de anticuerpos individuales. Las formulaciones pueden estar liofilizadas para la reconstitución o en forma líquida.

La presente invención también proporciona un método para tratar el cáncer o una infección, en donde el método comprende administrar la formulación reconstituida o líquida (formulación en solución) a un sujeto que lo necesita. En otras formas de realización la formulación se usa para tratar una infección crónica. También se contempla el uso de la formulación en solución o liofilizada en la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer o la infección.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1: Cantidad de partículas por contenedor $\geq 10 \mu\text{m}$ según se midió mediante mHIAC para las muestras de producto farmacológico anti-LAG3 que se almacenaron a -80°C , -20°C , 5°C , 25°C y 40°C .

Figura 2: Cantidad de partículas por contenedor $\geq 25 \mu\text{m}$ según se midió mediante mHIAC para las muestras de producto farmacológico anti-LAG3 que se almacenaron a -80°C , -20°C , 5°C , 25°C y 40°C .

Figura 3: Potencia según se midió mediante ELISA para las muestras de producto farmacológico anti-LAG3 que se almacenaron a -80°C , -20°C , 5°C , 25°C y 40°C .

Figura 4: Monómeros (%) según UP-SEC para las muestras de producto farmacológico anti-LAG3 que se almacenaron a -80°C , -20°C , 5°C , 25°C y 40°C .

Figura 5: Especies de alto peso molecular (%) según UP-SEC para las muestras de producto farmacológico anti-LAG3 que se almacenaron a -80°C , -20°C , 5°C , 25°C y 40°C .

Figura 6: Variantes ácidas (%) según HP-IEC para las muestras de producto farmacológico anti-LAG3 que se almacenaron a -80°C , -20°C , 5°C , 25°C y 40°C .

Figura 7: Pico principal total (%) según HP-IEX para las muestras de producto farmacológico anti-LAG3 que se almacenaron a -80 °C, -20 °C, 5 °C, 25 °C y 40 °C.

Figura 8: Variantes básicas (%) según HP-IEX para las muestras de producto farmacológico anti-LAG3 que se almacenaron a -80 °C, -20 °C, 5 °C, 25 °C y 40 °C.

- 5 Figura 9: Pureza de cadena pesada + cadena ligera (%) según CE-SDS reductora para las muestras de producto farmacológico anti-LAG3 que se almacenaron a -80 °C, -20 °C, 5 °C, 25 °C y 40 °C.

Figura 10: Pureza de IgG intacta (%) según CE-SDS no reductora para las muestras de producto farmacológico anti-LAG3 que se almacenaron a -80 °C, -20 °C, 5 °C, 25 °C y 40 °C.

- 10 Figura 11: Modelo de homología del anticuerpo anti-LAG3 Ab6 que presenta exposición de superficie de triptófano. La superficie de Trp102 está expuesta según se midió mediante área de superficie accesible ($85,25 \text{ \AA}^2$) calculada usando un modelo de homología.

Figura 12: Reducción de autointeracción (KD) y mejora de estabilidad coloidal (OD350) y solubilidad relativa (% de punto medio de PEG) del anticuerpo anti-LAG3 en presencia de sal (NaCl 50 mM) y en presencia de L-arginina clorhidrato (40 mM) en amortiguador de histidina 10 mM pH 5,6.

- Figura 13: Efecto de L-arginina clorhidrato en el parámetro de interacción de difusión (KD) y la turbidez (OD350 a 50 mg/ml) del anticuerpo anti-LAG3 en amortiguador de histidina 10 mM a pH 5,8 y a pH 6,0.

- 20 Figura 14: Estudios de variación de pH (5,3 a 6,4) del anticuerpo anti-LAG3.

Figura 15: Parámetro de interacción de difusión (KD) de anti-LAG3 (25 mg/ml en L histidina 10 mM pH 5,8) en presencia de L-arginina, L-histidina o cloruro de sodio.

Figura 16: Solubilidad relativa de anti-LAG3 (25 mg/ml en L-histidina 10 mM pH 5,8) en presencia de L-arginina, L-histidina o cloruro de sodio.

- 25 Figura 17: Porcentaje de cambio en especies con carga de anti-LAG3 (25 mg/ml en L-histidina 10 mM pH 5,8) en presencia de L-arginina, L-histidina o cloruro de sodio.

Figura 18: Optimización de 25 mg/ml de formulación anti-LAG3 en L-histidina 10 mM pH 5,8 amortiguador con L-arginina, cloruro de sodio o su mezcla usando medición del segundo coeficiente virial (B_{22}).

- 30 Figura 19: Estabilidad coloidal (OD350) de 25 mg/ml de formulación anti-LAG3 en amortiguador de L-histidina 10 mM pH 5,8 en presencia de L-arginina, cloruro de sodio o su mezcla.

Figura 20: Viscosidad de anti-LAG3 (60 mg/ml) en amortiguador de L-histidina 10 mM pH 5,8 en presencia de L-arginina, cloruro de sodio o su mezcla.

Figura 21: Osmolalidad de anti-LAG3 (25 mg/ml) en amortiguador de L-histidina 10 mM pH 5,8 en presencia de L-arginina, cloruro de sodio o su mezcla.

Figura 22: Análisis de turbidez de las formulaciones (F1-F6) en el tiempo en condiciones de almacenamiento a 40 °C y 25 °C.

- 5 Figura 23: Análisis de cromatografía de modo mixto de las formulaciones (F1-F6) en el tiempo en condición de almacenamiento a 40 °C. El cambio en el porcentaje de monómeros para cada mAb (anti-LAG3 y anti-PD-1) se representa con respecto al tiempo para las Formulaciones F1-F6.

- Figura 24: Porcentaje de cambio en especies de alto peso molecular (HMW), monómeros y
10 especies de bajo peso molecular (LMW) de 25 mg/ml de formulación anti-LAG3 (amortiguador de L-histidina 10 mM pH 5,8) en presencia de L-arginina clorhidrato 70 mM con 2,5 % a 9 % de estabilizantes o cloruro de sodio 70 mM con 2,5 % a 9,0 % de estabilizantes.

- Figura 25: Porcentaje de cambio en especies con carga de 25 mg/ml de formulación anti-LAG3 (amortiguador de L-histidina 10 mM pH 5,8) en presencia de L-arginina clorhidrato 70 mM con
15 2,5 % a 9 % de estabilizantes o cloruro de sodio 70 mM con 2,5 % a 9,0 % de estabilizantes.

Figura 26: Tm1, Tm2 y Tinicial de 25 mg/ml de formulación anti-LAG3 (L-histidina 10 mM pH 5,8) en presencia de L-arginina 70 mM con 2,5 % a 9 % de estabilizantes o cloruro de sodio 70 mM con 2,5 % a 9,0 % de estabilizantes.

- Figura 27: Estabilidad coloidal (OD350) de 25 mg/ml de formulación anti-LAG3 (L-histidina 10 mM, L-arginina 70 mM, 5 % p/v de sacarosa, pH 5,8) en presencia de diferentes concentraciones de polisorbato 80 después de estrés por agitación.
20

- Figura 28: Porcentaje de cambio en especies de alto peso molecular (HMW), monómeros y especies de bajo peso molecular (LMW) de 25 mg/ml de formulación anti-LAG3 (amortiguador de L-histidina 10 mM pH 5,8, L-arginina clorhidrato 70 mM, 5 % p/v de sacarosa) en presencia
25 de diferentes concentraciones de polisorbato 80 después de estrés por agitación.

Figura 29: Porcentaje de cambio en especies con carga de 25 mg/ml de formulación anti-LAG3 (L-histidina 10 mM, L-arginina 70 mM, 5 % p/v de sacarosa, pH 5,8) en presencia de diferentes concentraciones de polisorbato 80 después de estrés por agitación.

- Figura 30: Estabilidad coloidal (OD350) de 25 mg/ml de formulación anti-LAG3 (L-histidina 10 mM, L-arginina 70 mM, 5 % p/v de sacarosa, pH 5,8) sola y en presencia de concentraciones
30 crecientes de L-metionina.

Figura 31: Porcentaje de cambio en especies de alto peso molecular (HMW) y monómeros de 25 mg/ml de formulación anti-LAG3 (L-histidina 10 mM, L-arginina 70 mM, 5 % p/v de sacarosa, pH 5,8) sola y en presencia de concentraciones crecientes de L-metionina.

Figura 32: Porcentaje de cambio en especies con carga de 25 mg/ml de formulación anti-LAG3 (L-histidina 10 mM, L-arginina 70 mM, 5 % p/v de sacarosa, pH 5,8) sola y en presencia de concentraciones crecientes de L-metionina.

Figura 33: Porcentaje de cambio en oxidación de 25 mg/ml de formulación anti-LAG3 (L-histidina 10 mM, L-arginina 70 mM, 5 % p/v de sacarosa, pH 5,8) sola y en presencia de concentraciones crecientes de L-metionina.

Figura 34: Porcentaje de cambio en turbidez (OD₃₅₀) de 200 mg/ml de anti-LAG3 en presencia de amortiguador 10 mM con L-arginina clorhidrato 70 mM, pH 5,8 sola y en presencia de diferentes estabilizantes.

Figura 35: Porcentaje de cambio en especies de alto peso molecular (HMW), monómeros y especies de bajo peso molecular (LMW) de 200 mg/ml de anti-LAG3 en presencia de amortiguador 10 mM, con L-arginina clorhidrato 70 mM, pH 5,8 sola y en presencia de diferentes estabilizantes.

Figura 36: Porcentaje de cambio en especies con carga de 200 mg/ml de anti-LAG3 en presencia de amortiguador 10 mM con L-arginina clorhidrato 70 mM, pH 5,8 sola y en presencia de diferentes estabilizantes.

Figura 37: Porcentaje de cambio en turbidez (OD₃₅₀) de 25 mg/ml de anti-LAG3 en presencia de 40 a 70 mM de sal (cloruro de sodio) y 20 a 70 mM de aminoácidos sola y en combinaciones.

Figura 38: Porcentaje de cambio en especies de alto peso molecular (HMW), monómeros y especies de bajo peso molecular (LMW) de 25 mg/ml de anti-LAG3 en presencia de 40 a 70 mM de sal (cloruro de sodio) y 20 a 70 mM de aminoácidos sola y en combinaciones.

Figura 39: Porcentaje de cambio en especies con carga de 25 mg/ml de anti-LAG3 en presencia de 40 a 70 mM de sal (cloruro de sodio) y 20 a 70 mM de aminoácidos sola y en combinaciones.

Figura 40: Porcentaje de cambio en diámetro hidrodinámico de 25 mg/ml de anti-LAG3 en presencia de 40 a 70 mM de sal (cloruro de sodio) y 20 a 70 mM de aminoácidos sola y en combinaciones.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Como se usan en la presente y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares de palabras como “un”, “una” y “el/la” incluyen sus correspondientes referencias en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. A menos que se indique lo contrario, las proteínas y los sujetos a los que se hace referencia en la presente son proteínas humanas y sujetos humanos, y no de otras especies.

Definiciones

Como se usa en la presente, a menos que se indique lo contrario, “fragmento de fijación al antígeno” se refiere a fragmentos de fijación al antígeno de anticuerpos, es decir, fragmentos de anticuerpos que conservan la capacidad de fijarse específicamente al antígeno fijado por el anticuerpo de longitud completa, por ejemplo, fragmentos que conservan una o dos regiones CDR. Los ejemplos de fragmentos de fijación de anticuerpo incluyen, entre otros, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv.

Un "fragmento Fab" está compuesto por una cadena ligera y las regiones variables y CH1 de una cadena pesada. La cadena pesada de una molécula Fab no puede formar un puente de disulfuro con otra molécula de la cadena pesada. Un "fragmento Fab" puede ser el producto de la escisión de papaína de un anticuerpo.

Una región “Fc” contiene dos fragmentos de la cadena pesada que comprende los dominios CH1 y CH2 de un anticuerpo. Los dos fragmentos de la cadena pesada se encuentran unidos mediante dos o más enlaces disulfuro y mediante interacciones hidrófobas de los dominios CH3.

Un “fragmento Fab’” contiene una cadena ligera y una porción o fragmento de una cadena pesada que contiene el dominio VH y el dominio CH1 y también la región entre los dominios CH1 y CH2, de modo que se pueda formar un puente disulfuro intercatenario entre las dos cadenas pesadas de dos fragmentos Fab’ para formar una molécula F(ab’)₂.

Un "fragmento F(ab')₂" contiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que contienen una porción de la región constante entre los dominios CH1 y CH2, de modo que se puede formar un puente disulfuro intercatenario entre las dos cadenas pesadas. Por ende, un fragmento F(ab’)₂ está compuesto por dos fragmentos Fab’ que se mantienen unidos mediante un puente disulfuro entre las dos cadenas pesadas. Un “fragmento F(ab')₂” puede ser el producto de la escisión de pepsina de un anticuerpo.

La “región Fv” comprende las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera, pero carece de las regiones constantes.

Como se usa en la presente, la expresión “región hipervariable” se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la fijación al antígeno. La región hipervariable comprende residuos de aminoácidos de una “región determinante de la complementariedad” o “CDR” (por ejemplo, residuos 24-34 (CDRL1), 50-56 (CDRL2) y 89-97 (CDRL3) en el dominio variable de la cadena ligera y residuos 31-35 (CDRH1), 50-65 (CDRH2) y 95-102 (CDRH3) en el dominio variable de la cadena pesada (Kabat *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health,

Bethesda, Md.) y/o aquellos residuos de un "bucle hipervariable" (es decir, residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada (Chothia y Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901-917). Como se usa en la presente, la expresión "residuos de marco" o "FR" se refiere a aquellos residuos de dominio variable que no sean los residuos de la región hipervariable definidos en la presente como residuos de CDR. La numeración de residuos anterior se refiere al sistema de numeración Kabat y no necesariamente se corresponde en detalle con la numeración de secuencias en el Listado de secuencias adjunto.

La expresión "actividad proliferativa" abarca una actividad que promueve, que es necesaria para, o que se asocia específicamente a, por ejemplo, la división celular normal, así como al cáncer, tumores, displasia, transformación celular, metástasis, y angiogénesis.

Los términos "cáncer", "tumor", "canceroso" y "maligno" se refieren a o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza en general por el crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, entre otros, carcinoma, por ejemplo, adenocarcinoma, linfoma, blastoma, melanoma, sarcoma y leucemia. Los ejemplos más particulares de dichos tipos de cáncer incluyen cáncer de células escamosas, cáncer pulmonar de células pequeñas, cáncer pulmonar de células no pequeñas, cáncer gastrointestinal, linfoma de Hodgkin y no Hodgkin, cáncer pancreático, glioblastoma, glioma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, tal como carcinoma hepático y hepatoma, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio, mieloma (tal como mieloma múltiple), carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón, tal como carcinoma de células renales y tumores de Wilms, carcinoma de células basales, melanoma, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, cáncer de testículo, cáncer de esófago, y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello.

A medida que las células cancerosas crecen y se multiplican, forman una masa de tejido canceroso, es decir, un tumor, que invade y destruye tejidos adyacentes normales. Los tumores malignos son cáncer. En general, los tumores malignos pueden eliminarse, pero pueden volver a crecer. Las células de tumores malignos pueden invadir y dañar los tejidos y órganos cercanos. Además, las células cancerosas pueden desprenderse de un tumor maligno y entrar al torrente sanguíneo o sistema linfático, que es el modo en que las células cancerosas se esparcen desde el tumor primario (es decir, el cáncer original) y forman nuevos tumores en otros órganos. La diseminación del cáncer en el cuerpo se denomina metástasis (What You Need to Know About Cancer- an Overview, publicación NIH N.º 00-1566; publicado el 26 de Sept. del 2000, actualizado el 16 de Sept. del 2002 (2002)).

Como se usa en la presente, la expresión “tumor sólido” se refiere a un crecimiento anormal o masa tisular que por lo general no contiene quistes o áreas líquidas. Los tumores sólidos pueden ser benignos (no cancerosos) o malignos (cancerosos). Los diferentes tipos de tumores sólidos se denominaron de acuerdo al tipo de células que los conforman.

- 5 Ejemplos de tumores sólidos son los sarcomas, carcinomas y linfomas. Las leucemias (tipos de cáncer de la sangre) por lo general no forman tumores sólidos (National Cancer Institute, Dictionary of Cancer Terms).

- 10 Como se usa en la presente, el término “carcinomas” se refiere al cáncer en células epiteliales, que son células que cubren a superficie del cuerpo, producen hormonas y forman glándulas. Los ejemplos de carcinomas son el cáncer de piel, pulmón, colon, estómago, mama, próstata y de la glándula tiroides.

Definiciones de las composiciones farmacéuticas

- 15 Como se usa en la presente, una composición farmacéutica “acuosa” es una composición adecuada para el uso farmacéutico, en la que el portador acuoso es agua estéril para inyección. Una composición adecuada para uso farmacéutico puede ser estéril, homogénea e/o isotónica. En algunas formas de realización, las composiciones farmacéuticas acuosas de la invención son adecuadas para la administración parenteral a un sujeto humano. En una forma de realización específica, las composiciones farmacéuticas acuosas de la invención son adecuadas
20 para la administración intravenosa y/o subcutánea.

- La expresión "alrededor de", cuando modifica la cantidad (por ejemplo, mM, o M) de una sustancia o composición, el porcentaje (v/v o p/v) de un componente de una formulación, el pH de una solución/formulación, o el valor de un parámetro que caracteriza un paso en un método, o similares, se refiere a la variación en la cantidad numérica que puede surgir, por ejemplo, en los procesos típicos de medición, manipulación y muestreo durante la preparación, caracterización y/o uso de la sustancia o composición; en los errores instrumentales en dichos procedimientos; en las diferencias en la fabricación, fuente o pureza de los ingredientes empleados para elaborar o usar las composiciones o llevar a cabo los procedimientos; y similares. En algunas formas de realización, “alrededor de” puede referirse a
25 una variación de $\pm 0,1 \%$, $0,5 \%$, 1% , 2% , 3% , 4% , 5% o 10% .
30

Como se usa en la presente, “x % (p/v)” es equivalente a x g/100 ml (por ejemplo, 5 % p/v es igual a 50 mg/ml).

El término “amortiguador” abarca aquellos agentes que mantienen el pH de la solución dentro de un rango aceptable en la formulación líquida, antes de la liofilización y/o

después de la reconstitución, y puede incluir, entre otros succinato (de sodio o potasio), histidina, acetato, fosfato (de sodio o potasio), Tris (tris (hidroximetil) aminometano), dietanolamina, citrato (de sodio) y similares.

“Coformulado” o “coformulación”, como se usa en la presente, se refiere a al menos dos anticuerpos diferentes o fragmentos de fijación al antígeno de estos, que se formulan en conjunto y se almacenan como un producto combinado en un único vial o recipiente (por ejemplo, un dispositivo de inyección), en lugar de formularse y almacenarse de manera individual y luego mezclarse antes de la administración o administrarse por separado. En una forma de realización, la coformulación contiene dos anticuerpos diferentes o fragmentos de fijación al antígeno de estos.

El término “glicol” se refiere a un alquilo con dos grupos hidroxilo.

“Alcohol de azúcar” se refiere a polioles derivados de un azúcar y que tienen la fórmula general $\text{HOCH}_2(\text{CHOH})_n\text{CH}_2\text{OH}$, $n=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9$ o 10 . Los ejemplos incluyen, entre otros, manitol, sorbitol, eritritol, xilitol y glicerol.

Como se usa en la presente, “poliol” incluye un glicol y un alcohol de azúcar.

Las expresiones “liofilización”, “liofilizado” y “secado por congelación” se refieren a un proceso mediante el cual se congela en primer lugar el material que se debe secar y luego se retira el hielo o solvente congelado mediante sublimación al vacío. Se puede incluir un excipiente en formulaciones previamente liofilizadas para mejorar la estabilidad del producto liofilizado tras el almacenamiento.

El “azúcar no reductor” es un azúcar que no puede actuar como agente reductor porque no contiene o no se puede convertir para contener un grupo aldehído libre o un grupo cetona libre. Los ejemplos de azúcares no reductores incluyen, entre otros, disacáridos tales como sacarosa y trehalosa.

La expresión “formulación farmacéutica” se refiere a preparaciones que se encuentran en tal forma para permitir que los ingredientes activos sean eficaces, y que no contiene componentes adicionales que sean tóxicos para los sujetos a quienes se administraría la formulación.

Los excipientes (vehículos, aditivos) “farmacéuticamente aceptables” son aquellos que se pueden administrar de manera razonable a un sujeto para proporcionar una dosis eficaz del ingrediente activo empleado.

El “tiempo de reconstitución” es el tiempo necesario para rehidratar una formulación liofilizada con una solución para lograr una solución clarificada libre de partículas.

Una formulación "estable" es aquella en la cual la proteína retiene esencialmente su estabilidad física y/o estabilidad química y/o actividad biológica durante el almacenamiento. Diversas técnicas analíticas para la medición de la estabilidad de proteínas están disponibles en el estado de la técnica y se evalúan en Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., Pubs. (1991) y Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10:29-90 (1993). La estabilidad se puede medir a una temperatura seleccionada durante un período seleccionado. Por ejemplo, en una forma de realización, una formulación estable es una formulación sin cambios significativos observados a una temperatura refrigerada (2-8 °C) durante al menos 12 meses. En otra forma de realización, una formulación estable es una formulación sin cambios significativos observados a una temperatura refrigerada (2-8 °C) durante al menos 18 meses. En otra forma de realización, una formulación estable es una formulación sin cambios significativos observados a temperatura ambiente (23-27 °C) durante al menos 3 meses. En otra forma de realización, una formulación estable es una formulación sin cambios significativos observados a temperatura ambiente (23-27 °C) durante al menos 6 meses. En otra forma de realización, una formulación estable es una formulación sin cambios significativos observados a temperatura ambiente (23-27 °C) durante al menos 12 meses. En otra forma de realización, una formulación estable es una formulación sin cambios significativos observados a temperatura ambiente (23-27 °C) durante al menos 18 meses. Los criterios para la estabilidad de una formulación de anticuerpo son los siguientes: Por lo general, no más del 10 %, preferentemente 5 %, del monómero de anticuerpo se degrada, como se mide mediante SEC-HPLC. Por lo general, la formulación es incolora, o transparente a levemente opalescente mediante análisis visual. Por lo general, la concentración, pH y osmolalidad de la formulación no tienen más de +/-10 % de cambio. La potencia por lo general es de 60-140 %, preferentemente, 80-120 % del control o referencia. Por lo general, se observa no más de 10 %, preferentemente 5 % de recorte del anticuerpo, es decir, % de especies de bajo peso molecular, como se determina, por ejemplo, mediante HP-SEC. En general, se forma no más de 10 %, preferentemente, 5 % de agregación del anticuerpo, es decir, % de especies de alto peso molecular según se determina, por ejemplo, mediante HP-SEC.

Un "tensioactivo" es un agente tensioactivo que es naturalmente anfipático.

Un anticuerpo "retiene su estabilidad física" en una formulación farmacéutica si no muestra un aumento significativo de agregación, precipitación y/o desnaturalización en la examinación visual de color y/o claridad o como se mide mediante dispersión de luz UV, cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y dispersión de luz dinámica. Los cambios en la conformación de las proteínas se pueden evaluar mediante espectroscopia de fluorescencia, que

determina la estructura terciaria de la proteína, y mediante espectroscopia FTIR, que determina la estructura secundaria de la proteína.

Un anticuerpo "retiene su estabilidad química" en una formulación farmacéutica si no muestra alteraciones químicas significativas. La estabilidad química se puede evaluar
5 mediante la detección y cuantificación de las formas alteradas químicamente de la proteína. Los procesos de degradación que frecuentemente alteran la estructura química de la proteína incluyen hidrólisis o recorte (evaluado con métodos tales como cromatografía de exclusión por tamaño y SDS-PAGE), oxidación (evaluado con métodos tales como mapeo de péptidos en conjunción con la espectroscopia de masa o MALDI/TOF/MS), desamidación (evaluada con métodos tales como
10 cromatografía de intercambio iónico, enfoque isoelectrico capilar, mapeo de péptidos, medición del ácido isoaspártico) e isomerización (evaluada mediante la medición del contenido de ácido isoaspártico, mapeo de péptidos, etc.).

Un anticuerpo "retiene su actividad biológica" en una formulación farmacéutica si la actividad biológica del anticuerpo en un marco de tiempo determinado está dentro de un rango
15 predeterminado de la actividad biológica que exhibió al momento de preparar la formulación. La actividad biológica de un anticuerpo se puede determinar, por ejemplo, mediante un ensayo de fijación al antígeno. En una forma de realización, la actividad biológica de la formulación de anticuerpos estable en 12 meses se encuentra dentro de 60-140 % de la referencia.

El término "isotónico" se refiere a que la formulación de interés tiene
20 esencialmente la misma presión osmótica que la sangre humana. Las formulaciones isotónicas por lo general tienen una presión osmótica a partir de 270-328 mOsm aproximadamente. La presión levemente hipotónica es 250-269 y la presión levemente hipertónica es 328-350 mOsm. La presión osmótica se puede medir, por ejemplo, con un osmómetro de presión de vapor o un osmómetro de descenso crioscópico.

Una formulación "reconstituida" es aquella que se ha preparado mediante la
25 disolución de una formulación de proteína liofilizada en un diluyente de modo tal que la proteína se disperse en la formulación reconstituida. La formulación reconstituida es adecuada para la administración, (por ejemplo, administración parenteral) y, de manera opcional, puede ser adecuada para la administración subcutánea.

30 Como se usa en la presente, se debe interpretar que las concentraciones se encuentran aproximadamente dentro de los rangos habitualmente asociados a dichas concentraciones en la fabricación de formulaciones farmacéuticas. Específicamente, las concentraciones no son necesariamente exactas, sino que pueden diferir de las concentraciones indicadas dentro de las tolerancias habitualmente esperadas para los fármacos fabricados en

condiciones GMP. De manera similar, los valores de pH se encuentran aproximadamente dentro de las tolerancias habitualmente esperadas para los fármacos fabricados en condiciones GMP y almacenados en condiciones de almacenamiento típicas.

5 Cuando se menciona un rango de valores de pH, tal como “un pH entre pH 5,0 y 6,0,” el rango pretende incluir los valores mencionados. El pH se mide normalmente a 25 °C con el uso de medidor estándar de pH con bombilla de vidrio. Como se usa en la presente, una solución que comprende “amortiguador de histidina a pH X” hace referencia a una solución a pH X y que comprende el amortiguador de histidina, es decir, el pH se refiere al pH de la solución.

10 Métodos analíticos

Los métodos analíticos adecuados para evaluar la estabilidad del producto incluyen cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), prueba de dispersión de luz dinámica (DLS), calorimetría diferencial de barrido (DSC), cuantificación de iso-asp, potencia, UV a 350 nm, espectroscopia de UV, y FTIR. La SEC (*J. Pharm. Scien.*, 83:1645-1650, (1994); *Pharm. Res.*, 11:485 (1994); *J. Pharm. Bio. Anal.*, 15:1928 (1997); *J. Pharm. Bio. Anal.*, 14:1133-1140 (1986)) mide el porcentaje de monómeros en el producto y brinda información sobre la cantidad de agregados solubles. La DSC (*Pharm. Res.*, 15:200 (1998); *Pharm. Res.*, 9:109 (1982)) brinda información sobre la temperatura de desnaturalización de las proteínas y la temperatura de transición vítrea. La DLS (American Lab., Noviembre (1991)) mide el coeficiente promedio de 15 difusión, y brinda información sobre la cantidad de agregados solubles e insolubles. El UV a 340 nm mide la intensidad de la luz dispersa a 340 nm y brinda información sobre las cantidades de agregados solubles e insolubles. La espectroscopía de UV mide la absorbancia a 278 nm y brinda información sobre la concentración de proteínas. La FTIR (*Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 45:231 (1998); *Pharm. Res.*, 12:1250 (1995); *J. Pharm. Scien.*, 85:1290 (1996); *J. Pharm. Scien.*, 25 87:1069 (1998)) mide el espectro IR en la región de amida uno, y brinda información sobre la estructura secundaria de la proteína.

