

## TÍTULO DE LA INVENCION

FORMULACIONES ESTABLES DE ANTICUERPOS ANTI-TIGIT SOLOS Y EN COMBINACIÓN CON ANTICUERPOS RECEPTORES DE MUERTE PROGRAMADA 1 (PD-1) Y MÉTODOS PARA SU USO

5

## CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere a formulaciones de anticuerpos terapéuticos y su uso en el tratamiento de varios trastornos. En un aspecto, la invención se refiere a formulaciones que comprenden anticuerpos o fragmentos de fijación al antígeno de este que se fijan al  
10 inmunoreceptor de linfocitos T con Ig y dominios ITIM (TIGIT). En otro aspecto, tal formulación comprende además un anticuerpo anti-receptor de muerte programada humano 1 (PD-1) o un fragmento de fijación al antígeno de éste. También se proporcionan métodos para tratar varios tipos de cáncer e infecciones crónicas con las formulaciones de la invención.

## 15 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio de U.S.S.N 62/500.278, presentada el 2 de mayo de 2017, cuyo contenido se incorpora por referencia en su totalidad.

## REFERENCIA AL LISTADO DE SECUENCIAS PRESENTADO ELECTRÓNICAMENTE

20 El listado de secuencias de la presente solicitud se presenta electrónicamente a través de EFS-Web como un listado de secuencias con formato ASCII con un nombre de archivo "24453WOPCT-SEQTXT-01MAY2018.TXT", fecha de creación del 1 de mayo de 2018 y un tamaño de 227Kb. Este listado de secuencias enviado a través de EFS-Web forma parte de la memoria descriptiva y se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

25

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los fármacos de anticuerpos para uso en humanos pueden diferir levemente en la secuencia de aminoácidos de sus dominios constantes, o en sus secuencias marco dentro de los dominios variables, pero normalmente difieren más dramáticamente en las secuencias de CDR.  
30 Incluso los anticuerpos que se fijan a la misma proteína, al mismo polipéptido o incluso potencialmente al mismo epítipo pueden comprender secuencias de CDR completamente diferentes. Los anticuerpos terapéuticos para uso en seres humanos también pueden obtenerse a partir de una secuencia de anticuerpos de línea germinal humana o de secuencias de anticuerpos de línea germinal no humana (por ejemplo, roedores), como en el caso de los anticuerpos  
35 humanizados, lo que da lugar a una mayor diversidad en las posibles secuencias de CDR. Estas diferencias de secuencia resultan en diferentes estabilidades en la solución y diferente capacidad de respuesta a los parámetros de la solución. Además, los pequeños cambios en la disposición de los aminoácidos o los cambios en uno o unos pocos residuos de aminoácidos pueden dar lugar a

una estabilidad de los anticuerpos y una susceptibilidad dramáticamente diferentes a las rutas de degradación específicas de la secuencia. Como consecuencia, no es posible en la actualidad predecir las condiciones de solución necesarias para optimizar la estabilidad de los anticuerpos. Cada anticuerpo debe ser estudiado individualmente para determinar la formulación óptima de la solución. Bhambhani *et al.* (2012) J. Pharm. Sci. 101:1120.

Los anticuerpos también son proteínas de peso molecular relativamente alto (~150.000 Da), por ejemplo, en comparación con otras proteínas terapéuticas como las hormonas y las citocinas. Como consecuencia, con frecuencia es necesario dosificar con cantidades relativamente altas de fármacos de anticuerpo para lograr las concentraciones molares deseadas del fármaco. Además, a menudo es deseable administrar fármacos de anticuerpo por vía subcutánea, ya que esto permite la autoadministración. La autoadministración evita el tiempo y los gastos asociados con las visitas a un centro médico para su administración, por ejemplo, por vía intravenosa. La administración subcutánea está limitada por el volumen de solución que puede administrarse prácticamente en un punto de inyección en una sola inyección, que generalmente es de alrededor de 1 a 1,5 ml. La autoadministración subcutánea se realiza normalmente usando una jeringa precargada o un autoinyector lleno con una formulación de solución líquida del fármaco, en lugar de una forma liofilizada, para evitar la necesidad de que el paciente vuelva a suspender el fármaco antes de la inyección. Los fármacos de anticuerpos deben ser estables durante el almacenamiento para garantizar la eficacia y una dosificación consistente, por lo que es fundamental que la fórmula que se elija mantenga las propiedades deseables, como una alta concentración, claridad y viscosidad aceptable, y que también mantenga estas propiedades y la eficacia del fármaco durante un período de conservación aceptablemente largo en condiciones típicas de almacenamiento.

TIGIT (inmunorreceptor de linfocitos T con dominios Ig e ITIM) es un receptor inmunomodulador expresado principalmente en células NK y linfocitos T activados. TIGIT se conoce también como VSIG9, VSTM3, y WUCAM. Su estructura muestra un dominio de inmunoglobulina extracelular, una región transmembrana tipo 1 y dos motivos ITIM. TIGIT forma parte de una red de coestimulación que consiste en receptores inmunomoduladores positivos (CD226) y negativos (TIGIT) en linfocitos T, y ligandos expresados en APC (CD155 y CD112).

Una característica importante en la estructura de TIGIT es la presencia de un motivo de inhibición a base de tirosina del inmunorreceptor (ITIM) en el dominio de su cola citoplasmática. Al igual que con PD-1 y TIGIT, se predice que el dominio ITIM en la región citoplasmática de TIGIT reclutará fosfatasa de tirosina, tales como SHP-1 y SHP-2, y la subsiguiente desfosforilación de residuos de tirosina con motivos de activación de la base de tirosina (ITAM) en las subunidades receptoras de linfocitos T (TCR) del inmunorreceptor. Por lo tanto, la ligadura de TIGIT por los ligandos receptores CD155 y CD112 expresados por las células tumorales o TAMS puede contribuir a la supresión de la señalización TCR y la activación de

linfocitos T, lo cual es esencial para el desarrollo de una inmunidad antitumoral eficaz. Por lo tanto, un anticuerpo antagonista específico para TIGIT podría inhibir la supresión inducida por CD155 y CD112 de las respuestas de los linfocitos T y mejorar la inmunidad antitumoral.

Existe la necesidad de formulaciones estables de anticuerpos anti-TIGIT para uso farmacéutico, por ejemplo, para el tratamiento de diversos tipos de cáncer y enfermedades infecciosas, así como de formulaciones estables de anticuerpos anti-TIGIT coformulados con anticuerpos anti-PD-1 humana. Preferentemente, tales formulaciones tendrán una larga vida útil, serán estables cuando se almacenen y transporten, y preferentemente tendrán estabilidad durante meses o años en condiciones típicas de almacenamiento de medicamentos para autoadministración, es decir, a temperatura de refrigerador en una jeringa, lo que dará como resultado una larga vida útil para el producto farmacéutico correspondiente.

## SUMARIO DE LA INVENCION

En un aspecto, la invención incluye una formulación de un anticuerpo anti-TIGIT, o un fragmento de fijación al antígeno de este, que comprende (i) un anticuerpo anti-TIGIT, o un fragmento de fijación al antígeno de este; (ii) un amortiguador, (iii) un azúcar no reductor; (iv) un tensioactivo no iónico; y (v) un antioxidante. En una forma de realización, la formulación comprende además un anticuerpo anti-PD-1, por ejemplo, pembrolizumab o nivolumab. En otra forma de realización, la formulación comprende un quelante.

En una forma de realización de la invención, la formulación comprende: i) alrededor de 10 mg/ml a alrededor de 200 mg/ml de un anticuerpo anti-TIGIT, o un fragmento de fijación al antígeno de este ii) alrededor de 5 mM a alrededor de 20 mM de amortiguador; iii) alrededor de 6 % a alrededor de 8 % en peso/volumen (p/v) de azúcar no reductor; iv) alrededor de 0,01 % a alrededor de 0,10 % (p/v) de tensioactivo no iónico; y v) alrededor de 1 mM a alrededor de 20 mM de antioxidante. En una forma de realización, la formulación comprende además un anticuerpo anti-PD-1, por ejemplo, pembrolizumab o nivolumab. En otra forma de realización, la formulación comprende además un quelante. En una forma de realización, la formulación tiene un pH entre 4,5 y 6,5. En formas de realización particulares, el pH de la formulación es entre alrededor de 5,5 a alrededor de 6,2. En una forma de realización adicional, el pH de la formulación es de alrededor de 5,6 a alrededor de 6,0. En otra forma de realización, el pH de la formulación es de alrededor de 5,7. En otra forma de realización, el pH de la formulación es de alrededor de 5,8. En otra forma de realización, el pH de la formulación es de alrededor de 5,9. En otra forma de realización, el pH de la formulación es de alrededor de 6,0. En otra forma de realización, el pH de la formulación es de alrededor de 6,1. En otra forma de realización, el pH de la formulación es de alrededor de 6,2.

En una forma de realización de la formulación, el amortiguador es un amortiguador de L-histidina o acetato de sodio, el azúcar no reductor es sacarosa, el tensioactivo no iónico es polisorbato 80 y el antioxidante es metionina, o una sal farmacéuticamente aceptable de este. En

una forma de realización, el antioxidante es L-metionina. En una forma de realización, el antioxidante es sal de L-metionina farmacéuticamente aceptable, tal como, por ejemplo, metionina HCl.

En otra forma de realización, la formulación comprende: i) alrededor de 10 mg/ml a  
 5 alrededor de 200 mg/ml de un anticuerpo anti-TIGIT, o un fragmento de fijación al antígeno de este ii) alrededor de 5 mM a alrededor de 20 mM de amortiguador de L-histidina o alrededor de 5 mM a 20 mM de un amortiguador de acetato de sodio; iii) alrededor de 6 % a alrededor de 8 % p/v de sacarosa; iv) alrededor de 0,01 % a alrededor de 0,10 % (p/v) de polisorbato 80 y v) alrededor de 1 mM a alrededor de 20 mM de L-metionina. En otra forma de realización, la  
 10 formulación comprende además un anticuerpo anti-PD-1, por ejemplo, pembrolizumab o nivolumab. En una forma de realización, la formulación comprende además un quelante. En una forma de realización, el quelante está presente en una cantidad de alrededor de 1  $\mu$ m a alrededor de 50  $\mu$ m. En una forma de realización, el quelante es DTPA. En otra forma de realización, el quelante es EDTA. En una forma de realización, el amortiguador es L-histidina. En una forma de  
 15 realización, la formulación comprende alrededor de 8 mM a alrededor de 12 mM del amortiguador de L-histidina. En otra forma de realización, la formulación comprende alrededor de 5 mM a alrededor de 10 mM de L-metionina. En una forma de realización adicional, la formulación comprende polisorbato 80 en una relación de peso de aproximadamente 0,02 % (p/v). En una forma de realización, la formulación anti-TIGIT comprende sacarosa en una  
 20 relación de peso de alrededor de 7 % (p/v). En cualquiera de estas formas de realización, la metionina es L-metionina.

En formas de realización de la formulación, la concentración del anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este es de alrededor de 10 mg/ml a alrededor de 100 mg/ml. En otra forma de realización, la concentración del anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación  
 25 al antígeno de este es alrededor de 10 mg/ml, alrededor de 12,5 mg/ml, alrededor de 15 mg/ml, alrededor de 20 mg/ml, alrededor de 25 mg/ml, alrededor de 50 mg/ml, alrededor de 75 mg/ml o alrededor de 100 mg/ml. En una forma de realización, la concentración del anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este es de alrededor de 20 mg/ml. En una forma de realización, la concentración del anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de  
 30 este es de alrededor de 25 mg/ml. En una forma de realización, la concentración del anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este es de alrededor de 50 mg/ml. En una forma de realización, la concentración del anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este es de alrededor de 75 mg/ml. En una forma de realización, la concentración del anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este es de alrededor de 100 mg/ml.

35 En un aspecto, se proporciona una formulación que comprende alrededor de 20 mg/ml de un anticuerpo anti-TIGIT o un fragmento de fijación al antígeno de este, 10 mM de amortiguador de L-histidina, alrededor de 7 % p/v de sacarosa, alrededor de 0,02 % p/v de polisorbato 80, y alrededor de 10 mM de L-metionina.

En un aspecto, se proporciona una formulación que comprende alrededor de 25 mg/ml de un anticuerpo anti-TIGIT o un fragmento de fijación al antígeno de este, 10 mM de amortiguador de L-histidina, alrededor de 7 % p/v de sacarosa, alrededor de 0,02 % p/v de polisorbato 80, y alrededor de 10 mM de L-metionina.

5 En un aspecto, se proporciona una formulación que comprende alrededor de 50 mg/ml de un anticuerpo anti-TIGIT o un fragmento de fijación al antígeno de este, 10 mM de amortiguador de L-histidina, alrededor de 7 % p/v de sacarosa, alrededor de 0,02 % p/v de polisorbato 80, y alrededor de 10 mM de L-metionina.

10 En un aspecto, se proporciona una formulación que comprende alrededor de 75 mg/ml de un anticuerpo anti-TIGIT o un fragmento de fijación al antígeno de este, 10 mM de amortiguador de L-histidina, alrededor de 7 % p/v de sacarosa, alrededor de 0,02 % p/v de polisorbato 80, y alrededor de 10 mM de L-metionina.

15 En un aspecto, se proporciona una formulación que comprende alrededor de 100 mg/ml de un anticuerpo anti-TIGIT o un fragmento de fijación al antígeno de este, 10 mM de amortiguador de L-histidina, alrededor de 7 % p/v de sacarosa, alrededor de 0,02 % p/v de polisorbato 80, y alrededor de 10 mM de L-metionina.

20 En un aspecto de cualquiera de las formulaciones anteriores, la formulación tiene un pH de alrededor de 5,4 a alrededor de 6,2. En otro aspecto, la formulación tiene un pH de alrededor de 5,5 – 6,2. En otra forma de realización, la formulación tiene un pH de alrededor de 5,8 – 6,1. En otra forma de realización, el pH de la formulación es de alrededor de 5,8. En una forma de realización, el pH es de 5,9. En una forma de realización, el pH es de 6,0. En una forma de realización adicional, el pH es de 6,1.

25 En un aspecto de cualquiera de las formulaciones anteriores, la formulación comprende un anticuerpo anti-PD1 o fragmento de fijación al antígeno de este. En una forma de realización, el anticuerpo anti-PD1 es pembrolizumab. En otro aspecto, el anticuerpo anti-PD1 es nivolumab.

30 En otro aspecto, la formulación puede comprender además un quelante. En una forma de realización, el quelante es DTPA. En una forma de realización, el quelante es EDTA. En un aspecto, el quelante está presente en una cantidad de alrededor de 1  $\mu$ m a alrededor de 50  $\mu$ m. En una forma de realización, la formulación comprende alrededor de 5  $\mu$ m del quelante. En una forma de realización, la formulación comprende alrededor de 10  $\mu$ m del quelante. En una forma de realización, la formulación comprende alrededor de 15  $\mu$ m del quelante. En una forma de realización, la formulación comprende alrededor de 20  $\mu$ m del quelante. En una forma de realización, la formulación comprende alrededor de 25  $\mu$ m del quelante. En una forma de realización, la formulación comprende alrededor de 30  $\mu$ m del quelante. En una forma de realización, la formulación comprende alrededor de 35  $\mu$ m del quelante. En una forma de realización, la formulación comprende alrededor de 40  $\mu$ m del quelante. En una forma de realización, la formulación comprende alrededor de 45  $\mu$ m del quelante. En una forma de realización, la formulación comprende alrededor de 50  $\mu$ m del quelante. En una forma de

realización, el agente quelante es DTPA que está presente en cualquiera de las cantidades mencionadas anteriormente. En otra forma de realización, el agente quelante es EDTA que está presente en cualquiera de las cantidades mencionadas anteriormente.