El contenido iso-asp en las muestras se mide usando el Sistema Isoquant de Detección de Isoaspartato (Promega). El kit utiliza la enzima conocida como proteína isoaspartil metiltransferasa (PIMT) para detectar específicamente la presencia de residuos de ácido 30 isoaspártico en una proteína diana. La PIMT cataliza la transferencia de un grupo metilo a partir de S-adenosil-L-metionina a ácido isoaspártico en la posición .alfa.-carboxilo, lo cual en el proceso genera S-adenosil-L-homocisteína (SAH). Se trata de una molécula relativamente pequeña y en general se puede aislar y cuantificar mediante HPLC de fase inversa que usa los estándares HPLC de SAH proporcionados en el kit.

La potencia o bioidentidad de un anticuerpo se puede medir por su capacidad para fijarse a su antígeno. La fijación específica de un anticuerpo a su antígeno se puede cuantificar por cualquier método conocido por los expertos en la materia, por ejemplo, un inmunoensayo, tal como ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas).

5

Anticuerpos anti-LAG3

Los residuos de CDR son altamente variables entre diferentes anticuerpos, y pueden originarse a partir de secuencias de líneas germinales humanas (en el caso de los anticuerpos completamente humanos) o de secuencias de líneas germinales no humanas (por ejemplo, roedor). Las regiones de marco también pueden diferir significativamente entre los anticuerpos. Las regiones constantes diferirán según si el anticuerpo seleccionado tiene una cadena ligera lambda (λ) o kappa (κ), y en función de la clase (o isotipo) del anticuerpo (IgA, IgD, IgE, IgG o IgM) y subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4).

Los anticuerpos contra LAG3 ejemplificados a continuación tienen secuencias de CDR derivadas de secuencias de líneas germinales no humanas (en este caso, ratón) o de secuencias de líneas germinales humanas. Las secuencias de líneas germinales comprenden el repertorio de secuencias del que derivan las secuencias de CDR de un anticuerpo, además de cambios derivados de la hipermutación somática, y, en consecuencia, se esperaría que las CDR obtenidas a partir de una línea germinal de ratón difieran sistemáticamente con aquellas que inician a partir de una línea germinal humana. En general, el uso de las secuencias de líneas germinales humanas se justifica con base en que las secuencias de CDR de líneas germinales humanas serán menos inmunógenas en seres humanos que aquellas derivadas de otras especies, lo que refleja la creencia subyacente de que las CDR diferirán sistemáticamente en función de sus especies de origen. Aunque el incremento en la diversidad de las CDR aumenta las probabilidades de hallar anticuerpos con las propiedades deseadas, tales como afinidad alta, también aumenta las dificultades para desarrollar una formulación en solución estable del anticuerpo resultante.

Incluso los anticuerpos que se fijan al mismo antígeno pueden diferir considerablemente en sus secuencias, y sus secuencias no necesariamente son más cercanas que las de otros anticuerpos con antígenos totalmente distintos. Con base en la baja similitud de secuencia, no se puede suponer que las propiedades químicas de los anticuerpos, y, por ende, su susceptibilidad a la degradación, son similares a pesar de la diana en común.

Como se analizó anteriormente, los anticuerpos son complejos de polipéptidos grandes y altamente complejos sujetos a diversas formas de degradación e inestabilidad en

solución. La diversidad de la secuencia, y por lo tanto de la estructura, de los anticuerpos origina una amplia variedad de propiedades químicas. Aparte de las obvias diferencias específicas de la secuencia en la especificidad de fijación al antígeno, los anticuerpos presentan distintas susceptibilidades a diversas vías de degradación, agregación y precipitación. Las cadenas laterales de aminoácidos difieren en la presencia o ausencia de grupos reactivos, tales como grupos carboxi (D,E), amino (K), amida (N,Q), hidroxilo (S,T,Y), sulfhidrilo (C), tioéter (M), así como de sitios potencialmente químicamente reactivos en residuos de histidina, fenilalanina y prolina. Las cadenas laterales de aminoácidos directamente implicadas en las interacciones de fijación al antígeno son candidatos evidentes para la inactivación mediante modificación de la cadena lateral, sin embargo, la degradación en otras posiciones también puede afectar dichos factores, como la orientación estérica de las CDR (por ejemplo, cambios en los residuos de marco), la función efectora (por ejemplo, cambios en la región Fc –ver, por ejemplo, Liu *et al.* (2008) *Biochemistry* 47:5088) o la autoasociación/agregación.

Los anticuerpos están sujetos a cualquier cantidad de vías de degradación potenciales. La oxidación de los residuos de metionina en los anticuerpos, en particular, en las CDR, puede ser un problema si esta altera la fijación al antígeno. Presta (2005) *J. Allergy Clin. Immunol.* 116: 731; Lam *et al.* (1997) *J. Pharm. Sci.* 86:1250. Otras vías potenciales de degradación incluyen la desamidación de asparagina (Harris *et al.* (2001) *Chromatogr., B* 752:233; Vlasak *et al.* (2009) *Anal. Biochem.* 392:145), oxidación de triptófano (Wei *et al.* (2007) *Anal. Chem.* 79:2797), cisteinilación (Banks *et al.* (2008) *J. Pharm. Sci.* 97:775), glucación (Brady *et al.* (2007) *Anal. Chem.* 79:9403), formación de piroglutamato (Yu *et al.* (2006) *J. Pharm. Biomed. Anal.* 42:455), redistribución de disulfuros (Liu *et al.* (2008) *J. Biol. Chem.* 283:29266) e hidrólisis (Davagnino *et al.* (1995) *J. Immunol. Methods* 185:177). Se discuten en Ionescu & Vlasak (2010) *Anal. Chem.* 82:3198. Ver también Liu *et al.* (2008) *J. Pharm. Sci.* 97:2426. Algunas vías de degradación potenciales no solo dependen de la presencia de un residuo de aminoácido específico, sino también de la secuencia cercana. La desamidación y la formación de isoaspartato pueden producirse a partir de un reordenamiento intramolecular espontáneo del enlace peptídico que sigue (desde el terminal C) a los residuos N o D, en donde las secuencias N-G y D-G son particularmente susceptibles. Reissner & Aswad (2003) *CMLS Cell. Mol. Life Sci.* 60:1281.

Los anticuerpos también están sujetos a fragmentación no enzimática dependiente de la secuencia durante el almacenamiento. Vlasak & Ionescu (2011) *mAbs* 3:253. La presencia de cadenas laterales reactivas, tales como D, G, S, T, C o N, puede dar como resultado reacciones de escisión intramoleculares que rompan la estructura principal del polipéptido. Por

lo general, dichas reacciones de hidrólisis específicas de la secuencia dependen del pH. *Id.* Los anticuerpos también pueden someterse a agregación dependiente de la secuencia, por ejemplo, cuando las CDR incluyen una gran cantidad de residuos hidrófobos. Perchiacca *et al.* (2012) *Prot. Eng. Des. Selection* 25:591. La agregación resulta particularmente problemática en los anticuerpos que necesitan formularse a altas concentraciones para la administración subcutánea, e incluso generó la modificación de algunas secuencias de anticuerpos mediante la adición de residuos con carga a fin de aumentar la solubilidad. *Id.*

Al igual que los potenciales problemas de estabilidad específicos de la secuencia de los anticuerpos son diversos, las potenciales formulaciones de anticuerpos también resultan diversas. La variabilidad de la secuencia del anticuerpo produce una heterogeneidad química en los anticuerpos resultantes, lo que da como resultado en un amplio rango de vías de degradación potenciales. Las formulaciones pueden variar, por ejemplo, en concentración de anticuerpo, amortiguador, pH, presencia o ausencia de tensioactivo, presencia o ausencia de agentes tonificantes (iónicos o no iónicos), presencia o ausencia de agentes de aglomerado molecular.

Los anticuerpos terapéuticos disponibles en el comercio se comercializan en una amplia variedad de formulaciones en solución, en amortiguador de fosfato (por ejemplo, adalimumab), amortiguador de fosfato/glicina (por ejemplo, basilixumab), amortiguador de Tris (por ejemplo, ipilimumab), histidina (por ejemplo, ustekinumab), citrato de sodio (por ejemplo, rituximab); y desde pH 4,7 (por ejemplo, certolizumab) y pH 5,2 (por ejemplo, adalimumab) a pH 7,0-7,4 (por ejemplo, cetuximab). También están disponibles en formulaciones que contienen, opcionalmente, edetato disódico (por ejemplo, alemtuzumab), manitol (por ejemplo, ipilimumab), sorbitol (por ejemplo, golimumab), sacarosa (por ejemplo, ustekinumab), cloruro de sodio (por ejemplo, rituximab), cloruro de potasio (por ejemplo, alemtuzumab) y trehalosa (por ejemplo, ranibizumab); todas con y sin polisorbato-80, en el rango de 0,001 % (por ejemplo, abcixmab) a 0,1 % (por ejemplo, adalimumab).

Actividad biológica de anticuerpos anti-LAG3 y anti-PD-1 humanizados

Las formulaciones de la presente invención incluyen anticuerpos anti-LAG3 y fragmentos de estos y, opcionalmente, anticuerpos anti-PD1 y fragmentos de estos, que son biológicamente activos cuando están reconstituidos o en una formulación líquida.

A continuación se proporcionan ejemplos de anticuerpos anti-LAG3 (divulgados en WO 2016/028672, incorporados en la presente por referencia en su totalidad):

- **Ab1:** una inmunoglobulina de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos:

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKASQSLDYEGDSDMNWYLQKPGQPPQLLIYGASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTL
KISRVEAEDVGVIYCCQSTEDPRTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
5 DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO: 35); y

- una inmunoglobulina de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos:

QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCASGYTFTDYNVDWVRQARGQRLEWIGDINPNNGGTIYAQKFQERVTITVDKSTS
TAYMELSSLRSEDTAVYYCARNYRWFGAMDHWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
10 PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 36); o

- 15 un dominio variable de la inmunoglobulina de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos:

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKASQSLDYEGDSDMNWYLQKPGQPPQLLIYGASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTL
KISRVEAEDVGVIYCCQSTEDPRTFGGGKVEIK

(SEQ ID NO: 37 (CDR subrayadas)); y

- 20 un dominio variable de la inmunoglobulina de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos:

QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCASGYTFTDYNVDWVRQARGQRLEWIGDINPNNGGTIYAQKFQERVTITVDKSTS
TAYMELSSLRSEDTAVYYCARNYRWFGAMDHWGQGTITVTVSS

(SEQ ID NO: 38 (CDR subrayadas))

- 25 ; o que comprende las CDR:

CDR-L1: KASQSLDYEGDSDMN (SEQ ID NO: 39);

CDR-L2: GASNLES (SEQ ID NO: 40);

CDR-L3: QQSTEDPRT (SEQ ID NO: 41);

CDR-H1: DYNVD (SEQ ID NO: 42);

- 30 CDR-H2: DINPNNGGTIYAQKFQE (SEQ ID NO: 43); y

CDR-H3: NYRWFGAMDH (SEQ ID NO: 44)

- **Ab2:** una inmunoglobulina de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos:

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKASQSLDYEGDSDMNWYLQKPGQPPQLLIYGASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTL
35 KISRVEAEDVGVIYCCQSTEDPRTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO: 35); y

una inmunoglobulina de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos:

QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCASGYTFTDYNVDWVRQARGQRLEWIGDINPNSGGTIYAQKFQERVITITVDKSTS
TAYMELSSLRSEDTAVYYCARNYRWFAMDHWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
5 PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 45); o

10 un dominio variable de la inmunoglobulina de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos:

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKASQSLDYEGDSMDNWLQKPGQPPQLLIYGASNLESVPDRFSGSGSGTDFTL
KISRVEADVGVYYCQQSTEDPRTFGGGKVEIK

(SEQ ID NO: 37 (CDR subrayadas)); y

15 un dominio variable de la inmunoglobulina de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos:

QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCASGYTFTDYNVDWVRQARGQRLEWIGDINPNSGGTIYAQKFQERVITITVDKSTS
TAYMELSSLRSEDTAVYYCARNYRWFAMDHWGQGTITVTVSS

(SEQ ID NO: 46 (CDR subrayadas))

20 ; o que comprende las CDR:

CDR-L1: KASQSLDYEGDSMDN (SEQ ID NO: 39);

CDR-L2: GASNLES (SEQ ID NO: 40);

CDR-L3: QQSTEDPRT (SEQ ID NO: 41);

CDR-H1: DYNVD (SEQ ID NO: 42);

25 CDR-H2: DINPNSGGTIYAQKFQE (SEQ ID NO: 47); y

CDR-H3: NYRWFAMDH (SEQ ID NO: 44)

- **Ab3:** una inmunoglobulina de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos:

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKASQSLDYEGDSMDNWLQKPGQPPQLLIYGASNLESVPDRFSGSGSGTDFTL
30 KISRVEADVGVYYCQQSTEDPRTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO: 35)

una inmunoglobulina de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos:

QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCASGYTFTDYNVDWVRQARGQRLEWIGDINPDGGTIYAQKFQERVITITVDKSTS
35 TAYMELSSLRSEDTAVYYCARNYRWFAMDHWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC

PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 48); o

- 5 un dominio variable de la inmunoglobulina de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos:

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKASQSLDYEGDSMDNWLQKPGQPPQLLIYGASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTL
KISRVEAEDVGVYYCQQSTEDPRTFSGGKVEIK

(SEQ ID NO: 37 (CDR subrayadas)); y

- 10 un dominio variable de la inmunoglobulina de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos:

QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCASGYTFTDYNVDWVRQARGQRLEWIGDINPNDGGTIYAQKFQERVTITVDKSTS
TAYMELSSLRSEDTAVYYCARNYRWFGAMDHWGQGTITVTVSS

(SEQ ID NO: 49 (CDR subrayadas))

- 15 ; o que comprende las CDR:

CDR-L1: KASQSLDYEGDSMDN (SEQ ID NO: 39);

CDR-L2: GASNLES (SEQ ID NO: 40);

CDR-L3: QQSTEDPRT (SEQ ID NO: 41);

CDR-H1: DYNVD (SEQ ID NO: 42);

- 20 CDR-H2: DINPNDGGTIYAQKFQE (SEQ ID NO: 50); y

CDR-H3: NYRWFGAMDH (SEQ ID NO: 44)

- **Ab4:** una inmunoglobulina de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos:

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKASQSLDYEGDSMDNWLQKPGQPPQLLIYGASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTL
KISRVEAEDVGVYYCQQSTEDPRTFSGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

- 25 (SEQ ID NO: 35); y

una inmunoglobulina de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos:

QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCASGYTFTDYNVDWVRQARGQRLEWIGDINPNQGGTIYAQKFQERVTITVDKSTS
TAYMELSSLRSEDTAVYYCARNYRWFGAMDHWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

- 35 (SEQ ID NO: 51); o

un dominio variable de la inmunoglobulina de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos:

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKASQSLDYEGDSDMNWYLQKPGQPPQLLIYGASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQSTEDPRTFGGGKVEIK

5 (SEQ ID NO: 37 (CDR subrayadas)); y

un dominio variable de la inmunoglobulina de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos:

QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCASGYTFTDYNVDWVRQARGQRLEWIGDINPNQGGTIYAQKFQERVITITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNYRWFGAMDHWGQGTITVTVSS

10 (SEQ ID NO: 52 (CDR subrayadas))

; o que comprende las CDR:

CDR-L1: KASQSLDYEGDSDMN (SEQ ID NO: 39);

CDR-L2: GASNLES (SEQ ID NO: 40);

CDR-L3: QQSTEDPRT (SEQ ID NO: 41);

15 CDR-H1: DYNVD (SEQ ID NO: 42);

CDR-H2: DINPNQGGTIYAQKFQE (SEQ ID NO: 53); y

CDR-H3: NYRWFGAMDH (SEQ ID NO: 44)

- **Ab5:** una inmunoglobulina de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos:

20 DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKASQSLDYEGDSDMNWYLQKPGQPPQLLIYGASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQSTEDPRTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO: 35); y

una inmunoglobulina de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos:

25 QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCASGYTFTDYNVDWVRQARGQRLEWIGDINPNNGGTIYAQKFQERVITITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNYRWFGAMDHWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVEISKYGPCCPAPCPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ

30 PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

(SEQ ID NO: 54); o

un dominio variable de la inmunoglobulina de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos:

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKASQSLDYEGDSDMNWYLQKPGQPPQLLIYGASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQSTEDPRTFGGGKVEIK

35 (SEQ ID NO: 37 (CDR subrayadas)); y

un dominio variable de la inmunoglobulina de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos:

QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCASGYTFTDYNVDWVRQARGQRLEWIGDINPNNGGTIYAQKFQ~~ERV~~TITVDKSTS
TAYMELSSLRSEDTAVYYCARNYRWFGAMDHWGQGT~~TV~~TVSS

5 (SEQ ID NO: 55 (CDR subrayadas))

; o que comprende las CDR:

CDR-L1: KASQSLDYEGDSDMN (SEQ ID NO: 39);

CDR-L2: GASNLES (SEQ ID NO: 40);

CDR-L3: QQSTEDPRT (SEQ ID NO: 41);

10 CDR-H1: DYNVD (SEQ ID NO: 42);

CDR-H2: DINPNNGGTIYAQKFQ~~E~~ (SEQ ID NO: 56); y

CDR-H3: NYRWFGAMDH (SEQ ID NO: 44)

- **Ab6:** una inmunoglobulina de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos:

15 DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKASQSLDYEGDSDMNWYLQKPGQPPQLLIYGASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTL
KISRVEAEDVGYYCQQSTEDPRTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN~~NY~~FYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO: 35); y

una inmunoglobulina de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos:

20 QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCASGYTFTDYNVDWVRQARGQRLEWIGDINPNDGGTIYAQKFQ~~ERV~~TITVDKSTS
TAYMELSSLRSEDTAVYYCARNYRWFGAMDHWGQGT~~TV~~TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNV~~DH~~KPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAP
EFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSD~~Q~~EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT~~VL~~
HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
25 PENNYKTTTPVLDSGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK

(SEQ ID NO: 57); o

un dominio variable de la inmunoglobulina de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos:

30 DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKASQSLDYEGDSDMNWYLQKPGQPPQLLIYGASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTL
KISRVEAEDVGYYCQQSTEDPRTFGGGTKVEIK

(SEQ ID NO: 37 (CDR subrayadas)); y

un dominio variable de la inmunoglobulina de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos:

35 QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCASGYTFTDYNVDWVRQARGQRLEWIGDINPNDGGTIYAQKFQ~~ERV~~TITVDKSTS
TAYMELSSLRSEDTAVYYCARNYRWFGAMDHWGQGT~~TV~~TVSS

(SEQ ID NO: 58 (CDR subrayadas))

; o que comprende las CDR:

CDR-L1: KASQSLDYEGDSMDN (SEQ ID NO: 39);

CDR-L2: GASNLES (SEQ ID NO: 40);

CDR-L3: QQSTEDPRT (SEQ ID NO: 41);

5 CDR-H1: DYNVD (SEQ ID NO: 42);

CDR-H2: DINPNDGGTIYAQKFQE (SEQ ID NO: 59); y

CDR-H3: NYRWFGAMDH (SEQ ID NO: 44)

- **Ab7: una inmunoglobulina de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos:**

10 DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKASQSLDYEGDSMDNWYLQKPGQPPQQLLIYGASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTL
KISRVEAEDVGVYYCQQSTEDPRTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO: 35); y

una inmunoglobulina de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos:

15 QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCASGYTFTDYNVDWVRQARGQRLEWIGDINPNSGGTIYAQKFQERVTITVDKSTS
TAYMELSSLRSEDTAVYYCARNYRWFGAMDHWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCPAP
EFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT
HQLDNLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
20 PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

(SEQ ID NO: 60); o

un dominio variable de la inmunoglobulina de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos:

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKASQSLDYEGDSMDNWYLQKPGQPPQQLLIYGASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTL
25 KISRVEAEDVGVYYCQQSTEDPRTFGGGTKVEIK

(SEQ ID NO: 37 (CDR subrayadas)); y

un dominio variable de la inmunoglobulina de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos:

QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCASGYTFTDYNVDWVRQARGQRLEWIGDINPNSGGTIYAQKFQERVTITVDKSTS
30 TAYMELSSLRSEDTAVYYCARNYRWFGAMDHWGQGTITVTVSS

(SEQ ID NO: 61 (CDR subrayadas))

; o que comprende las CDR:

CDR-L1: KASQSLDYEGDSMDN (SEQ ID NO: 39);

CDR-L2: GASNLES (SEQ ID NO: 40);

35 CDR-L3: QQSTEDPRT (SEQ ID NO: 41);

CDR-H1: DYNVD (SEQ ID NO: 42);

CDR-H2: DINPNSGGTIYAQKFQE (SEQ ID NO: 62); y

CDR-H3: NYRWFGAMDH (SEQ ID NO: 44)

- **Ab8:** una inmunoglobulina de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos:

5 DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKASQSLDYEGDSDMNWYLQKPGQPPQLLIYGASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTL
KISRVEAEDVGVYYCQQSTEDPRTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO: 35); y

una inmunoglobulina de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos:

10 QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSKASGYTFTDYNVDWVRQARGQRLEWIGDINPNQGGTIYAQKFQERVTITVDKSTS
TAYMELSSLRSEDTAVYYCARNYRWFGAMDHWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAP
EFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
15 PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

(SEQ ID NO: 63); o

un dominio variable de la inmunoglobulina de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos:

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKASQSLDYEGDSDMNWYLQKPGQPPQLLIYGASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTL
20 KISRVEAEDVGVYYCQQSTEDPRTFGGGKVEIK

(SEQ ID NO: 37 (CDR subrayadas)); y

un dominio variable de la inmunoglobulina de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos:

QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSKASGYTFTDYNVDWVRQARGQRLEWIGDINPNQGGTIYAQKFQERVTITVDKSTS
25 TAYMELSSLRSEDTAVYYCARNYRWFGAMDHWGQGTITVTVSS

(SEQ ID NO: 64 (CDR subrayadas))

; o que comprende las CDR:

CDR-L1: KASQSLDYEGDSDMN (SEQ ID NO: 39);

CDR-L2: GASNLES (SEQ ID NO: 40);

30 CDR-L3: QQSTEDPRT (SEQ ID NO: 41);

CDR-H1: DYNVD (SEQ ID NO: 42);

CDR-H2: DINPNQGGTIYAQKFQE (SEQ ID NO: 65); y

CDR-H3: NYRWFGAMDH (SEQ ID NO: 44)

- **Ab9:** una inmunoglobulina de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos:

35

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKASQSLDYEGDSDMNWYLQKPGQPPQLLIYGASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTL
KISRVEAEDVGVIYCCQSTEDPRTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO: 35); y

5 una inmunoglobulina de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos:

QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCASGYTFTDYNVDWVRQARGQRLEWIGDINPNGGGTIYAQKFQERVTITVDKSTS
TAYMELSSLRSEDTAVYYCARNYRWFAMDHWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVEISKYGPCCPCPAP
EFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL
10 HQDWLNGKEYCKKVSNNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

(SEQ ID NO: 66); o

un dominio variable de la inmunoglobulina de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos:

15 DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKASQSLDYEGDSDMNWYLQKPGQPPQLLIYGASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTL
KISRVEAEDVGVIYCCQSTEDPRTFGGGKVEIK

(SEQ ID NO: 37 (CDR subrayadas)); y

un dominio variable de la inmunoglobulina de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos:

20 QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCASGYTFTDYNVDWVRQARGQRLEWIGDINPNGGGTIYAQKFQERVTITVDKSTS
TAYMELSSLRSEDTAVYYCARNYRWFAMDHWGQGTITVTVSS

(SEQ ID NO: 67 (CDR subrayadas))

; o que comprende las CDR:

CDR-L1: KASQSLDYEGDSDMN (SEQ ID NO: 39);

25 CDR-L2: GASNLES (SEQ ID NO: 40);

CDR-L3: QQSTEDPRT (SEQ ID NO: 41);

CDR-H1: DYNVD (SEQ ID NO: 42);

CDR-H2: DINPNGGGTIYAQKFQE (SEQ ID NO: 68); y

CDR-H3: NYRWFAMDH (SEQ ID NO: 44)

30 La presente invención proporciona formulaciones de anticuerpos anti-LAG3, que comprenden dos cadenas ligeras idénticas con la secuencia de SEQ ID NO: 35 y dos cadenas pesadas idénticas con la secuencia de SEQ ID NO: 36, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63 o 66. La presente invención también proporciona formulaciones de anticuerpos anti-LAG3, que comprenden dos cadenas ligeras idénticas con la secuencia de SEQ ID NO: 35 y dos cadenas
35 pesadas idénticas con la secuencia de SEQ ID NO: 57.

La presente invención proporciona formulaciones de un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de fijación al antígeno que comprende una secuencia de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 37 y una secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 38, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64 o 67. La presente invención también proporciona

5 formulaciones de un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de fijación al antígeno que comprende una secuencia de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 37 y una secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 58. La presente invención también proporciona formulaciones de un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de fijación al antígeno que comprende una secuencia de CDRL1 de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO:

10 39, secuencia de CDRL2 de SEQ ID NO: 40, secuencia de CDRL3 de SEQ ID NO: 41 y una secuencia de CDRH1 de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 42, secuencia de CDRH2 de SEQ ID NO: 43, 47, 50, 53, 56, 59, 62, 65 o 68, y secuencia de CDRH3 de SEQ ID NO: 44. La presente invención también proporciona formulaciones de un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de fijación al antígeno que comprende una secuencia de CDRL1 de la región

15 variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 39, secuencia de CDRL2 de SEQ ID NO: 40, secuencia de CDRL3 de SEQ ID NO: 41 y una secuencia de CDRH1 de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 42, secuencia de CDRH2 de SEQ ID NO: 59, y secuencia de CDRH3 de SEQ ID NO: 44.

Otros anticuerpos anti-LAG3 que pueden incluirse en la formulación incluyen

20 BMS-986016, divulgado en WO2014008218; IMP731 y IMP701. Por lo tanto, la presente invención proporciona formulaciones de un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de fijación al antígeno que comprende una secuencia de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 69 y una secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 70. La presente invención también proporciona formulaciones de un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de

25 fijación al antígeno que comprende una secuencia de CDRL1 de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 71, secuencia de CDRL2 de SEQ ID NO: 72, secuencia de CDRL3 de SEQ ID NO: 73 y una secuencia de CDRH1 de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 74, secuencia de CDRH2 de SEQ ID NO: 75, y secuencia de CDRH3 de SEQ ID NO: 76.

La formulación puede comprender también un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento

30 de fijación al antígeno como se ejemplifica a continuación.

Tabla 1. Secuencias de anticuerpos contra PD-1 de ejemplo

Característica del anticuerpo	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO.
Cadena ligera de pembrolizumab		
CDR1	RASKGVSTSGYSYLH	1
CDR2	LASYLES	2
CDR3	QHSRDLPLT	3
Región variable	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWY QQKPGQAPRLLIYLAstyleSGVPARFSGSGSGTDFTLT LEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGKVEIK	4
Cadena ligera	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWY QQKPGQAPRLLIYLAstyleSGVPARFSGSGSGTDFTLT LEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	5
Cadena pesada de pembrolizumab		
CDR1	NYMY	6
CDR2	GINPSNGGTNFNEKFKN	7
CDR3	RDYRFDMGFDY	8
Región variable	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMYWV RQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVTLTDSST TTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQG TTVTVSS	9
Cadena pesada	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMYWV RQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVTLTDSST TTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQG TTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESEKYGPPCPAP EFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLK	10
Cadena ligera de nivolumab		
CDR1	RASQSVSSYLA	11
CDR2	DASNRAT	12
CDR3	QQSSNWPRT	13
Región variable	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGKVEIK	14
Cadena ligera	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH	15

Característica del anticuerpo	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO.
	QGLSSPVTKSFNRGEC	
Cadena pesada de nivolumab		
CDR1	NSGMH	16
CDR2	VIWYDGSKRYYADSVKG	17
CDR3	NDDY	18
Región variable	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVR QAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRDNK NTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGTLLTVSS	19
Cadena pesada	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVR QAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRDNK NTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGTLLTVSSA STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTLSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTY TCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVF LFPPPKKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV LDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNH YTQKSLSLSLGK	20

Tabla 2. Anticuerpos PD-1 y fragmentos de fijación al antígeno adicionales en las formulaciones, métodos y usos de la invención.