En una forma de realización, la formulación está contenida en un vial de vidrio. En una forma de realización, la formulación está contenida en un dispositivo de inyección. En otra forma de realización, la formulación es una formulación líquida. En un aspecto, la formulación se congela a por lo menos -70 °C. En otra forma de realización, la formulación es una solución reconstituida de una formulación liofilizada.

En ciertas formas de realización, la formulación es estable en temperatura refrigerada (2-8 °C) por al menos 3 meses, preferentemente 6 meses, y con mayor preferencia 1 año, e incluso con máxima preferencia hasta 2 años. En una forma de realización de la formulación, después de 12 meses a 5 °C el % de monómero del anticuerpo anti-TIGIT es  $\geq 90$  % según lo determinado por la cromatografía de exclusión de tamaño. En otra forma de realización de la formulación, después de 12 meses a 5 °C el % de monómero del anticuerpo anti-TIGIT es  $\geq 95$  % según lo determinado por la cromatografía de exclusión de tamaño. En otra forma de realización de la formulación, después de 12 meses a 5 °C el % de la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo anti-TIGIT es  $\geq 90$  % según lo determinado mediante CE-SDS reducido. En otra forma de realización de la formulación, después de 12 meses a 5 °C el % de la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo anti-TIGIT es  $\geq 95$  % según lo determinado mediante CE-SDS reducido. En otra forma de realización de la formulación, después de 12 meses a 5 °C el % de IgC intacto del anticuerpo anti-TIGIT es  $\geq 90$  % según lo determinado mediante CE-SDS no reducido. En otra forma de realización de la formulación, después de 12 meses a 5 °C el % de IgC intacto del anticuerpo anti-TIGIT es  $\geq 95$  % según lo determinado mediante CE-SDS no reducido.

En un aspecto de cualquiera de las formulaciones descritas anteriormente, la formulación comprende un anticuerpo anti-TIGIT o un fragmento de fijación al antígeno de este que comprende tres CDR de cadena ligera y tres CDR de cadena pesada, en donde las CDR de cadena ligera comprenden CDRL1 de SEQ ID NO: 111 o variante de esta, CDRL2 de SEQ ID NO: 112 o variante de esta, CDRL3 de SEQ ID NO: 113 o variante de esta y las CDR de cadena pesada comprenden CDRH1 de SEQ ID NO: 108 o variante de esta, CDRH2 de SEQ ID NO: 154 o variante de esta, y CDHR3 de SEQ ID NO: 110 o variante de esta. En un aspecto de cualquiera de las formulaciones descritas anteriormente, la formulación comprende un anticuerpo anti-TIGIT o un fragmento de fijación al antígeno de este que comprende tres CDR de cadena ligera y tres CDR de cadena pesada, en donde las CDR de cadena ligera comprenden CDRL1 de SEQ ID NO: 111, CDRL2 de SEQ ID NO: 112, CDRL3 de SEQ ID NO: 113 y las CDR de cadena pesada comprenden CDRH1 de SEQ ID NO: 108, CDRH2 de SEQ ID NO: 154, y CDHR3 de SEQ ID NO: 110. En otro aspecto, la formulación comprende un anticuerpo anti-TIGIT o un fragmento de fijación al antígeno de este que comprende una región variable de

cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 148 o variante de esta y una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 152 o variante de esta. En otro aspecto, la formulación comprende un anticuerpo anti-TIGIT o un fragmento de fijación al antígeno de este que comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 148 y una  
5 región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 152. En un aspecto, el anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este comprende además un dominio constante de cadena pesada humana IgG1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:291 o variante de esta y un dominio constante de cadena ligera kappa humana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:293 o variante de esta. En un aspecto, el anticuerpo anti-TIGIT o  
10 fragmento de fijación al antígeno de este comprende además un dominio constante de cadena pesada humana IgG1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:291 y un dominio constante de cadena ligera kappa humana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:293. En otro aspecto, el anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este comprende además un dominio constante de cadena pesada humana IgG4 que  
15 comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:292 y un dominio constante de cadena ligera kappa humana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:293. En otro aspecto, el anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este comprende además un dominio constante de cadena pesada humana IgG4 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:292 o variante de esta y un dominio constante de cadena ligera  
20 kappa humana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:293 o variante de esta.

En un aspecto, la invención proporciona una coformulación de un anticuerpo anti-TIGIT, o un fragmento de fijación al antígeno de este y un anticuerpo anti-PD-1 humana, o fragmento de fijación al antígeno de este, que comprende (i) un anticuerpo anti-TIGIT, o un fragmento de  
25 fijación al antígeno de este; (ii) un anticuerpo anti-PD-1 humana, o fragmento de fijación al antígeno de este, (ii) un amortiguador, (iii) un azúcar no reductor; (iv) un tensioactivo no iónico; y (v) un antioxidante. En una forma de realización, la coformulación comprende además un quelante. En una forma de realización, el quelante es EDTA. En otra forma de realización, el quelante es DTPA. En una forma de realización de la coformulación, la relación entre el  
30 anticuerpo anti-PD-1 humana y el anticuerpo anti-TIGIT es de 1:2. En una forma de realización de la coformulación, la relación entre el anticuerpo anti-PD-1 humana y el anticuerpo anti-TIGIT es de 1:1. En una forma de realización de la coformulación, la relación entre el anticuerpo anti-PD-1 humana y el anticuerpo anti-TIGIT es de 2:1.

En una forma de realización de la invención, la coformulación comprende: (i) alrededor  
35 de 1 mg/ml a alrededor de 200 mg/ml de un anticuerpo anti-TIGIT, o un fragmento de fijación al antígeno de este (ii) alrededor de 1 mg/ml a alrededor de 200 mg/ml de un anticuerpo anti-PD-1 humana (iii) alrededor de 5 mM a alrededor de 20 mM de amortiguador; iv) alrededor de 6 % a alrededor de 8 % en peso/volumen (p/v) de un azúcar no reductor; v) alrededor de 0,01 % a

alrededor de 0,10 % (P/V) de tensioactivo no iónico; y v) alrededor de 1 mM a alrededor de 20 mM de antioxidante. En una forma de realización, la coformulación comprende además un quelante. En una forma de realización, el quelante está presente en una cantidad de alrededor de 1  $\mu$ m a alrededor de 50  $\mu$ m. En una forma de realización, el quelante es DTPA. En otra forma de realización, el quelante es EDTA. En una forma de realización de la coformulación, la relación entre el anticuerpo anti-PD-1 humana y el anticuerpo anti-TIGIT es de 1:2. En una forma de realización de la coformulación, la relación entre el anticuerpo anti-PD-1 humana y el anticuerpo anti-TIGIT es de 1:1. En una forma de realización de la coformulación, la relación entre el anticuerpo anti-PD-1 humana y el anticuerpo anti-TIGIT es de 2:1. En una forma de realización, la coformulación tiene un pH entre 4,5 – 6,5. En formas de realización particulares, el pH de la formulación es entre alrededor de 5,5 a alrededor de 6,2. En una forma de realización adicional, el pH de la formulación es de alrededor de 5,8-6,0.

En una forma de realización de la coformulación, el amortiguador es un amortiguador de L-histidina o acetato de sodio, el azúcar no reductor es sacarosa, el tensioactivo no iónico es polisorbato 80 y el antioxidante es L-metionina. En otra forma de realización, la coformulación comprende (i) alrededor de 1 mg/ml a alrededor de 100 mg/ml de un anticuerpo anti-TIGIT, o fragmento de fijación al antígeno de este; (ii) alrededor de 1 mg/ml a alrededor de 100 mg/ml de un anticuerpo anti-PD-1 humana o fragmento de fijación al antígeno del este; (iii) alrededor de 5 mM a alrededor de 20 mM de L-histidina o alrededor de 5 mM a alrededor de 20 mM de amortiguador de acetato de sodio; (iv) alrededor de 6 % a alrededor de 8 % p/v de sacarosa; (v) alrededor de 0,01 % a alrededor de 0,10 % (p/v) de polisorbato 80; y (vi) de 1 mM a alrededor de 20 mM de L-metionina. En una forma de realización, la coformulación comprende opcionalmente un quelante. En una forma de realización, el quelante está presente en una cantidad de alrededor de 1  $\mu$ m a alrededor de 50  $\mu$ m. En una forma de realización, el quelante es DTPA. En otra forma de realización, el quelante es EDTA. En una forma de realización de la coformulación, el amortiguador es L-histidina. En una forma de realización, la coformulación comprende de alrededor de 8 mM a alrededor de 12 mM del amortiguador de L-histidina. En otra forma de realización, la coformulación comprende de alrededor de 5 mM a alrededor de 10 mM de L-metionina. En una forma de realización adicional, la coformulación comprende polisorbato 80 en una relación de peso de alrededor de 0,02 % (p/v). En una forma de realización, la coformulación comprende sacarosa en una proporción de peso de alrededor de 7 % (P/V).

En formas de realización de la coformulación, la concentración del anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este es de alrededor de 1 mg/ml a alrededor de 100 mg/ml. En formas de realización de la coformulación, la concentración del anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este es de alrededor de 10 mg/ml a alrededor de 100 mg/ml. En otra forma de realización, la concentración del anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este es de alrededor de 10 mg/ml. En otra forma de realización, la concentración del anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este es de alrededor de 12,5

mg/ml. En otra forma de realización, la concentración del anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este es de alrededor de 20 mg/ml. En otra forma de realización, la concentración del anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este es de alrededor de 25 mg/ml. En otra forma de realización, la concentración del anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este es de alrededor de 50 mg/ml. En otra forma de realización, la concentración del anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este es de alrededor de 75 mg/ml. En otra forma de realización, la concentración del anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este es de alrededor de 100 mg/ml.

En algunas formas de realización de la coformulación, la concentración del anticuerpo anti-PD-1 humana es de alrededor de 1 mg/ml a alrededor de 100 mg/ml. En una forma de realización de la coformulación, la concentración del anticuerpo anti-PD-1 humana es de alrededor de 10 mg/ml a alrededor de 100 mg/ml. En otra forma de realización, la concentración del anticuerpo anti-PD-1 humana es de alrededor de 20 mg/ml. En otra forma de realización, la concentración del anticuerpo anti-PD-1 humana es de alrededor de 25 mg/ml.

En una forma de realización, la coformulación comprende alrededor de 20 mg/ml de un anticuerpo anti-PD-1 humana, alrededor de 20 mg/ml del anticuerpo anti-TIGIT, 10 mM de amortiguador de L-histidina, alrededor de 7 % p/v de sacarosa, alrededor de 0,02 % p/v de polisorbato 80, y alrededor de 10 mM de L-metionina.

En una forma de realización, la coformulación comprende alrededor de 25 mg/ml de un anticuerpo anti-PD-1 humana, alrededor de 25 mg/ml del anticuerpo anti-TIGIT, 10 mM de amortiguador de L-histidina, alrededor de 7 % p/v de sacarosa, alrededor de 0,02 % p/v de polisorbato 80, y alrededor de 10 mM de L-metionina.

En una forma de realización, la coformulación comprende alrededor de 50 mg/ml de un anticuerpo anti-PD-1 humana, alrededor de 50 mg/ml del anticuerpo anti-TIGIT, 10 mM de amortiguador de L-histidina, alrededor de 7 % p/v de sacarosa, alrededor de 0,02 % p/v de polisorbato 80, y alrededor de 10 mM de L-metionina.

En un aspecto de cualquiera de las formulaciones descritas anteriormente, la formulación comprende un anticuerpo anti-TIGIT o un fragmento de fijación al antígeno de este que comprende tres CDR de cadena ligera y tres CDR de cadena pesada, en donde las CDR de cadena ligera comprenden CDRL1 de SEQ ID NO: 111 o variante de esta, CDRL2 de SEQ ID NO: 112 o variante de esta, CDRL3 de SEQ ID NO: 113 o variante de esta y las CDR de cadena pesada comprenden CDRH1 de SEQ ID NO: 108 o variante de esta, CDRH2 de SEQ ID NO: 154 o variante de esta, y CDHR3 de SEQ ID NO: 110 o variante de esta. En un aspecto de cualquiera de las formulaciones descritas anteriormente, la formulación comprende un anticuerpo anti-TIGIT o un fragmento de fijación al antígeno de este que comprende tres CDR de cadena ligera y tres CDR de cadena pesada, en donde las CDR de cadena ligera comprenden CDRL1 de SEQ ID NO: 111, CDRL2 de SEQ ID NO. 112, CDRL3 de SEQ ID NO. 113 y las CDR de cadena pesada comprenden CDRH1 de SEQ ID NO: 108, CDRH2 de SEQ ID NO. 154,

y CDHR3 de SEQ ID NO: 110. En otro aspecto, la formulación comprende un anticuerpo anti-TIGIT o un fragmento de fijación al antígeno de este que comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 148 o variante de esta y una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 152 o variante de esta. En otro aspecto, la

5 formulación comprende un anticuerpo anti-TIGIT o un fragmento de fijación al antígeno de este que comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 148 y una región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 152. En un aspecto, el anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este comprende además un dominio constante de cadena pesada humana IgG1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:291 o variante de esta y un dominio constante de cadena ligera kappa humana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:293 o variante de esta. En un aspecto, el anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este comprende además un dominio constante de cadena pesada humana IgG1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:291 y un dominio constante de cadena ligera kappa humana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:293. En otro aspecto, el anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este comprende además un dominio constante de cadena pesada humana IgG4 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:292 o variante de esta y un dominio constante de cadena ligera kappa humana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:293 o variante de esta. En otro aspecto, el anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este comprende además un dominio constante de cadena pesada humana IgG4 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:292 y un dominio constante de cadena ligera kappa humana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:293.

En un aspecto de cualquiera de las formulaciones descritas anteriormente, el anticuerpo anti-PD-1 humana o fragmento de fijación al antígeno de este comprende tres CDR de cadena ligera y tres CDR de cadena pesada, en donde las CDR de cadena ligera comprenden CDRL1 de SEQ ID NO: 1 o variante de esta, CDRL2 de SEQ ID NO: 2 o variante de esta, CDRL3 de SEQ ID NO: 3 o variante de esta y las CDR de cadena pesada comprenden CDRH1 de SEQ ID NO: 6 o variante de esta, CDRH2 de SEQ ID NO: 7 o variante de esta, y CDHR3 de SEQ ID NO: 8 o variante de esta. En un aspecto de cualquiera de las formulaciones descritas anteriormente, el anticuerpo anti-PD-1 humana o fragmento de fijación al antígeno de este comprende tres CDR de cadena ligera y tres CDR de cadena pesada, en donde las CDR de cadena ligera comprenden CDRL1 de SEQ ID NO: 1, CDRL2 de SEQ ID NO: 2, CDRL3 de SEQ ID NO: 3 y las CDR de cadena pesada comprenden CDRH1 de SEQ ID NO: 6, CDRH2 de la SEQ ID NO. 7, y CDHR3 de la SEQ ID NO: 8. En otro aspecto, las formulaciones comprenden un anticuerpo anti-PD-1 humana o fragmento de fijación al antígeno de este que comprende una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 4 o variante de esta y una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 9 o variante de esta. En otro aspecto, las formulaciones comprenden un anticuerpo anti-PD-1 humana o fragmento de fijación al antígeno de este que

comprende una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 4 y una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 9. En otro aspecto, las formulaciones comprenden un anticuerpo anti-PD-1 humana o fragmento de fijación al antígeno de este que comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 5 y una cadena pesada que

- 5 comprende SEQ ID NO: 10. En otro aspecto, las formulaciones comprenden un anticuerpo anti-PD-1 humana o fragmento de fijación al antígeno de este que comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 5 o variante de esta y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 10 o variante de esta. En un aspecto de cualquiera de las formulaciones descritas anteriormente, el anticuerpo anti-PD-1 humana o fragmento de fijación al antígeno de este es pembrolizumab.
- 10 En otro aspecto, el anticuerpo anti-PD-1 humana o fragmento de fijación al antígeno de este es nivolumab.