A. Anticuerpos y fragmentos de fijación al antígeno que comprenden CDR de cadena pesada y ligera de hPD-1.08A en WO2008/156712 (incorporados en la presente por referencia en su totalidad)	
CDRL1	SEQ ID NO:21
CDRL2	SEQ ID NO:22
CDRL3	SEQ ID NO:23
CDRH1	SEQ ID NO:24
CDRH2	SEQ ID NO:25
CDRH3	SEQ ID NO:26
C. Anticuerpos y fragmentos de fijación al antígeno que comprenden la región variable de la cadena pesada de h109A madura y una de las regiones de la cadena ligera de K09A madura en WO 2008/156712	
VR de la cadena pesada	SEQ ID NO:27
VR de la cadena ligera	SEQ ID NO:28 o SEQ ID NO:29 o SEQ ID NO:30
D. Anticuerpos y fragmentos de fijación al antígeno que comprenden la cadena pesada madura 409 y una de las cadenas ligeras maduras K09A en WO	

2008/156712	
Cadena pesada	SEQ ID NO:31
Cadena ligera	SEQ ID NO:32 o SEQ ID NO:33 o SEQ ID NO:34

En otro aspecto de la invención, la formulación comprende un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de fijación al antígeno que comprende una secuencia de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 37 y una secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 58; y un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de fijación al antígeno que comprende una secuencia de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 4 y una secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 9. En otra forma de realización, la formulación comprende un anticuerpo anti-LAG3 que comprende una secuencia de la cadena ligera de SEQ ID NO: 35 y una secuencia de la cadena pesada de SEQ ID NO: 57; y un anticuerpo anti-PD-1 que comprende una secuencia de la cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y una secuencia de la cadena pesada de SEQ ID NO: 10. La presente invención también proporciona formulaciones de anticuerpos anti-LAG3 o fragmentos de fijación al antígeno de estos que comprenden una secuencia de CDRL1 de cadena ligera de SEQ ID NO: 39, secuencia de CDRL2 de SEQ ID NO: 40 y secuencia de CDRL3 de SEQ ID NO: 41, y una secuencia de CDRH1 de cadena pesada de SEQ ID NO: 42, secuencia de CDRH2 de SEQ ID NO: 59, y secuencia de CDRH3 de SEQ ID NO: 44; y un anticuerpo anti-PD-1 que comprende una secuencia de CDRL1 de cadena ligera de SEQ ID NO: 1, secuencia de CDRL2 de SEQ ID NO: 2, secuencia de CDRL3 de SEQ ID NO: 3, y una secuencia de CDRH1 de cadena pesada de SEQ ID NO: 6, secuencia de CDRH2 de SEQ ID NO: 7, y una secuencia de CDRH3 de SEQ ID NO: 8. En una forma de realización, la relación de anticuerpo anti-LAG3 con respecto a anticuerpo anti-PD-1 en la formulación es 1:1, 1:2 o 1:3. En otra forma de realización, la relación molar de anticuerpo anti-LAG3 con respecto a anticuerpo anti-PD-1 en la formulación es 1:1, 2:1, 3:1 o 3,5:1.

En otro aspecto de la presente invención, las formulaciones comprenden un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de fijación al antígeno que comprende una secuencia de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 69 y una secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 70 y un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de fijación al antígeno que comprende una secuencia de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 14 y una secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 19. La presente invención también proporciona formulaciones de un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de fijación al antígeno que comprende una secuencia de CDRL1 de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 71, secuencia de CDRL2 de SEQ ID NO: 72, secuencia de CDRL3 de SEQ ID NO:

73 y una secuencia de CDRH1 de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 74, secuencia de CDRH2 de SEQ ID NO: 75, y secuencia de CDRH3 de SEQ ID NO: 76, y un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de fijación al antígeno que comprende una secuencia de CDRL1 de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 11, secuencia de CDRL2 de
 5 SEQ ID NO: 12, secuencia de CDRL3 de SEQ ID NO: 13 y una secuencia de CDRH1 de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 16, secuencia de CDRH2 de SEQ ID NO: 17, y secuencia de CDRH3 de SEQ ID NO: 18.

El anticuerpo o fragmentos de fijación al antígeno de la formulación pueden comprender una región variable de la cadena ligera y una región variable de la cadena pesada. En algunas
 10 formas de realización, la región variable de la cadena ligera comprende SEQ ID NO:4 o una variante de SEQ ID NO:4, y la región variable de la cadena pesada comprende SEQ ID NO:9 o una variante de SEQ ID NO:9. En otras formas de realización, la región variable de la cadena ligera comprende SEQ ID NO:14 o una variante de SEQ ID NO:14, y la región variable de la cadena pesada comprende SEQ ID NO:19 o una variante de SEQ ID NO:19. En otras formas de
 15 realización, la región variable de la cadena pesada comprende SEQ ID NO:27 o una variante de SEQ ID NO:27 y la región variable de la cadena ligera comprende SEQ ID NO:28 o una variante de SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29 o una variante de SEQ ID NO:29, o SEQ ID NO:30 o una variante de SEQ ID NO:30. En tales formas de realización, una secuencia de región variable de cadena ligera o cadena pesada variante es idéntica a la secuencia de referencia, excepto en que
 20 tiene 1, 2, 3, 4, o 5 sustituciones de aminoácidos. En algunas formas de realización, las sustituciones se hacen en la región de marco (es decir, fuera de las CDR). En algunas formas de realización, 1, 2, 3, 4 o 5 de las sustituciones de aminoácidos son sustituciones conservadoras.

En otra forma de realización, las formulaciones de la invención comprenden un anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno, que tiene un dominio V_L y/o un dominio V_H con
 25 al menos 95 %, 90 %, 85 %, 80 %, 75 % o 50 % de homología de secuencia con uno de los dominios V_L o dominios V_H descritos anteriormente, y exhibe fijación específica a PD-1 o LAG3. En otra forma de realización, el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de las formulaciones de la invención comprende dominios V_L y V_H que tienen hasta 1, 2, 3, 4 o 5 o más sustituciones de aminoácidos, y exhibe fijación específica a PD-1 o LAG3.

30 En formas de realización de la invención, el anticuerpo es un anticuerpo anti-PD-1 que comprende una cadena ligera que comprende o consiste en una secuencia de residuos de aminoácidos que se indica en SEQ ID NO:5 y una cadena pesada que comprende o consiste en una secuencia de residuos de aminoácidos que se indica en SEQ ID NO:10. En formas de realización alternativas, el anticuerpo es un anticuerpo anti-PD-1 que comprende una cadena

ligera que comprende o consiste en una secuencia de residuos de aminoácidos que se indica en SEQ ID NO:15 y una cadena pesada que comprende o consiste en una secuencia de residuos de aminoácidos que se indica en SEQ ID NO:20. En otras formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo anti-PD-1 que comprende una cadena ligera que comprende o consiste en una
 5 secuencia de residuos de aminoácidos que se indica en SEQ ID NO:32 y una cadena pesada que comprende o consiste en una secuencia de residuos de aminoácidos que se indica en SEQ ID NO:31. En formas de realización adicionales, el anticuerpo es un anticuerpo anti-PD-1 que comprende una cadena ligera que comprende o consiste en una secuencia de residuos de
 10 aminoácidos que se indica en SEQ ID NO:33 y una cadena pesada que comprende o consiste en una secuencia de residuos de aminoácidos que se indica en SEQ ID NO:31. En otras formas de realización adicionales, el anticuerpo es un anticuerpo anti-PD-1 que comprende una cadena ligera que comprende o consiste en una secuencia de residuos de aminoácidos que se indica en SEQ ID NO:34 y una cadena pesada que comprende o consiste en una secuencia de residuos de aminoácidos que se indica en SEQ ID NO:31. En algunas formulaciones de la invención, el
 15 anticuerpo es pembrolizumab o un biosimilar de pembrolizumab. En algunas formulaciones de la invención, el anticuerpo es nivolumab o un biosimilar de nivolumab.

En general, las variantes de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos anti-PD-1 o anti-LAG3 y fragmentos de fijación al antígeno de la invención tienen una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos
 20 de un anticuerpo de referencia o fragmento de fijación al antígeno (por ejemplo, secuencia de la cadena pesada, cadena ligera, V_H , V_L , de marco o humanizada), con mayor preferencia, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 85 %, con mayor preferencia 90 %, y con máxima preferencia, al menos 95, 98 o 99 %. La identidad o la homología con respecto a una secuencia se define en la presente como el porcentaje de residuos de aminoácido en la secuencia candidata
 25 que son idénticos a los residuos de anti-PD-1 o anti-LAG3, después de la alineación de las secuencias y de la introducción de separaciones, de ser necesario, para alcanzar el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y no tener en cuenta sustituciones conservadoras como parte de la identidad de secuencia. Ninguno del terminal N, terminal C, o extensiones, eliminaciones o inserciones internas en la secuencia del anticuerpo deben construirse de modo que afecte la
 30 identidad u homología de secuencia.

Formulaciones

En algunos aspectos de la invención, las formulaciones de esta invención minimizan la formación de agregados de anticuerpo (especies de alto peso molecular) y

particulados, mejoran la estabilidad coloidal, minimizan la fragmentación (especies de bajo peso molecular), o aseguran que el anticuerpo mantenga la actividad biológica en el tiempo. En un aspecto, la formulación comprende: alrededor de 5-300 mg/ml de un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de fijación al antígeno de este, uno o más de un excipiente seleccionado del grupo que

5 consiste en histidina, aspartato, glutamina, glicina, prolina, metionina, arginina o una sal de estos farmacéuticamente aceptable, NaCl, KCl, LiCl, CaCl₂, MgCl₂, ZnCl₂ y FeCl₂, a una concentración total de 10-1000 mM, y un amortiguador a pH alrededor de 5-8. En otro aspecto, la formulación comprende: alrededor de 10-250 mg/ml de un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de fijación al antígeno de este que comprende CDRL1 de SEQ ID NO: 39, CDRL2 de SEQ ID

10 NO: 40, CDRL3 de SEQ ID NO: 41, CDRH1 de SEQ ID NO: 42, CDRH2 de SEQ ID NO: 59, CDRH3 de SEQ ID NO: 44. En una forma de realización, uno o más de un excipiente seleccionado del grupo que consiste en histidina, aspartato, glutamina, glicina, prolina, metionina, arginina o una sal de estos farmacéuticamente aceptable, NaCl, KCl, LiCl, CaCl₂, MgCl₂, ZnCl₂ y FeCl₂, a una concentración total de 25-250 mM. En otra forma de realización,

15 uno o más de un excipiente seleccionado del grupo que consiste en histidina, aspartato, glutamina, glicina, prolina, metionina, arginina o una sal de estas farmacéuticamente aceptable, NaCl, KCl, LiCl, CaCl₂, MgCl₂, ZnCl₂ y FeCl₂, a una concentración total de 40-250 mM.

En un aspecto, el excipiente es arginina o una sal de este farmacéuticamente aceptable a una concentración de 15-250 mM. En un aspecto, el excipiente es arginina o una sal de este farmacéuticamente aceptable a una concentración de 25-250 mM. En otra forma de

20 realización, el excipiente es arginina o una sal de esta farmacéuticamente aceptable a una concentración de 40-150 mM. En otra forma de realización, el excipiente es arginina o una sal de este farmacéuticamente aceptable a una concentración de 40-100 mM. En otra forma de realización, el excipiente es arginina o una sal de este farmacéuticamente aceptable a una

25 concentración de 70 mM. En otra forma de realización, el excipiente es arginina o una sal de este farmacéuticamente aceptable a una concentración de 70-150 mM. Los ejemplos de sales de este farmacéuticamente aceptables de arginina (forma L o D) incluyen, entre otras, L-arginina clorhidrato y succinato de L-arginina. En otros aspectos de las formas de realización anteriores, la formulación además comprende un tensioactivo no iónico, azúcar o poliol, o glutamina,

30 glicina, prolina o metionina.

En otro aspecto, el excipiente es una combinación de NaCl y arginina o una sal de este farmacéuticamente aceptable con una concentración total de 25-250 mM. En otra forma de realización, el excipiente es una combinación de NaCl y arginina o una sal de este farmacéuticamente aceptable con una concentración total de 70-100 mM. En una forma de

realización, la proporción de concentración de NaCl con respecto a arginina es 1:1. En otra forma de realización, la concentración de NaCl es 35 mM y la concentración de arginina es 35 mM. En otra forma de realización, la concentración de NaCl es 50 mM y la concentración de arginina es 50 mM.

5 En otro aspecto, el excipiente es NaCl, KCl o LiCl a alrededor de 40-150 mM. En otra forma de realización, el excipiente es NaCl, KCl o LiCl a alrededor de 40-100 mM. En otra forma de realización, el excipiente es NaCl, KCl o LiCl a alrededor de 70-130 mM. En otra forma de realización, el excipiente es NaCl, KCl o LiCl a alrededor de 70-100 mM. En otra forma de realización, el excipiente es NaCl a alrededor de 70 mM. En otros aspectos de las formas de realización anteriores, la formulación además comprende un tensioactivo no iónico.

10 En otro aspecto, el excipiente es L-histidina a alrededor de 25-200 mM. En otra forma de realización, la L-histidina está a aproximadamente 50-200 mM. En aún otra forma de realización, la L-histidina está a alrededor de 40-100 mM.

15 En otro aspecto, el excipiente es L-glutamina, L-glicina, L-prolina o L-metionina, o una combinación de estas a alrededor de 25-200 mM. En otra forma de realización, el excipiente está a alrededor de 50-200 mM. En aún otra forma de realización, el excipiente está a alrededor de 40-100 mM. En aún otra forma de realización, el excipiente está a alrededor de 70 mM.

20 En una forma de realización, el excipiente es L-glutamina, L-glicina, L-aspartato o una combinación de estos a alrededor de 25-200 mM. En otra forma de realización, el excipiente está a alrededor de 20-50 mM. En otra forma de realización, el excipiente está a alrededor de 20 mM. En aún otra forma de realización, el excipiente está a alrededor de 40-100 mM. En aún otra forma de realización, el excipiente está a alrededor de 70 mM. En otra forma de realización, el excipiente es L-aspartato 20 mM y L-glicina 50 mM. En otra forma de realización, el excipiente es L-glutamina 20 mM y L-glicina 50 mM.

25 En una forma de realización, la composición es una formulación farmacéuticamente aceptable que contiene un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de fijación al antígeno de este en un amortiguador que tiene un pH neutro o levemente ácido (pH 5-8), y arginina o una sal de este farmacéuticamente aceptable. En una forma de realización, se usa un amortiguador de pH alrededor de 5,5-6,5 en la composición. En otra forma de realización, se usa un amortiguador de pH alrededor de 5,5-6,0 en la composición. En otra forma de realización, se usa un amortiguador de pH alrededor de 5,0-6,0 en la composición. El amortiguador puede tener una concentración de 5-1000 mM. En otra forma de realización, el amortiguador puede tener una concentración de 5-150 mM. En otra forma de realización, el amortiguador puede tener una

concentración de 5-300 mM. En otra forma de realización, el amortiguador tiene una concentración de alrededor de 1-300 mM. En otra forma de realización, el amortiguador puede tener una concentración de 1-30 mM. En aun otra forma de realización, el amortiguador puede tener una concentración de 5-30 mM. En aun otra forma de realización, el amortiguador puede tener una concentración de 5-20 mM. En una forma de realización, el amortiguador es histidina, acetato o citrato. Un amortiguador preferido contiene alrededor de 10 mM de histidina, acetato o citrato.

En una forma de realización, la formulación comprende un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de fijación al antígeno de este, azúcar o poliol; un tensioactivo no iónico, un amortiguador de histidina o un amortiguador de acetato a un pH alrededor de 5-8, arginina 10-1000 mM, o una sal de esta farmacéuticamente aceptable y, de manera opcional, metionina (forma L o D), EDTA, DTPA, triptófano (forma L o D) o piridoxina. En otra forma de realización, la formulación comprende alrededor de 10-300 mg/ml de un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de fijación al antígeno de este, un azúcar o poliol; un tensioactivo no iónico, amortiguador de histidina 50-500 mM a pH alrededor de 5-8, sal de cationes monovalentes 10-1000 mM seleccionada de NaCl, KCl y LiCl o sal de cationes polivalentes seleccionada de CaCl_2 , MgCl_2 , ZnCl_2 , FeCl_2 y FeCl_3 , de manera opcional, arginina 10-1000 mM o una sal de esta farmacéuticamente aceptable y, de manera opcional, metionina (forma D o L), EDTA, DTPA, triptófano y piridoxina.

La formulación puede incluir 1-100 μM , 1-30 μM , 1-20 μM , 10 μM -30 μM de DTPA o EDTA. La formulación además puede incluir L-metionina 1-30 mM. En una forma de realización, la formulación también puede incluir L-metionina 1-20 mM. La formulación además puede incluir L-metionina 5-15 mM. La formulación además puede incluir L-metionina 5-10 mM. La formulación además puede incluir L-metionina 10 mM, o al menos 10 mM. En ocasiones, se usa superposición de nitrógeno (mantener en manta de nitrógeno, por ejemplo, solo 5 % o 10 % de O_2 residual) durante las etapas de producción y/o antes del cierre de los viales, para estabilizar el anticuerpo frente a la oxidación.

En otro aspecto de la invención, la formulación además comprende un azúcar, poliol, o un tensioactivo no iónico, o una combinación de estos. En una forma de realización, el azúcar se selecciona del grupo que consiste en glucosa, sacarosa, trehalosa y lactosa o una combinación de estos. En una forma de realización, el azúcar es un disacárido tal como sacarosa, trehalosa y maltosa. En una forma de realización, el azúcar es un azúcar no reductor. En otra forma de realización, el azúcar es un disacárido no reductor, tal como sacarosa o trehalosa, o una combinación de estas. En una forma de realización, el azúcar está a una

concentración de 10-200 mg/ml. En otra forma de realización, el azúcar está a una concentración de 30-120 mg/ml. En otra forma de realización, el azúcar está a una concentración de 50-90 mg/ml.

En una forma de realización, el poliol se selecciona del grupo que consiste en manitol, sorbitol, glicerol y polietilenglicol. En otra forma de realización, el poliol es un alcohol de azúcar. En una forma de realización, el azúcar y el poliol se seleccionan del grupo que consiste en sacarosa, trehalosa, sorbitol, glicerol y polietilenglicol. En otra forma de realización, el poliol es un glicol. En una forma de realización, el glicol se selecciona del grupo que consiste en etilenglicol, propilenglicol y polietilenglicol. En una forma de realización, el poliol está a una concentración de 10-200 mg/ml. En otra forma de realización, el poliol está a una concentración de 10-50 mg/ml. En otra forma de realización, el poliol está a una concentración de 5-30 mg/ml.

En una forma de realización, la formulación comprende alrededor de 10-250 mg/ml de sacarosa o trehalosa. En otra forma de realización, la formulación comprende alrededor de 20-200 mg/ml de sacarosa o trehalosa. En otra forma de realización, la formulación comprende alrededor de 50-80 mg/ml de sacarosa o trehalosa. En otra forma de realización, la formulación comprende alrededor de 50-90 mg/ml de sacarosa o trehalosa. En aun otra forma de realización, la formulación comprende alrededor de 70-80 mg/ml de sacarosa o trehalosa. En aun otra forma de realización, la formulación comprende al menos alrededor de 50 mg/ml de sacarosa o trehalosa. En otra forma de realización, la formulación comprende alrededor de 20-200 mg/ml de sorbitol, PEG400 o glicerol. En otra forma de realización, la formulación comprende alrededor de 20-50 mg/ml de sorbitol, PEG400 o glicerol.

En una forma de realización, el tensioactivo no iónico se selecciona del grupo que consiste en un polisorbato y un poloxámero. En aun otra forma de realización, el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en Tween80® (polisorbato 80), Tween20® (polisorbato 20), PluronicF88®, Pluronic F-127®, PluronicF68®, Triton X-100®. En una forma de realización preferida, el tensioactivo es polisorbato 20 o polisorbato 80, y el azúcar es sacarosa o trehalosa. El tensioactivo de polisorbato 80 o 20 puede estar presente en la formulación en una cantidad de alrededor de 0,005 a alrededor de 1 mg/ml. El tensioactivo de polisorbato 80 o 20 puede estar presente en la formulación en una cantidad de alrededor de 0,05 a alrededor de 1 mg/ml. El tensioactivo de polisorbato 80 o 20 puede estar presente en la formulación en una cantidad de alrededor de 0,1 a alrededor de 0,5 mg/ml. En otra forma de realización, el tensioactivo de polisorbato 80 o 20 puede estar presente en la formulación en una cantidad de al menos alrededor de 0,005 mg/ml. El tensioactivo de polisorbato 80 o 20 también puede estar presente en la

formulación en una cantidad de al menos alrededor de 0,1 mg/ml. El tensioactivo de polisorbato 80 puede estar presente en la formulación en una cantidad de alrededor de 0,2 mg/ml.

En otros aspectos de las formulaciones anteriores, a 5 °C, el % de monómero del anticuerpo anti-LAG3 es ≥ 95 % después de 3 meses, como se determinó

5 mediante cromatografía de exclusión por tamaño. En otra forma de realización de las formulaciones anteriores, a 5 °C, el % de

monómero del anticuerpo anti-LAG3 es ≥ 98 % después de 3 meses, como se determinó mediante cromatografía de exclusión por tamaño. En otra forma de realización de las

formulaciones anteriores, a 5 °C, el % de

10 monómero del anticuerpo anti-LAG3 es ≥ 99 % después de 3 meses, como se determinó mediante cromatografía de exclusión por tamaño. En otra forma de realización de las

formulaciones anteriores, a 25 °C, el % de

monómero del anticuerpo anti-LAG3 es ≥ 98 % después de 3 meses, como se determinó mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

15 En otros aspectos de las formulaciones anteriores, a 5 °C, el % de

cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo anti-LAG3 es ≥ 90 % después de 3 meses, como se midió mediante CE-SDS no reductora. En una forma de realización, a 5 °C, el % de

cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo anti-LAG3 es $\geq 95\%$ después de 3 meses, como se midió mediante CE-SDS no reductora. En otra forma de realización, a 5 °C, el % de

20 cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo anti-LAG3 es $\geq 97\%$ después de 3 meses, como se midió mediante CE-SDS no reductora.

En otros aspectos de las formulaciones anteriores, a 5 °C, el % de

IgG intacta del anticuerpo anti-LAG3 es ≥ 90 % luego de 3 meses, como se midió mediante CE-SDS no reductora. En una forma de realización, a 5 °C, el % de IgG intacta del anticuerpo anti-

25 LAG3 es ≥ 95 % después de 3 meses, como se midió mediante CE-SDS no reductora. En otra

forma de realización, a 5 °C, el % de IgG intacta del anticuerpo anti-LAG3 es ≥ 97 % después de 3 meses, como se midió mediante CE-SDS no reductora.

En otros aspectos de la invención, a 5 °C, el % de variante ácida del anticuerpo anti-LAG3 es menor de 15 % luego de 3 meses, como se determinó mediante cromatografía de

30 intercambio iónico.

Las anteriores formas de realización de la formulación también se pueden aplicar a una formulación conjunta de un anticuerpo anti-LAG3 y un anticuerpo anti-PD1, como se analiza en la sección anterior.

Las siguientes formas de realización también son aspectos de la invención:

1. Una formulación líquida que comprende: alrededor de 5-300 mg/ml de un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de fijación al antígeno de este, azúcar o poliol; un tensioactivo no iónico, un amortiguador de histidina o un amortiguador de acetato a un pH alrededor de 5-8, arginina 10-1000 mM o una sal de esta farmacéuticamente aceptable y, de manera opcional, metionina, EDTA, DTPA, triptófano y piridoxina.
2. La formulación de acuerdo con la forma de realización 1 que comprende alrededor de 5-300 mg/ml de un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de fijación al antígeno de este; alrededor de 10-250 mg/ml de sacarosa; alrededor de 0,005-2 mg/ml de polisorbato 80 o 20; alrededor de 5-300 mM de amortiguador de histidina a pH alrededor de 5-8; arginina 10-1000 mM o una sal de esta farmacéuticamente aceptable; y, de manera opcional, alrededor de 1-100 uM DTPA o EDTA.
3. La formulación de acuerdo con la forma de realización 1 que comprende alrededor de 10-100 mg/ml del anticuerpo anti-LAG3; alrededor de 20-200 mg/ml de sacarosa; alrededor de 0,1-2,0 mg/ml de polisorbato 80 o 20; alrededor de 5-150 mM de amortiguador de histidina a alrededor de pH 5,0 - pH 6,5; alrededor de 30-1000 mM de L-arginina o una sal de esta farmacéuticamente aceptable; y, de manera opcional, alrededor de 1-30 uM de DTPA o EDTA.
4. La formulación de acuerdo con la forma de realización 1 que comprende alrededor de 10-100 mg/ml del anticuerpo anti-LAG3; alrededor de 50-80 mg/ml de sacarosa; alrededor de 0,2-0,5 mg/ml de polisorbato 80 o 20; alrededor de 10-50 mM de amortiguador de histidina a alrededor de pH 5,0 - pH 6,0; alrededor de 40-150 mM de arginina o una sal de esta farmacéuticamente aceptable; y, de manera opcional, alrededor de 1-30 uM de DTPA o EDTA.
5. La formulación de acuerdo con la forma de realización 1 que comprende alrededor de 10-50 mg/ml de anticuerpo anti-LAG3; alrededor de 50 mg/ml de sacarosa; alrededor de 0,2-0,5 mg/ml de polisorbato 80 o 20; alrededor de 10 mM de amortiguador de histidina a pH alrededor de 5,6 - 6,2; alrededor de 40-100 mM de arginina o una sal de esta farmacéuticamente aceptable.
6. La formulación de acuerdo con la forma de realización 1 que comprende 25 mg/ml de anticuerpo anti-LAG3; alrededor de 50 mg/ml de sacarosa; alrededor de 0,2 mg/ml de polisorbato 80; alrededor de 10 mM de amortiguador de histidina a alrededor de pH 5,8-6,0; alrededor de 70 mM de arginina o arginina-HCl.
7. Una formulación liofilizada, en donde, luego de la reconstitución, que comprende alrededor de 10-300 mg/ml de anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de fijación al antígeno de este, azúcar o poliol; un tensioactivo no iónico, un amortiguador de histidina o

acetato a pH alrededor de 5-8, arginina 10-1000 mM o una sal de esta farmacéuticamente aceptable; y, de manera opcional, metionina, EDTA, DTPA, triptófano y piridoxina.

8. La formulación de acuerdo con la forma de realización 7, en donde, luego de la reconstitución, la formulación comprende alrededor de 5-300 mg/ml de un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de fijación al antígeno de este; alrededor de 10-250 mg/ml de sacarosa; alrededor de 0,005-2 mg/ml de polisorbato 80 o 20; alrededor de 5-1000 mM de amortiguador de histidina a pH alrededor de 5-8; alrededor de 0-1000 mM de arginina o una sal de esta farmacéuticamente aceptable; y, de manera opcional, alrededor de 1-100 uM de DTPA o EDTA.

9. La formulación de acuerdo con la forma de realización 7, en donde, luego de la reconstitución, la formulación comprende alrededor de 10-100 mg/ml del anticuerpo anti-LAG3; alrededor de 20-200 mg/ml de sacarosa; alrededor de 0,1-2,0 mg/ml de polisorbato 80 o 20; alrededor de 5-150 mM de amortiguador de histidina a alrededor de pH 5,0 - pH 6,5; al menos 30 mM de arginina o una sal de esta farmacéuticamente aceptable; y, de manera opcional, alrededor de 1-100 uM de DTPA o EDTA.

10. La formulación de acuerdo con la forma de realización 7, en donde la formulación comprende alrededor de 10-50 mg/ml del anticuerpo anti-LAG3; alrededor de 50-80 mg/ml de sacarosa; alrededor de 0,2-0,5 mg/ml de polisorbato 80 o 20; alrededor de 10-50 mM de amortiguador de histidina a alrededor de pH 5,0 - pH 6,0; alrededor de 40-150 mM de arginina o una sal de esta farmacéuticamente aceptable; y, de manera opcional, alrededor de 1-30 uM de DTPA o EDTA.

11. La formulación de acuerdo con la forma de realización 7, en donde, luego de la reconstitución, la formulación comprende alrededor de 10-50 mg/ml de anticuerpo anti-LAG3; alrededor de 50 mg/ml de sacarosa; alrededor de 0,2-0,5 mg/ml de polisorbato 80 o 20; alrededor de 10 mM de amortiguador de histidina a pH alrededor de 5,6 - 6,2; y alrededor de 40-100 mM de arginina o una sal de esta farmacéuticamente aceptable.

12. La formulación de acuerdo con la forma de realización 7, en donde, luego de la reconstitución, la formulación comprende 25 mg/ml de anticuerpo anti-LAG3; alrededor de 50 mg/ml de sacarosa; alrededor de 0,2 mg/ml de polisorbato 80; alrededor de 10 mM de amortiguador de histidina a alrededor de pH 5,8-6,0; y alrededor de 70 mM de arginina o arginina-HCl.

13. Una formulación líquida que comprende: alrededor de 10-300 mg/ml de un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de fijación al antígeno de este, un azúcar o poliol; un tensioactivo no iónico; alrededor de 50-500 mM de amortiguador de histidina a pH alrededor de 5-8; alrededor de 10-1000 mM de NaCl, KCl, LiCl, CaCl₂, MgCl₂, ZnCl₂, o FeCl₂; de manera

opcional, alrededor de 10-1000 mM de arginina o una sal de esta farmacéuticamente aceptable; y, de manera opcional, metionina, EDTA, DTPA, triptófano y piridoxina.

14. La formulación de acuerdo con la forma de realización 13 que comprende: alrededor de 10-300 mg/ml de un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de fijación al antígeno de este, azúcar o poliol; un tensioactivo no iónico; amortiguador de histidina 50-150 mM a pH alrededor de 5-6,5; alrededor de 30-100 mM de NaCl o KCl; de manera opcional, alrededor de 40-150 mM de arginina o una sal de esta farmacéuticamente aceptable y, de manera opcional, alrededor de 1-100 uM DTPA o EDTA.

15. Una formulación liofilizada, en donde, luego de la reconstitución, la formulación comprende alrededor de 10-300 mg/ml de un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de fijación al antígeno de este; azúcar o poliol; un tensioactivo no iónico; alrededor de 50-300 mM de amortiguador de histidina a pH alrededor de 5-8; alrededor de 10-1000 mM de NaCl, KCl, LiCl, CaCl₂, MgCl₂, ZnCl₂, o FeCl₂; de manera opcional, alrededor de 10-1000 mM de arginina o una sal de esta farmacéuticamente aceptable; y, de manera opcional, metionina, EDTA, DTPA, triptófano y piridoxina.

16. La formulación de acuerdo con la forma de realización 15, en donde, luego de la reconstitución, la formulación comprende alrededor de 10-300 mg/ml de un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de fijación al antígeno de este, un azúcar o poliol; un tensioactivo no iónico; alrededor de 50-150 mM de amortiguador de histidina a pH alrededor de 5-6,5; alrededor de 30-100 mM de NaCl o KCl; de manera opcional, alrededor de 40-150 mM de arginina o una sal de esta farmacéuticamente aceptable; y, de manera opcional, alrededor de 1-100 uM de DTPA o EDTA.

17. La formulación de acuerdo con la forma de realización 1, 7, 13, 15 o 16, en donde el azúcar se selecciona del grupo que consiste en sacarosa y trehalosa.

18. La formulación de acuerdo con la forma de realización 1, 7, 13, 15 o 16, en donde el poliol se selecciona del grupo que consiste en manitol, sorbitol, glicerol y polietilenglicol.

19. La formulación de acuerdo con la forma de realización 1, 7, 13, 15 o 16, en donde el tensioactivo no iónico se selecciona del grupo que consiste en un polisorbato y un poloxámero.

20. La formulación de acuerdo con la forma de realización 1, 7, 13, 15 o 16, en donde el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en Tween80®, Tween20®, PluronicF88®, Pluronic F-127®, PluronicF68®, Triton X-100®.

21. La formulación de acuerdo con la forma de realización 1, 7, 13, 15 o 16, en donde el tensioactivo es polisorbato 20 o polisorbato 80, y el azúcar es sacarosa o trehalosa.

22. La formulación de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1-21 que se congela hasta al menos por debajo de -70°C .

5 23. La formulación de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1-22, en donde, a 5°C , el % de monómero del anticuerpo anti-LAG3 es $\geq 95\%$ después de 3 meses, como se midió mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

24. La formulación de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1-23, en donde, a 5°C , el % de cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo anti-LAG3 es $\geq 90\%$ después de 3 meses, como se midió mediante CE-SDS no reductora.

25. La formulación de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1-24, en donde, a 5°C , el % de IgG intacta del anticuerpo anti-LAG3 es $\geq 90\%$ después de 3 meses, como se midió mediante CE-SDS no reductora.

15 26. La formulación de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1-25, en donde, a 5°C , el % de variante ácida del anticuerpo anti-LAG3 es $\geq 15\%$ después de 3 meses, como se midió mediante cromatografía de intercambio iónico.

27. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-26, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, comprende: una secuencia de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 37 y una secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 38, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64 o 67.

28. La formulación de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1-27, en donde el anticuerpo anti-LAG3 comprende una secuencia de la cadena ligera de SEQ ID NO: 35 y una secuencia de la cadena pesada de SEQ ID NO: 57.

29. La formulación de cualquiera de las formas de realización 1-28, que además comprende un anticuerpo anti-PD-1.

30. La formulación de acuerdo con la reivindicación 29, en donde el anticuerpo anti-PD1 comprende una región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 9 y una región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 4.

31. La formulación de la forma de realización 29, en donde el anticuerpo anti-PD1 comprende una secuencia de la cadena pesada de SEQ ID NO: 10 y una secuencia de la cadena ligera de SEQ ID NO: 5.

32. La formulación de acuerdo con la forma de realización 31, en donde la relación del anticuerpo anti-LAG3 con respecto al anticuerpo anti-PD1 es 1:1, 1:2 o 1:3.

Las siguientes formas de realización también son aspectos de la invención:

1. Una formulación que comprende: alrededor de 5-300 mg/ml de un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de fijación al antígeno de este, uno o más de un excipiente seleccionado del grupo que consiste en histidina, aspartato, glutamina, glicina, prolina, metionina, arginina o una sal de estos farmacéuticamente aceptable, NaCl, KCl, LiCl, CaCl₂,
5 MgCl₂, ZnCl₂, y FeCl₂, a una concentración total de 10-1000 mM, y un amortiguador a pH alrededor de 5-8.
2. La formulación de acuerdo con la forma de realización 1 que comprende: alrededor de 10-250 mg/ml de un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de fijación al antígeno de este, que comprende CDRL1 de SEQ ID NO: 39, CDRL2 de SEQ ID NO: 40, CDRL3 de SEQ
10 ID NO: 41, CDRH1 de SEQ ID NO: 42, CDRH2 de SEQ ID NO: 59, CDRH3 de SEQ ID NO: 44, uno o más de un excipiente seleccionado del grupo que consiste en histidina, aspartato, glutamina, glicina, prolina, metionina, arginina o una sal de este farmacéuticamente aceptable, NaCl, KCl, LiCl, CaCl₂, MgCl₂, ZnCl₂, y FeCl₂, a una concentración total de 25-250 mM, y un amortiguador a pH alrededor de 5-8.
3. La formulación de acuerdo con la forma de realización 1 o 2, en donde el excipiente es L-arginina o una sal de este farmacéuticamente aceptable a una concentración de 25-250 mM.
15
4. La formulación de acuerdo con la forma de realización 1 o 2, en donde el excipiente es L-arginina o una sal de este farmacéuticamente aceptable a una concentración de
20 40-100 mM.
5. La formulación de acuerdo con la forma de realización 1 o 2, en donde el excipiente es una combinación de NaCl y L-arginina o una sal de esta farmacéuticamente aceptable con una concentración total de 25-250 mM.
6. La formulación de acuerdo con la forma de realización 5, en donde la
25 proporción de concentración de NaCl con respecto a L-arginina es 1:1.
7. La formulación de acuerdo con la forma de realización 6, en donde la concentración de NaCl es 35 mM y la concentración de L-arginina es 35 mM.
8. La formulación de acuerdo con la forma de realización 6, en donde la concentración de NaCl es 50 mM y la concentración de L-arginina es 50 mM.
9. La formulación de acuerdo con la forma de realización 1 o 2, en donde el
30 excipiente es NaCl, KCl o LiCl a alrededor de 40-150 mM.
10. La formulación de acuerdo con la forma de realización 1 o 2, en donde el excipiente es L-histidina a alrededor de 25-200 mM.

11. La formulación de acuerdo con la forma de realización 10, en donde la concentración de L-histidina es alrededor de 40-100 mM.
12. La formulación de cualquiera de las formas de realización 1 a 11 en donde el amortiguador es L-histidina, acetato o citrato.
- 5 13. La formulación de acuerdo con la forma de realización 12, en donde el amortiguador tiene una concentración de alrededor de 1-300 mM.
14. La formulación de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1-13 que además comprende un azúcar, poliol o un tensioactivo no iónico, o una combinación de estos.
- 10 15. La formulación de acuerdo con la forma de realización 14, en donde el azúcar es un disacárido no reductor.
16. La formulación de acuerdo con la forma de realización 15, en donde el azúcar es trehalosa o sacarosa, o una combinación de estas.
- 15 17. La formulación de acuerdo con la forma de realización 15 o 16, en donde el azúcar está a una concentración de 10-200 mg/ml.
18. La formulación de acuerdo con la forma de realización 14, en donde el poliol es un alcohol de azúcar.
19. La formulación de acuerdo con la forma de realización 14, en donde el poliol se selecciona del grupo que consiste en manitol, sorbitol, glicerol y polietilenglicol.
- 20 20. La formulación de acuerdo con la forma de realización 18 o 19, en donde el poliol está a una concentración de alrededor de 10-200 mg/ml.
21. La formulación de acuerdo con la forma de realización 14, en donde el tensioactivo no iónico se selecciona del grupo que consiste en un polisorbato y un poloxámero.
- 25 22. La formulación de acuerdo con la forma de realización 14, en donde el tensioactivo no iónico se selecciona del grupo que consiste en Tween80®, Tween20®, PluronicF88®, Pluronic F-127®, PluronicF68®, Triton X-100®.
23. La formulación de acuerdo con la forma de realización 14, en donde el tensioactivo no iónico se polisorbato 80 o 20.
- 30 24. La formulación de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1 a 13 que además comprende un tensioactivo polisorbato 20 o polisorbato 80, y un azúcar sacarosa o trehalosa, o una combinación de estas.
25. La formulación de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1 a 13, que además comprende alrededor de 10-250 mg/ml de sacarosa, trehalosa, manitol, sorbitol,

polietilenglicol o glicerol; alrededor de 0,005-2,0 mg/ml de polisorbato 80 o 20; alrededor de 3-300 mM de amortiguador de L-histidina, acetato o citrato a pH alrededor de 5,0 -6,5.

26. La formulación de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1 a 13, que además comprende alrededor de 30-120 mg/ml de sacarosa o trehalosa; alrededor de 0,05-1,5 mg/ml de polisorbato 80 o 20; alrededor de 3-150 mM de amortiguador de L-histidina, acetato o citrato a pH alrededor de 5,0 -6,5.

27. La formulación de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1 a 13, que además comprende alrededor de 50-90 mg/ml de sacarosa o trehalosa; alrededor de 0,05-1,0 mg/ml de polisorbato 80; alrededor de 5-30 mM de amortiguador de L-histidina, acetato o citrato a pH alrededor de 5,0 -6,5.

28. La formulación de acuerdo con la forma de realización 1 o 2, que comprende alrededor de 20-220 mg/ml del anticuerpo anti-LAG3; alrededor de 50-90 mg/ml de sacarosa o trehalosa; alrededor de 0,05-1,0 mg/ml de polisorbato 80 o 20; alrededor de 5-20 mM de amortiguador de L-histidina, acetato o citrato a pH alrededor de 5,0 - 6,5; alrededor de 40-150 mM de L-arginina o una sal de esta farmacéuticamente aceptable.

29. La formulación de acuerdo con la forma de realización 1 o 2, que comprende alrededor de 20-220 mg/ml del anticuerpo anti-LAG3; alrededor de 20-200 mg/ml de glicerol, sorbitol o PEG400; alrededor de 0,05-1,0 mg/ml de polisorbato 80 o 20; alrededor de 3-150 mM de amortiguador de L-histidina, acetato o citrato a pH alrededor de 5,0 - 6,5; alrededor de 40-150 mM de L-arginina o una sal de esta farmacéuticamente aceptable.

30. La formulación de acuerdo con la forma de realización 1 o 2, que comprende alrededor de 20-220 mg/ml del anticuerpo anti-LAG3; alrededor de 40-150 mg/ml de L-glutamina, L-glicina, L-prolina o L-metionina; alrededor de 0,05-1,0 mg/ml de polisorbato 80 o 20; alrededor de 3-150 mM de amortiguador de L-histidina, acetato o citrato a pH alrededor de 5,0 - 6,5; alrededor de 40-150 mM de L-arginina o una sal de esta farmacéuticamente aceptable.

31. La formulación de acuerdo con la forma de realización 1 o 2, que comprende alrededor de 20-220 mg/ml del anticuerpo anti-LAG3; alrededor de 0,05-1,0 mg/ml de polisorbato 80 o 20; alrededor de 0,05-1,0 mg/ml de polisorbato 80 o 20; alrededor de 3-150 mM de amortiguador de L-histidina, acetato o citrato a pH alrededor de 5,0 - 6,5; alrededor de 40-150 mM de NaCl o una sal de este farmacéuticamente aceptable.

32. La formulación de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1 a 31, que además comprende L-metionina 3-150 mM.

33. La formulación de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1 a 31, que además comprende L-metionina 5-70 mM.

34. La formulación de acuerdo con la forma de realización 1 o 2 que comprende alrededor de 25 mg/ml del anticuerpo anti-LAG3; alrededor de 50 mg/ml de sacarosa; alrededor de 0,2 mg/ml de polisorbato 80; alrededor de 10 mM de amortiguador de L-histidina a pH alrededor de 5,8; alrededor de 70 mM de L-arginina o una sal de esta farmacéuticamente aceptable; y alrededor de 10 mM de L-metionina.

35. La formulación de acuerdo con la forma de realización 1 o 2 que comprende alrededor de 5-300 mg/ml del anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de fijación al antígeno de este, un azúcar, poliol, un tensioactivo no iónico, un amortiguador de histidina o acetato a pH alrededor de 5-8, arginina 10-1000 mM o una sal de esta farmacéuticamente aceptable.

36. La formulación de acuerdo con la forma de realización 1 o 2 que comprende alrededor de 25 mg/ml del anticuerpo anti-LAG3; alrededor de 50 mg/ml de sacarosa; alrededor de 0,2 mg/ml de polisorbato 80; alrededor de 10 mM de amortiguador de L-histidina a pH alrededor de 5,8-6,0; alrededor de 70 mM de L-arginina o L-arginina-HCl.

37. La formulación de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1-36 que es una formulación líquida.

38. La formulación de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1-36 que se congela hasta al menos debajo de -70°C .

39. La formulación de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1-36 que es una solución reconstituida a partir de una formulación liofilizada.

40. La formulación de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 37-39, en donde, a 5°C , el % de monómero del anticuerpo anti-LAG3 es $\geq 95\%$ después de 3 meses, como se determinó mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

41. La formulación de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 37-40, en donde, a 5°C , el % de cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo anti-LAG3 es $\geq 90\%$ después de 3 meses, como se midió mediante CE-SDS no reductora.

42. La formulación de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 37-41, en donde, a 5°C , el % de IgG intacta del anticuerpo anti-LAG3 es $\geq 90\%$ como se midió mediante CE-SDS no reductora.

43. La formulación de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 37-42, en donde, a 5°C , el % de variante ácida del anticuerpo anti-LAG3 es menor de 15% luego de 3 meses, como se determinó mediante cromatografía de intercambio iónico.

44. La formulación de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1 a 43, en donde el anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de fijación al antígeno comprende: una

secuencia de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 37 y una secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 58.

45. La formulación de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1-43, en donde el anticuerpo anti-LAG3 comprende una secuencia de la cadena ligera de SEQ ID NO: 35 y una secuencia de la cadena pesada de SEQ ID NO: 57.

46. La formulación de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1-43, que además comprende un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de fijación al antígeno de este.

47. La formulación de acuerdo con la forma de realización 46, en donde la relación molar del anticuerpo anti-LAG3 y el anticuerpo anti-PD-1 es 1:1.

48. La formulación de acuerdo con la forma de realización 46, en donde la relación molar del anticuerpo anti-LAG3 y el anticuerpo anti-PD-1 es 1:1, 2:1, 3:1 o 3.5:1.

49. La formulación de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1-48, en donde el anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de fijación al antígeno de este comprende una región variable de la cadena ligera que comprende una CDRL1 de SEQ ID NO: 1, CDRL2 de SEQ ID NO: 2, y CDRL3 de SEQ ID NO: 3 y una región variable de la cadena pesada que comprende una CDRH1 de SEQ ID NO: 6, CDRH2 de SEQ ID NO: 7, y CDRH3 de SEQ ID NO: 8.

50. La formulación de acuerdo con la forma de realización 49, en donde el anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de fijación al antígeno de este comprende una región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 9 y una región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 4.

51. La formulación de acuerdo con la forma de realización 49, en donde el anticuerpo anti-PD-1 comprende una secuencia de la cadena pesada de SEQ ID NO: 10 y una secuencia de la cadena ligera de SEQ ID NO: 5.

52. La formulación de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 46-51 que comprende: alrededor de 10-120 mg/ml del anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de fijación al antígeno de este y alrededor de 10-120 mg/ml del anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de fijación al antígeno de este.

53. Una formulación que comprende: alrededor de 10-120 mg/ml de un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de fijación al antígeno de este que comprende una región variable de la cadena ligera CDRL1 de SEQ ID NO: 39, CDRL2 de SEQ ID NO: 40, CDRL3 de SEQ ID NO: 41 y una región variable de la cadena pesada que comprende CDRH1 de SEQ ID NO: 42, CDRH2 de SEQ ID NO: 59, CDRH3 de SEQ ID NO: 44, un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de fijación al antígeno de este que comprende una región variable de la cadena pesada

que comprende una CDRL1 de SEQ ID NO: 1, CDRL2 de SEQ ID NO: 2, CDRL3 de SEQ ID NO: 3, CDRH1 de SEQ ID NO: 6, CDRH2 de SEQ ID NO: 7, y CDRH3 de SEQ ID NO: 8, L-arginina o una sal de este farmacéuticamente aceptable a una concentración de 25-250 mM, y un amortiguador a pH alrededor de 5-8.

5 54. La formulación de acuerdo con la forma de realización 53, en donde el anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de fijación al antígeno comprende: una región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 37 y una secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 58, y el anticuerpo anti-PD-1 comprende una región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 9 y una región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 4.

10 55. La formulación de acuerdo con la forma de realización 53, en donde el anticuerpo anti-LAG3 comprende una secuencia de la cadena ligera de SEQ ID NO: 35 y una secuencia de la cadena pesada de SEQ ID NO: 57, y el anticuerpo anti-PD-1 comprende una secuencia de la cadena pesada de SEQ ID NO: 10 y una secuencia de la cadena ligera de SEQ ID NO: 5.

15 56. La formulación de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 53-55 que comprende alrededor de 10-120 mg/ml del anticuerpo anti-LAG3; alrededor de 10-120 mg/ml del anticuerpo anti-PD-1; alrededor de 30-120 mg/ml de un disacárido no reductor; alrededor de 0,05-2,0 mg/ml de polisorbato 80 o 20; un amortiguador a pH alrededor de 5,0 - 6,5; alrededor de 40-150 mM de L-arginina o una sal de este farmacéuticamente aceptable.

20 57. La formulación de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 53-55, que comprende 20-30 mg/ml del anticuerpo anti-LAG3; alrededor de 20-30 mg/ml del anticuerpo anti-PD-1; alrededor de 50-90 mg/ml de sacarosa; alrededor de 0,05-1,0 mg/ml de polisorbato 80 o 20; alrededor de 3-30 mM de amortiguador de L-histidina a pH alrededor de 5,0 - 6,0; alrededor de 40-100 mM de L-arginina o una sal de este farmacéuticamente aceptable.

25 58. La formulación de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 53-57, que además comprende alrededor de 3-100 mM de L-metionina.

 59. La formulación de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 53-57, que además comprende alrededor de 5-15 mM de L-metionina.

30 60. La formulación de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 53-57, que comprende alrededor de 25 mg/ml del anticuerpo anti-LAG3; alrededor de 25 mg/ml del anticuerpo anti-PD-1; alrededor de 50 mg/ml de sacarosa; alrededor de 0,2 mg/ml de polisorbato 80; alrededor de 10 mM de amortiguador de L-histidina a pH alrededor de 5,8; alrededor de 70 mM de L-arginina o una sal de esta farmacéuticamente aceptable; y alrededor de 10 mM de L-metionina.

61. La formulación de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1-60 para el tratamiento del cáncer o una infección.

En una forma de realización, la formulación comprende:

- alrededor de 20 a 220 mg/ml del anticuerpo anti-LAG3, en donde el anticuerpo comprende una
- 5 región variable de la cadena ligera que comprende CDRL1 de SEQ ID NO: 39, CDRL2 de SEQ ID NO: 40, y CDRL3 de SEQ ID NO: 41 y una región variable de la cadena pesada que comprende CDRH1 de SEQ ID NO: 42, CDRH2 de SEQ ID NO: 59, y CDRH3 de SEQ ID NO: 44;
- alrededor de 30 a 120 mg/ml de sacarosa o trehalosa;
- 10 alrededor de 0,05 a 2 mg/ml de polisorbato 80;
- alrededor de 3 a 30 mM de amortiguador de L-histidina a pH alrededor de 5,0-6,5;
- alrededor de 40 a 150 mM de L-arginina o una sal de esta farmacéuticamente aceptable; y
- de manera opcional, alrededor de 5 a 70 mM de L-metionina.

En otra forma de realización, la formulación comprende:

- 15 alrededor de 20 a 220 mg/ml de un anticuerpo anti-LAG3, en donde el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno comprende: una región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 37 y una secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 58;
- alrededor de 30 a 120 mg/ml de sacarosa o trehalosa;
- alrededor de 0,05 a 2 mg/ml de polisorbato 80;
- 20 alrededor de 3 a 30 mM de amortiguador de L-histidina a pH alrededor de 5,0-6,5;
- alrededor de 40 a 150 mM de L-arginina o una sal de esta farmacéuticamente aceptable; y
- de manera opcional, alrededor de 5 a 70 mM de L-metionina.

En otra forma de realización, la formulación comprende:

- alrededor de 20 a 220 mg/ml del anticuerpo anti-LAG3, en donde el anticuerpo comprende una
- 25 secuencia de la cadena ligera de SEQ ID NO: 35 y una secuencia de la cadena pesada de SEQ ID NO: 57;
- alrededor de 30 a 120 mg/ml de sacarosa o trehalosa;
- alrededor de 0,05 a 2 mg/ml de polisorbato 80;
- alrededor de 3 a 30 mM de amortiguador de L-histidina a pH alrededor de 5,0-6,5;
- 30 alrededor de 40 a 150 mM de L-arginina o una sal de esta farmacéuticamente aceptable; y
- de manera opcional, alrededor de 5 a 70 mM de L-metionina.

En una forma de realización, la formulación comprende:

alrededor de 25 mg/ml del anticuerpo anti-LAG3, en donde el anticuerpo comprende una región variable de la cadena ligera que comprende CDRL1 de SEQ ID NO: 39, CDRL2 de SEQ ID NO:

40, CDRL3 de SEQ ID NO: 41 y una región variable de la cadena pesada que comprende CDRH1 de SEQ ID NO: 42, CDRH2 de SEQ ID NO: 59, CDRH3 de SEQ ID NO: 44; alrededor de 50 mg/ml de sacarosa;

alrededor de 0,2 mg/ml de polisorbato 80;

- 5 alrededor de 10 mM de amortiguador de L-histidina a pH alrededor de 5,8; alrededor de 70 mM de L-arginina o una sal de esta farmacéuticamente aceptable; y alrededor de 10 mM de L-metionina.

En otra forma de realización, la formulación comprende:

alrededor de 25 mg/ml de un anticuerpo anti-LAG3, en donde el anticuerpo o fragmento de

- 10 fijación al antígeno comprende: una región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 37 y una secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 58;

alrededor de 50 mg/ml de sacarosa;

alrededor de 0,2 mg/ml de polisorbato 80;

alrededor de 10 mM de amortiguador de L-histidina a pH alrededor de 5,8;

- 15 alrededor de 70 mM de L-arginina o una sal de esta farmacéuticamente aceptable; y alrededor de 10 mM de L-metionina.

En otra forma de realización, la formulación comprende:

alrededor de 25 mg/ml del anticuerpo anti-LAG3, en donde el anticuerpo comprende una secuencia de la cadena ligera de SEQ ID NO: 35 y una secuencia de la cadena pesada de SEQ ID

- 20 NO: 57;

alrededor de 50 mg/ml de sacarosa;

alrededor de 0,2 mg/ml de polisorbato 80;

alrededor de 10 mM de amortiguador de L-histidina a pH alrededor de 5,8;

alrededor de 70 mM de L-arginina o una sal de esta farmacéuticamente aceptable; y

- 25 alrededor de 10 mM de L-metionina.

En un aspecto, la formulación comprende:

alrededor de 10 a 120 mg/ml de un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de fijación al antígeno de este que comprende una región variable de la cadena ligera que comprende CDRL1 de SEQ ID NO: 39, CDRL2 de SEQ ID NO: 40, CDRL3 de SEQ ID NO: 41 y una región variable de la

30 cadena pesada que comprende CDRH1 de SEQ ID NO: 42, CDRH2 de SEQ ID NO: 59, CDRH3 de SEQ ID NO: 44;

alrededor de 10 a 120 mg/ml de un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de fijación al antígeno de este que comprende una región variable de la cadena ligera que comprende CDRL1 de SEQ ID NO: 1, CDRL2 de SEQ ID NO: 2, CDRL3 de SEQ ID NO: 3 y una región variable de la cadena

pesada que comprende CDRH1 de SEQ ID NO: 6, CDRH2 de SEQ ID NO: 7, y CDRH3 de SEQ ID NO: 8;

alrededor de 30 a 120 mg/ml de sacarosa o trehalosa;

alrededor de 0,05 a 2 mg/ml de polisorbato 80;

- 5 alrededor de 3 a 30 mM de amortiguador de L-histidina a pH alrededor de 5,0-6,5;
alrededor de 40 a 150 mM de L-arginina o una sal de esta farmacéuticamente aceptable; y
de manera opcional, alrededor de 5 a 70 mM de L-metionina.

En otro aspecto, la formulación comprende:

- 10 alrededor de 10 a 120 mg/ml de un anticuerpo anti-LAG3, en donde el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno comprende: una región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 37 y una secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 58;

alrededor de 10 a 120 mg/ml de un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de fijación al antígeno de este que comprende una región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 9 y una región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 4;

- 15 alrededor de 30 a 120 mg/ml de sacarosa o trehalosa;
alrededor de 0,05 a 2 mg/ml de polisorbato 80;
alrededor de 3 a 30 mM de amortiguador de L-histidina a pH alrededor de 5,0-6,5;
alrededor de 40 a 150 mM de L-arginina o una sal de esta farmacéuticamente aceptable; y
de manera opcional, alrededor de 5 a 70 mM de L-metionina.