- En un aspecto de cualquiera de las coformulaciones descritas anteriormente, la formulación comprende (i) un anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este que comprende tres CDR de cadena ligera y tres CDR de cadena pesada, en donde las CDR de
- 15 cadena ligera comprenden CDRL1 de SEQ ID NO:111, CDRL2 de SEQ ID NO:112, CDRL3 de SEQ ID NO:113 y las CDR de cadena pesada comprenden CDRH1 de SEQ ID NO:108, CDRH2 de SEQ ID NO:154 y CDHR3 de SEQ ID NO:110 y (ii) un anticuerpo anti-PD-1 humana o fragmento de fijación al antígeno de este que comprende tres CDR de cadena ligera y tres CDR de cadena pesada, en donde las CDR de cadena ligera comprenden CDRL1 de SEQ ID NO: 1,
- 20 CDRL2 de SEQ ID NO: 2, CDRL3 de SEQ ID NO: 3 y las CDR de cadena pesada comprenden CDRH1 de SEQ ID NO: 6, CDRH2 de la SEQ ID NO. 7, y CDHR3 de la SEQ ID NO: 8.

- En un aspecto de cualquiera de las coformulaciones anteriores, la formulación comprende (i) un anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este que comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:148 y una región variable de
- 25 cadena ligera que comprende SEQ ID NO:152 y (ii) un anticuerpo anti-PD-1 humana o fragmento de fijación al antígeno de este que comprende una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 4 y una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 9.

- En otro aspecto de cualquiera de las coformulaciones anteriores, la formulación
- 30 comprende (i) un anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este que comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:148 y que además comprende un dominio constante de IgG1 de cadena pesada humana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:291 y una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:152 y que además comprende un dominio constante de kappa de cadena ligera humana
- 35 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:293 y (ii) un anticuerpo anti-PD-1 humana o fragmento de fijación al antígeno de este que comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 5 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 10.

En otro aspecto de cualquiera de las coformulaciones anteriores, la formulación comprende (i) un anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este que comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:148 y que además comprende un dominio constante de IgG1 de cadena pesada humana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:292 y una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:152 y que además comprende un dominio constante de kappa de cadena ligera humana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:293 y (ii) un anticuerpo anti-PD-1 humana o fragmento de fijación al antígeno de este que comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 5 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 10.

En una forma de realización de cualquiera de las formulaciones descritas anteriormente, la formulación está contenida en un vial de vidrio. En una forma de realización, la formulación está contenida en un dispositivo de inyección. En otra forma de realización, la formulación es una formulación líquida. En un aspecto, la formulación está congelada a por lo menos -70 °C. En otra forma de realización, la formulación es una solución reconstituida de una formulación liofilizada.

La presente invención proporciona un método de tratar infección crónica o cáncer en un sujeto mamífero (por ejemplo, un ser humano) que lo necesita que comprende: administrar una cantidad eficaz de la formulación anti-TIGIT o la co-formulación establecida en la presente.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra la estabilidad del pH de las formulaciones durante 9 meses en diversas condiciones de almacenamiento.

La Figura 2 muestra la estabilidad de la concentración de polisorbato 80 de las formulaciones durante 9 meses en diversas condiciones de almacenamiento.

La Figura 3 muestra la potencia según los datos de estabilidad de ELISA para las formulaciones durante 9 meses en diversas condiciones de almacenamiento.

La Figura 4 muestra el monómero (%) por datos de estabilidad UP-SEC para las formulaciones durante 9 meses en diversas condiciones de almacenamiento.

La Figura 5 muestra las especies de alto peso molecular (HMW) (%) por datos de estabilidad UP-SEC para las formulaciones durante 9 meses en diversas condiciones de almacenamiento.

La Figura 6 muestra las especies de bajo peso molecular (LMW) (%) por datos de estabilidad UP-SEC para las formulaciones durante 9 meses en diversas condiciones de almacenamiento.

La Figura 7 muestra la pureza de la cadena pesada + cadena ligera (%) por datos de estabilidad de CE-SDS reducido para las formulaciones durante 9 meses en diversas condiciones de almacenamiento.

La Figura 8 muestra la pureza intacta de IgG (%) por datos de estabilidad de CE-SDS no

reducido para las formulaciones de más de 9 meses en diversas condiciones de almacenamiento.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En un aspecto, la invención proporciona formulaciones que comprenden anticuerpos anti-TIGIT y fragmentos de fijación al antígeno de estos que comprende metionina. También se proporcionan coformulaciones de un anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno y un anticuerpo anti-PD-1 humana o fragmento de fijación al antígeno de este que comprende metionina. En cada caso, la formulación y la coformulación comprenden opcionalmente un agente quelante.

### I. Definiciones y abreviaturas

Las siguientes abreviaturas se aplican a lo largo de la memoria descriptiva y de las reivindicaciones anexas:

|                                                            |                                                             |
|------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| API                                                        | ingrediente farmacéutico activo                             |
| CDR                                                        | región determinante de complementariedad en las regiones de |
| inmunoglobulina variable, definidas mediante el sistema de |                                                             |
| numeración de Kabat a menos que se indique lo contrario.   |                                                             |
| CHO                                                        | ovario de hámster chino                                     |
| CI                                                         | intervalo de confianza                                      |
| DTPA                                                       | ácido dietilentriaminopentaacético                          |
| EC50                                                       | concentración que resulta en 50 % de eficacia o fijación    |
| ELISA                                                      | ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas                    |
| FFPE                                                       | fijada con formalina, incrustada con parafina               |
| FR                                                         | región marco                                                |
| HRP                                                        | peróxido de rábano picante                                  |
| HNSCC                                                      | carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello           |
| IC50                                                       | concentración que resulta en 50 % de inhibición             |
| IgG                                                        | inmunoglobulina G                                           |
| IHC                                                        | inmunohistoquímica o inmunohistoquímico                     |
| mAb                                                        | anticuerpo monoclonal                                       |
| MES                                                        | ácido 2-(N-morfolin)etanosulfónico                          |
| NCBI                                                       | Centro Nacional de Información Biotecnológica               |
| NSCLC                                                      | cáncer de pulmón de células no pequeñas                     |
| PCR                                                        | reacción en cadena de la polimerasa                         |
| PD-1                                                       | muerte programada 1 (también denominada muerte celular      |
| programada-1 y receptor de muerte programada 1)            |                                                             |
| PD-L1                                                      | ligando 1 de muerte celular programada 1                    |
| PD-L2                                                      | ligando 2 de muerte celular programada 1                    |
| PS80                                                       | polisorbato 80                                              |

|   |                |                                                              |
|---|----------------|--------------------------------------------------------------|
|   | TNBC           | cáncer de mama triple negativo                               |
|   | V <sub>H</sub> | región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina       |
|   | VK             | región variable de la cadena ligera kappa de inmunoglobulina |
|   | V <sub>L</sub> | región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina       |
| 5 | v/v            | volumen por volumen                                          |
|   | WFI            | agua para inyección                                          |
|   | p/v            | peso por volumen                                             |

10 A fin de que la invención pueda entenderse más fácilmente, ciertos términos técnicos y científicos se definen específicamente a continuación. A menos que se defina lo contrario en alguna parte de la presente, todos los términos técnicos y científicos que se usan en la presente tienen el mismo significado que entiende comúnmente una persona experta en la materia a la que pertenece esta invención.

15 Tal como se utiliza a lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, la forma singular "un"/"una", y "el"/"la" incluye referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

La referencia a "o" indica una o ambas posibilidades a menos que el contexto dicte claramente una de las posibilidades indicadas. En algunos casos, "y/o" se empleó para resaltar una o ambas posibilidades.

20 "Tratar" o "tratamiento de" un cáncer como se usa en la presente significa administrar una formulación de la invención a un sujeto que tiene una afección inmunitaria o cancerosa, o que ha sido diagnosticado con un cáncer o una infección patógena (por ejemplo, viral, bacteriana, micótica), para lograr al menos un efecto terapéutico positivo, como por ejemplo, un número reducido de células cancerosas, un tamaño reducido del tumor, una tasa reducida de  
25 infiltración de células cancerosas en los órganos periféricos, o una tasa reducida de metástasis tumoral o de crecimiento tumoral. El "tratamiento" puede incluir uno o más de los siguientes aspectos: inducir/incrementar la respuesta inmunitaria antitumoral, estimular una respuesta inmunitaria a un patógeno, toxina y/o autoantígeno, estimular una respuesta inmunitaria a una infección viral, disminuir el número de uno o más marcadores tumorales, inhibir el crecimiento o  
30 la supervivencia de las células tumorales, eliminar o reducir el tamaño de una o más lesiones o tumores cancerosos, disminuir el nivel de uno o más marcadores tumorales, mejorar, reducir la gravedad o duración del cáncer, prolongar la supervivencia de un paciente en relación con la supervivencia esperada en un paciente similar no tratado.

35 "Afección inmunitaria" o "trastorno inmunitario" abarca, por ejemplo, inflamación patológica, un trastorno inflamatorio y un trastorno o enfermedad autoinmunitaria. La "afección inmunitaria" también se refiere a infecciones, infecciones persistentes y afecciones proliferativas, como cáncer, tumores y angiogénesis, incluidas infecciones, tumores y tipos de cáncer que resisten la erradicación del sistema inmunitario. "Afección cancerosa" incluye, por ejemplo,

cáncer, células cancerosas, tumores, angiogénesis y afecciones precancerosas tales como displasia.

Los efectos terapéuticos positivos en el cáncer se pueden medir de varias maneras. (véase, W. A. Weber, *J. Nucl. Med.* 50:1S-10S (2009)). Por ejemplo, con respecto a la inhibición del crecimiento tumoral, de acuerdo con los estándares del NCI, un T/C  $\leq 42$  % es el nivel mínimo de actividad antitumoral. Un T/C  $< 10$  % se considera un alto nivel de actividad antitumoral, con  $T/C (\%) = \text{Mediana del volumen tumoral de los casos tratados} / \text{Mediana del volumen tumoral de los casos de control} \times 100$ . En algunas formas de realización, el tratamiento logrado mediante la administración de una formulación de la invención es cualquiera de supervivencia libre de progresión (PFS), supervivencia libre de enfermedad (DFS) o supervivencia general (OS). PFS, también conocido como "Tiempo hasta la progresión del tumor" indica la cantidad de tiempo durante y después del tratamiento en el que el cáncer no crece, e incluye la cantidad de tiempo que los pacientes han experimentado una respuesta completa o parcial, así como la cantidad de tiempo que los pacientes han experimentado una enfermedad estable. DFS se refiere al tiempo que el paciente permanece libre de la enfermedad durante y después del tratamiento. OS se refiere a una prolongación de la esperanza de vida en comparación con los individuos o pacientes no tratados o sin tratamiento previo. Si bien una forma de realización de las formulaciones, los métodos de tratamiento y los usos de la presente invención pueden no ser eficaces para lograr un efecto terapéutico positivo en cada paciente, debería hacerlo en un número estadísticamente significativo de sujetos según lo determinado por cualquier prueba estadística conocida en la técnica como la prueba t de Student, la prueba  $\chi^2$ , la prueba U según Mann y Whitney, la prueba Kruskal-Wallis (prueba H), la prueba Jonckheere-Terpstra y la prueba Wilcoxon.

El término "paciente" (alternativamente denominado "sujeto" o "individuo" en la presente) se refiere a un mamífero (por ejemplo, rata, ratón, perro, gato, conejo) capaz de ser tratado con las formulaciones de la invención, con máxima preferencia un ser humano. En algunas formas de realización, el paciente es un paciente adulto. En otras formas de realización, el paciente es un paciente pediátrico.

El término "anticuerpo" se refiere a cualquier forma de anticuerpo que exhibe la actividad biológica deseada. Por lo tanto, se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente, entre otros, a anticuerpos monoclonales (incluidos los anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos humanizados, anticuerpos completamente humanos y anticuerpos quiméricos. Los "anticuerpos parentales" son anticuerpos obtenidos por exposición de un sistema inmune a un antígeno antes de la modificación de los anticuerpos para un uso previsto, tal como la humanización de un anticuerpo para su uso como anticuerpo terapéutico humano.

En general, la unidad estructural básica del anticuerpo comprende un tetrámero. Cada tetrámero incluye dos pares idénticos de cadenas de polipéptidos, en donde cada par tiene una

cadena "ligera" (alrededor de 25 kDa) y una "pesada" (alrededor de 50-70 kDa). La porción terminal amino de cada cadena incluye una región variable de alrededor de 100 a 110 o más aminoácidos responsables principalmente del reconocimiento de antígenos. Las regiones variables de cada par de cadenas ligera/pesada forman el sitio de fijación del anticuerpo. Por ende, un anticuerpo intacto tiene, en general, dos sitios de fijación. La porción del terminal carboxi de la cadena pesada puede definir una región constante responsable principalmente de la función efectora. Normalmente, las cadenas ligeras humanas se clasifican como cadenas ligeras kappa y lambda. Además, las cadenas pesadas humanas se clasifican típicamente como mu, delta, gamma, alfa o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. Dentro de las cadenas ligeras y pesadas, las regiones variables y constantes están unidas por una región "J" de alrededor de 12 aminoácidos o más, y la cadena pesada también incluye una región "D" de alrededor de 10 aminoácidos más. Véase, en general, Fundamental Immunology, capítulo 7 (Paul, W., ed., 2<sup>da</sup> ed. Raven Press, N.Y. (1989).

Normalmente, los dominios variables de las cadenas pesada y ligera comprenden tres regiones hipervariables, también llamadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), que se encuentran dentro de regiones marco relativamente conservadas (FR). Las CDR se alinean generalmente mediante regiones marco, lo que permite la fijación a un epítipo específico. En general, del terminal N al terminal C, los dominios variables de las cadenas ligera y pesada comprenden FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio se produce, por lo general, de acuerdo con las definiciones de Sequences of Proteins of Immunological Interest, Kabat, *et al.* (National Institutes of Health, Bethesda, Md.; 5<sup>ta</sup> ed.; NIH Publi. No. 91-3242 (1991); Kabat (1978) *Adv. Prot. Chem.* 32:1-75; Kabat, *et al.*, (1977) *J. Biol. Chem.* 252:6609-6616; Chothia, *et al.*, (1987) *J Mol. Biol.* 196:901-917 o Chothia, *et al.*, (1989) *Nature* 342:878-883.

Un anticuerpo que "se fija específicamente a" una proteína diana especificada es un anticuerpo que exhibe una fijación preferencial a esa diana en comparación con otras proteínas, pero esta especificidad no requiere una especificidad de fijación absoluta. Un anticuerpo se considera "específico" para su objetivo diana previsto si su fijación es determinante de la presencia de la proteína diana en una muestra, por ejemplo, sin producir resultados no deseados como falsos positivos. Los anticuerpos, o fragmentos de fijación de estos, útiles en la presente invención se fijarán a la proteína diana con una afinidad que es al menos dos veces mayor, preferentemente al menos diez veces mayor, con mayor preferencia al menos 20 veces mayor, y con máxima preferencia al menos 100 veces mayor que la afinidad con las proteínas no diana. Como se usa en la presente, se dice que un anticuerpo se fija específicamente a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos dada, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de un TIGIT humano maduro o PD-1 humana, si se fija a polipéptidos que comprenden esa secuencia pero no se fijan a proteínas que carecen de esa secuencia.

"Anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo en donde una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en un anticuerpo derivado de una especie particular (por ejemplo, ser humano) o que pertenece a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de las cadenas son idénticas u homólogas a las secuencias correspondientes en un anticuerpo derivado de otra especie (por ejemplo, ratón) o que pertenece a otra clase o subclase de anticuerpos, así como a fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que exhiben la actividad biológica deseada.

"Coformulado" o "coformulación" como se usa en la presente se refiere al menos a dos anticuerpos diferentes o fragmentos de fijación al antígeno de estos que se formulan juntos y se almacenan como un producto combinado en un solo vial o recipiente (por ejemplo, un dispositivo de inyección) en lugar de formularse y almacenarse individualmente 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 "cantidad farmacéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" significa una cantidad mediante la cual se introduce suficiente composición terapéutica o formulación a un paciente para tratar una enfermedad o afección. Un experto en la materia reconoce que este nivel puede variar de acuerdo a las características del paciente como la edad, el peso, etc.

El término "alrededor de", cuando se modifica la cantidad (por ejemplo, mM o M) de una sustancia o composición, el porcentaje (v/v o p/v) de un componente de formulación, el pH de una solución/formulación o el valor de un parámetro que caracteriza una etapa en un método, o similar, se refiere a la variación en la cantidad numérica que puede ocurrir, por ejemplo, a través de procedimientos típicos de medición, manipulación y muestreo involucrados en la preparación, caracterización y/o uso de la sustancia o composición; por error instrumental en estos procedimientos; a través de diferencias en la fabricación, fuente o pureza de los ingredientes empleados para hacer o usar las composiciones o llevar a cabo los procedimientos; y similares. En ciertas formas de realización, "alrededor de" puede significar una variación de  $\pm 0,1\%$ ,  $0,5\%$ ,  $1\%$ ,  $2\%$ ,  $3\%$ ,  $4\%$ ,  $5\%$  o  $10\%$ .

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).

Las formulaciones de la presente invención incluyen anticuerpos y fragmentos de estos que son biológicamente activos en forma líquida o cuando se reconstituyen.

Los términos "cáncer", "canceroso" o "maligno" se refieren o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza en general por el crecimiento celular no regulado.

Los ejemplos de "cáncer" incluye, entre otros, carcinoma, linfoma, leucemia, blastoma y sarcoma. Los ejemplos más particulares de tales tipos de cáncer incluyen carcinoma de células escamosas, mieloma, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no

pequeñas, glioma, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer (del tracto) gastrointestinal, cáncer renal, cáncer de ovarios, cáncer de hígado, leucemia linfoblástica, leucemia linfocítica, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, melanoma, condrosarcoma, neuroblastoma, cáncer de páncreas, glioblastoma multiforme, cáncer de cuello uterino, cáncer de cerebro, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, carcinoma de colon y cáncer de cabeza y cuello.

"Chothia" significa un sistema de numeración de anticuerpos descrito en Al-Lazikani *et al.*, *JMB* 273:927-948 (1997).

"Kabat", como se usa en la presente, significa un sistema de alineación y numeración de inmunoglobulinas promovido por Elvin A. Kabat ((1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5<sup>ta</sup> Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.).

Un "agente inhibidor del crecimiento" cuando se usa en la presente se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente la célula cancerosa que sobreexpresa cualquiera de los genes identificados en la presente, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Por lo tanto, el agente inhibidor del crecimiento es uno que reduce significativamente el porcentaje de células que sobreexpresan dichos genes en la fase S. Los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un lugar que no sea la fase S), tales como agentes que inducen la detención de G1 y la detención de la fase M. Los bloqueadores clásicos de la fase M incluyen los taxanos de vincas (vincristina y vinblastina) e inhibidores de topo II como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina y etopósido. Aquellos agentes que detienen a G1 también se extienden a la detención de la fase S de, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN como la dacarbazina, la mecloretamina y el cisplatino. Se puede encontrar más información en *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn e Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs" por Murakami *et al.* (WB Saunders: Philadelphia, 1995).

Los términos "fragmento de fijación al TIGIT", "fragmento de fijación al antígeno de este", "fragmento de fijación de este" o "fragmento de este" abarcan un fragmento o un derivado de un anticuerpo que aún retiene sustancialmente su actividad biológica de fijación al antígeno (TIGIT humano) e inhibe su actividad (por ejemplo, bloquear la fijación de TIGIT humano a sus ligandos nativos). Por lo tanto, el término "fragmento de anticuerpo" o fragmento de fijación a TIGIT se refiere a una porción de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la fijación al antígeno o región variable de este. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos TIGIT incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, y Fv. Normalmente, un fragmento de fijación o derivado retiene al menos el 10 % de su actividad inhibidora de TIGIT. En algunas formas de realización, un fragmento de fijación o derivado retiene al menos 25 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o 100 % (o más) de su actividad inhibidora de TIGIT, aunque será útil cualquier fragmento de fijación con suficiente afinidad para ejercer el efecto biológico deseado. En algunas formas de

realización, un fragmento de fijación al antígeno se fija a su antígeno con una afinidad que es al menos dos veces mayor, preferentemente al menos diez veces mayor, con mayor preferencia al menos 20 veces mayor, y con máxima preferencia al menos 100 veces mayor que la afinidad con antígenos no relacionados. En una forma de realización, el anticuerpo tiene una afinidad que es mayor de alrededor de 10<sup>9</sup> litros/mol, según se determina, por ejemplo, mediante análisis de Scatchard. Munsen *et al.* (1980) *Analyt. Biochem.* 107:220-239. También se pretende que un fragmento de fijación a TIGIT pueda incluir variantes que tengan sustituciones conservadoras de aminoácidos que no alteren sustancialmente su actividad biológica.

Los términos "fragmento de fijación a PD-1", "fragmento de fijación al antígeno de este", "fragmento de fijación a este" o "fragmento de este" abarcan un fragmento o un derivado de un anticuerpo que aún retiene sustancialmente su actividad biológica de fijación al antígeno (PD-1 humana) e inhibe su actividad (por ejemplo, bloquea la fijación de PD-1 a PDL1 y PDL2). Por lo tanto, el término "fragmento de anticuerpo" o fragmento de fijación a PD-1 se refiere a una porción de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la fijación al antígeno o región variable de este. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, y Fv. Normalmente, un fragmento de fijación o derivado retiene al menos el 10 % de su actividad inhibidora de PD-1. En algunas formas de realización, un fragmento de fijación o derivado retiene al menos 25 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o 100 % (o más) de su actividad inhibidora de PD-1, aunque será útil cualquier fragmento de fijación con suficiente afinidad para ejercer el efecto biológico deseado. En algunas formas de realización, un fragmento de fijación al antígeno se fija a su antígeno con una afinidad que es al menos dos veces mayor, preferentemente al menos diez veces mayor, con mayor preferencia al menos 20 veces mayor, y con máxima preferencia al menos 100 veces mayor que la afinidad con antígenos no relacionados. En una forma de realización, el anticuerpo tiene una afinidad que es mayor de alrededor de 10<sup>9</sup> litros/mol, según se determina, por ejemplo, mediante análisis de Scatchard. Munsen *et al.* (1980) *Analyt. Biochem.* 107:220-239. También se pretende que un fragmento de fijación a PD-1 pueda incluir variantes que tengan sustituciones conservadoras de aminoácidos que no alteren sustancialmente su actividad biológica.

"Anticuerpo humano" se refiere a un anticuerpo que comprende secuencias de proteína de inmunoglobulina humana solamente. Un anticuerpo humano puede contener cadenas de carbohidratos murinos si se produce en un ratón, en una célula de ratón o en un hibridoma derivado de una célula de ratón. De manera similar, "anticuerpo de ratón" o "anticuerpo de rata" se refieren a un anticuerpo que comprende solo secuencias de inmunoglobulina de ratón o rata, respectivamente.

"Anticuerpo humanizado" se refiere a formas de anticuerpos que contienen secuencias de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) así como también anticuerpos humanos. Dichos anticuerpos contienen una secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina no humana. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y

normalmente dos dominios variables, en el que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son los de una secuencia de inmunoglobulina humana. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado también comprenderá al menos una porción de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, por lo general aquella de una inmunoglobulina humana. Las formas humanizadas de anticuerpos contra roedores generalmente comprenderán las mismas secuencias de CDR de los anticuerpos contra roedores parentales, aunque se pueden incluir ciertas sustituciones de aminoácidos para aumentar la afinidad, aumentar la estabilidad del anticuerpo humanizado o por otras razones.

Los anticuerpos de la presente invención también incluyen anticuerpos con regiones Fc modificadas (o bloqueadas) para proporcionar funciones de efector alteradas. (Véase, por ejemplo, la patente estadounidense No. 5.624.821; WO2003/086310; WO2005/120571; WO2006/0057702; Presta (2006) *Adv. Drug Delivery Rev.* 58:640-656. Dicha modificación puede utilizarse para mejorar o suprimir diversas reacciones del sistema inmunológico, con posibles efectos beneficiosos en el diagnóstico y el tratamiento. Las alteraciones de la región Fc incluyen cambios de aminoácidos (sustituciones, eliminaciones e inserciones), glicosilación o deglicosilación, y la adición de múltiples Fc. Los cambios en el Fc también pueden alterar la semivida de los anticuerpos en los anticuerpos terapéuticos, y una semivida más larga resultaría en una dosificación menos frecuente, con el consiguiente aumento de la conveniencia y disminución del uso de material. Véase Presta (2005) *J. Allergy Clin. Immunol.* 116:731 at 734-35.

"Anticuerpo completamente humano" se refiere a un anticuerpo que comprende secuencias de proteína de inmunoglobulina humana solamente. Un anticuerpo completamente humano puede contener cadenas de carbohidratos murinos si se produce en un ratón, en una célula de ratón o en un hibridoma derivado de una célula de ratón. De manera similar, "anticuerpo de ratón" se refiere a un anticuerpo que comprende únicamente secuencias de inmunoglobulina de ratón. Se puede generar un anticuerpo completamente humano en un ser humano, en un animal transgénico que tiene secuencias de la línea germinal de inmunoglobulina humana, mediante expresión de fagos u otros métodos biológicos moleculares.

"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 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 los residuos 31 -35 (CDRH1), 50-65 (CDRH2) y 95-102 (CDRH3) en el dominio variable de la cadena pesada medido por el sistema de numeración de Kabat (Kabat *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ta Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.) y/o aquellos residuos de un "bucle hipervariable" (es decir, los 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). Tal como se usa en la presente, el término residuos "marco" o "FR" se refiere a aquellos residuos de dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable definidos en la presente como residuos CDR. Los residuos CDR y FR se determinan de acuerdo con la definición de secuencia estándar de Kabat. Kabat *et al.* (1987) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, National Institutes of Health, Bethesda, MD.

"Variantes modificadas de manera conservadora" o "sustitución conservadora" se refieren a sustituciones de aminoácidos que son conocidas por los expertos en la materia y que pueden realizarse generalmente sin alterar la actividad biológica de la molécula resultante, incluso en regiones esenciales del polipéptido. Dichas sustituciones de ejemplo se realizan preferentemente de acuerdo con las establecidas en la Tabla 1 a continuación:

Tabla 1. Sustituciones de aminoácidos conservadoras de ejemplo

| Residuo original | Sustitución conservadora |
|------------------|--------------------------|
| Ala (A)          | Gly; Ser                 |
| Arg (R)          | Lys, His                 |
| Asn (N)          | Gln; His                 |
| Asp (D)          | Glu; Asn                 |
| Cys (C)          | Ser; Ala                 |
| Gln (Q)          | Asn                      |
| Glu (E)          | Asp; Gln                 |
| Gly (G)          | Ala                      |
| His (H)          | Asn; Gln                 |
| Ile (I)          | Leu; Val                 |
| Leu (L)          | Ile; Val                 |
| Lys (K)          | Arg; His                 |
| Met (M)          | Leu; Ile; Tyr            |
| Phe (F)          | Tyr; Met; Leu            |
| Pro (P)          | Ala                      |
| Ser (S)          | Thr                      |
| Thr (T)          | Ser                      |
| Trp (W)          | Tyr; Phe                 |
| Tyr (Y)          | Trp; Phe                 |
| Val (V)          | Ile; Leu                 |

Además, los expertos en la materia reconocen que, en general, las sustituciones de aminoácidos individuales en regiones no esenciales de un polipéptido no alteran sustancialmente la actividad biológica. Véase, por ejemplo, Watson *et al.* (1987) *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4<sup>ta</sup> edición).

La frase "consiste esencialmente en" o variaciones tales como "consisten esencialmente en" o "que consiste esencialmente en", tal como se utilizan en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, indican la inclusión de cualquier elemento o grupo de elementos recitados, y la

inclusión opcional de otros elementos, de naturaleza similar o diferente a los elementos enumerados, que no cambian materialmente las propiedades básicas o novedosas del régimen, método o composición de dosificación especificada. Como ejemplo no limitativo, un compuesto de fijación que consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos recitada también puede

5 incluir uno o más aminoácidos, incluidas las sustituciones de uno o más residuos de aminoácidos, que no afectan materialmente las propiedades del compuesto de fijación.

"Comprender" o variaciones tales como "comprende" o "comprendido" se utilizan a lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones en un sentido inclusivo, es decir, para especificar la presencia de las características enunciadas, pero no para excluir la presencia o

10 adición de otras características que puedan mejorar materialmente el funcionamiento o la utilidad de cualquiera de las formas de realización de la invención, a menos que el contexto exija lo contrario debido a un lenguaje expreso o a una implicación necesaria.

"Anticuerpo aislado" y "fragmento de anticuerpo aislado" se refiere al estado de purificación y en tal contexto significa que la molécula nombrada está sustancialmente libre de

15 otras moléculas biológicas tales como ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, carbohidratos u otros materiales tales como desechos celulares y medios de crecimiento. Generalmente, el término "aislado" no se refiere a la ausencia total de dicho material o a la ausencia de agua, amortiguadores o sales, a menos que estén presentes en cantidades que interfieran sustancialmente con el uso experimental o terapéutico del compuesto de fijación tal como se

20 describe en la presente.

El término "anticuerpo monoclonal" o "mAb" o "Mab", tal como se utiliza en la presente, se refiere a una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, las moléculas de anticuerpos que comprenden la población son idénticas en la secuencia de aminoácidos, excepto en el caso de posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores.