- 20 En otro aspecto, la formulación comprende:

alrededor de 10 a 120 mg/ml de un anticuerpo anti-LAG3 que comprende una secuencia de la cadena ligera de SEQ ID NO: 35 y una secuencia de la cadena pesada de SEQ ID NO: 57;

alrededor de 10 a 120 mg/ml de un anticuerpo anti-PD-1 que comprende una secuencia de la cadena pesada de SEQ ID NO: 10 y una secuencia de la cadena ligera de SEQ ID NO: 5;

- 25 alrededor de 30 a 120 mg/ml de sacarosa o trehalosa;
alrededor de 0,05 a 2 mg/ml de polisorbato 80;
alrededor de 3 a 30 mM de amortiguador de L-histidina a pH alrededor de 5,0-6,5;
alrededor de 40 a 150 mM de L-arginina o una sal de esta farmacéuticamente aceptable; y
de manera opcional, alrededor de 5 a 70 mM de L-metionina.

- 30 En otra forma de realización, la formulación comprende:

alrededor de 25 mg/ml de un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de fijación al antígeno de este que comprende una región variable de la cadena ligera que comprende CDRL1 de SEQ ID NO: 39, CDRL2 de SEQ ID NO: 40, y CDRL3 de SEQ ID NO: 41, una región variable de la cadena

pesada que comprende CDRH1 de SEQ ID NO: 42, CDRH2 de SEQ ID NO: 59, y CDRH3 de SEQ ID NO: 44;

alrededor de 25 mg/ml de un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de fijación al antígeno de este que comprende una región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 9 y una región variable

5 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 4;

alrededor de 50 mg/ml de sacarosa;

alrededor de 0,2 mg/ml de polisorbato 80;

alrededor de 10 mM de un amortiguador de L-histidina a pH alrededor de 5,8;

alrededor de 70 mM de L-arginina o una sal de esta farmacéuticamente aceptable; y

10 alrededor de 10 mM de L-metionina.

En otra forma de realización, la formulación comprende:

alrededor de 25 mg/ml de un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de fijación al antígeno de este que comprende una región variable de la cadena ligera que comprende CDRL1 de SEQ ID NO: 39, CDRL2 de SEQ ID NO: 40, y CDRL3 de SEQ ID NO: 41, una región variable de la cadena

15 pesada que comprende CDRH1 de SEQ ID NO: 42, CDRH2 de SEQ ID NO: 59, y CDRH3 de SEQ ID NO: 44;

alrededor de 25 mg/ml de un anticuerpo anti-PD-1 que comprende una secuencia de la cadena pesada de SEQ ID NO: 10 y una secuencia de la cadena ligera de SEQ ID NO: 5;

alrededor de 50 mg/ml de sacarosa;

20 alrededor de 0,2 mg/ml de polisorbato 80;

alrededor de 10 mM de un amortiguador de L-histidina a pH alrededor de 5,8.

alrededor de 70 mM de L-arginina o una sal de esta farmacéuticamente aceptable; y

alrededor de 10 mM de L-metionina.

En otra forma de realización, la formulación comprende:

25 alrededor de 25 mg/ml de un anti-LAG3 que comprende una secuencia de la cadena ligera de SEQ ID NO: 35 y una secuencia de la cadena pesada de SEQ ID NO: 57;

alrededor de 25 mg/ml de un anticuerpo anti-PD-1 que comprende una secuencia de la cadena pesada de SEQ ID NO: 10 y una secuencia de la cadena ligera de SEQ ID NO: 5;

alrededor de 50 mg/ml de sacarosa;

30 alrededor de 0,2 mg/ml de polisorbato 80;

alrededor de 10 mM de un amortiguador de L-histidina a pH alrededor de 5,8.

alrededor de 70 mM de L-arginina o una sal de esta farmacéuticamente aceptable; y

alrededor de 10 mM de L-metionina.

Formulaciones liofilizadas

Las formulaciones liofilizadas de proteínas terapéuticas proporcionan varias ventajas. Las formulaciones liofilizadas ofrecen, en general, mejor estabilidad química que las formulaciones en solución, y por ende, mayor vida útil. Una formulación liofilizada también se puede reconstituir a diferentes concentraciones según factores clínicos, tales como vía de administración o dosificación. Por ejemplo, una formulación liofilizada se puede reconstituir a una concentración alta (es decir, en un volumen pequeño) de ser necesario para administración subcutánea, o a una menor concentración si se administra por vía intravenosa. También se pueden necesitar altas concentraciones si se requiere una alta dosis para un sujeto particular, en particular, si se administra por vía subcutánea en donde se debe minimizar el volumen de inyección. La administración subcutánea de fármacos de anticuerpos permite la autoadministración. La autoadministración evita el tiempo y los gastos asociados con las visitas a una institución médica para la administración, por ejemplo, por vía intravenosa. La administración subcutánea está limitada por el volumen de solución que se puede administrar de manera práctica en un sitio de inyección en una sola aplicación, que generalmente es de alrededor de 1 a 1,5 ml. En general, dicha limitación requiere una solución a una concentración relativamente alta para administrar la cantidad deseada del fármaco. La autoadministración subcutánea por lo general se realiza mediante una jeringa prellenada o un autoinyector cargado con una formulación de solución líquida del fármaco, en lugar de una forma liofilizada, para evitar la necesidad del paciente de resuspender el fármaco antes de la inyección.

En general, la formulación liofilizada se prepara antes de la reconstitución a alta concentración del producto farmacológico (DP), es decir, antes de la reconstitución en un volumen bajo de líquido. La dilución posterior con agua o amortiguador isotónico se pueden usar entonces fácilmente para diluir el DP hasta una concentración menor. Por lo general, los excipientes se incluyen en una formulación liofilizada de la presente invención a niveles que darán como resultado una formulación aproximadamente isotónica cuando se la reconstruye a una alta concentración de DP, por ejemplo, para la administración subcutánea. La reconstitución en un mayor volumen de agua para generar una menor concentración de DP reducirá necesariamente la tonicidad de la solución reconstituida, pero tal reducción puede tener poca importancia durante la administración no subcutánea, por ejemplo, administración intravenosa como una mezcla con solución isotónica (solución de dextrosa al 5 %, USP, o cloruro de sodio al 0,9 %, USP). Si se desea una isotonicidad a una menor concentración de DP, el polvo liofilizado se puede reconstituir en el bajo volumen estándar de agua y luego se diluye de forma adicional con diluyente isotónico, tal como 0,9 % de cloruro de sodio.

Las formulaciones liofilizadas de la presente invención se forman por liofilización (secado por congelación) de una solución de liofilización previa. El secado por congelación se logra congelando la formulación y sublimando posteriormente el agua a una temperatura adecuada para un secado primario. Bajo esta condición, la temperatura del producto está por debajo del punto eutéctico o de la temperatura de colapso de la formulación. En general, la temperatura de almacenamiento para el secado primario varía de alrededor de -30 a -25 °C (siempre y cuando el producto permanezca congelado durante el secado primario) a una presión adecuada, que en general varía de alrededor de 50 a 250 mTorr. La formulación, el tamaño y tipo del contenedor que contiene la muestra (por ejemplo, vial de vidrio) y el volumen de la formulación que se desea liofilizar determinarán el tiempo necesario para el secado, que puede variar de unas pocas horas a varios días (por ejemplo, 40-60 h). Se puede llevar a cabo un secado secundario a alrededor de 0-40 °C, que depende principalmente del tipo y tamaño del contenedor y del tipo de proteína empleados. El tiempo de secado secundario depende del nivel de humedad residual deseado en el producto y en general toma al menos alrededor de 5 horas. Por lo general, el contenido de humedad de una formulación liofilizada es menor que alrededor de 5 %, y preferentemente, menor que alrededor de 3 %. La presión puede ser la misma que la empleada durante la etapa de secado primario. Las condiciones de secado por congelación pueden variar según la formulación y el tamaño del vial.

En algunos casos, puede resultar conveniente liofilizar la formulación de proteínas en el contenedor en el que se llevará a cabo la reconstitución de la proteína a fin de evitar una etapa de transferencia. El contenedor en este caso puede ser, por ejemplo, un vial de 3, 5, 10, 20, 50 o 100 cc.

Las formulaciones liofilizadas de la presente invención se reconstituyeron antes de la administración. La proteína se puede reconstituir a una concentración de alrededor de 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 75, 80, 90 o 100 mg/ml o mayores concentraciones tales como 150 mg/ml, 200 mg/ml, 250 mg/ml, o 300 mg/ml hasta alrededor de 500 mg/ml. En una forma de realización, la concentración de proteínas después de la reconstitución es de alrededor de 10-300 mg/ml. En una forma de realización, la concentración de proteínas después de la reconstitución es de alrededor de 20-250 mg/ml. En una forma de realización, la concentración de proteínas después de la reconstitución es de alrededor de 150-250 mg/ml. En una forma de realización, la concentración de proteínas después de la reconstitución es de alrededor de 180-220 mg/ml. En una forma de realización, la concentración de proteínas después de la reconstitución es de alrededor de 50-150 mg/ml. En una forma de realización, la concentración de proteínas después de la reconstitución es de alrededor de 50 mg/ml. En una forma de realización, la concentración

de proteínas después de la reconstitución es de alrededor de 25 mg/ml. Las altas concentraciones de proteínas resultan particularmente útiles cuando se pretende administrar la formulación reconstituida por vía subcutánea. Sin embargo, para otras vías de administración, tales como administración intravenosa, pueden resultar convenientes menores concentraciones de proteínas (por ejemplo, desde alrededor de 5-25 mg/ml).

La reconstitución generalmente tiene lugar a una temperatura de alrededor de 25 °C para garantizar la hidratación completa, aunque se pueden usar otras temperaturas según se desee. El tiempo necesario para la reconstitución dependerá, por ejemplo, del tipo de diluyente, la cantidad de excipientes y proteína. Los diluyentes de ejemplo incluyen agua estéril, agua bacteriostática para inyección (BWFI), una solución amortiguada de pH (por ejemplo, solución salina amortiguada con fosfato), solución salina estéril, solución de Ringer o solución de dextrosa.

En una forma de realización de la presente invención, el anticuerpo anti-LAG3 (o fragmento de fijación al antígeno de este) se formula como un polvo liofilizado para la administración intravenosa. En otra forma de realización de la presente invención, el anticuerpo anti-LAG3 (o fragmento de fijación al antígeno de este) se formula como un polvo liofilizado para la administración subcutánea. En algunas formas de realización, el anticuerpo (o fragmento de fijación al antígeno de este) se proporciona a alrededor de 40-300 mg/vial, y se reconstituye con agua estéril para la inyección antes del uso. En otras formas de realización, el anticuerpo (o fragmento de fijación al antígeno de este) se proporciona a alrededor de 200 mg/vial, y se reconstituye con agua estéril para la inyección antes del uso. En una forma de realización, el pH diana de la formulación reconstituida es 6,0. En diversas formas de realización, la formulación liofilizada de la presente invención permite la reconstitución del anticuerpo anti-LAG3 a altas concentraciones, tales como alrededor de 20, 25, 30, 40, 50, 60, 75, 100, 150, 200, 250 o más mg/ml. En otras formas de realización, la concentración del anticuerpo anti-LAG3 después de la reconstitución es alrededor de 10-300, 20-250, 150-250, 180-220, 20-200, 40-100 o 50-150 mg/ml. En otras formas de realización, la concentración del anticuerpo anti-LAG3 antes de la liofilización es alrededor de 10-300, 150-250, 180-220, 10-100, 10-50 o 25-50 mg/ml.

En otras formas de realización, la formulación liofilizada del anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de fijación al antígeno, o anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de fijación al antígeno, se define en términos de la solución reconstituida generada a partir de la formulación liofilizada. Las soluciones reconstituidas pueden comprender anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, a concentraciones de alrededor de 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 75, 80, 90 o 100 mg/ml, o concentraciones más altas, tales como 150 mg/ml, 200 mg/ml, 250 mg/ml,

o hasta alrededor de 300 mg/ml. En una forma de realización, la formulación reconstituida puede comprender 10-300 mg/ml del anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este. En otra forma de realización, la formulación reconstituida puede comprender 10-200 mg/ml del anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este. En otra forma de realización, la formulación reconstituida puede comprender 10-100 mg/ml del anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este. En otra forma de realización, la formulación reconstituida puede comprender 10-60 o 15-50 mg/ml del anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este. En otra forma de realización, la formulación reconstituida puede comprender 10-25 mg/ml del anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este. En una forma de realización preferida, la formulación reconstituida puede comprender 20-30 o 25 mg/ml del anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este.

Formulación líquida

Una formulación líquida de anticuerpos se puede preparar al tomar la sustancia farmacológica, que se encuentra, por ejemplo, en una formulación farmacéutica acuosa, y someterla a intercambio de amortiguador en el amortiguador deseado como última etapa del proceso de purificación. En esta forma de realización no hay etapa de liofilización. La sustancia farmacológica en el amortiguador final se concentra hasta una concentración deseada. Los excipientes, tales como estabilizantes y tensioactivos, se agregan a la sustancia farmacológica, y esta se diluye usando el amortiguador adecuado hasta obtener la concentración de proteínas final. La sustancia farmacológica formulada final se filtra usando filtros de 0,22 μm , y se carga en un contenedor final (por ejemplo, viales de vidrio). La formulación puede almacenarse en un vial, y administrarse por medio de un recipiente o dispositivo de inyección.

En otro aspecto de la invención, el anticuerpo anti-LAG3 está en una formulación líquida y tiene una concentración de alrededor de 10-300 mg/ml. En otra forma de realización, el anticuerpo anti-LAG3 está en una formulación líquida y tiene una concentración de alrededor de 20-250 mg/ml. En otra forma de realización, el anticuerpo anti-LAG3 está en una formulación líquida y tiene una concentración de alrededor de 40-100 mg/ml. En otra forma de realización, el anticuerpo anti-LAG3 está en una formulación líquida y tiene una concentración de alrededor de 10-60 mg/ml. En otra forma de realización, el anticuerpo anti-LAG3 está en una formulación líquida y tiene una concentración de alrededor de 20-30 mg/ml. En otra forma de realización, el anticuerpo anti-LAG3 está en una formulación líquida y tiene una concentración de alrededor de 10-30 mg/ml. En otra forma de realización, el anticuerpo anti-LAG3 está en una formulación líquida y tiene una concentración de alrededor de 15-50 mg/ml. En otra forma de realización, el

anticuerpo anti-LAG3 se encuentra a una concentración de alrededor de 10-100 mg/ml. En una forma de realización preferida, el anticuerpo anti-LAG3 se encuentra a una concentración de alrededor de 20-30 o 25 mg/ml.

En otro aspecto de la invención, la formulación también comprende un anticuerpo anti-PD-1 en la formulación líquida que tiene una concentración de alrededor de 10-300 mg/ml. En una forma de realización, el anticuerpo anti-PD-1 se encuentra a una concentración de alrededor de 20-250 mg/ml. En otra forma de realización, el anticuerpo anti-PD-1 se encuentra a una concentración de alrededor de 40-100 mg/ml. En otra forma de realización, el anticuerpo anti-PD-1 se encuentra a una concentración de alrededor de 10-60 mg/ml. En otra forma de realización, el anticuerpo anti-PD-1 se encuentra a una concentración de alrededor de 20-30 mg/ml. En otra forma de realización, el anticuerpo anti-PD-1 se encuentra a una concentración de alrededor de 10-30 mg/ml. En otra forma de realización, el anticuerpo anti-PD-1 se encuentra a una concentración de alrededor de 15-50 mg/ml. En otra forma de realización, el anticuerpo anti-PD-1 se encuentra a una concentración de alrededor de 10-100 mg/ml. En una forma de realización preferida, el anticuerpo anti-PD-1 se encuentra a una concentración de alrededor de 20-30 o 25 mg/ml.

En una forma de realización, la formulación líquida comprende un amortiguador a pH alrededor de 5-8, 5,0-6,5, 5,5-6,5, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1 o 6,2, y arginina y una sal de esta farmacéuticamente aceptable. En una forma de realización, la formulación líquida comprende un amortiguador a pH alrededor de 5-8. En una forma de realización, la formulación líquida comprende un amortiguador a pH alrededor de 5,0-6,5. En una forma de realización, la formulación líquida comprende un amortiguador a pH alrededor de 5,0-6,0. En otras formas de realización, el amortiguador es histidina. En otra forma de realización, el amortiguador es citrato o acetato. En otra forma de realización, la formulación líquida comprende un amortiguador de acetato a pH alrededor de 5-8, 5,0-6,5, 5,5-6,5, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1 o 6,2, y arginina y una sal de esta farmacéuticamente aceptable.

La formulación líquida de anticuerpo de la presente invención es adecuada para la administración parenteral, tal como inyección intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea; en particular, es adecuada para la inyección subcutánea.

Dosificación y administración

Al seleccionar la dosis adecuada de un agente terapéutico, tal como un anticuerpo anti-LAG3 o anti-PD-1 humanizado (o fragmento de fijación al antígeno de este), se considera su toxicidad. La toxicidad y la eficacia terapéutica de las composiciones de anticuerpos,

administradas solas o en combinación con un agente inmunodepresor, se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándares en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la LD50 (la dosis mortal en el 50 % de la población) y la ED50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La relación de dosis de los efectos tóxicos con respecto a los efectos terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la relación de LD50 con respecto a ED50. Se prefieren los anticuerpos que exhiben altos índices terapéuticos. Los datos obtenidos a partir de estos ensayos de cultivo celular y los estudios en animales pueden usarse para formular un rango de dosis para usar en seres humanos. La dosis de dichos compuestos se encuentra, preferentemente, dentro de un rango de concentraciones circulatorias que incluyen la ED50 con toxicidad leve o nula. La dosis puede variar dentro de este rango en función de la forma de dosis empleada y la vía de administración utilizada.

Las vías de administración adecuadas pueden incluir, por ejemplo, la administración parenteral, que incluye la inyección intramedular, intramuscular, intradérmica, subcutánea, así como la administración intratecal, intraventricular directa, intravenosa, intraperitoneal. Los fármacos se pueden administrar por varias vías convencionales, tales como inyección intraperitoneal, parenteral, intraarterial o intravenosa. Las vías de administración en las que se debe limitar el volumen de la solución (por ejemplo, administración subcutánea) requieren una formulación liofilizada para permitir la reconstitución a altas concentraciones.

De manera alternativa, el anticuerpo puede administrarse de manera local en vez de sistémica, por ejemplo, mediante inyección del anticuerpo directamente en la lesión inducida por patógenos caracterizada por inmunopatología, en general en una formulación de depósito o de liberación sostenida. Además, el anticuerpo puede administrarse en un sistema de administración dirigida del fármaco, por ejemplo, en un liposoma cubierto con un anticuerpo específico del tejido, que actúa sobre, por ejemplo, una lesión inducida por patógenos caracterizada por inmunopatología. El tejido afectado se dirigirá a los liposomas y los absorberá selectivamente.

La elección de un régimen de administración del agente terapéutico depende de diversos factores, que incluyen la velocidad de recambio del suero o tejido de la entidad, el nivel de síntomas, la inmunogenicidad de la entidad y la accesibilidad de las células diana en la matriz biológica. Preferentemente, un régimen de administración maximiza la cantidad de agente terapéutico administrado al paciente acorde a un nivel aceptable de efectos secundarios. Consecuentemente, la cantidad de producto biológico administrado depende en parte de la particular y de la gravedad de la afección que se desea tratar. La orientación para elegir dosis

adecuadas de anticuerpos, citocinas, y pequeñas moléculas se encuentra disponible. Ver, por ejemplo, Wawrzynczak (1996) *Antibody Therapy*, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, Reino Unido; Kresina (ed.) (1991) *Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis*, Marcel Dekker, Nueva York, NY; Bach (ed.) (1993) *Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in*

- 5 *Autoimmune Diseases*, Marcel Dekker, Nueva York, NY; Baert, et al. (2003) *New Engl. J. Med.* 348:601-608; Milgrom et al. (1999) *New Engl. J. Med.* 341:1966-1973; Slamon et al. (2001) *New Engl. J. Med.* 344:783-792; Beniaminovitz et al. (2000) *New Engl. J. Med.* 342:613-619; Ghosh et al. (2003) *New Engl. J. Med.* 348:24-32; Lipsky et al. (2000) *New Engl. J. Med.* 343:1594-1602; Physicians' Desk Reference 2003 (Physicians' Desk Reference, 57.^a Ed);
- 10 Medical Economics Company; ISBN: 1563634457; 57.^a edición (noviembre de 2002).

El médico determina la dosis adecuada, por ejemplo, de acuerdo con parámetros o factores que en el estado de la técnica se sabe o se sospecha que afectan el tratamiento o que se prevé que afectan el tratamiento. La dosificación adecuada (“cantidad terapéuticamente eficaz”) de la proteína dependerá, por ejemplo, de la afección que se desea tratar, la gravedad y el curso

15 de la afección, si la proteína se administra para fines profilácticos o terapéuticos, el tratamiento previo, la historia clínica del paciente y la respuesta a la proteína, el tipo de proteína usada y el criterio del médico tratante. En general, la dosis comienza con una cantidad un poco menor que la dosis óptima y aumenta de a poco hasta alcanzar el efecto deseado u óptimo con respecto a cualquier efecto secundario negativo. Las medidas de diagnóstico importantes incluyen

20 síntomas, tales como la inflamación o el nivel de citocinas inflamatorias producidas. La proteína se administra de manera adecuada al paciente una sola vez o repetidas veces. La proteína puede administrarse sola o en conjunto con otros fármacos o tratamientos.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo pueden administrarse mediante infusión continua, o mediante dosis a intervalos de, por ejemplo, un día, 1-7 veces por semana,

25 una semana, dos semanas, tres semanas, un mes, dos meses, etc. Un protocolo de dosis preferido es uno que implica la dosis máxima o la frecuencia de dosis que evita los efectos secundarios significativos no deseados.

En algunas formas de realización, las formulaciones farmacéuticas de la invención se administrarán mediante inyección o infusión intravenosa (IV).

30 En otras formas de realización, las formulaciones farmacéuticas de la invención se administrarán mediante administración subcutánea. La administración subcutánea puede realizarse por medio de inyección usando una jeringa, o usando otros dispositivos de inyección (por ejemplo, el dispositivo Inject-ease®); plumas inyectoras; o dispositivos sin aguja (por ejemplo, MediJector y BioJector®).

La administración subcutánea puede realizarse mediante inyección usando una jeringa, un autoinyector, una pluma inyectora o dispositivo de inyección sin aguja. La inyección intravenosa puede realizarse después de diluir la formulación con un diluyente adecuado disponible en el comercio, tal como solución salina o 5 % de dextrosa en agua.

- 5 Aunque las formulaciones en solución a alta concentración de la presente invención resultan particularmente ventajosas para usos que requieren una alta concentración de anticuerpo, las formulaciones también pueden usarse a concentraciones más bajas en los casos en los que no es necesaria o conveniente una alta concentración. Las concentraciones más bajas de anticuerpo pueden ser útiles para administración subcutánea de dosis bajas, o en otros modos de
- 10 administración (tales como administración intravenosa) en donde el volumen administrado es sustancialmente mayor de 1 ml. Dichas concentraciones más bajas pueden incluir 15, 10, 5, 2, 1 mg/ml o menos.

Usos

- 15 La presente invención proporciona formulaciones líquidas o liofilizadas de anticuerpo anti-LAG3 humano para su uso en el tratamiento del cáncer y la infección.

- La persona experta en la materia comprenderá que se denomina “cáncer” a las enfermedades en las que las células del cuerpo se vuelven anormales y se dividen sin control. Los distintos tipos de cáncer que se pueden tratar mediante los compuestos, composiciones y
- 20 métodos de la invención incluyen, entre otros: cardíaco: sarcoma (angiosarcoma, fibrosarcoma, rabdomiosarcoma, liposarcoma), mixoma, rabdomioma, fibroma, lipoma y teratoma; de pulmón: carcinoma broncogénico (de células escamosas, de célula pequeña no diferenciada, de célula grande no diferenciada, adenocarcinoma), carcinoma alveolar (bronquiolar), adenoma bronquial, sarcoma, linfoma, hamartoma condromatoso, mesotelioma; gastrointestinal: de esófago
- 25 (carcinoma de las células escamosas, adenocarcinoma, leiomiomasarcoma, linfoma), de estómago (carcinoma, linfoma, leiomiomasarcoma), de páncreas (adenocarcinoma ductal, insulinooma, glucagonoma, gastrinooma, tumores carcinoides, vipoma), del intestino delgado (adenocarcinoma, linfoma, tumores carcinoides, sarcoma de Kaposi, leiomioma, hemangioma, lipoma, neurofibroma, fibroma), del intestino grueso (adenocarcinoma, adenoma tubular, adenoma
- 30 vellosa, hamartoma, leiomioma), colorrectal; del tracto genitourinario: de riñón (adenocarcinoma, tumor de Wilm [nefroblastoma], linfoma, leucemia), de vejiga y uretra (carcinoma de células escamosas, carcinoma de células transitorias, adenocarcinoma), de próstata (adenocarcinoma, sarcoma), de testículo (seminoma, teratoma, carcinoma embrionario, teratocarcinoma, coriocarcinoma, sarcoma, carcinoma de células intersticiales, fibroma,

fibroadenoma, tumores adenomatoideos, lipoma); de hígado: hepatoma (carcinoma hepatocelular), colangiocarcinoma, hepatoblastoma, angiosarcoma, adenoma hepatocelular, hemangioma; óseo: sarcoma osteogénico (osteosarcoma), fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, linfoma maligno (sarcoma de células de retículo), mieloma múltiple, cordoma de tumor celular gigante maligno, osteocondroma (exostosis osteocartilaginosa), condroma benigno, condroblastoma, condromixofibroma, osteoma osteoide y tumores celulares gigantes; del sistema nervioso: de cráneo (osteoma, hemangioma, granuloma, xantoma, osteítis deformante), de meninges (meningioma, meningiosarcoma, gliomatosis), de cerebro (astrocitoma, meduloblastoma, glioma, ependimoma, germinoma [pinealoma], glioblastoma multiforme, oligodendroglioma, schwannoma, retinoblastoma, tumores congénitos), neurofibroma, meningioma, glioma, sarcoma de la médula espinal; ginecológico: de útero (carcinoma endometrial), de cuello uterino (carcinoma cervical, displasia cervical pretumor), de ovarios (carcinoma de ovarios [cistoadenocarcinoma seroso, cistoadenocarcinoma mucinoso, carcinoma no clasificado], tumores de células de la granulosa, tumores de células de Sertoli-Leydig, disgerminoma, teratoma maligno), de vulva (carcinoma de células escamosas, carcinoma intraepitelial, adenocarcinoma, fibrosarcoma, melanoma), de vagina (carcinoma de células claras, carcinoma de células escamosas, sarcoma botrioide (rabdomyosarcoma embrionario), trompas de Falopio (carcinoma), mama; hematológico: de la sangre (leucemia mieloide [aguda y crónica], leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, enfermedades mieloproliferativas, mieloma múltiple, síndromes mielodisplásicos), enfermedad de Hodgkin, linfoma de no Hodgkin [linfoma maligno]; de piel: melanoma maligno, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas, sarcoma de Karposi, nevo displásico de lunares, lipoma, angioma, dermatofibroma, queloides, psoriasis; y glándulas adrenales: neuroblastoma. En una forma de realización, el cáncer se selecciona de cáncer colorrectal, cáncer gástrico y cáncer de cabeza y cuello.

EJEMPLOS

Ejemplo: Estudios de estabilidad a largo plazo

El anticuerpo anti-LAG3 (SEQ ID NO: 35 y 57, cadenas ligera y pesada) se desarrolló como producto farmacológico congelado (almacenamiento recomendado a $\leq -70^{\circ}\text{C}$) o producto farmacológico refrigerado (almacenamiento recomendado de 2 a 8 $^{\circ}\text{C}$) y se llevaron a cabo estudios de estabilidad en los ejemplos a continuación. Formulación A: 25 mg/ml de anticuerpo anti-LAG3 (SEQ ID NO: 35 y 57, cadenas ligera y pesada); 50 mg/ml de sacarosa; 0,2 mg/ml de polisorbato 80; amortiguador de histidina 10 mM a pH 5,8; L-Arginina-HCl 70 mM. El producto

farmacológico congelado se debe descongelar a temperatura ambiente antes de la infusión. El producto farmacológico se envasó en un vial tubular de vidrio tipo 1 estéril de 2 ml de un solo uso con un tapón elastomérico de 13 mm y un sello de aluminio con una tapa de plástico de apertura fácil. Cada vial contenía 50 mg (carga de 2,2 ml) según la etiqueta a una concentración de 25 mg/ml.

Los estudios de estabilidad se llevaron a cabo a $-80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ (vertical), a la condición de almacenamiento acelerada de $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (vertical), y a la condición de estrés de $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ (invertida) de acuerdo con las pautas de ICH donde $\leq -70\text{ }^{\circ}\text{C}$ es la condición de almacenamiento a largo plazo recomendada. Además, los datos se capturaron a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ / $60\text{ \%} \pm 5\text{ \%}$ de humedad relativa, invertida) y $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ / $75\text{ \%} \pm 5\text{ \%}$ humedad relativa, invertida) como información complementaria.

Ejemplo 2: Estudios de materia particulada

Los datos de materia particulada para el anticuerpo anti-LAG3 en la Formulación A se recolectaron usando mHIAC, que es una versión modificada del método HIAC, con un volumen de muestra más pequeño. El método de prueba HIAC USP <787> se ha usado para la detección de particulados subvisibles entre 2 micrómetros y 100 micrómetros. Bajo una campana de flujo laminar, las muestras de solución alcanzaron la temperatura ambiente, y se mezclaron suavemente en tubos de polipropileno de 50 ml para obtener un volumen combinado de al menos 6 ml en un tubo de polipropileno de 50 ml. Las muestras mezcladas se agitaron suavemente y se dejaron reposar sin alteraciones durante 30 minutos. Las muestras liofilizadas se reconstituyeron con 2,2 ml de agua para inyección, antes de la mezcla. Las muestras después de la reconstitución se dejaron reposar sin alteraciones en condiciones ambiente durante 30 minutos antes de la prueba. Antes del análisis de muestras, el instrumento se purgó cinco veces con agua filtrada con 0,22 micrómetros al insertar la punta de la sonda de muestra casi en el fondo del tubo centrífugo autoportante de 50 ml. En el software PharmSpec, la prueba de procedimiento de estándar ambiental USP_36_788 se llevó a cabo como valor inicial al sumergir el puerto de muestreo en 50 ml de agua Milli-Q. El análisis de muestras se llevó a cabo solo cuando la prueba aprobó USP_36_788_Environment, lo que aseguraba un sistema limpio. En la configuración de *hardware* del software PharmSpec, el método se configuró con los siguientes parámetros de entrada: volumen de la muestra (1,0 ml), cantidad de corridas (5), factor de dilución (1,00), volumen de la tara (0 ml), primera corrida descartada (sí), 16 canales para conteo de corridas se seleccionaron para los parámetros operativos (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 50, 75 y 90 micrómetros). Antes de correr la muestra, se realizó un lavado de jeringa usando placebo

(asegurando que la sonda de la muestra se sumerja en la solución de muestra para evitar que corra aire por el instrumento). Al final de la corrida, la sonda y el sensor se enjuagaron con placebo. La etapa de lavado con placebo se repitió para cada muestra. Para el análisis de muestras, se realizaron cinco mediciones de 1 ml en cada muestra. Las primeras dos corridas se descartaron y las tres corridas restantes se promediaron para producir el resultado final.

El cambio en las partículas subvisibles $\geq 10 \mu\text{m}$ por contenedor así como $\geq 25 \mu\text{m}$ por contenedor a los 12 meses era insignificante a la condición de -80°C , -20°C y 5°C . (Figuras 1 y Figura 2).

Ejemplo 3: Potencia según ELISA de fijación

El ensayo de potencia evalúa la actividad anti-LAG3 en la Formulación A a través de fijación anti-LAG3 a LAG-3 humano recombinante inmovilizado (rhLAG-3). Las curvas de respuesta a la dosis se generaron mediante el uso de diluciones en serie de material de referencia anti-LAG3 y muestras de prueba. Los valores EC_{50} , la concentración de material de referencia anti-LAG3 y muestras de prueba que exhiben 50 % de la fijación máxima, se determinaron usando un análisis de ajuste de curva logística de 4 parámetros. La potencia relativa se calculó mediante la aplicación del análisis de líneas paralelas de las curvas de respuesta a la dosis en SoftMax® Pro. La potencia de una muestra de prueba se informó como la media geométrica de la potencia en relación con el material de referencia con una desviación estándar geométrica y 95 % de intervalo de confianza.

Los datos de estabilidad de la potencia en condiciones de almacenamiento de -80°C , -20°C , 5°C , 25°C y 40°C para anti-LAG3 se muestran en la Figura 3. No se observaron cambios en los resultados obtenidos hasta la fecha y los datos están dentro de los criterios de aceptación de 60 % – 140 % de potencia con respecto a la referencia. No se observó ningún cambio a 25°C , mientras que a 40°C se observó una disminución de la potencia a los 3 meses aunque todavía dentro de los criterios de aceptación indicados.

Ejemplo 4: Pureza según medición de UP-SEC

La pureza del anticuerpo anti-LAG3 en la Formulación A se evaluó mediante cromatografía de exclusión por tamaño de ultra rendimiento (UP-SEC), en donde se determinó el porcentaje de monómeros, así como todos los porcentajes de especies de alto peso molecular (HMW) y picos de elución tardía (especies de LMW). La cromatografía de exclusión por tamaño de ultra rendimiento (UP-SEC) se realizó mediante la dilución de las muestras hasta 1,0

mg/ml en la fase móvil (fosfato 100 mM, cloruro de sodio 100 mM, pH 7,0). La temperatura de la columna se mantuvo a 25 ± 3 °C y la velocidad de flujo se mantuvo a 0,5 ml/min usando elusión isocrática. Las muestras diluidas se inyectaron (5 µl) en un UPLC equipado con una columna Waters BEH200 y un detector de UV. Las proteínas de la muestra se separaron por tamaño y se detectaron por absorción UV a 214 nm.

La pureza según UP-SEC se ilustró más abajo en la Figura 4 para el % de monómero y la Figura 5 para el % de especies de alto peso molecular. No hubo cambio en el % de monómero o el % de especies de alto peso molecular como una función de tiempo o condición de almacenamiento por hasta 12 meses a -80 °C y -20 °C (con solo un leve aumento del % de especies de alto peso molecular a 5 °C). A 25 °C, hubo un aumento de 0,3 % en las especies de alto peso molecular observado a los 5 meses con una disminución de 0,5 % en el % de monómero y la aparición de 0,2 % de especies de alto peso molecular en comparación con el valor inicial. Hubo un aumento de 1,5 % en especies de alto peso molecular y una disminución de 1,8 % en el % de monómero en comparación con el valor inicial a 40 °C a los 3 meses. No se observaron picos para especies de bajo peso molecular a -80 °C, -20 °C y 5 °C.

Ejemplo 5: CE-SDS reductora y no reductora

El método de prueba CE-SDS en condiciones reductoras se usó para determinar la pureza del anticuerpo monoclonal IgG mediante la resolución de la cadena ligera (LC), la cadena pesada (HC) y sus productos de descomposición de acuerdo con su tamaño en un capilar que contiene una matriz de gel de SDS reemplazable. En condiciones no reductoras, el método de prueba de CE-SDS se usó para determinar la pureza de los anticuerpos monoclonales IgG mediante la resolución de la IgG intacta de sus componentes de acuerdo con su tamaño en un capilar que contenía una matriz de gel de SDS reemplazable. En ambos casos (reductora y no reductora), los resultados se informaron como porcentaje de área corregido de cada pico según se calculó del porcentaje de área de pico corregido total. Las muestras se analizaron por medio de una técnica CE-SDS en donde la proteína se desnaturizó con dodecilsulfato de sodio (SDS) en condiciones reductoras y no reductoras, y se separaron usando electroforesis capilar (CE) (sistema de CE PA800 Plus de Beckman-Coulter ProteomeLab y kit de ensayo de pureza/heterogeneidad de IgG). Para las condiciones reductoras, las muestras de mAb se desnaturizaron en presencia de 1,0 % de SDS y se redujeron usando 5 % de β-mercaptoetanol. Para las condiciones no reductoras, las muestras de mAb se desnaturizaron en presencia de 1,0 % de SDS y se trataron con N-etilmaleimida (NEM). Después de calentarse durante 10 min a 70

°C, cada muestra se inyectó a 5 kV durante 20 segundos en un capilar de sílice fundido no recubierto cargado con matriz de gel de SDS, y luego separación a 15 kV durante 40 minutos para las condiciones no reductoras y reductoras. Las bandas de proteínas separadas se detectaron mediante absorbancia de UV a 220 nm. Las proteínas se separan en función de su peso molecular aparente. En condiciones no reductoras, todas las especies distintas del pico principal de IgG se clasificaron como impurezas. En condiciones reductoras, la IgG se resolvió en las cadenas pesada y ligera. Todas las demás especies se clasificaron como impurezas. En ambos casos, el resultado se informó como porcentaje de área corregido de cada pico según se calculó del porcentaje de área de pico corregido total.

Los datos de pureza según CE-SDS del anticuerpo anti-LAG3 en la Formulación A se ilustran en la Figura 9 y la Figura 10 para el anticuerpo anti-LAG3. La Figura 9 describe el % de pureza (cadena pesada + cadena ligera) según CE-SDS reductora y la Figura 10 muestra el ensayo de % de pureza (IgG intacta) para la condición de CE-SDS no reductora. No hay un cambio medible en el % de pureza (reductora) o el % de IgG intacta (no reductora) a -80 °C, -20 °C y 5 °C por hasta 12 meses. En general, todos los resultados están dentro de los criterios de aceptación de las cadena pesada + cadena ligera $\geq 90,0$ % e IgG intacta $\geq 90,0$ %. Una disminución de 1,5 % y 1,0 % en el % de cadena pesada + ligera y en el % de IgG intacta, respectivamente, se observó a 25 °C por hasta 5 meses, mientras que una disminución de 5,4 % y 5,8 % en la pureza para el % de cadena pesada + ligera y el % de IgG intacta, respectivamente, se observó a 40 °C.

Ejemplo 6: Medidas de variantes de carga según HP-IEX

Se usó cromatografía de intercambio iónico de alto rendimiento (HP-IEX) para evaluar el perfil de carga. Un método de HPLC de intercambio iónico se llevó a cabo usando una columna Dionex MAbPac® SCX-10 con un detector UV a 280 nm. El volumen de inyección se fijó a 10 μ l, y la temperatura de columna se mantuvo a 35 °C. Las muestras se diluyeron en agua purificada hasta 5 g/l y se inyectaron 50 μ g para análisis. La fase móvil usada para el análisis IEX de las muestras fue un gradiente de las fases móviles a continuación:

Fase móvil A: ácido 2-(N-morfolino)etansulfónico (MES) 25 mM, 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propandiol (Tris) 14 mM, pH 6,25

Fase móvil B: MES 25 mM, Tris 22 mM, cloruro de litio 100 mM, pH 6,85

Amortiguador de extracción C: Ácido etilendiamintetraacético (EDTA) 15 mM, Tris 40 mM, ácido 2-(ciclohexilamino)etansulfónico (CHES) 10 mM, cloruro de sodio 500 mM, pH 8,1

La velocidad de flujo se mantuvo a 0,5-1,0 ml/min. Estos resultados se presentan como porcentajes relativos en función del área total del cromatograma. La suma de ácido 3, ácido 2 y ácido 1 se informó en la categoría “Variantes ácidas”, mientras la suma de básico 1, básico 2, y básico 3 se informó en la categoría “Variantes básicas”. El % principal se informó en la categoría

5 “Principal”.

El % de variantes ácidas, el % principal total, y % de variantes básicas según el método HP-IEX de anticuerpo anti-LAG3 en la Formulación A se representa en la Figura 6, Figura 7 y Figura 8, respectivamente, para las condiciones de temperatura de -80 °C, -20 °C, 5 °C, 25 °C y 40 °C para el anticuerpo anti-LAG3. No se observó ningún cambio en las variantes de carga

10 después de 12 meses de monitorear los datos de estabilidad para las condiciones de almacenamiento de -80 °C, -20 °C y 5 °C. A 25 °C, el % total de pico principal disminuyó 9,7 %, el % de variantes ácidas aumentó 11 %, mientras que el % de variantes básicas mostró una mínima disminución de 1,4 % después de 5 meses en estabilidad en comparación con el valor inicial. A 40 °C, el % total de pico principal mostró una disminución significativa de 36,2 %, el

15 % de variantes ácidas aumentó significativamente un 39,3 %, mientras que el % de variantes básicas mostró una pequeña disminución de 3,1 % después de 3 meses en estabilidad en comparación con el valor inicial.

Ejemplo 7: Estudios de turbidez

La turbidez del anticuerpo anti-LAG3 en la Formulación A se determinó de la

20 absorbancia espectrofotométrica a 350 nm usando un lector Spectramax M5. No hubo un cambio de turbidez importante como una función de condición o tiempo de almacenamiento después de 12 meses de estabilidad para almacenamiento a -80 °C, -20 °C y 5 °C. En los datos recolectados del almacenamiento a 25 °C y 40 °C, que se usan como información complementaria, hay un aumento de la turbidez en muestras organizadas a 25 °C de 0,074 en el

25 punto temporal inicial a 0,100 a los 5 meses. Se observó un aumento significativo en la turbidez para las muestras organizadas a 40 °C de 0,074 en el punto temporal inicial a 0,150 a los 3 meses.

En síntesis, 12 meses de datos de estabilidad para el anticuerpo anti-LAG3 no mostraron cambios sustanciales después de almacenamiento en la condición de almacenamiento a ≤ -70 °C.

30 Además, no se observaron cambios significativos en la condición acelerada de -20 °C o la condición de estrés de 5 °C.

Ejemplo 8: Estudios de variación de pH del anticuerpo anti-LAG3

La Formulación A del anticuerpo anti-LAG3 se cribó en el rango de pH de 5,3 a 6,4 considerando el pH de la formulación diana pH de 5,8. Como muestra la Figura 14, no hubo un cambio significativo en la concentración, turbidez, % de especies de alto peso molecular, % de especies de bajo peso molecular o % de monómeros de pH 5,3 a pH 6,4. Una disminución en el % de variantes ácidas (por ejemplo, 17,28 % a pH 5,5 a 14,10 % a pH 6,0) en medio de un aumento en el % del pico principal (por ejemplo, 64,0 % a pH 5,5 a 66,9 % a pH 6,0) se observó de pH 5,3 hasta pH 6,4. El cambio en el diámetro hidrodinámico promedio Z fue mínimo (menor de 1 nm) de pH 5,3 hasta 6,4. Se observó un pequeño aumento en los particulados subvisibles por mililitro (rango de tamaño $\geq 5 \mu\text{m}$, $\geq 10 \mu\text{m}$, y $\geq 25 \mu\text{m}$) a pH cercano al punto isoeléctrico de $\sim 6,3$ (es decir, pH 6,0 y pH 6,4). En general, el anticuerpo anti-LAG3 se consideró estable entre pH 5,3 y pH 6,4, lo que confirmó la elección de pH 5,8 como el pH de formulación diana.

Ejemplo 9: Estudios de las condiciones para reducir la autoasociación del anticuerpo anti-LAG3

Medición del parámetro de interacción de difusión (k_D)

Se descubrió que B22 en Histidina 10 mM pH 5,6 es negativo, lo que indica la propiedad inherente de la molécula a autoasociarse. Se descubrió que la presencia de cloruro de sodio 50 mM en histidina 10 mM pH 5,6 aumenta el parámetro de interacción de difusión (K_D) o reduce la autointeracción, mejora la solubilidad relativa y reduce la turbidez (OD350) del anticuerpo anti-LAG3 como se observa en la Figura 12. La estabilidad del anticuerpo anti-LAG3 en histidina 10 mM pH 5,6 se investigó en presencia de L-arginina clorhidrato 40 mM usando parámetro de interacción de difusión (K_D), turbidez (OD350) y ensayo de solubilidad relativa (% PEG punto medio). Como se ve en la Figura 13, se descubrió que la autointeracción y la turbidez se redujeron drásticamente, mientras que la solubilidad relativa del anticuerpo anti-LAG3 mejoró significativamente tras la adición de L-arginina clorhidrato 40 mM en amortiguador de histidina 10 mM a pH 5,6. Un estudio de variación de L-arginina clorhidrato (40 mM-100 mM) con 50 mg/ml de anticuerpo anti-LAG3 se llevó a cabo a pH 5,8 y a pH 6,0, en donde se descubrió que una concentración de L-arginina clorhidrato de 70 mM (14,7 mg/ml) era eficaz para reducir la autointeracción y mejorar la estabilidad coloidal (Figura 13).

Se descubrió que el anti-LAG3 se separa por fases en amortiguadores a baja intensidad iónica (10 mM). Con el fin de evaluar las propiedades de autoasociación, así como la estabilidad coloidal, física, química y también térmica de anti-LAG3 en presencia de tres especies con carga

5 diferentes [L-arginina, L-histidina y cloruro de sodio (NaCl)] en diferentes niveles de concentración (mM), se prepararon nueve formulaciones diferentes como se enumera en la Tabla 3 a continuación. El anti-LAG3 no formulado (~37 mg/ml) en L-histidina 10 mM L-arginina clorhidrato 70 mM pH 5,8 se dializó contra tres soluciones de amortiguador de histidina 10 mM pH 5,8; cada solución de amortiguador contenía L-arginina 100 mM, cloruro de sodio 100 mM o L-histidina 100 mM. El anti-LAG3 se formuló a 25 mg/ml usando dializados de las respectivas formulaciones. Las formulaciones que contenían 40 mM a 130 mM de L-arginina o cloruro de sodio se prepararon mediante la dilución de la solución de reserva anti-LAG3 respectiva con amortiguador de L-histidina a pH 5,8 y la concentración de anti-LAG3 hasta 25 mg/ml.

Tabla 3 Cribado de preformulación de alto rendimiento de anti-LAG3 con especies con carga (L-arginina, L-histidina y cloruro de sodio)		
Formulación N.º	Concentración de excipiente	Descripción de la Formulación
1	L-Arginina 40 mM	25 mg/ml de anti-LAG3, L-histidina 10 mM, L-arginina 40 mM, pH 5,8
2	L-Arginina 70 mM	25 mg/ml de anti-LAG3, L-histidina 10 mM, L-arginina 70 mM, pH 5,8
3	L-Arginina 100 mM	25 mg/ml de anti-LAG3, L-histidina 10 mM, L-arginina 100 mM, pH 5,8
4	L-Histidina 40 mM	25 mg/ml de anti-LAG3, L-histidina 10 mM, L-histidina 40 mM, pH 5,8
5	L-Histidina 70 mM	25 mg/ml de anti-LAG3, L-histidina 10 mM, L-histidina 70 mM, pH 5,8
6	L-Histidina 100 mM	25 mg/ml de anti-LAG3, L-histidina 10 mM, L-histidina 100 mM, pH 5,8
7	Cloruro de sodio 40 mM	25 mg/ml de anti-LAG3, L-histidina 10 mM, cloruro de sodio 40 mM, pH 5,8
8	Cloruro de sodio 70 mM	25 mg/ml de anti-LAG3, L-histidina 10 mM, cloruro de sodio 70 mM, pH 5,8
9	Cloruro de sodio 100 mM	25 mg/ml de anti-LAG3, L-histidina 10 mM, cloruro de sodio 100 mM, pH 5,8

El parámetro de interacción de difusión (k_D) de las nueve formulaciones se evaluó usando dispersión de luz dinámica (DLS) a 20 °C para cinco adquisiciones. El parámetro de interacción (k_D) se calculó de la pendiente y la intersección Y del gráfico de los valores de coeficiente de difusión (cm^2/s) registrados contra series de concentraciones diluidas (mg/ml) de formulaciones respectivas. Un parámetro de interacción de difusión (k_D) positivo sugiere una interacción repulsiva. Con una concentración creciente ($> 40 \text{ mM}$) de L-arginina, L-histidina o cloruro de sodio, anti-LAG3 muestra un aumento en k_D que sugiere reducción de la autoasociación molecular (menor aglomeración molecular). El efecto es comparativamente pronunciado para L-arginina y luego cloruro de sodio y L-histidina en orden relativo (ver Figura 15).

Estudios de solubilidad relativa

El cribado automatizado de la solubilidad relativa de las nueve formulaciones se evaluó usando precipitación inducida por polietilenglicol (PEG) que requería 10 mg/ml de concentración de proteínas. Se prepararon 40 % (p/v) de PEG 6000 en cada solución de amortiguador, después de lo cual se prepararon soluciones de PEG-6000, 2 %–36 % (p/v) en distintos aumentos usando el sistema de manipulación automatizada de líquidos JANUS G3. Se agregó una solución de proteína de 10 mg/ml a las soluciones de PEG en una placa transparente Costar de 96 cavidades para obtener una concentración de ensayo final de 1 mg/ml . La placa se equilibró a temperatura ambiente durante la noche y se transfirió a la placa Abgene PCR y se centrifugó a 4600 rpm durante 30 min con el fin de forzar la proteína precipitada al fondo de cada cavidad. El sobrenadante se transfirió de cada cavidad a una placa transparente Costar de 96 cavidades nueva. La placa se leyó en un lector de placas M5 SpectraMax a 280 y 320 nm para determinar la pérdida de proteínas debido a precipitación durante la incubación de noche. Los datos de absorbancia (280-320) en comparación con la concentración de PEG se analizaron para determinar el $\% \text{PEG}_{\text{punto medio}}$.

El anti-LAG3 muestra una mejor solubilidad relativa en presencia de concentraciones crecientes de especies con carga, tales como L-arginina, L-histidina o cloruro de sodio (40 mM hasta 100 mM), lo que sugiere reducción en la aglomeración molecular de anti-LAG3 a esas concentraciones. Ver Figura 16. La magnitud de mejora en la solubilidad relativa fue similar entre las tres especies con carga.

Estudios de cambios en las especies con carga

El cambio en la heterogeneidad de carga y el punto isoelectrico (pI) de anti-LAG3 en presencia de L-arginina, L-histidina o cloruro de sodio se evaluó usando el sistema de enfoque isoelectrico capilar (cIEF) ProteinSimple. Las muestras se mezclaron con anfolito portador antes de la inyección en el capilar. Al aplicar un campo eléctrico al capilar, un gradiente de pH se creó mediante el anfolito portador en el capilar y las moléculas de proteína migraron a la locación en el capilar en donde el valor pH local era igual a los valores de pH isoelectrico (pI). La detección de las proteínas separadas se logró al realizar un barrido completo del capilar entero usando los sistemas iCE (iCE3 de ProteinSimple). La última imagen tomada por el instrumento se usó para la cuantificación de datos. Los porcentajes de área de los picos resueltos se estimaron al tomar el área de las especies individuales dividida por el área total de la proteína. El valor de pI de la proteína se estimó mediante la calibración lineal de la distancia entre los dos marcadores de pI agrupando la proteína. Los parámetros operativos incluían temperatura del automuestreador a 10 °C; cartucho recubierto con fluorocarbono (FC), longitud de onda de detección de 280 nm, con un período de enfoque de 1 minuto a 1500 V. Las nueve formulaciones se transfirieron a una placa de 96 cavidades y se evaluaron para detectar cambios en las especies con carga (% de variantes ácidas, % de pico principal y % de variantes básicas) en el punto temporal inicial usando cIEF. Las muestras restantes de las nueve formulaciones se transfirieron a otra placa de 96 cavidades, se sellaron herméticamente y se colocaron para estrés térmico durante 10 días a 50 °C. Luego del estrés, se reevaluó el cambio en las especies con carga. Los datos en la Figura 17 informan cambios (diferencias) en el % de variantes ácidas, un cambio de % en el pico así como un cambio en el % de variantes básicas luego de estrés térmico en comparación con el valor inicial.

El cloruro de sodio mostró el menor cambio en % de variantes ácidas y el % de pico principal para la formulación anti-LAG3 y luego L-arginina y L-histidina. El cloruro de sodio mostró una mejora en la estabilidad química en el rango de concentración de 40 a 100 mM, especialmente, a una concentración ≥ 70 mM. La L-arginina mostró mejor estabilidad química a una concentración de 70 mM, mientras que la L-histidina mostró mejor estabilidad química hasta a una concentración de 100 mM.

Con el fin de evaluar las propiedades de autoasociación, así como la estabilidad coloidal de anti-LAG3 en presencia de L-arginina o cloruro de sodio (NaCl), se prepararon doce formulaciones diferentes como se enumera en la Tabla 4. El anti-LAG3 no formulado (~37

- mg/ml) en L-histidina 10 mM L-arginina clorhidrato 70 mM pH 5,8 se dializó contra cuatro soluciones de amortiguador de histidina 10 mM pH 5,8; cada solución de amortiguador contenía L-arginina 150 mM, cloruro de sodio 150 mM o una mezcla de L-arginina 35 mM y cloruro de sodio 35 mM o una mezcla de L-arginina 50 mM y cloruro de sodio 50 mM. El anti-LAG3 se formuló a 25 mg/ml usando dializados de la respectiva formulación. Las formulaciones que contenían 40 mM a 130 mM de L-arginina o cloruro de sodio se prepararon mediante la dilución de la solución de reserva anti-LAG3 respectiva con amortiguador de L-histidina a pH 5,8 y la concentración de anti-LAG3 hasta 25 mg/ml.

Tabla 4 Optimización de la formulación con L-arginina, cloruro de sodio y su mezcla		
Formulación N.º	Concentración de excipiente	Descripción de la Formulación
1	L-Arginina 40 mM	25 mg/ml de anti-LAG3, L-histidina 10 mM, L-arginina 40 mM, pH 5,8
2	L-Arginina 70 mM	25 mg/ml de anti-LAG3, L-histidina 10 mM, L-arginina 70 mM, pH 5,8
3	L-Arginina 100 mM	25 mg/ml de anti-LAG3, L-histidina 10 mM, L-arginina 100 mM, pH 5,8
4	L-Arginina 130 mM	25 mg/ml de anti-LAG3, L-histidina 10 mM, L-arginina 130 mM, pH 5,8
5	L-Arginina 150 mM	25 mg/ml de anti-LAG3, L-histidina 10 mM, L-arginina 150 mM, pH 5,8
6	Cloruro de sodio 40 mM	25 mg/ml de anti-LAG3, L-histidina 10 mM, cloruro de sodio 40 mM, pH 5,8
7	Cloruro de sodio 70 mM	25 mg/ml de anti-LAG3, L-histidina 10 mM, cloruro de sodio 70 mM, pH 5,8
8	Cloruro de sodio 100 mM	25 mg/ml de anti-LAG3, L-histidina 10 mM, cloruro de sodio 100 mM, pH 5,8
9	Cloruro de sodio 130 mM	25 mg/ml de anti-LAG3, L-histidina 10 mM, cloruro de sodio 130 mM, pH 5,8
10	Cloruro de sodio 150 mM	25 mg/ml de anti-LAG3, L-histidina 10 mM, cloruro de sodio 150 mM, pH 5,8
11	35 mM: L-Arginina:cloruro de	25 mg/ml de anti-LAG3, L-histidina 10

	sodio 35 mM	mM, L-arginina 35 mM, cloruro de sodio 35 mM, pH 5,8
12	L-Arginina:cloruro de sodio 50 mM:50 mM	25 mg/ml de anti-LAG3, L-histidina 10 mM, L-arginina 50 mM, cloruro de sodio 50 mM, pH 5,8

Medición del segundo coeficiente virial (B_{22})

Las mediciones del segundo coeficiente virial (B_{22}) para cada una de las doce formulaciones se realizaron a 5 mg/ml usando dispersión de luz dinámica (DLS). Las mediciones automáticas se realizaron a 20 °C usando retrodispersión de 173°.