25 En contraste, las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) típicamente incluyen una multitud de anticuerpos diferentes que tienen diferentes secuencias de aminoácidos en sus dominios variables, particularmente sus CDR, que a menudo son específicos para diferentes epítomos. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe interpretarse que requiere

30 la producción del anticuerpo mediante ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se deben usar de acuerdo con la presente invención se pueden fabricar mediante el método de hibridoma descrito, en primer lugar, en Kohler *et al.* (1975) *Nature* 256: 495, o se pueden fabricar mediante métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente estadounidense N.º 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también se pueden

35 aislar de colecciones de anticuerpos en fagos mediante técnicas descritas en Clackson *et al.* (1991) *Nature* 352: 624-628, y Marks *et al.*, (1991) *J. Mol. Biol.* 222: 581-597, por ejemplo. Véase también Presta (2005) *J. Allergy Clin. Immunol.* 116:731.

"Tumor" como se aplica a un sujeto diagnosticado con, o que se sospecha que tiene, un cáncer se refiere a una neoplasia maligna o potencialmente maligna o masa de tejido de cualquier tamaño, e incluye tumores primarios y neoplasias secundarias. Un tumor sólido es una masa anormal de tejido que generalmente no contiene quistes o áreas líquidas. Los diferentes tipos de tumores sólidos se nombran según el tipo de células que los forman. Ejemplos de tumores sólidos son los sarcomas, carcinomas y linfomas. Las leucemias (tipos de cáncer de la sangre) generalmente no forman tumores sólidos (National Cancer Institute, Dictionary of Cancer Terms).

El término "tamaño del tumor" se refiere al tamaño total del tumor que puede medirse como la longitud y la anchura de un tumor. El tamaño del tumor puede determinarse mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica, como por ejemplo, midiendo las dimensiones de los tumores al extirparlos del sujeto, por ejemplo, utilizando calibradores, o mientras se encuentran en el cuerpo utilizando técnicas de imágenes, por ejemplo, gammagrafías óseas, ecografías, tomografías computarizadas o resonancias magnéticas.

Por "regiones variables" o "región V", tal como se utilizan en la presente, se entenderá el segmento de las cadenas IgG que es variable en secuencia entre diferentes anticuerpos. Se extiende hasta el residuo de Kabat 109 en la cadena ligera y 113 en la cadena pesada.

El término "amortiguador" abarca aquellos agentes que mantienen el pH de solución de las formulaciones de la invención en un rango aceptable, o, para formulaciones liofilizadas de la invención, proporcionan un pH de solución aceptable antes de la liofilización.

Los términos "liofilización", "liofilizado" y "secado por congelación" se refieren a un proceso por el cual el material a secar se congela primero y luego se elimina el hielo o el solvente congelado por sublimación en un ambiente al vacío. Se puede incluir un excipiente en formulaciones previamente liofilizadas para mejorar la estabilidad del producto liofilizado durante el almacenamiento.

El término "formulación farmacéutica" se refiere a los preparados que tienen una forma que permite que los ingredientes activos sean eficaces y que no contienen ningún componente adicional que sea tóxico para los sujetos a los que se administrará la formulación. Los términos "formulación" y "formulación farmacéutica" se utilizan de manera intercambiable a lo largo de la presente.

"Farmacéuticamente aceptable" se refiere a excipientes (vehículos, aditivos) y composiciones que pueden administrarse razonablemente a un sujeto para proporcionar una dosis eficaz del ingrediente activo empleado y que son "generalmente considerados como seguros", por ejemplo, que son fisiológicamente tolerables y no producen típicamente una reacción alérgica o similar, como molestias gástricas y similares, cuando se administran a un ser humano. En otra forma de realización, este término se refiere a entidades y composiciones moleculares aprobadas por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o listadas en la Farmacopea

de los Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales, y más en particular en seres humanos.

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

"Tiempo de reconstitución" es el tiempo necesario para rehidratar una formulación liofilizada con una solución a una solución clarificada libre de partículas.

Una formulación "estable" es aquella en la que la proteína que contiene retiene esencialmente su estabilidad física y/o química y/o su actividad biológica en el momento del almacenamiento. Varias técnicas analíticas para medir la estabilidad de las proteínas están disponibles en la técnica y se revisan en *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc, Nueva York, N.Y., Pubs. (1991) y Jones, A. *Adv. Drug Delivery Rev.* 10:29-90 (1993). La estabilidad se puede medir a una temperatura seleccionada para un período de tiempo 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 una 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 una 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 una 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 una temperatura ambiente (23-27 °C) durante al menos 18 meses. Los criterios de estabilidad para una formulación de anticuerpos son los siguientes. Normalmente, no se degrada más del 10 %, preferentemente 5 %, del monómero del anticuerpo según las mediciones del SEC-HPLC. Normalmente, la formulación es incolora, o clara a ligeramente opalescente por análisis visual. Normalmente, la concentración, el pH y la osmolaridad de la formulación no tienen más de +/- 10 % de cambio. La potencia está normalmente dentro del 60-140 %, preferentemente 80-120 % del control o referencia. Normalmente, no se observa más del 10 %, preferentemente 5 % de recorte del anticuerpo, es decir, % de especies de bajo peso molecular según lo determinado, por ejemplo, por HP-SEC. Normalmente, no se observa más del 10 %, preferentemente 5 % de agregación del anticuerpo, es decir, % de especies de alto peso molecular según lo determinado, por ejemplo, por HP-SEC.

Un anticuerpo "conserva su estabilidad física" en una formulación farmacéutica si no muestra un aumento significativo de la agregación, precipitación y/o desnaturalización tras un examen visual del color y/o la claridad, o según lo medido por la dispersión de la luz UV, la cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) y la dispersión dinámica de la luz. Los cambios en la conformación de la proteína pueden ser evaluados 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 "conserva su estabilidad química" en una formulación farmacéutica, si no muestra ninguna alteración química significativa. La estabilidad química puede evaluarse detectando y cuantificando las formas químicamente alteradas de la proteína. Los procesos de degradación que a menudo alteran la estructura química de la proteína incluyen hidrólisis o recorte (evaluados por métodos como la cromatografía de exclusión de tamaño y SDS-PAGE), oxidación (evaluada por métodos como el mapeo de péptidos junto con la espectroscopia de masa o MALDI/TOF/MS), deamidación (evaluada por métodos como la cromatografía de intercambio iónico, el enfoque isoelectrico capilar, el mapeo de péptidos, la medición de ácido isoaspártico) e isomerización (evaluada mediante la medición de la concentración del contenido de isoaspártico).

Un anticuerpo "conserva su actividad biológica" en una formulación farmacéutica, si la actividad biológica del anticuerpo en un momento dado está dentro de un rango predeterminado de la actividad biológica exhibida en el momento en que se preparó la formulación farmacéutica. La actividad biológica de un anticuerpo puede determinarse, por ejemplo, mediante un ensayo de fijación al antígeno.

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

## II. Formulaciones y coformulaciones de la invención.

En un aspecto, la invención proporciona formulaciones biológicas que comprenden anticuerpos anti-TIGIT o fragmentos de fijación al antígeno de estos que se fijan específicamente a TIGIT humano como el ingrediente farmacéutico activo. La inclusión de metionina en tales formulaciones reduce la oxidación de los residuos de metionina en la región Fc del anticuerpo anti-TIGIT y, en el ejemplo de un anticuerpo anti-TIGIT que comprende una CDRH3 de SEQ ID NO: 110, el triptófano. Tales formulaciones pueden comprender un quelante, tal como DTPA, que puede reducir de manera adicional la oxidación.

En un aspecto, la invención también proporciona una coformulación de un anticuerpo anti-TIGIT con un anticuerpo anti-PD-1. Las mayores vías de degradación de pembrolizumab incluyeron oxidación de metionina 105 (Met105) en la cadena pesada CDR3 (por ejemplo, M105 de SEQ ID NO: 10) bajo estrés de peróxido y oxidación de Met105 y residuos de Fc metionina cuando se expone a la luz. Pembrolizumab mantuvo su bioactividad bajo las mayores condiciones de estrés para los niveles de degradación probados. Sin embargo, la reducción en la afinidad a PD-1 se observó en las muestras de peróxido sometidas a estrés por resonancia de plasmón de superficie (SPR). Un residuo de metionina expuesto o un residuo de metionina en la CDR de un anticuerpo tiene el potencial de impactar la actividad biológica del anticuerpo a través de oxidación. La adición de metionina es capaz de reducir la oxidación de Met105 dentro de la CDR de la cadena pesada de pembrolizumab.

#### Anticuerpos anti-PD-1 y fragmentos de fijación al antígeno de estos

En un aspecto, la invención proporciona formulaciones biológicas estables que comprenden anticuerpos anti-TIGIT o fragmentos de fijación al antígeno de estos, coformuladas con un anticuerpo anti-PD-1 humana o fragmentos de fijación al antígeno de estos que se fijan específicamente a PD-1 humana (por ejemplo, anticuerpo anti-PD-1 humana o humanizada) como el ingrediente farmacéutico activo (API PD-1), así como también métodos para el uso de las formulaciones de la invención. Cualquier anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de fijación al antígeno de este puede ser utilizado en las coformulaciones y métodos de la invención. En formas de realización particulares, el API PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1, que se selecciona de pembrolizumab y nivolumab. En formas de realización específicas, el anticuerpo anti-PD-1 es pembrolizumab. En formas de realización alternativas, el anticuerpo anti-PD-1 es nivolumab. La Tabla 2 proporciona secuencias de aminoácido para los anticuerpos anti-PD-1 humana de ejemplo de pembrolizumab y nivolumab. Los anticuerpos anti-PD-1 y los fragmentos de fijación al antígeno que son útiles en las coformulaciones y métodos de la invención se muestran en la Tabla 3.

En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-PD-1 humana o fragmento de fijación al antígeno de este para su uso en las coformulaciones de la invención comprende tres CDR de la cadena ligera de CDRL1, CDRL2 y CDRL3 y/o tres CDR de la cadena pesada de CDRH1, CDRH2 y CDRH3.

En una forma de realización de la invención, CDRL1 es SEQ ID NO:1 o una variante de SEQ ID NO:1, CDRL2 es SEQ ID NO:2 o una variante de SEQ ID NO:2, y CDRL3 es SEQ ID NO:3 o una variante de SEQ ID NO:3.

En una forma de realización, CDRH1 es SEQ ID NO:6 o una variante de SEQ ID NO:6, CDRH2 es SEQ ID NO: 7 o una variante de SEQ ID NO:7, y CDRH3 es SEQ ID NO:8 o una variante de SEQ ID NO:8.

En una forma de realización, las tres CDR de cadena ligera son SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, y SEQ ID NO:3 y las tres CDR de cadena pesada son SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:8.

5 En una forma de realización alternativa de la invención, CDRL1 es SEQ ID NO:11 o una variante de SEQ ID NO:11, CDRL2 es SEQ ID NO:12 o una variante de SEQ ID NO:12, y CDRL3 es SEQ ID NO:13 o una variante de SEQ ID NO:13.

En una forma de realización, CDRH1 es SEQ ID NO:16 o una variante de SEQ ID NO:16, CDRH2 es SEQ ID NO:17 o una variante de SEQ ID NO:17, y CDRH3 es SEQ ID NO:18 o una variante de SEQ ID NO:18.

10 En una forma de realización, las tres CDR de cadena ligera son SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, y SEQ ID NO:3 y las tres CDR de cadena pesada son SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:8.

En una forma de realización alternativa, las tres CDR de cadena ligera son SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, y SEQ ID NO:13 y las tres CDR de cadena pesada son SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17 y SEQ ID NO:18.

En una forma de realización adicional de la invención, CDRL1 es SEQ ID NO:21 o una variante de SEQ ID NO:21, CDRL2 es SEQ ID NO:22 o una variante de SEQ ID NO:22, y CDRL3 es SEQ ID NO:23 o una variante de SEQ ID NO:23.

20 En aun otra forma de realización, CDRH1 es SEQ ID NO:24 o una variante de SEQ ID NO:24, CDRH2 es SEQ ID NO: 25 o una variante de SEQ ID NO:25, y CDRH3 es SEQ ID NO:26 o una variante de SEQ ID NO:26.

En otra forma de realización, las tres CDR de cadena ligera son SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, y SEQ ID NO:23 y las tres CDR de cadena pesada son SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25 y SEQ ID NO:26.

25 Algunos anticuerpos anti-PD-1 humana y fragmentos de fijación al antígeno de la invención comprenden una región variable de la cadena ligera y una región variable de la cadena pesada. En algunas 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 formas de realización adicionales, la región

30 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 formas de realización adicionales, 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

35 SEQ ID NO:29, o SEQ ID NO:30 o una variante de SEQ ID NO:30. En tales formas de realización, una variante de cadena ligera o una secuencia de región variable de cadena pesada es idéntica a la secuencia de referencia excepto que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones de aminoácidos. En algunas formas de realización, las sustituciones están en la región marco (es

decir, fuera de las CDR). En algunas formas de realización, una, dos, tres, cuatro o cinco de las sustituciones de aminoácidos son sustituciones conservadoras.

En una forma de realización de las coformulaciones de la invención, el anticuerpo anti-PD-1 humana o fragmento de fijación al antígeno comprende una región variable de la cadena ligera que comprende o consiste en SEQ ID NO:4 y una región variable de la cadena pesada que comprende o consiste en SEQ ID NO:9. En una forma de realización adicional, el anticuerpo anti-PD-1 humana o fragmento de fijación al antígeno comprende una región variable de la cadena ligera que comprende o consiste en SEQ ID NO:14 y una región variable de la cadena pesada que comprende o consiste en SEQ ID NO:19. En una forma de realización de las formulaciones de la invención, el anticuerpo anti-PD-1 humana o fragmento de fijación al antígeno comprende una región variable de la cadena ligera que comprende o consiste en SEQ ID NO:28 y una región variable de la cadena pesada que comprende o consiste en SEQ ID NO:27. En una forma de realización adicional, el anticuerpo anti-PD-1 humana o fragmento de fijación al antígeno comprende una región variable de la cadena ligera que comprende o consiste en SEQ ID NO:29 y una región variable de la cadena pesada que comprende o consiste en SEQ ID NO:27. En otra forma de realización, el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno comprende una región variable de la cadena ligera que comprende o consiste en SEQ ID NO:30 y una región variable de la cadena pesada que comprende o consiste en SEQ ID NO:27.

En otra forma de realización, las coformulaciones de la invención comprenden un anticuerpo anti-PD-1 humana o una proteína de fijación al antígeno que tiene un dominio  $V_L$  y/o un dominio  $V_H$  con una secuencia de homología de al menos 95 %, 90 %, 85 %, 80 %, 75 % o 50 % a uno de los dominios  $V_L$  o dominios  $V_H$  que se describen anteriormente, y exhiben fijación específica a PD-1. En otra forma de realización, el anticuerpo anti-PD-1 humana o la proteína de fijación al antígeno de las coformulaciones de la invención comprenden dominios  $V_L$  y  $V_H$  que tienen hasta 1, 2, 3, 4, o 5 o más sustituciones de aminoácidos, y exhiben fijación específica a PD-1.

En cualquiera de las formas de realización anteriores, el API PD-1 puede ser anticuerpo anti-PD-1 de longitud completa o un fragmento de fijación al antígeno de este que se fija específicamente a PD-1 humana. En ciertas formas de realización, el API PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1 de longitud completa que se selecciona de cualquier clase de inmunoglobinas, que incluyen IgM, IgG, IgD, IgA, y IgE. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo contra IgG. Se puede utilizar cualquier isotipo de IgG, que incluyen IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, y IgG<sub>4</sub>. Se pueden agregar diferentes dominios constantes a las regiones  $V_L$  y  $V_H$  que se describen en la presente. Por ejemplo, si un uso previsto particular de un anticuerpo (o fragmento) de la presente invención llegara a requerir funciones efectoras alteradas, entonces se podría usar un dominio constante de cadena pesada diferente de IgG1. Si bien los anticuerpos contra IgG1 proporcionan una semivida larga y funciones efectoras, tales como activación complementaria y citotoxicidad

celular dependiente de anticuerpos, tales actividades pueden no ser deseables para todos los usos del anticuerpo. En tales instancias, se puede utilizar un dominio constante de IgG4, por ejemplo.

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

Por lo general, las variantes de secuencia de aminoácidos de los anticuerpos anti-PD-1 y los fragmentos de fijación al antígeno de la invención y los anticuerpos anti-TIGIT y los fragmentos de fijación al antígeno tendrán una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia de aminoácidos, con la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo de referencia o fragmento de fijación al antígeno (por ejemplo, cadena pesada, cadena ligera, V<sub>H</sub>, V<sub>L</sub>, o secuencia humanizada), con mayor preferencia al menos 80 %, con mayor preferencia al menos 85 %, con mayor preferencia al menos 90 %, y con máxima preferencia al menos 95, 98, o 99 %. La identidad u homología con respecto a una secuencia se define en la presente como el porcentaje de residuos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos a los residuos anti-PD-1, luego de alinear las secuencias e introducir espacios, de ser necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia, sin tener en cuenta sustitución conservadora alguna como parte de la identidad de secuencia. Ninguno del terminal N, el terminal C, o las extensiones, eliminaciones o inserciones internas en la secuencia de anticuerpo se interpretarán como que afectan la identidad de secuencia u homología.

La identidad de secuencia se refiere al grado en el cual los aminoácidos de dos polipéptidos son los mismos en posiciones equivalentes cuando dos secuencias están alineadas de manera óptima. La identidad de secuencia se puede determinar mediante un algoritmo BLAST en donde los parámetros del algoritmo se seleccionan para obtener la mayor

5 coincidencia entre las secuencias respectivas sobre la longitud completa de las secuencias de referencia respectivas. Las siguientes referencias se refieren a algoritmos BLAST que se utilizan a menudo para los análisis de secuencia: ALGORITMOS BLAST: Altschul, S.F., *et al.*, (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish, W., *et al.*, (1993) Nature Genet. 3:266-272; Madden, T.L., *et al.*, (1996) Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S.F., *et al.*, (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-

10 3402; Zhang, J., *et al.*, (1997) Genome Res. 7:649-656; Wootton, J.C., *et al.*, (1993) Comput. Chem. 17:149-163; Hancock, J.M. *et al.*, (1994) Comput. Appl. Biosci. 10:67-70; SISTEMAS DE PUNTUACIÓN DE ALINEACIÓN: Dayhoff, M.O., *et al.*, "A model of evolutionary change in proteins." en Atlas of Protein Sequence and Structure, (1978) vol. 5, supl. 3. M.O. Dayhoff (ed.), págs. 345-352, Natl. Biomed. Res. Found., Washington, DC; Schwartz, R.M., *et al.*,

15 "Matrices for detecting distant relationships." en Atlas of Protein Sequence and Structure, (1978) vol. 5, supl. 3. M.O. Dayhoff (ed.), pp. 353-358, Natl. Biomed. Res. Found., Washington, DC; Altschul, S.F., (1991) J. Mol. Biol. 219:555-565; States, D.J., *et al.*, (1991) Methods 3:66-70; Henikoff, S., *et al.*, (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919; Altschul, S.F., *et al.*, (1993) J. Mol. Evol. 36:290-300; ESTADÍSTICAS DE ALINEACIÓN: Karlin, S., *et al.*, (1990)

20 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268; Karlin, S., *et al.*, (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877; Dembo, A., *et al.*, (1994) Ann. Prob. 22:2022-2039; y Altschul, S.F. "Evaluating the statistical significance of multiple distinct local alignments." en Theoretical and Computational Methods in Genome Research (S. Suhai, ed.), (1997) págs. 1-14, Plenum, Nueva York.

25 De la misma manera, se puede utilizar cualquier clase de cadena ligera en las composiciones y métodos de la presente. De manera específica, kappa, lambda, o variantes de estos son útiles en las presentes composiciones y métodos.

Tabla 2. Secuencias de anticuerpo 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                | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLH<br>WYQQKPGQAPRLLIYLA<br>SYLESGV<br>PARFSGSGSGTDF<br>TLTISSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGG<br>TKVEIK   | 4          |
| Cadena ligera                  | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLH<br>WYQQKPGQAPRLLIYLA<br>SYLESGV<br>PARFSGSGSGTDF<br>TLTISSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGG<br>TKVEIKRT | 5          |

| Característica del anticuerpo         | Secuencia de aminoácidos                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | SEQ ID NO. |
|---------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
|                                       | VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV<br>QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS<br>KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |            |
| <b>Cadena pesada de pembrolizumab</b> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |            |
| CDR1                                  | NYMY                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 6          |
| CDR2                                  | GINPSNGGTNFNEKFKN                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 7          |
| CDR3                                  | RDYRFDMGFDY                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 8          |
| Región variable                       | QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCASGYTFTNYYMY<br>WVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVT<br>TTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDM<br>GFDYWGQGTTVTVSS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 9          |
| Cadena pesada                         | QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCASGYTFTNYYMY<br>WVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVT<br>TTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDM<br>GFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST<br>AALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ<br>SSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNTKVD<br>KRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAK<br>TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV<br>NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKN<br>QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV<br>LDSGSEFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN<br>HYTQKSLSLSLGK | 10         |
| <b>Cadena ligera de nivolumab</b>     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |            |
| CDR1                                  | RASQSVSSYLA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 11         |
| CDR2                                  | DASNRAT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 12         |
| CDR3                                  | QQSSNWPRT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 13         |
| Región variable                       | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQ<br>QKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLT<br>SSLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 14         |
| Cadena ligera                         | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQ<br>QKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLT<br>SSLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIKRTVA<br>APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW<br>KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD<br>YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                             | 15         |
| <b>Cadena pesada de nivolumab</b>     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |            |
| CDR1                                  | NSGMH                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 16         |
| CDR2                                  | VIWYDGSKRYYADSVKG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 17         |
| CDR3                                  | NDDY                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 18         |
| Región variable                       | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHW<br>VRQAPGKGLEWVAWIWYDGSKRYYADSVKGRFTIS<br>RDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQG<br>TLVTVSS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 19         |
| Cadena pesada                         | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHW<br>VRQAPGKGLEWVAWIWYDGSKRYYADSVKGRFTIS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 20         |

| Característica del anticuerpo | Secuencia de aminoácidos                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | SEQ ID NO. |
|-------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
|                               | RDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQG<br>TLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD<br>YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV<br>VTVPSSSLGKTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGP<br>PCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV<br>VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN<br>STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE<br>KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK<br>GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY<br>SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL<br>SLGK |            |

Tabla 3. Anticuerpos contra PD-1 y fragmentos de fijación al antígeno adicionales útiles en las coformulaciones, métodos y usos de la invención.

|                                                                                                                                                                                                          |                                            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| A. Anticuerpos y fragmentos de fijación al antígeno que comprenden CDR de cadenas ligera y pesada de hPD-1.08A en WO2008/156712                                                                          |                                            |
| 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 madura h109A y una de las regiones variables de la cadena ligera madura K09A 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 409 madura y una de las cadenas ligeras K09A maduras 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 |

- 5 En algunas formas de realización de la coformulación de la invención, el API PD-1 (es decir, el anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de fijación al antígeno de este) está presente en una concentración de alrededor de 25 mg/ml a alrededor de 100 mg/ml. En formas de realización alternativas, el API está presente en una concentración de alrededor de 10 mg/ml, alrededor de 25 mg/ml, alrededor de 50 mg/ml, alrededor de 75 mg/ml, o alrededor de 100 mg/ml.

10 Anticuerpos anti-TIGIT y fragmento de fijación al antígeno de estos

En un aspecto, la invención proporciona formulaciones biológicas que comprenden anticuerpos anti-TIGIT o fragmentos de fijación a antígeno de estos que se fijan específicamente a TIGIT humano (por ejemplo, anticuerpo anti-TIGIT humano o humanizado) como el ingrediente farmacéutico activo (API TIGIT), así como también métodos para el uso de las formulaciones de la invención.

En otro aspecto, la invención también proporciona coformulaciones biológicas que comprenden (i) anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este el cual se fija específicamente a TIGIT humano (por ejemplo, anticuerpo anti-TIGIT humano o humanizado) y (ii) un anticuerpo anti-PD-1 humana o fragmento de fijación al antígeno de este el cual se fija específicamente a PD-1 humana. Cualquier anticuerpo anti-tigit o fragmentos de fijación a antígeno de este puede ser utilizado en la formulación, que incluye la coformulación y métodos de la invención. Las secuencias de anticuerpo anti-TIGIT de ejemplo se establecen a continuación en las Tablas 4 y 5.

TABLA 4 Anticuerpos anti-TIGIT de ejemplo

| Descripción      | SEQ ID NO: | SECUENCIA                                                                                                                                                       |
|------------------|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 14A6 H - CDR1    | 35         | SDYWG                                                                                                                                                           |
| 14A6 H - CDR2    | 36         | FITYSGSTSYNPSLKS                                                                                                                                                |
| 14A6 H - CDR3    | 37         | MPSFITLASLSTWEGYFDF                                                                                                                                             |
| 14A6 L - CDR1    | 38         | KASQSIHKNLA                                                                                                                                                     |
| 14A6 L - CDR2    | 39         | YANSLQT                                                                                                                                                         |
| 14A6 L - CDR3    | 40         | QQYYSGWT                                                                                                                                                        |
| 14A6 VH PARENTAL | 41         | EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGSSIA<br><u>SDYWG</u> WIRKFPGNKMEWMGFITYSGSTS<br><u>YNPSLKS</u> RISITRDTSKNQFFLQLHSVTTD<br>DTATYSCARMPSFITLASLSTWEGYFDFW<br>GPGTMVTVSS |
| 14A6 VL PARENTAL | 42         | DIQMTQSPSLLSASVGDRVTLNCKASQSI                                                                                                                                   |

|             |    |                                                                                                                                                                          |
|-------------|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|             |    | <u>HKNLAWYQQKLGEAPKFLIYYANSLQTG</u><br>IPSRFSGSGSGTDFTLTISGLQPEDVATYF<br><u>CQQYYSGWTFGGG</u> TKVELK                                                                     |
| Hu14A6VH.1  | 43 | EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS<br><u>SDYWGWIRQPPGKGLEWIGFITYSGSTSY</u><br><u>NPSLKS</u> RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA<br>DTAVYYCARM <u>PSFITLASLSTWEGYFDF</u><br>WGQGTMTVTVSS  |
| Hu14A6VH.1a | 44 | EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS<br><u>SDYWGWIRQPPGKGLEWIGFITYSGSTSY</u><br><u>NPSLKS</u> RVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAA<br>DTAVYYCARM <u>PSFITLASLSTWEGYFDF</u><br>WGQGTMTVTVSS  |
| Hu14A6VH.1b | 45 | EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS<br><u>SDYWGWIRQPPGKGLEWIGFITYSGSTSY</u><br><u>NPSLKS</u> RITISRDTSKNQFSLKLSSVTAA<br>TAVYYCARM <u>PSFITLASLSTWEGYFDFW</u><br>GQGTMTVTVSS   |
| Hu14A6VH.1c | 46 | EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS<br><u>SDYWGWIRQPPGKGLEWMGFITYSGSTS</u><br><u>YNPSLKS</u> RITISRDTSKNQFSLKLSSVTAA<br>DTAVYYCARM <u>PSFITLASLSTWEGYFDF</u><br>WGQGTMTVTVSS  |
| Hu14A6VH.1d | 47 | EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS<br><u>SDYWGWIRQPPGKGLEWIGFITYSGSTSY</u><br><u>NPSLKS</u> RVTISRDTSKNQFSLKLHSTVTAA<br>DTAVYYCARM <u>PSFITLASLSTWEGYFDF</u><br>WGQGTMTVTVSS |
| Hu14A6VH.1e | 48 | EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS<br><u>SDYWGWIRQPPGKGLEWIGFITYSGSTSY</u>                                                                                                   |

|             |    |                                                                                                                                                                       |
|-------------|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|             |    | <u>NPSLKS</u> RITISRDTSKNQFSLKLHSVTAAD<br>TAVYYCARM <u>PSFITLASLSTWEGYFDFW</u><br>GQGTMTVSS                                                                           |
| Hu14A6VH.1f | 49 | EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGSSIS<br><u>SDYWGWIRQPPGKGLEWIGFITYSGSTSY</u><br><u>NPSLKS</u> RITISRDTSKNQFSLKLHSVTAAD<br>TAVYYCARM <u>PSFITLASLSTWEGYFDFW</u><br>GQGTMTVSS |
| Hu14A6VH.1g | 50 | EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGSSIS<br><u>SDYWGWIRQPPGKGLEWMGFITYSGSTS</u><br><u>YNPSLKS</u> RITISVDTSKNQFSLKLHSVTAA<br>DTAVYYCARM <u>PSFITLASLSTWEGYFDF</u><br>WGQGTMTVSS |
| Hu14A6VH.2  | 51 | EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGYSIS<br><u>SDYWGWIRQPPGKGLEWIGFITYSGSTSY</u><br><u>NPSLKS</u> RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA<br>DTAVYYCARM <u>PSFITLASLSTWEGYFDF</u><br>WGQGTMTVSS |
| Hu14A6VH.2a | 52 | EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGYSIS<br><u>SDYWGWIRQPPGKGLEWIGFITYSGSTSY</u><br><u>NPSLKS</u> RVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAA<br>DTAVYYCARM <u>PSFITLASLSTWEGYFDF</u><br>WGQGTMTVSS |
| Hu14A6VH.2b | 53 | EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGYSIS<br><u>SDYWGWIRQPPGKGLEWIGFITYSGSTSY</u><br><u>NPSLKS</u> RITISRDTSKNQFSLKLSSVTAAD<br>TAVYYCARM <u>PSFITLASLSTWEGYFDFW</u><br>GQGTMTVSS |
| Hu14A6VH.2c | 54 | EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGSSIS<br><u>SDYWGWIRQPPGKGLEWMGFITYSGSTS</u>                                                                                                 |