- 5 El segundo coeficiente virial (B_{22}) sugiere interacciones repulsivas entre las moléculas de proteína (menor aglomeración) en la matriz de la formulación. Tanto L-arginina como cloruro de sodio en concentraciones mayores de 40 mM parecieron ser favorables para reducir la aglomeración molecular. Ver Figura 18.

Medición de turbidez (OD_{350})

- 10 Con el fin de evaluar la estabilidad coloidal de anti-LAG3 en la matriz de la formulación, la turbidez (OD_{350}) de las doce formulaciones se evaluó usando un espectrofotómetro de absorbancia ultravioleta (UV). Las absorbancias UV de las muestras se midieron en una placa transparente Costar de 96 cavidades a una longitud de onda de 350 nm con (sensor) Pathcheck corregido para absorbancia en placa.

- 15 El anti-LAG3 mostró mejor estabilidad coloidal (OD_{350}) con concentraciones crecientes de L-arginina o cloruro de sodio con valores comparables entre los dos. Ver Figura 19. Una relación equivalente de L-arginina y cloruro de sodio (35:35 o 50:50) en la matriz de la formulación anti-LAG3 también mostró estabilidad coloidal comparable.

Medición de viscosidad

- 20 Con el fin de evaluar la capacidad de concentración de anti-LAG3 en una matriz diferente de la formulación, las doce formulaciones anti-LAG3 enumeradas en la Tabla 4 se concentraron hasta 60 mg/ml usando un Eppendorf centrífugo a 3000 rpm a 15 °C. Las viscosidades de las doce formulaciones se midieron a 20 °C usando viscosímetro RheoSense VROC® Initium en una placa de 96 cavidades.

Las viscosidades de anti-LAG3 a 60 mg/ml en presencia de mezcla de L-arginina o cloruro de sodio fueron comparables en el rango de 40 a 150 mM de concentración. Las viscosidades a 60 mg/ml en presencia de una relación equivalente de L-arginina y cloruro de sodio (35:35 o 50:50) mostraron valores de viscosidad similares. Ver Figura 20.

5 Medición de osmolalidad

La osmolalidad de anti-LAG3 se midió usando un osmómetro Vapro Vapor Pressure 5520. La unidad se calibró con estándares de calibración de 100 mmol/kg, 290 mmol/kg y 1000 mmol/kg antes de la medición.

Se descubrió que las osmolalidades de las doce formulaciones anti-LAG3 enumeradas en la Tabla 4 eran comparables en presencia de L-arginina o cloruro de sodio. Las osmolalidades en presencia de una relación equivalente de L-arginina y cloruro de sodio (50:50) mostraron valores de viscosidad similar, mientras las relaciones equivalentes de 35:35 mostraron valores de osmolalidad menores. Ver Figura 21.

Ejemplo 10: Cribado de preformulación con especies con carga (sal y aminoácido)

Con el fin de evaluar la estabilidad de anti-LAG3 en presencia de especies con carga (sal y aminoácidos), se prepararon diez formulaciones enumeradas en la Tabla 5 y se cribaron para detectar cambios en las propiedades fisicoquímicas de anti-LAG3 mediante análisis de alto rendimiento. Las formulaciones se sellaron adecuadamente en una placa de 96 cavidades y se estresaron a 50 °C durante 10 días en un horno de calor seco. Las muestras estresadas térmicamente también se evaluaron para detectar cambios en las propiedades fisicoquímicas de anti-LAG3. Las concentraciones de 20 mM de ácido L-aspartico o ácido L-glutámico se seleccionaron en función de su límite de solubilidad.

Tabla 5 Viabilidad de alta concentración de la formulación anti-LAG3		
Formulación N.º	Nomenclatura de la muestra	Descripción de la Formulación
1	L-Asp 20 mM	25 mg/ml de anti-LAG3, L-histidina 10 mM, ácido L-aspartico 20 mM, pH 5,8
2	L-Glu 20 mM	25 mg/ml de anti-LAG3, L-histidina 10 mM, ácido L-glutámico 20 mM, pH 5,8
3	L-Arg 40 mM	25 mg/ml de anti-LAG3, L-histidina 10 mM, L-arginina 40 mM, pH 5,8
4	NaCl 40 mM	25 mg/ml de anti-LAG3, L-histidina 10 mM, cloruro de sodio

		40 mM, pH 5,8
5	L-His 40 mM	25 mg/ml de anti-LAG3, L-histidina 10 mM, L-histidina 40 mM, pH 5,8
6	L-Arg 70 mM	25 mg/ml de anti-LAG3, L-histidina 10 mM, L-arginina 70 mM, pH 5,8
7	NaCl 70 mM	25 mg/ml de anti-LAG3, L-histidina 10 mM, cloruro de sodio 70 mM, pH 5,8
8	L-His 70 mM	25 mg/ml de anti-LAG3, L-histidina 10 mM, L-histidina 70 mM, pH 5,8
9	L-Asp/Gly 20 mM/50 mM	25 mg/ml de anti-LAG3, L-histidina 10 mM, ácido L-aspartico 20 mM, glicina 50 mM, pH 5,8
10	L-Glu/Gly 20 mM/50 mM	25 mg/ml de anti-LAG3, L-histidina 10 mM, ácido L-glutámico 20 mM, glicina 50 mM, pH 5,8

Protocolo para turbidez (OD₃₅₀)

La turbidez (OD₃₅₀) de las nueve formulaciones se evaluó usando un espectrofotómetro de absorbanza ultravioleta (UV). Las absorbancias UV de las muestras se midieron en una placa transparente Costar de 96 cavidades a una longitud de onda de 350 nm con (sensor) Pathcheck corregido para absorbancia en placa.

Como se observa en la Figura 37, luego del estrés térmico, el cambio en la estabilidad coloidal (OD₃₅₀) de anti-LAG3 fue comparable entre 40 mM de cloruro de sodio o L-arginina a 20 mM de ácido L-aspartico o ácido L-glutámico. De manera similar, el cambio en la estabilidad coloidal (OD₃₅₀) de anti-LAG3 entre 70 mM de cloruro de sodio o L-arginina fue comparable a la combinación de 20 mM de ácido L-aspartico o ácido L-glutámico con glicina 50 mM (resistencia total de 70 mM). El cambio en la estabilidad coloidal (OD₃₅₀) de anti-LAG3 en presencia de L-histidina 40 mM o 70 mM fue comparativamente alto.

UP-SEC

La pureza de la muestra se evaluó mediante UP-SEC, en donde se determinó el porcentaje de monómeros, así como todos los porcentajes de especies de alto peso molecular (HMW) y picos de elución tardía (especies de LMW). La UP-SEC se llevó a cabo en Acquity H class (DS) diluyendo las muestras a 1,0 mg/ml en fase móvil (fosfato 100 mM, cloruro de sodio 100 mM, pH 7,0). La temperatura de la columna se mantuvo a 25 ± 3 °C y la velocidad de flujo se mantuvo a 0,5 ml/min usando elusión isocrática. Las muestras diluidas se inyectaron (1 µl) en

un UPLC equipado con una columna Waters BEH200 y un detector de UV. Las proteínas de la muestra se separaron por tamaño y se detectaron por absorción UV a 214 nm.

Como se observa en la Figura 38, luego del estrés térmico, el cambio en los niveles de agregado soluble (% de especies de alto peso molecular, HMW) y el cambio en el % de monómero para anti-LAG3 fue comparable de 40 a 70 mM de cloruro de sodio y 20 a 70 mM de aminoácidos solos o en algunas combinaciones. El cambio en las especies de bajo peso molecular fue comparativamente menor para ácido L-aspártico o ácido L-glutámico 20 mM, L-histidina 40 mM, cloruro de sodio 70 mM, y combinación de ácido L-aspártico 20 mM y glicina 50 mM.

cIEF

El cambio en la heterogeneidad de carga y el punto isoeléctrico (pI) de anti-LAG3 en presencia de L-arginina, L-histidina o cloruro de sodio se evaluó usando el sistema de enfoque isoeléctrico capilar (cIEF) ProteinSimple. Las muestras se mezclaron con anfolito portador antes de la inyección en el capilar. Al aplicar un campo eléctrico al capilar, un gradiente de pH se creó mediante el anfolito portador en el capilar y las moléculas de proteína migraron a la locación en el capilar en donde el valor pH local era igual a los valores de pH isoeléctrico (pI). La detección de las proteínas separadas se logró al realizar un barrido completo del capilar entero usando los sistemas iCE (iCE3 de ProteinSimple). La última imagen tomada por el instrumento se usó para la cuantificación de datos. Los porcentajes de área de los picos resueltos se estimaron al tomar el área de las especies individuales dividida por el área total de la proteína. El valor de pI de la proteína se estimó mediante la calibración lineal de la distancia entre los dos marcadores de pI agrupando la proteína. Los parámetros operativos incluían la temperatura del automuestreador a 10 °C; cartucho recubierto con fluorocarbono (FC), longitud de onda de detección de 280 nm, con un período de enfoque de 1 minuto a 1500 V.

Los datos en la Figura 39 informan cambios (diferencias) en el % de variantes ácidas, un cambio de % en el pico así como un cambio en el % de variantes básicas luego de estrés térmico en comparación con el valor inicial.

Como se observa en la Figura 39, el cambio en el % de variantes ácidas y pico principal de anti-LAG3 fue comparable entre ácido L-aspártico o ácido L-glutámico 20 mM, L-histidina 40 mM y L-arginina 40 mM. El cambio fue menor para cloruro de sodio 40 mM. De manera similar, el cambio en el % de variantes ácidas y pico principal a 70 mM fue comparable entre L-histidina y la combinación de ácido L-aspártico o ácido L-glutámico 20 mM con glicina 50 mM. El cambio fue menor para cloruro de sodio 70 mM y L-arginina 70 mM. En cambio en el % de

variantes básicas fue mínimo para la totalidad de las diez formulaciones enumeradas en la Tabla 5.

DLS

- 5 La medición de diámetro hidrodinámico se llevó a cabo usando un instrumento de dispersión de luz dinámica (DLS) de Wyatt en una placa de fondo de vidrio de 96 cavidades. La muestra se diluyó hasta una concentración de proteínas de 5 mg/ml y se hizo correr en modo automático usando detección de dispersión de 158° a 20 °C, duración de corrida de 5 segundos durante cinco mediciones.
- 10 Como se observa en la Figura 40, el porcentaje de cambio en el diámetro de anti-LAG3 fue mínimo para ácido L-aspártico o ácido L-glutámico 20 mM y su combinación con glicina 50 mM. El cambio en diámetro fue entre 6 y 11 % para cloruro de sodio (40 a 70 mM), L-arginina (40 a 70 mM) y L-histidina (40 a 70 mM) y dentro de la variabilidad de ensayo.
- 15 Ejemplo 11: Cribado de estabilizantes

Con el fin de evaluar la estabilidad de anti-LAG3 (25 mg/ml en L-histidina 10 mM L-arginina clorhidrato 70 mM o en cloruro de sodio 70 mM a pH 5,8) en presencia de diferentes estabilizantes tales como azúcares y polioles, once formulaciones se prepararon como enumerados en la Tabla 6.

Tabla 6 Optimización de formulación de la formulación anti-LAG3 con estabilizantes		
Formulación N.º	Nomenclatura de la muestra	Descripción de la Formulación
1	L-Arg70	25 mg/ml de anti-LAG3, L-histidina 10 mM, L-arginina clorhidrato 70 mM, pH 5,8
2	NaCl70	25 mg/ml de anti-LAG3, L-histidina 10 mM, cloruro de sodio (NaCl) 70 mM, pH 5,8
3	L-Arg70+Sac5%	25 mg/ml de anti-LAG3, L-histidina 10 mM, L-arginina clorhidrato 70 mM, pH 5,8, 5 % (p/v) de sacarosa
4	L-Arg70+Sac9%	25 mg/ml de anti-LAG3, L-histidina 10 mM, L-arginina clorhidrato 70 mM, pH 5,8, 9% (p/v) de

		sacarosa
5	L-Arg70+Treh5%	25 mg/ml de anti-LAG3, L-histidina 10 mM, L-arginina clorhidrato 70 mM, pH 5,8, 5 % (p/v) de trehalosa
6	L-Arg70+Treh9%	25 mg/ml de anti-LAG3, L-histidina 10 mM, L-arginina clorhidrato 70 mM, pH 5,8, 9% (p/v) de trehalosa
7	L-Arg70+Sorb2,5%	25 mg/ml de anti-LAG3, L-histidina 10 mM, L-arginina clorhidrato 70 mM, pH 5,8, 2,5% (p/v) de sorbitol
8	L-Arg70+PEG400 2 %	25 mg/ml de anti-LAG3, L-histidina 10 mM, L-arginina clorhidrato 70 mM, pH 5,8, 2,0% (p/v) de PEG400
9	L-Arg70+Glycer 2,5%	25 mg/ml de anti-LAG3, L-histidina 10 mM, L-arginina clorhidrato 70 mM, pH 5,8, 2,5% (p/v) de glicerol
10	NaCl70+Sac5%	25 mg/ml de anti-LAG3, L-histidina 10 mM, cloruro de sodio 70 mM, pH 5,8, 5,0% (p/v) de sacarosa
11	NaCl70+Sac9%	25 mg/ml de anti-LAG3, L-histidina 10 mM, cloruro de sodio 70 mM, pH 5,8, 9,0% (p/v) de sacarosa

Cromatografía de exclusión por tamaño de ultra rendimiento (UP-SEC)

La pureza de la muestra se evaluó mediante UP-SEC, en donde se determinó el porcentaje de monómeros, así como todos los porcentajes de especies de alto peso molecular (HMW) y picos de elución tardía (especies de LMW). La UP-SEC se llevó a cabo en un sistema Waters Acquity UPLC H-class Bio diluyendo las muestras a 1,0 mg/ml en fase móvil (fosfato 100 mM, cloruro de sodio 100 mM, pH 7,0). La temperatura de la columna se mantuvo a 25 ± 3 °C y la velocidad de flujo se mantuvo a 0,5 ml/min usando elusión isocrática. Las muestras diluidas se inyectaron (5 µl) en un UPLC equipado con una columna Waters BEH200 y un detector de UV. Las proteínas de la muestra se separaron por tamaño y se detectaron por absorción UV a 214 nm.

Como se observó en la Figura 24, se descubrió que el porcentaje de cambio en especies de alto peso molecular y el % de monómero de anti-LAG3 (25 mg/ml en L-histidina 10 mM pH 5,8, L-arginina 70 mM) son menores en presencia de estabilizantes tales como sacarosa, trehalosa, PEG 400 y glicerol. El efecto se pronunció a una concentración más alta de sacarosa y trehalosa (9 % p/v), en comparación con anti-LAG3 (25 mg/ml en L-histidina 10 mM pH 5,8, L-arginina clorhidrato 70 mM) solo. De manera similar, se descubrió que el porcentaje de cambio en especies de alto peso molecular y el % de monómero de anti-LAG3 (25 mg/ml en L-histidina 10 mM pH 5,8, cloruro de sodio 70 mM) es menor en presencia de sacarosa con efecto pronunciado a una concentración más alta de sacarosa y trehalosa (9 % p/v), en comparación con anti-LAG3 (25 mg/ml en L-histidina 10 mM pH 5,8, 70 mM cloruro de sodio) solo.

Cambio en las especies con carga (cIEF)

El cambio en la heterogeneidad de carga y el punto isoeléctrico (pI) de anti-LAG3 en presencia de L-arginina, L-histidina o cloruro de sodio se evaluó usando el sistema de enfoque isoeléctrico capilar (cIEF) ProteinSimple. Las muestras se mezclaron con anfolito portador antes de la inyección en el capilar. Al aplicar un campo eléctrico al capilar, un gradiente de pH se creó mediante el anfolito portador en el capilar y las moléculas de proteína migraron a la locación en el capilar en donde el valor pH local era igual a los valores de pH isoeléctrico (pI). La detección de las proteínas separadas se logró al realizar un barrido completo del capilar entero usando los sistemas iCE (iCE3 de ProteinSimple). La última imagen tomada por el instrumento se usó para la cuantificación de datos. Los porcentajes de área de los picos resueltos se estimaron al tomar el área de las especies individuales dividida por el área total de la proteína. El valor de pI de la proteína se estimó mediante la calibración lineal de la distancia entre los dos marcadores de pI agrupando la proteína. Los parámetros operativos incluían la temperatura del automuestreador a 10 °C; cartucho recubierto con fluorocarbono (FC), longitud de onda de detección de 280 nm, con un período de enfoque de 1 minuto a 1500 V.

Las once formulaciones se cargaron en viales estériles de 2 ml (carga de 2,0 ml), se sellaron y se taparon, y se inspeccionaron visualmente. En el punto temporal inicial, las once formulaciones se almacenaron de 2 a 8 °C (protegidos de la luz) y las muestras para estrés térmico se colocaron invertidas en un contenedor protegido de la luz durante 10 días a 50 °C en un horno de calor seco. Los datos en la Figura 25 informan cambios (diferencias) en el % de variantes ácidas, un cambio de % en el pico así como un cambio en el % de variantes básicas luego de estrés térmico en comparación con el valor inicial.

Como se muestra en la Figura 25, anti-LAG3 (25 mg/ml en L-histidina 10 mM, L-arginina 70 mM pH 5,8) mostró una responsabilidad química reducida en presencia de 5 % de sacarosa. El efecto estabilizante de trehalosa (5 % p/v y 10 % p/v), sorbitol, PEG 400, y glicerol fueron comparables. El anti-LAG3 (25 mg/ml en L-histidina 10 mM, cloruro de sodio 70 mM pH 5,8) 5 mostró mejor estabilidad química en ausencia de sacarosa.

DSC

Las capacidades térmicas (cp) en kcal/°C de las once formulaciones de anti-LAG3 enumeradas en la Tabla 6 se midieron usando microcalorimetría diferencial de barrido (DSC) a 1 mg/ml. El T_{m1} , T_{m2} y $T_{inicial}$ para las once formulaciones se determinaron del gráfico de cp 10 (cal/mol/°C) en comparación con la temperatura (°C).

Como se observa en la Figura 26, en función de los valores T_{m1} , T_{m2} y $T_{inicial}$, la sacarosa y trehalosa (cada una a 5 % p/v a 9 % p/v) tuvieron un efecto estabilizante en anti-LAG3 (25 mg/ml en L-histidina 10 mM, L-arginina clorhidrato 70 mM pH 5,8) así como en anti-LAG3 (25 mg/ml en L-histidina 10 mM, cloruro de sodio 70 mM pH 5,8). El efecto estabilizante de 15 sorbitol, PEG 400, y glicerol fueron comparables.

Ejemplo 12: Estudios de variación de la concentración de polisorbato

Con el fin de determinar la concentración óptima de polisorbato 80 en la matriz de la formulación (25 mg/ml de anti-LAG3 en L-histidina 10 mM, L-arginina clorhidrato 70 mM, 5% p/v de sacarosa, pH 5,8), se prepararon ocho formulaciones diferentes, en donde cada una 20 contenía polisorbato en el rango de 0 mg/ml hasta 1,0 mg/ml como se indicó en la Tabla 7. Las formulaciones se expusieron a agitación a 300 rpm por hasta 7 días. Dos formulaciones consistieron en placebos (0,1 mg/ml o 1,0 mg/ml de polisorbato 80 en la misma matriz de formulación sin anti-LAG3, es decir, Formulación N.º 1 en la Tabla 7).

Tabla 7 Optimización de la formulación con L-arginina, cloruro de sodio y su mezcla			
Formulación N.º	Cantidad de Polisorbato 80 (PS80) en mg/ml	Cantidad de Polisorbato 80 (PS80) en % (p/v)	Descripción de la Formulación
1	0	0	25 mg/ml de anti-LAG3, L-histidina 10 mM, L-arginina clorhidrato 70 mM, 5 % (p/v) de sacarosa, pH 5,8

2	0,05	0,005	25 mg/ml de anti-LAG3, L-histidina 10 mM, L-arginina clorhidrato 70 mM, 5 % (p/v) de sacarosa, 0,05 mg/ml de polisorbato 80, pH 5,8
3	0,1	0,01	25 mg/ml de anti-LAG3, L-histidina 10 mM, L-arginina clorhidrato 70 mM, 5 % (p/v) de sacarosa, 0,1 mg/ml de polisorbato 80, pH 5,8
4	0,2	0,02	25 mg/ml de anti-LAG3, L-histidina 10 mM, L-arginina clorhidrato 70 mM, 5 % (p/v) de sacarosa, 0,2 mg/ml de polisorbato 80, pH 5,8
5	0,5	0,05	25 mg/ml de anti-LAG3, L-histidina 10 mM, L-arginina clorhidrato 70 mM, 5 % (p/v) de sacarosa, 0,5 mg/ml de polisorbato 80, pH 5,8
6	1,0	0,1	25 mg/ml de anti-LAG3, L-histidina 10 mM, L-arginina clorhidrato 70 mM, 5 % (p/v) de sacarosa, 1,0 mg/ml de polisorbato 80, pH 5,8
7	0,1	0,01	L-histidina 10 mM, L-arginina clorhidrato 70 mM, 5 % (p/v) de sacarosa, 0,1 mg/ml de polisorbato 80, pH 5,8 (placebo)
8	1,0	0,1	L-histidina 10 mM, L-arginina clorhidrato 70 mM, 5 % (p/v) de sacarosa, 1,0 mg/ml de polisorbato 80, pH 5,8 (placebo)

Turbidez

Con el fin de evaluar la estabilidad coloidal de anti-LAG3 en la matriz de la formulación que contenía diferentes concentraciones de polisorbato 80, la turbidez (OD₃₅₀) de las doce formulaciones se evaluó usando un espectrofotómetro de absorbancia ultravioleta (UV). Las absorbancias UV de las muestras se midieron en una placa transparente Costar de 96 cavidades a una longitud de onda de 350 nm con (sensor) Pathcheck corregido para absorbancia en placa.

Como se observó en la Figura 27, en ausencia de polisorbato 80, anti-LAG3 en la matriz de la formulación (25 mg/ml de anti-LAG3 en L-histidina 10 mM, L-arginina clorhidrato 70 mM, 5 % p/v de sacarosa, pH 5,8) mostró un aumento en la turbidez luego de la agitación. En presencia de concentraciones de polisorbato 80 de 0,1 mg/ml a 1,0 mg/ml en la matriz de la formulación (25 mg/ml de anti-LAG3 en L-histidina 10 mM, L-arginina clorhidrato 70 mM, 5 % p/v de sacarosa, pH 5,8), se halló que anti-LAG3 era estable. No hubo impacto en la estabilidad coloidal del placebo de 0,1 mg/ml a 1,0 mg/ml.

UP-SEC

La pureza de la muestra se evaluó mediante UP-SEC, en donde se determinó el porcentaje de monómeros, así como todos los porcentajes de especies de alto peso molecular (HMW) y picos de elución tardía (especies de LMW). UP-SEC se llevó a cabo en un sistema Waters Acquity Liquid Chromatography diluyendo las muestras a 1,0 mg/ml en fase móvil (fosfato de sodio monobásico monohidrato 0,1 M, fosfato de sodio dibásico dihidrato 0,1 M, L-arginina 0,1 M, pH 7,0). Las muestras diluidas se inyectaron (5 µl) en la cromatografía de líquidos equipada con columna Protein BEH SEC y un detector de UV. Las proteínas de la muestra se separaron por tamaño y se detectaron por absorción UV a 214 nm.

Como se observa en la Figura 28, no hubo ningún cambio en los niveles de agregados solubles (% de especies de alto peso molecular) o fragmentación (% de especies de bajo peso molecular) o cambio en el % de monómero en presencia de polisorbato 80 (concentración de 0,1 a 1,0 mg/ml). Se descubrió que anti-LAG3 es estable coloidalmente en presencia de polisorbato 80 en la matriz de la formulación.

HP-IEX

Con el fin de determinar las variantes de carga en las formulaciones anti-LAG3, se usó cromatografía de intercambio iónico de alto rendimiento (HP-IEX). El análisis se llevó a cabo usando una columna Dionex MabPac® SCX-10, 10 µm 4 x 250 mm y un gradiente de fase móvil de MES 25 mM, Tris 14 mM, pH 6,25 a MES 25 mM, Tris 22 mM, LiCl 100 mM pH 6,85. La detección de UV se llevó a cabo a 280 nm. Este método también incluye un amortiguador de extracción opcional (EDTA 15 mM Tris 40 mM, CHES 10 mM, NaCl 500 mM, pH 8,1) para mejorar la fiabilidad y sostenibilidad del ensayo. La muestra se preparó a 5 mg/ml con un volumen de inyección de 10 µl.

Como se observa en la Figura 29, no hubo cambio en el nivel de especies con carga (% de variantes ácidas, % de pico principal, % de variantes básicas) en presencia de polisorbato 80 (concentración de 0,1 a 1,0 mg/ml). Se descubrió que anti-LAG3 es estable coloidalmente en presencia de polisorbato 80 en la matriz de la formulación.

5 Ejemplo 13: Cribado de antioxidantes

Con el fin de determinar el efecto del antioxidante en anti-LAG3 en la formulación (25 mg/ml de anti-LAG3 en L-histidina 10 mM, L-arginina clorhidrato 70 mM, 5% p/v de sacarosa, pH 5,8), se evaluaron tres niveles diferentes de L-metionina en la formulación. Se prepararon cuatro formulaciones diferentes como se enumera en la Tabla 8, cargadas (2,2 ml) en un vial de vidrio tipo 1 de 2 ml y sellado adecuadamente. Las cuatro formulaciones se expusieron a estrés de luz 0,2 ICH, 0,5 ICH, y 1 ICH (ultravioleta y luz blanca fría o luz visible). Un control oscuro (cubierto con una película) para cada una de las cuatro formulaciones (control) también se expuso a estrés de luz hasta 1 ICH.

Tabla 8 Cribado de antioxidantes para la formulación anti-LAG3	
Concentración de L-metionina (mM)	Descripción de la Formulación
Control	25 mg/ml de anti-LAG3, L-histidina 10 mM, L-arginina clorhidrato 70 mM, 5 % (p/v) de sacarosa, 0,2 mg/ml de polisorbato 80, pH 5,8 (control)
5 mM	25 mg/ml de anti-LAG3, L-histidina 10 mM, L-arginina clorhidrato 70 mM, 5 mM de L-metionina, 5 % (p/v) de sacarosa, 0,2 mg/ml de polisorbato 80, pH 5,8
7 mM	25 mg/ml de anti-LAG3, L-histidina 10 mM, L-arginina clorhidrato 70 mM, L-metionina 7 mM, 5 % (p/v) de sacarosa, 0,2 mg/ml de polisorbato 80, pH 5,8
10 mM	25 mg/ml de anti-LAG3, L-histidina 10 mM, L-arginina clorhidrato 70 mM, L-metionina 10 mM, 5 % (p/v) de sacarosa, 0,2 mg/ml de polisorbato 80, pH 5,8

Turbidez

La turbidez (OD_{350}) de las cuatro formulaciones se evaluó usando un espectrofotómetro de absorbancia ultravioleta (UV). Las absorbancias UV de las muestras se midieron en una placa transparente Costar de 96 cavidades a una longitud de onda de 350 nm con (sensor) Pathcheck
5 corregido para absorbancia en placa.

Como se observó en la Figura 30, se descubrió que L-metionina (5 mM a 10 mM) estabiliza coloidalmente anti-LAG3 (25 mg/ml de anti-LAG3, L-histidina 10 mM, L-arginina 70 mM, 5 % p/v de sacarosa, pH 5,8) en comparación con el control como se enumeró en la Tabla 8; con L-
10 metionina 10 mM como la cantidad óptima. No hubo impacto en la inestabilidad coloidal para la muestras de control oscuro luego de la exposición a la luz 1 ICH.