|             |    |                                                                                                                                                                         |
|-------------|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|             |    | <u>YNPSLKS</u> RITISRDTSKNQFSLKLSSVTAA<br>DTAVYYCARM <u>PSFITLASLSTWEGYFDF</u><br>WGQGTMTVTVSS                                                                          |
| Hu14A6VH.2d | 55 | EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGYSIS<br><u>SDYWGWIRQPPGKGLEWIGFITYSGSTSY</u><br><u>NPSLKS</u> RVTISRDTSKNQFSLKLHSVTAA<br>DTAVYYCARM <u>PSFITLASLSTWEGYFDF</u><br>WGQGTMTVTVSS |
| Hu14A6VH.2e | 56 | EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGYSIS<br><u>SDYWGWIRQPPGKGLEWIGFITYSGSTSY</u><br><u>NPSLKS</u> RITISRDTSKNQFSLKLHSVTAA<br>TAVYYCARM <u>PSFITLASLSTWEGYFDFW</u><br>GQGTMTVTVSS  |
| Hu14A6VH.2f | 57 | EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGSSIS<br><u>SDYWGWIRQPPGKGLEWIGFITYSGSTSY</u><br><u>NPSLKS</u> RITISRDTSKNQFSLKLHSVTAA<br>TAVYYCARM <u>PSFITLASLSTWEGYFDFW</u><br>GQGTMTVTVSS  |
| Hu14A6VH.2e | 58 | EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGSSIS<br><u>SDYWGWIRQPPGKGLEWMGFITYSGSTS</u><br><u>YNPSLKS</u> RITISRDTSKNQFSLKLHSVTAA<br>DTAVYYCARM <u>PSFITLASLSTWEGYFDF</u><br>WGQGTMTVTVSS |
| Hu14A6Vk.1  | 59 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCK <u>ASQSIH</u><br><u>KNLAWYQQKPGKAPKLLIYYANSLQTG</u><br>VPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY<br>C <u>QQYYSGWTFGGG</u> TKVEIK                           |
| Hu14A6Vk.1a | 60 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCK <u>ASQSIH</u><br><u>KNLAWYQQKPGKAPKFLIYYANSLQTGV</u><br>PSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC                                                          |

|                                                                |    |                                                                                                                                                                   |
|----------------------------------------------------------------|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                |    | <u>QQYYSGWTFGGGTKVEIK</u>                                                                                                                                         |
| Hu14A6Vk.1b                                                    | 61 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTITCKASQSIH<br><u>KNLAWYQQKPGKAPKFLIYYANSLQTGI</u><br>PSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC<br><u>QQYYSGWTFGGGTKVEIK</u>                              |
| Hu14A6Vk.2                                                     | 62 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTITCKASQSIH<br><u>KNLAWYQQKPGKVPKLLIYYANSLQTG</u><br>VPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYY<br><u>CQQYYSGWTFGGGTKVEIK</u>                              |
| Hu14A6Vk.2a                                                    | 63 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTITCKASQSIH<br><u>KNLAWYQQKPGKVPKFLIYYANSLQTGV</u><br>PSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYC<br><u>QQYYSGWTFGGGTKVEIK</u>                              |
| Hu14A6Vk.2b                                                    | 64 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTITCKASQSIH<br><u>KNLAWYQQKPGKVPKFLIYYANSLQTGI</u><br>PSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYC<br><u>QQYYSGWTFGGGTKVEIK</u>                              |
| 16AHA_tigit_14a6_humanize<br>d_VH1<br><br>LB155.14A6.G2.A8_VH1 | 65 | EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGSSIA<br><u>SDYWGWIRQPPGKGLEWIGFITYSGSTSY</u><br><u>NPSLKS</u> RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA<br>DTAVYYCARMPSFITLASLSTWEGYFDF<br>WGQGTMTVTVSSAS |
| 18AHA_tigit_14a6_humanize<br>d_VH2<br><br>LB155.14A6.G2.A8_VH2 | 66 | EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGSSIA<br><u>SDYWGWIRQPPGKGLEWIGFITYSGSTSY</u><br><u>NPSLKS</u> RVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAA<br>DTAVYYCARMPSFITLASLSTWEGYFDF<br>WGQGTMTVTVSS   |

|                                                                |    |                                                                                                                                                                |
|----------------------------------------------------------------|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 20AHA_tigit_14a6_humanize<br>d_VH3<br><br>LB155.14A6.G2.A8_VH3 | 67 | EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGSSIA<br><u>SDYWGWIRKPPGKGLEWIGFITYSGSTSY</u><br><u>NPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAA</u><br>DTAVYYCARMPSFITLASLSTWEGYFDF<br>WGQGTMTVTVSS |
| 21AHA_tigit_14a6_humanize<br>d_VH4<br><br>LB155.14A6.G2.A8_VH4 | 68 | EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGSSIA<br><u>SDYWGWIRQPPGKKLEWIGFITYSGSTSY</u><br><u>NPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAA</u><br>DTAVYYCARMPSFITLASLSTWEGYFDF<br>WGQGTMTVTVSS |
| 19AHA_tigit_14a6_humanize<br>d_VH5<br><br>LB155.14A6.G2.A8_VH5 | 69 | EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGSSIA<br><u>SDYWGWIRQPPGKGMWIGFITYSGSTS</u><br><u>YNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTA</u><br>ADTAVYYCARMPSFITLASLSTWEGYFD<br>EWGQGTMTVTVSS  |
| 22AHA_tigit_14a6_humanize<br>d_VH6<br><br>LB155.14A6.G2.A8_VH6 | 70 | EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGSSIA<br><u>SDYWGWIRKPPGKKMEWIGFITYSGSTS</u><br><u>YNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTA</u><br>ADTAVYYCARMPSFITLASLSTWEGYFD<br>EWGQGTMTVTVSS |
| 23AHA_tigit_14a6_humanize<br>d_VH7<br><br>LB155.14A6.G2.A8_VH7 | 71 | EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGSSIA<br><u>SDYWGWIRQFPGKGLEWIGFITYSGSTSY</u><br><u>NPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAD</u><br>DTAVYYCARMPSFITLASLSTWEGYFDF<br>WGQGTMTVTVSS |
| 24AHA_tigit_14a6_humanize<br>d_VH8<br><br>LB155.14A6.G2.A8_VH8 | 72 | EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGSSIA<br><u>SDYWGWIRKPPGKKMEWIGFITYSGSTS</u><br><u>YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA</u><br>ADTAVYYCARMPSFITLASLSTWEGYFD<br>EWGQGTMTVTVSS |

|                                                                  |    |                                                                                                                                                                       |
|------------------------------------------------------------------|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 25AHA_tigit_14a6_humanize<br>d_VH9<br><br>LB155.14A6.G2.A8_VH9   | 73 | EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCSVTGSSIA<br><u>SDYWGWIRQPPGKGLEWIGFITYSGSTSY</u><br><u>NPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAA</u><br>DTAVYYCARMPSFITLASLSTWEGYFDF<br>WGQGTMTVTVSS       |
| 26AHA_tigit_14a6_humanize<br>d_VH10<br><br>LB155.14A6.G2.A8_VH10 | 74 | EVQLQQSGAGLLKPSETLSLTCSVTGSSIA<br><u>SDYWGWIRQPPGKGLEWIGFITYSGSTSY</u><br><u>NPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA</u><br>DTAVYYCARMPSFITLASLSTWEGYFDF<br>WGQGTMTVTVSS        |
| 27AHA_tigit_14a6_humanize<br>d_VH11<br><br>LB155.14A6.G2.A8_VH11 | 75 | EVQLQESGPGLVKPPGTLTLTCSVTGSSIA<br><u>SDYWGWVRQPPGKGLEWIGFITYSGSTS</u><br><u>YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA</u><br>ADTAVYYCARMPSFITLASLSTWEGYFD<br><u>EWGQGTMTVTVSS</u> |
| 09AHA_tigit_14a6_humanize<br>d_VL1<br><br>LB155.14A6.G2.A8_VL1   | 76 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCK <u>ASQSIH</u><br><u>KNLAWYQQKPGKAPKLLIYYANSLQTG</u><br>VPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY<br><u>CQQYYSGWTFGGGTKVEIK</u>                            |
| 11AHA_tigit_14a6_humanize<br>d_VL2<br><br>LB155.14A6.G2.A8_VL2   | 77 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCK <u>ASQSIH</u><br><u>KNLAWYQQKPGKAPKFLIYYANSLQTGV</u><br>PSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC<br><u>QQYYSGWTFGGGTKVEIK</u>                            |
| 12AHA_tigit_14a6_humanize<br>d_VL3<br><br>LB155.14A6.G2.A8_VL3   | 78 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCK <u>ASQSIH</u><br><u>KNLAWYQQKPGKAPKLLIYYANSLQTG</u><br>VPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYF<br><u>CQQYYSGWTFGGGTKVEIK</u>                            |

|                                                                |    |                                                                                                                                               |
|----------------------------------------------------------------|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                |    |                                                                                                                                               |
| 13AHA_tigit_14a6_humanize<br>d_VL4<br><br>LB155.14A6.G2.A8_VL4 | 79 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <u>KASQSIH</u><br><u>KNLAWYQQKPGKAPKFLIYYANSLQT</u> GV<br>PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFC<br><u>QQYYSGWTFGGG</u> TKVEIK |
| 15AHA_tigit_14a6_humanize<br>d_VL5<br><br>LB155.14A6.G2.A8_VL5 | 80 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <u>KASQSIH</u><br><u>KNLAWYQQKPGKAPKLLIYYANSLQT</u> GI<br>PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC<br><u>QQYYSGWTFGGG</u> TKVEIK |
| 28H5 H - CDR1                                                  | 81 | GYSITSDYAWN                                                                                                                                   |
| 28H5 H - CDR2                                                  | 82 | YISNSGSASYNPSLKS                                                                                                                              |
| 28H5 H - CDR3                                                  | 83 | LIYYDYGGAMNF                                                                                                                                  |
| 28H5 L - CDR1                                                  | 84 | KASQGVSTTVA                                                                                                                                   |
| 28H5 L - CDR2                                                  | 85 | SASYRYT                                                                                                                                       |
| 28H5 L - CDR3                                                  | 86 | QHYYSTPWT                                                                                                                                     |
| 28H5 VH PARENTAL                                               | 87 | DVQLQESGPGLVKPSQSLTCTVTGYSI<br>TSDYAWN WIRQFPGNKLEWMGYISNSGS<br>ASYNPSLKSRI SITRDT SKNQFFLQLNSVT<br>TEDTATYYCATLIYYDYGGAMNFWGQG<br>TSVTVSS    |
| 28H5 VL PARENTAL                                               | 88 | DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQG<br>VSTTVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYT<br>GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQSEDLAV<br>YYCQHYYSTPWTFGGGTKLEIK                       |
| 14H6 L – variante de CDR2                                      | 89 | YASNLQT                                                                                                                                       |
| 14H6 L – variante de CDR2                                      | 90 | YASSLQT                                                                                                                                       |
| 14H6 L – variante de CDR2                                      | 91 | YASTLQT                                                                                                                                       |

|                                           |     |                                                                                                                                                               |
|-------------------------------------------|-----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 14H6 L – variante de CDR2                 | 92  | YATTLQT                                                                                                                                                       |
| 14H6 L – variante de CDR2                 | 93  | YASYLQT                                                                                                                                                       |
| 14H6 L – variante de CDR2                 | 94  | YANQLQT                                                                                                                                                       |
| 14H6 L – variante de CDR2                 | 95  | YAGSLQT                                                                                                                                                       |
| 14H6 L – variante de CDR2                 | 96  | YASQLQT                                                                                                                                                       |
| 14H6 L – variante de CDR2                 | 97  | YADSLQT                                                                                                                                                       |
| 14H6 L – variante de CDR3                 | 98  | QQYYSGFT                                                                                                                                                      |
| 14H6 L – variante de CDR3                 | 99  | QQYYSGYT                                                                                                                                                      |
| 14H6 L – variante de CDR3                 | 100 | QQYYSGIT                                                                                                                                                      |
| 14H6 L – variante de CDR3                 | 101 | QQYYSGVT                                                                                                                                                      |
| 14H6 L – variante de CDR3                 | 102 | QQYYSGLT                                                                                                                                                      |
| 14H6 H – variante de CDR3                 | 103 | MPSFITLASLSTFEGYFDF                                                                                                                                           |
| 14H6 H – variante de CDR3                 | 104 | MPSFITLASLSTYEGYFDF                                                                                                                                           |
| 14H6 H – variante de CDR3                 | 105 | MPSFITLASLSTIEGYFDF                                                                                                                                           |
| 14H6 H – variante de CDR3                 | 106 | MPSFITLASLSTVEGYFDF                                                                                                                                           |
| 14H6 H – variante de CDR3                 | 107 | MPSFITLASLSTLEGYFDF                                                                                                                                           |
| 31C6 H -CDR1                              | 108 | SYVMH                                                                                                                                                         |
| 31C6 H -CDR2                              | 109 | YIDPYNDGAKYNEKFKG                                                                                                                                             |
| 31C6 H -CDR3                              | 110 | GGPYGWYFDV                                                                                                                                                    |
| 31C6 L - CDR1                             | 111 | RASEHIYSYLS                                                                                                                                                   |
| 31C6 L – CDR2                             | 112 | NAKTLAE                                                                                                                                                       |
| 31C6 L – CDR3                             | 113 | QHHFGSPLT                                                                                                                                                     |
| 31C6 VH PARENTAL (con las CDR subrayadas) | 114 | EVQLQQSGPELVKPGSSVKMSCKASGYT<br>FSS <u>YVMH</u> WVKQKPGQGLEWIG <u>YIDPYN</u><br><u>DGAKYNEKFKG</u> KATLTSDKSSSTAYMEL<br>SSLTSEDSAVYYCARG <u>GGPYGWYFDV</u> WG |

|                                           |     |                                                                                                                                                                                    |
|-------------------------------------------|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                           |     | AGTTVTVSS                                                                                                                                                                          |
| 31C6 VL PARENTAL (con las CDR subrayadas) | 115 | DIQMTQSPASLSASVGETVTITC <u>RASEHIY</u><br><u>SYLSWYQQKQ</u> GKSPQLLVYNA <u>KT</u> LAEG<br>VPSRFSGSGSGTQFSLKINS <b>LQ</b> PEDFGTY <b>Y</b><br>CQH <b>H</b> FGSPLTFGAGTTLE <b>LK</b> |
| 31C6 H – VARIANTE DE CDR2 (D56R)          | 116 | YIDPYNrGAKYNEKFG                                                                                                                                                                   |
| 31C6 H – VARIANTE DE CDR2 (D56L)          | 117 | YIDPYNiGAKYNEKG<br>F                                                                                                                                                               |
| 31C6 H – VARIANTE DE CDR2 (D56K)          | 118 | YIDPYNkGAKYNEKFG                                                                                                                                                                   |
| 31C6 H – VARIANTE DE CDR2 (D56F)          | 119 | YIDPYNfGAKYNEKFG                                                                                                                                                                   |
| 31C6 H – VARIANTE DE CDR2 (D56S)          | 120 | YIDPYNsGAKYNEKFG                                                                                                                                                                   |
| 31C6 H – VARIANTE DE CDR2 (D56Y)          | 121 | YIDPYNyGAKYNEKFG                                                                                                                                                                   |
| 31C6 H – VARIANTE DE CDR2 (D56V)          | 122 | YIDPYNvGAKYNEKFG                                                                                                                                                                   |
| 31C6 H – VARIANTE DE CDR2 (G57R)          | 123 | YIDPYNd <b>r</b> AKYNEK <b>F</b> KG                                                                                                                                                |
| 31C6 H – VARIANTE DE CDR2 (G57N)          | 124 | YIDPYNd <b>n</b> AKYNEK <b>F</b> KG                                                                                                                                                |
| 31C6 H – VARIANTE DE CDR2 (G57Q)          | 125 | YIDPYNd <b>q</b> AKYNEK <b>F</b> KG                                                                                                                                                |