UP-SEC

La pureza de la muestra se evaluó mediante UP-SEC, en donde se determinó el porcentaje de
15 monómeros, así como todos los porcentajes de especies de alto peso molecular (HMW) y picos de elución tardía (especies de LMW). La UP-SEC se llevó a cabo en el sistema UPLC acquity H class diluyendo las muestras a 1,0 mg/ml en fase móvil (fosfato 100 mM y cloruro de sodio 100 mM, pH 7,0). Las muestras diluidas se inyectaron (5 μ l) en la cromatografía de líquidos equipada con columna Protein BEH SEC y un detector de UV, velocidad de flujo de 0,5 ml/min.
20 Las proteínas de la muestra se separaron por tamaño y se detectaron por absorción UV a 214 nm y 280 nm.

Como se observó en la Figura 31, se descubrió que L-metionina (5 mM a 10 mM) reduce la formación de agregados solubles (% de HMW) en la formulación anti-LAG3 (25 mg/ml de anti-LAG3, L-histidina 10 mM, L-arginina 70 mM, 5 % p/v de sacarosa, pH 5,8) en comparación con
25 el control como se enumeró en la Tabla 8; con L-metionina 10 mM como la cantidad óptima. No hubo formación de agregados solubles para la muestras de control oscuro luego de la exposición a la luz 1 ICH.

HP-IEX

Con el fin de determinar las variantes de carga en las formulaciones anti-LAG3, se usó
30 cromatografía de intercambio iónico de alto rendimiento (HP-IEX). El análisis se llevó a cabo usando una columna Dionex MabPac® SCX-10, 10 μ m 4 x 250 mm y un gradiente de fase móvil de MES 25 mM, Tris 14 mM, pH 6,25 a MES 25 mM, Tris 22 mM, LiCl 100 mM pH 6,85. La detección de UV se llevó a cabo a 280 nm. Este método también incluye un amortiguador de

extracción opcional (EDTA 15 mM Tris 40 mM, CHES 10 mM, NaCl 500 mM, pH 8,1) para mejorar la fiabilidad y sostenibilidad del ensayo. La muestra se preparó a 5 mg/ml con un volumen de inyección de 10 µl y una velocidad de flujo de 0,5 a 1,0 ml/min.

Como se observó en la Figura 32, se descubrió que la L-metionina 5 mM a 10 mM es eficaz para reducir el aumento de las especies con carga (% de variantes ácidas y % de variantes básicas) hasta una exposición de luz de 1 ICH para un anti-LAG3 (25 mg/ml de anti-LAG3 en L-histidina 10 mM, L-arginina clorhidrato 70 mM, 5 % p/v de sacarosa, 0,2 mg/ml de polisorbato 80) en comparación con el control. No hubo impacto en las especies con carga para las muestras de control oscuro 1 ICH.

10 *Mapeo de péptidos reducidos*

Los cambios en el nivel de oxidación de las modificaciones oxidativas después de la traducción de anti-LAG3 se evaluaron usando mapeo de péptidos reducidos. Se llevó a cabo un mapeo de péptidos reducidos en el sistema Waters Acquity H Bio Class con fase móvil (0,1 % de ácido trifluoroacético en agua de grado LC/MS), fase móvil B (0,1 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo de grado LC/MS). El volumen de inyección era 50 µl equipado con columna HALO Peptide ES-C18 con velocidad de flujo de 0,2 ml/min y absorbancia de detección de 214 nm. La espectrometría de masa consistió en capilar 3,0, cono de muestra de 30, temperatura fuente de 120 °C, gas de cono 30, gas de desolvación, rango m/z de 100-200, MS recolectado de 2 a 110 min. Las muestras se redujeron y alquilaron con reactivos apropiados antes de la corrida de columna. Se realizó una digestión vacía (no de muestras) para identificar picos relacionados que no eran muestras, con elución en la región de interés.

Como se observó en la Figura 33, se descubrió que la L-metionina 5 mM a 10 mM es eficaz para reducir la oxidación de las modificaciones después de la traducción de anti-LAG3 (25 mg/ml de anti-LAG3 en L-histidina 10 mM, L-arginina clorhidrato 70 mM, 5 % p/v de sacarosa, 0,2 mg/ml de polisorbato 80) luego de la exposición a luz 1 ICH en comparación con el control.

Ejemplo 14: Estudios a alta concentración de anti-LAG3

Con el fin de evaluar la viabilidad de la alta concentración (200 mg/ml) de anti-LAG3 en tres amortiguadores diferentes a pH 5,8 (histidina, acetato y citrato; en donde cada uno contenía L-arginina clorhidrato 70 mM) y de la formulación que contenía L-histidina, L-arginina clorhidrato 70 mM, pH 5,8, en presencia de diferentes estabilizantes, se prepararon nueve formulaciones como se enumeró en la Tabla 9. Cada una de las nueve formulaciones se cargó en placas de 96

cavidades y se selló apropiadamente. Las formulaciones se estresaron a 50 °C durante 10 días en un horno de calor seco. El análisis se llevó a cabo para las muestras iniciales y estresadas.

Tabla 9 Viabilidad de alta concentración de la formulación anti-LAG3			
Formulación N.º	Concentración de anti-LAG3 (mg/ml)	Descripción de la Formulación	Estabilizante
1	200	L-histidina 10 mM, L-arginina clorhidrato 70 mM, pH 5,8	Sin estabilizante
2	200	Acetato 10 mM, L-arginina clorhidrato 70 mM, pH 5,8	Sin estabilizante
3	200	Citrato 10 mM, L-arginina clorhidrato 70 mM, pH 5,8	Sin estabilizante
4	200	Acetato 10 mM, L-arginina clorhidrato 70 mM, pH 5,8	5 % (p/v) de sacarosa
5	200	Acetato 10 mM, L-arginina clorhidrato 70 mM, pH 5,8	5 % (p/v) de glicerol
6	200	Acetato 10 mM, L-arginina clorhidrato 70 mM, pH 5,8	L-glutamina 70 mM
7	200	Acetato 10 mM, L-arginina clorhidrato 70 mM, pH 5,8	L-glicina 70 mM
8	200	Acetato 10 mM, L-arginina clorhidrato 70 mM, pH 5,8	Prolina 70 mM
9	200	Acetato 10 mM, L-arginina clorhidrato 70 mM, pH 5,8	L-metionina 70 mM

Turbidez

- La turbidez (OD_{350}) de las nueve formulaciones se evaluó usando un espectrofotómetro de absorbancia ultravioleta (UV). Las absorbancias UV de las muestras se midieron en una placa transparente Costar de 96 cavidades a una longitud de onda de 350 nm con (sensor) Pathcheck corregido para absorbancia en placa.

Como se observó en la Figura 34, la estabilidad coloidal (OD_{350}) de anti-LAG3 (200 mg/ml de anti-LAG3 en L-histidina 10 mM L-arginina 70 mM, pH 5,8) es menor en presencia de L-metionina 70 mM como estabilizante en comparación con el control (200 mg/ml de anti-LAG3

en L-histidina 10 mM L-arginina 70 mM, pH 5,8). El efecto estabilizante (coloidal) de L-glutamina 70 mM y prolina 70 mM en 200 mg/ml de formulación anti-LAG3 fue comparable. De manera similar, el efecto estabilizante (coloidal) de 5 % p/v de glicerol y L-glicina 70 mM en 200 mg/ml de formulación anti-LAG3 fue comparable. La estabilidad coloidal de 200 mg/ml de anti-LAG3 fue comparablemente alta en presencia de 5% p/v de sacarosa.

UP-SEC

La pureza de la muestra se evaluó mediante UP-SEC, en donde se determinó el porcentaje de monómeros, así como todos los porcentajes de especies de alto peso molecular (HMW) y picos de elución tardía (especies de LMW). La UP-SEC se llevó a cabo en Acquity H class (DS) diluyendo las muestras a 1,0 mg/ml en fase móvil (fosfato 100 mM, cloruro de sodio 100 mM, pH 7,0). La temperatura de la columna se mantuvo a 25 ± 3 °C y la velocidad de flujo se mantuvo a 0,5 ml/min usando elución isocrática. Las muestras diluidas se inyectaron (5 µl) en un UPLC equipado con una columna Waters BEH200 y un detector de UV. Las proteínas de la muestra se separaron por tamaño y se detectaron por absorción UV a 214 nm.

Como se observa en la Figura 35, el amortiguador de L-histidina 10 mM en presencia de L-arginina clorhidrato 70 mM es eficaz para reducir niveles de agregados solubles en comparación con L-acetato 10 mM o amortiguador de citrato 10 mM para una alta concentración de formulación anti-LAG3 (200 mg/ml). 5 % (w/v) de sacarosa es eficaz como un estabilizante para reducir aún más los niveles de agregados solubles, seguida de 5 % (w/v) de glicerol. El efecto estabilizante de los aminoácidos, es decir, L-glutamina 70 mM, L-glicina 70 mM, prolina 70 mM y L-metionina 70 mM, es comparable.

Cambio en las especies con carga (cIEF)

El cambio en la heterogeneidad de carga y el punto isoeléctrico (pI) de anti-LAG3 en presencia de L-arginina, L-histidina o cloruro de sodio se evaluó usando el sistema de enfoque isoeléctrico capilar (cIEF) ProteinSimple. Las muestras se mezclaron con anfolito portador antes de la inyección en el capilar. Al aplicar un campo eléctrico al capilar, un gradiente de pH se creó mediante el anfolito portador en el capilar y las moléculas de proteína migraron a la locación en el capilar en donde el valor pH local era igual a los valores de pH isoeléctrico (pI). La detección de las proteínas separadas se logró al realizar un barrido completo del capilar entero usando los sistemas iCE (iCE3 de ProteinSimple). La última imagen tomada por el instrumento se usó para la cuantificación de datos. Los porcentajes de área de los picos resueltos se estimaron al tomar el área de las especies individuales dividida por el área total de la proteína. El valor de pI de la

proteína se estimó mediante la calibración lineal de la distancia entre los dos marcadores de pI agrupando la proteína. Las muestras se prepararon a 5 mg/ml y los parámetros operativos incluían la temperatura del automuestreador a 10 °C; cartucho recubierto con fluorocarbono (FC), longitud de onda de detección de 280 nm, con un período de enfoque de 1 minuto a 1500

5 V.

La estabilidad química de 200 mg/ml de anti-LAG3 era comparable en L-histidina 10 mM así como amortiguador de citrato 10 mM en comparación con amortiguador de acetato 10 mM en presencia de L-arginina clorhidrato 70 mM a pH 5,8. 5 % (w/v) de glicerol fue eficaz para reducir el cambio en las especies con carga (% ácido y variantes básicas) seguido de 5 % (w/v) de sacarosa (% variantes básicas). El efecto estabilizante de los aminoácidos, es decir, L-glutamina 70 mM, L-glicina 70 mM, prolina 70 mM y L-metionina 70 mM, era comparable.

Ejemplo 15: Estudios de estabilidad de la coformulación de anticuerpos anti-PD-1 y anti-LAG3

Las coformulaciones del anticuerpo anti-PD-1 (cadena pesada SEQ ID NO: 10 y la cadena ligera SEQ ID NO: 5) y anticuerpo anti-LAG3 (cadena pesada SEQ ID NO: 57 y la cadena ligera SEQ ID NO: 37) se prepararon como en la Tabla 10.

Tabla 10

Form . N.º	Anti-LAG3 (mg/ml)	Anti-PD1 (mg/ml)	Histidina (mM)	Arginina (mM)	Sacarosa (mg/ml)	Metionina (mM)	PS-80 (mg/ml)	pH
F1	20	0	10	70	50	0	0,2	5,8
F2	0	20	10	70	50	0	0,2	5,8
F3	20	20	10	70	50	0	0,2	5,8
F4	0	20	10	0	70	0	0,2	5,8
F5	20	20	10	70	50	10	0,2	5,8
F6	20	20	10	40	50	10	0,2	5,8

20 Estudio de estabilidad térmica

Los estudios de estabilidad térmica se llevaron a cabo usando 1,0 ml de formulaciones líquidas de F1-F6 en viales de 2 ml con tapón de suero de 13 mm hasta 12 semanas a condiciones de almacenamiento a 5 °C (humedad ambiente), 25 °C (60 % de humedad) y 40 °C (75 % de humedad relativa). Las muestras de estabilidad se evaluaron mediante turbidez y cromatografía de modo mixto (MMC).

Cromatografía de modo mixto

5 La cromatografía de modo mixto permitió la separación de los anticuerpos individuales (anti-LAG3 y anti-PD1) en coformulaciones y también permitió el control de los agregados anti-LAG3 y agregados anti-PD1 y la oxidación en coformulaciones. En MMC, el porcentaje de monómero para cada mAb se determinó mediante el área de pico principal de cada mAb. Para anti-LAG3, se calcularon los porcentajes de especies de alto peso molecular (agregados) y las
 10 especies de bajo peso molecular (fragmentos). Para anti-PD1, los porcentajes de especies de alto peso molecular (agregados) y especies de bajo peso molecular (fragmentos) así como las especies de oxidación (Ox1 y Ox2) se calcularon en función del área de pico individual correspondiente a cada especie. La cromatografía de modo mixto se llevó a cabo al diluir las muestras a 1,0 mg/ml en fase móvil (PBS, pH 7,4). La temperatura de la columna se mantuvo a
 15 25 °C, y la velocidad de flujo se mantuvo a 0,5 ml/min usando elusión isocrática. Las muestras diluidas se inyectaron (15 µl) en HPLC equipado con una columna SEC-300 Sepax Zenix personalizada. Los diferentes componentes en la muestra se separaron por tamaño e hidrofobicidad y se detectaron por absorción UV a 280nm.

20 *Medición de turbidez*

El análisis de turbidez se llevó a cabo en las muestras de estabilidad térmica a una absorbancia espectrofotométrica de 350 nm y 500 nm en un lector de placas M5 de SpectraMax.

Conclusión

25 Las coformulaciones (F3, F5 y F6) mostraron una estabilidad similar o mejor estabilidad que las formulaciones individuales (Figuras 22 y 23). Comparativamente, la Formulación F2 mostró menos turbidez y pérdida de monómero que la Formulación F4 en el tiempo en almacenamiento a 40 °C que indicaba que anti-PD1 mostraba mejor estabilidad en la formulación anti-LAG3 (Figuras 22 y 23). Las coformulaciones F5 y F6 mostraron un cambio
 30 mínimo en monómeros en el tiempo durante 12 semanas de almacenamiento a 40 °C en comparación con las formulaciones individuales. La L-metionina ayudó a minimizar la pérdida de monómero en coformulaciones (F5, F6) (Figura 23).

REIVINDICACIONES

1. Una formulación que comprende: alrededor de 5-300 mg/ml de un anticuerpo anti-LAG3
- 5 o fragmento de fijación al antígeno de este, uno o más de un excipiente seleccionado del grupo que consiste en histidina, aspartato, glutamina, glicina, prolina, metionina, arginina o una sal de estos farmacéuticamente aceptable, NaCl, KCl, LiCl, CaCl₂, MgCl₂, ZnCl₂, y FeCl₂, a una concentración total de 10-1000 mM, y un amortiguador a pH alrededor de 5-8.
2. La formulación de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende el
- 10 anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de fijación al antígeno de este a una concentración de 10-250 mg/ml y comprende una región variable de la cadena ligera que comprende CDRL1 de SEQ ID NO: 39, CDRL2 de SEQ ID NO: 40, CDRL3 de SEQ ID NO: 41 y una región variable de la cadena pesada que comprende CDRH1 de SEQ ID NO: 42, CDRH2 de SEQ ID NO: 59, CDRH3 de SEQ ID NO: 44, uno o más de un excipiente seleccionado del grupo que consiste de histidina,
- 15 aspartato, glutamina, glicina, prolina, metionina, arginina o una sal de este farmacéuticamente aceptable, NaCl, KCl, LiCl, a una concentración total de 15-300 mM, y un amortiguador a pH alrededor de 5,0-6,5.
3. La formulación de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el excipiente es
- 20 L-arginina o una sal de este farmacéuticamente aceptable a una concentración de 15-250 mM.
4. La formulación de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el excipiente es L-arginina o una sal de este farmacéuticamente aceptable a una concentración de 40-100 mM.
5. La formulación de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el
- 25 excipiente es una combinación de NaCl y L-arginina o una sal de esta farmacéuticamente aceptable con una concentración total de 20-250 mM.
6. La formulación de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el excipiente es NaCl, KCl o
- 30 LiCl a alrededor de 40-150 mM.
7. La formulación de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el excipiente es L-histidina, L-aspartato, L-glutamina, o L-glicina a alrededor de 15-200 mM.

8. La formulación de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el excipiente es L-histidina a alrededor de 40-100 mM.
- 5 9. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en donde el amortiguador es un amortiguador de histidina, un amortiguador de acetato o un amortiguador de citrato.
- 10 10. La formulación de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el amortiguador tiene una concentración de alrededor de 1-300 mM.
11. La formulación de acuerdo con cualquiera de reivindicaciones 1-10 que además comprende un azúcar o poliol, y un tensioactivo no iónico, o una combinación de estos.
12. La formulación de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el azúcar es un
- 15 disacárido no reductor.
13. La formulación de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el azúcar es trehalosa o sacarosa, o una combinación de estas.
14. La formulación de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el poliol se
- 20 selecciona del grupo que consiste en manitol, sorbitol, glicerol y polietilenglicol.
15. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en donde el azúcar o poliol se encuentra en una concentración de alrededor de 10-200 mg/ml.
16. La formulación de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el
- 25 tensioactivo no iónico es un polisorbato.
17. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que además comprende un tensioactivo seleccionado de polisorbato 20 y polisorbato 80, y un azúcar seleccionado de
- 30 sacarosa y trehalosa, o una combinación de estas.
18. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que además comprende

alrededor de 10-250 mg/ml de sacarosa, trehalosa, manitol, sorbitol, polietilenglicol o glicerol; alrededor de 0,005-2,0 mg/ml de polisorbato 80 o 20; y alrededor de 3-300 mM de amortiguador de L-histidina, acetato o citrato a pH alrededor de 5,0 -6,5.

19. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10,
5 que además comprende
alrededor de 30-120 mg/ml de sacarosa o trehalosa; alrededor de 0,05-1,5 mg/ml de polisorbato 80 o 20; y alrededor de 3-150 mM de amortiguador de L-histidina, acetato o citrato a pH
alrededor de 5,0 -6,5.

20. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10,
10 que además comprende
alrededor de 50-90 mg/ml de sacarosa o trehalosa; alrededor de 0,05-1,0 mg/ml de polisorbato 80; y alrededor de 5-30 mM de amortiguador de L-histidina, acetato o citrato a pH alrededor de 5,0 -6,5.

21. La formulación de acuerdo con la reivindicación 11, que comprende
15 alrededor de 20-220
mg/ml del anticuerpo anti-LAG3; alrededor de 50-90 mg/ml de sacarosa o trehalosa; alrededor de 0,05-1,0 mg/ml de polisorbato 80 o 20; alrededor de 5-20 mM de amortiguador de L-histidina, acetato o citrato a pH alrededor de 5,0 - 6,5; y alrededor de 40-150 mM de L-arginina o una sal de esta farmacéuticamente aceptable.

22. La formulación de acuerdo con la reivindicación 11, que comprende
20 alrededor de 20-220
mg/ml del anticuerpo anti-LAG3; alrededor de 20-200 mg/ml de glicerol, sorbitol o PEG400; alrededor de 0,05-1,0 mg/ml de polisorbato 80 o 20; alrededor de 3-150 mM de amortiguador de L-histidina, acetato o citrato a pH alrededor de 5,0 - 6,5; y alrededor de 40-150 mM de L-
25 arginina o una sal de esta farmacéuticamente aceptable.

23. La formulación de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende
alrededor de 20-220
mg/ml del anticuerpo anti-LAG3; alrededor de 20-150 mg/ml de L-glutamina, L-glicina, L-prolina o L-metionina; alrededor de 0,05-1,0 mg/ml de polisorbato 80 o 20; alrededor de 3-150
30 mM de amortiguador de L-histidina, acetato o citrato a pH alrededor de 5,0 - 6,5; y alrededor de 40-150 mM de L-arginina o una sal de esta farmacéuticamente aceptable.

24. La formulación de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende
alrededor de 20-220

mg/ml del anticuerpo anti-LAG3; alrededor de 0,05-1,0 mg/ml de polisorbato 80 o 20; alrededor de 3-150 mM de amortiguador de L-histidina, acetato o citrato a pH alrededor de 5,0 - 6,5; y alrededor de 40-150 mM de NaCl o una sal de este farmacéuticamente aceptable.

25. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24,
5 que además comprende 3-150 mM de L-metionina.

26. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24,
que además comprende 5-70 mM de L-metionina.

10 27. La formulación de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende alrededor de 25 mg/ml del anticuerpo anti-LAG3; alrededor de 50 mg/ml de sacarosa; alrededor de 0,2 mg/ml de polisorbato 80; alrededor de 10 mM de amortiguador de L-histidina a pH alrededor de 5,8; alrededor de 70 mM de L-arginina o una sal de esta farmacéuticamente aceptable; y alrededor de
15 10 mM de L-metionina.

28. La formulación de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende alrededor de 25 mg/ml del anticuerpo anti-LAG3; alrededor de 50 mg/ml de sacarosa; alrededor de 0,2 mg/ml de polisorbato 80; alrededor de 10 mM de amortiguador de L-histidina a pH alrededor de 5,8-6,0;
20 alrededor de 70 mM de L-arginina o L-arginina-HCl.

29. La formulación de acuerdo con cualquiera de reivindicaciones 1-28 que es una formulación líquida.

30. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-28 que se congela hasta al menos
25 por debajo de -70°C .

31. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-28 que es una solución reconstituida a partir de una formulación liofilizada.

32. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 29-31,
30 en donde, a 5°C , el % de monómero del anticuerpo anti-LAG3 es $\geq 95\%$ después de 3 meses, como se determinó mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

33. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 29-32, en donde, a 5°C , el % de

variante ácida del anticuerpo anti-LAG3 es menor de 15 % luego de 3 meses, como se determinó mediante cromatografía de intercambio iónico.

34. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-33, en donde el anticuerpo anti-LAG3

5 o fragmento de fijación al antígeno comprende: una región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 37 y una secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 58.

35. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-33, en donde el anticuerpo anti-LAG3

comprende una secuencia de la cadena ligera de SEQ ID NO: 35 y una secuencia de la cadena
10 pesada de SEQ ID NO: 57.

36. La formulación de acuerdo con cualquiera de reivindicaciones 1-35 que además comprende un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de fijación al antígeno de este.

37. La formulación de acuerdo con la reivindicación 36, en donde la relación
15 molar del anticuerpo anti-LAG3 y el anticuerpo anti-PD-1 es 1:1.

38. La formulación de acuerdo con la reivindicación 36, en donde la relación molar del anticuerpo anti-LAG3 y el anticuerpo anti-PD-1 es 1:1, 2:1, 3:1 o 3,5:1.

20 39. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 36-38, en donde el anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de fijación al antígeno de este comprende una región variable ligera que comprende CDRL1 de SEQ ID NO: 1, CDRL2 de SEQ ID NO: 2, y CDRL3 de SEQ ID NO: 3, y una región variable de la cadena pesada que comprende CDRH1 de SEQ ID NO: 6, CDRH2 de SEQ ID
25 NO: 7, y CDRH3 de SEQ ID NO: 8.

40. La formulación de acuerdo con la reivindicación 39, en donde el anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de fijación al antígeno de este comprende una región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 9 y una región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 4.

30 41. La formulación de acuerdo con la reivindicación 39, en donde el anticuerpo anti-PD-1 comprende una secuencia de la cadena pesada de SEQ ID NO: 10 y una secuencia de la cadena ligera de SEQ ID NO: 5.

42. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 36-41 que comprende: alrededor de 10-120

mg/ml del anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de fijación al antígeno de este y alrededor de 10-120 mg/ml del anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de fijación al antígeno de este.

5 43. Una formulación que comprende: un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de fijación al antígeno de este que comprende una región variable de la cadena ligera CDRL1 de SEQ ID NO: 39, CDRL2 de SEQ ID NO: 40, CDRL3 de SEQ ID NO: 41, y una región variable de la cadena pesada que comprende CDRH1 de SEQ ID NO: 42, CDRH2 de SEQ ID NO: 59, CDRH3 de SEQ ID NO: 44, un anticuerpo anti-PD-1 o
10 fragmento de fijación al antígeno de este que comprende una región variable de la cadena ligera CDRL1 de SEQ ID NO: 1, CDRL2 de SEQ ID NO: 2, CDRL3 de SEQ ID NO: 3, y una región variable de la cadena pesada que comprende CDRH1 de SEQ ID NO: 6, CDRH2 de SEQ ID NO: 7, y CDRH3 de SEQ ID NO: 8, L-arginina o una sal de este farmacéuticamente aceptable a una concentración de 25-250 mM, y un amortiguador a pH alrededor de 5-8.

15 44. La formulación de acuerdo con la reivindicación 43, en donde el anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de fijación al antígeno comprende: una región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 37 y una secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 58 y el anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de fijación al antígeno de este que comprende una región
20 variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 9 y una región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 4.

45. La formulación de acuerdo con la reivindicación 43, en donde el anticuerpo anti-LAG3 comprende una secuencia de la cadena ligera de SEQ ID NO: 35 y una secuencia de la cadena
25 pesada de SEQ ID NO: 57, y el anticuerpo anti-PD-1 comprende una secuencia de la cadena pesada de SEQ ID NO: 10 y una secuencia de la cadena ligera de SEQ ID NO: 5.

46. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 43-45 que comprende alrededor de 10-120 mg/ml del anticuerpo anti-LAG3; alrededor de 10-120 mg/ml del anticuerpo anti-PD-1; alrededor
30 de 30-120 mg/ml de un disacárido no reductor; alrededor de 0,05-2,0 mg/ml de polisorbato 80 o 20; un amortiguador a pH alrededor de 5,0 - 6,5; y alrededor de 40-150 mM de L-arginina o una sal de esta farmacéuticamente aceptable.

47. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 43-45 que comprende alrededor de 20-30

mg/ml del anticuerpo anti-LAG3; alrededor de 20-30 mg/ml del anticuerpo anti-PD-1; alrededor de 50-90 mg/ml de sacarosa o trehalosa; alrededor de 0,05-1,0 mg/ml de polisorbato 80 o 20; alrededor de 3-30 mM de amortiguador de histidina a pH alrededor de 5,0 - 6,5; y alrededor de 40-100 mM de L-arginina o una sal de esta farmacéuticamente aceptable.

5 48. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 43-47, que además comprende alrededor de 3-100 mM de L-metionina.

 49. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 43-47, que además comprende alrededor de 10 5-15 mM de L-metionina.

 50. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 43-47, que comprende: alrededor de 25 mg/ml del anticuerpo anti-LAG3; alrededor de 25 mg/ml del anticuerpo anti-PD-1; alrededor de 50 mg/ml de sacarosa; alrededor de 0,2 mg/ml de polisorbato 80; alrededor de 10 mM de 15 amortiguador de histidina a pH alrededor de 5,8; alrededor de 70 mM de L-arginina o una sal de esta farmacéuticamente aceptable; y alrededor de 10 mM de L-metionina.

 51. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 43-50, en donde, a 5 °C, el % de monómero del anticuerpo anti-LAG3 es ≥ 95 % después de 3 meses, como se determinó 20 mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

 52. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 43-51, en donde, a 5 °C, el % de variante ácida del anticuerpo anti-LAG3 es menor de 15 % luego de 3 meses, como se determinó mediante cromatografía de intercambio iónico.

25 53. Un recipiente o dispositivo de inyección que comprende la formulación de cualquiera de las reivindicaciones 1-52.

 54. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-52 para el tratamiento del cáncer 30 o una infección.

RESUMEN

La presente invención proporciona formulaciones de anticuerpos anti-LAG3, y coformulaciones de anticuerpos anti-PD-1 y anticuerpos anti-LAG3, y su uso en el tratamiento
5 de distintos trastornos.