|                                  |     |                                 |
|----------------------------------|-----|---------------------------------|
| 31C6 H – VARIANTE DE CDR2 (G57E) | 126 | YIDPYND <sub>e</sub> AKYNEKFKG  |
| 31C6 H – VARIANTE DE CDR2 (G57L) | 127 | YIDPYNDI <sub>A</sub> AKYNEKFKG |
| 31C6 H – VARIANTE DE CDR2 (G57K) | 128 | YIDPYND <sub>k</sub> AKYNEKFKG  |
| 31C6 H – VARIANTE DE CDR2 (G57S) | 129 | YIDPYND <sub>s</sub> AKYNEKFKG  |
| 31C6 H – VARIANTE DE CDR2 (G57Y) | 130 | YIDPYND <sub>y</sub> AKYNEKFKG  |
| 31C6 H – VARIANTE DE CDR2 (G57V) | 131 | YIDPYND <sub>v</sub> AKYNEKFKG  |
| 31C6 L – variante de CDR2 (N50A) | 132 | AAKTLAE                         |
| 31C6 L – variante de CDR2 (N50Y) | 133 | YAKTLAE                         |
| 31C6 L – variante de CDR2 (N50W) | 134 | WAKTLAE                         |
| 31C6 L – variante de CDR2 (N50S) | 135 | SAKTLAE                         |
| 31C6 L – variante de CDR2 (N50T) | 136 | TAKTLAE                         |
| 31C6 L – variante de CDR2 (N50I) | 137 | IAKTLAE                         |
| 31C6 L – variante de CDR2 (N50V) | 138 | VAKTLAE                         |

|                                           |     |                                                                                                                                                               |
|-------------------------------------------|-----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 31C6 L – variante de CDR2<br>(A51N)       | 139 | NNKTLAE                                                                                                                                                       |
| 31C6 L – variante de CDR2<br>(A51I)       | 140 | NIKTLAE                                                                                                                                                       |
| 31C6 L – variante de CDR2<br>(A51L)       | 141 | NLLTLAE                                                                                                                                                       |
| 31C6 L – variante de CDR2<br>(A51T)       | 142 | NTKTLAE                                                                                                                                                       |
| 31C6 L – variante de CDR2<br>(A51V)       | 143 | NVKTLAE                                                                                                                                                       |
| 31C6_HUMZ_VH1<br>(con las CDR subrayadas) | 144 | EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYT<br>FSS <u>YVMH</u> WVRQAPGQRLEWIGYIDPYND<br>GAKYSQKFQGRVTLTRDTSASTAYMELS<br>SLRSED <sup>T</sup> AVYYCARGGPGYWYFDVWGQ<br>GTTVTVSS |
| 31C6_HUMZ_VH2<br>(con las CDR subrayadas) | 145 | EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYT<br>FSS <u>YVMH</u> WVRQAPGQRLEWIGYIDPYND<br>GAKYSQKFQGRVTLTSDKSASTAYMELS<br>SLRSED <sup>T</sup> AVYYCARGGPGYWYFDVWGQ<br>GTTVTVSS |
| 31C6_HUMZ_VH3<br>(con las CDR subrayadas) | 146 | EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYT<br>FSS <u>YVMH</u> WVRQAPGQGLEWIGYIDPYND<br>GAKYAQKFQGRVTLTRDTSTSTVYMELS<br>SLRSED <sup>T</sup> AVYYCARGGPGYWYFDVWGQ<br>GTTVTVSS |
| 31C6_HUMZ_VH4<br>(con las CDR subrayadas) | 147 | EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYT<br>FSS <u>YVMH</u> WVRQAPGQGLEWIGYIDPYND<br>GAKYAQKFQGRVTLTSDKSTSTVYMELS<br>SLRSED <sup>T</sup> AVYYCARGGPGYWYFDVWGQ             |

|                                           |     |                                                                                                                                                                   |
|-------------------------------------------|-----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                           |     | GTTVTVSS                                                                                                                                                          |
| 31C6_HUMZ_VH5<br>(con las CDR subrayadas) | 148 | EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYT<br><u>FSSYVMHWVRQAPGQGLEWIGYIDPYND</u><br><u>GAKYAQKFQGRVTLTSDKSTSTAYMELS</u><br>SLRSED <del>TAVYYCARGGPYGWYFDVWGQ</del><br>GTTVTVSS |
| 31C6_HUMZ_VH6<br>(con las CDR subrayadas) | 149 | EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYT<br><u>FSSYVMHWVRQAPGQGLEWIGYIDPYND</u><br><u>GAKYAQKFQGRVTLTSDKSISTAYMELS</u><br>RLRSDDTV <del>VYYCARGGPYGWYFDVWG</del><br>QGTTVTVSS |
| 31C6_Humz_L1<br>(con las CDR subrayadas)  | 150 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <u>RASEHIY</u><br><u>SYLSWYQQKPGKAPKLLIYNAKTLAEGV</u><br>PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC<br><u>QHHFGSPLTFGQGTRLEIK</u>                      |
| 31C6_Humz_L2<br>(con las CDR subrayadas)  | 151 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <u>RASEHIY</u><br><u>SYLSWYQQKPGKAPKLLIYNAKTLAEGV</u><br>PSRFSGSGSGTQFTLTISLQPEDFATYYC<br><u>QHHFGSPLTFGQGTRLEIK</u>                      |
| 31C6_Humz_L3 (con las CDR<br>subrayadas)  | 152 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <u>RASEHIY</u><br><u>SYLSWYQQKPGKVPKLLIYNAKTLAEGV</u><br>PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYC<br><u>QHHFGSPLTFGQGTRLEIK</u>                      |
| 31C6_Humz_L4 (con las CDR<br>subrayadas)  | 153 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <u>RASEHIY</u><br><u>SYLSWYQQKPGKVPKLLIYNAKTLAEGV</u><br>PSRFSGSGSGTQFTLTISLQPEDVATYYC<br><u>QHHFGSPLTFGQGTRLEIK</u>                      |
| 31C6 H – variante de CDR2                 | 154 | YIDPYNDGAKYAQKFQG                                                                                                                                                 |
| 31C6 H – variante de CDR2                 | 155 | YIDPYNDGAKYSQKFQG                                                                                                                                                 |
| 18G10 – secuencia de VH                   | 156 | QVQLMESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFPL<br>TSYTVHWVRQPPGKGLEWIGAIWSSGST<br>DYN <del>SALKSRLNINRDSSKSQVFLKMNSL</del>                                                          |

|                                 |     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|---------------------------------|-----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                 |     | QTEDTAIFYCTKSGWAFFDYWGQGMV<br>TVSS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 18G10 – secuencia de VL         | 157 | DIQMTQSPSLLSASVGDRVTLNCIASQNI<br>YKSLAWYQLKLGEAPKLLIYNANSLQAG<br>IPSRFSGSGSGTDFALTISGLQPEDVATYF<br>CQQYSGGYTFGAGTKLELK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 11A11 – secuencia de VH         | 158 | EVQLVESGGDLVQPGRSLKISCVASGFTF<br>SDYYMAWVRLAPQKGLEWVASISYEGS<br>RTHYGDSVRGRFIISRDNPKNILYLQMNS<br>LGSEDTATYFCARHTGTLDWL VYWGQG<br>TLVIVSS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 11A11 – secuencia de VL         | 159 | NIVMAQSPKSMSSISAGDRVMTNCKASQN<br>VDNNIAWYQQKPGQSPKLLIFYASNRY<br>GVPDRFTGGGYGTDFTLTIKSVQAEDAA<br>FYYCQRIYNFPTFGSGTKLEIK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 14A6 H - CDR3<br>CONSENSO       | 160 | MPSFITLASLSTXEGYFDF<br><br>X= W, F, Y, I, V, L                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 14A6 L - CDR2<br>CONSENSO       | 161 | YAX <sub>1</sub> X <sub>2</sub> LQT<br><br>X <sub>1</sub> = N, S, T, G, D<br><br>X <sub>2</sub> = S, N, S, T, Y, Q                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 14A6 L - CDR3<br>CONSENSO       | 162 | QQYYSGXT<br><br>X= W, F, Y, I, V, L                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 14A6 VH<br>PARENTAL<br>CONSENSO | 163 | EVQLQX <sub>1</sub> SGX <sub>2</sub> GLX <sub>3</sub> KPX <sub>4</sub> X <sub>5</sub> X <sub>6</sub> LSLTCX <sub>7</sub> V<br>X <sub>8</sub> GX <sub>30</sub> SIX <sub>31</sub> <u>SDYWG</u> WX <sub>9</sub> RX <sub>10</sub> X <sub>11</sub> PGX <sub>12</sub> X <sub>13</sub><br>X <sub>14</sub> EWX <sub>15</sub> <u>GFITYSGSTSYNPSLKS</u> RX <sub>16</sub> X <sub>17</sub> I<br>X <sub>18</sub> X <sub>19</sub> DTSKNQFX <sub>20</sub> LX <sub>21</sub> LX <sub>22</sub> SVTX <sub>23</sub> X <sub>24</sub> DT<br>AX <sub>25</sub> Y<br><br>X <sub>26</sub> CARMPSFITLASLSTX <sub>27</sub> <u>EGYFDF</u> WGX <sub>32</sub><br>GTX <sub>28</sub> X <sub>29</sub> TVSS<br><br>X <sub>1</sub> = E o Q |

|  |  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|--|--|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  |  | $X_2 = P \circ A$<br>$X_3 = V \circ L$<br>$X_4 = S \circ P$<br>$X_5 = Q \circ E \circ G$<br>$X_6 = S \circ T$<br>$X_7 = S \circ T \circ A$<br>$X_8 = T \circ S$<br>$X_9 = I \circ V$<br>$X_{10} = K \circ Q$<br>$X_{11} = F \circ P$<br>$X_{12} = N \circ K$<br>$X_{13} = K \circ G$<br>$X_{14} = M \circ L$<br>$X_{15} = M \circ I$<br>$X_{16} = I \circ V$<br>$X_{17} = S \circ T$<br>$X_{18} = T \circ S$<br>$X_{19} = R \circ V$<br>$X_{20} = F \circ S$<br>$X_{21} = Q \circ K$<br>$X_{22} = H \circ S$<br>$X_{23} = T \circ A$<br>$X_{24} = D \circ A$<br>$X_{25} = T \circ V$<br>$X_{26} = S \circ Y,$<br>$X_{27} = W, F, Y, I, V \circ L$<br>$X_{28} = M, V, L, A, R, N, P, Q, E, G, I, H, K, F,$ |
|--|--|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|                                |     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|--------------------------------|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                |     | <p>S, T, W o Y</p> <p>X<sub>29</sub> = V, T o L</p> <p>X<sub>30</sub> = S o G o Y</p> <p>X<sub>31</sub> = A o S</p> <p>X<sub>31</sub> = P o Q</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 14A6 VH HUMANIZADA<br>CONSENSO | 164 | <p>EVQLQX<sub>1</sub>SGX<sub>2</sub>GLX<sub>3</sub>KPX<sub>4</sub>X<sub>5</sub>TLSLTCX<sub>6</sub>VX<sub>7</sub>GX<sub>8</sub>SIX<sub>9</sub>SDYWGWX<sub>10</sub>RX<sub>11</sub>X<sub>12</sub>PGKX<sub>13</sub>X<sub>14</sub>EWX<sub>15</sub>GFITYSGSTSYNPSLKSRX<sub>16</sub>TISX<sub>17</sub>DTSKNQFSLKLX<sub>18</sub>SVTAX<sub>19</sub>DTAVYYCARM<u>PSFITLASLSTX<sub>20</sub>EGYFDFWGQGT</u>X<sub>21</sub>X<sub>22</sub>T VSS</p> <p>X<sub>1</sub> = E o Q</p> <p>X<sub>2</sub> = P o A</p> <p>X<sub>3</sub> = V o L</p> <p>X<sub>4</sub> = S o P</p> <p>X<sub>5</sub> = E o G</p> <p>X<sub>6</sub> = T o A o S</p> <p>X<sub>7</sub> = S o T</p> <p>X<sub>8</sub> = G o S o Y</p> <p>X<sub>9</sub> = S o A</p> <p>X<sub>10</sub> = I o V</p> <p>X<sub>11</sub> = Q o K</p> <p>X<sub>12</sub> = P o F</p> <p>X<sub>13</sub> = G o K</p> <p>X<sub>14</sub> = L o M</p> <p>X<sub>15</sub> = I o M</p> <p>X<sub>16</sub> = V o I</p> |

|                                 |     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|---------------------------------|-----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                 |     | $X_{17} = V \text{ o } R$<br>$X_{18} = S \text{ o } H$<br>$X_{19} = A \text{ o } D$<br>$X_{20} = W, F, Y, I, V, L$<br>$X_{21} = M, V, L, A, R, N, P, Q, E, G, I, H, K, F, S, T, W \text{ o } Y$<br>$X_{22} = V, T \text{ o } L$                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 14A6 VL<br>PARENTAL<br>CONSENSO | 165 | <p> <math>DIQMTQSPSX_1LSASVGDRVTX_2X_3CKASQ</math><br/> <math>SIHKNLAWYQQKX_4GX_5X_{15}PKX_6LIYYAX_7</math><br/> <math>X_8LQTGX_9PSRFSGSGSGTDFTLTISX_{10}LQP</math><br/> <math>EDX_{11}ATYX_{12}CQYYSGX_{13}TFGGGKVE</math><br/> <math>X_{14}K</math> </p> $X_1 = L \text{ o } S$<br>$X_2 = L \text{ o } I$<br>$X_3 = N \text{ o } T$<br>$X_4 = L \text{ o } P$<br>$X_5 = E \text{ o } K$<br>$X_6 = F \text{ o } L$<br>$X_7 = N, S, T, G \text{ o } D$<br>$X_8 = S, N, T, Y \text{ o } Q$<br>$X_9 = I \text{ o } V$<br>$X_{10} = G \text{ o } S$<br>$X_{11} = V \text{ o } F$<br>$X_{12} = F \text{ o } Y$<br>$X_{13} = W, F, Y, I, V \text{ o } L$<br>$X_{14} = L \text{ o } I$<br>$X_{15} = A \text{ o } V$ |

|                                 |     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|---------------------------------|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 14A6 VL HUMANIZADA<br>CONSENSO  | 166 | <p>DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCKASQSIH<br/> <u>KNLA</u>WYQQKPGKX<sub>6</sub>PKX<sub>1</sub>LIYYAX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>LQ<br/> <u>TGX</u><sub>4</sub>PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDX<sub>7</sub>A<br/>         TYYCQQYYSGX<sub>5</sub>TFGGGTKVEIK</p> <p>X<sub>1</sub> = L o F</p> <p>X<sub>2</sub> = N, S, T, G o D</p> <p>X<sub>3</sub> = S, N, T, Y o Q</p> <p>X<sub>4</sub> = V o I</p> <p>X<sub>5</sub> = W, F, Y, I, V o L</p> <p>X<sub>6</sub> = A o V</p> <p>X<sub>7</sub> = F o V</p>                                                                                                                                                              |
| 31C6 H -CDR2<br>CONSENSO        | 167 | <p>YIDPYNX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>AKYX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>KFX<sub>5</sub>G</p> <p>X<sub>1</sub>= D, R, L, K, F, S, Y o V</p> <p>X<sub>2</sub>= G, R, N, Q, E, L K, S, Y o V</p> <p>X<sub>3</sub>= N, A o S</p> <p>X<sub>4</sub>= E o Q</p> <p>X<sub>5</sub>= K o Q</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 31C6 L – CDR2<br>CONSENSO       | 168 | <p>X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>KTAE</p> <p>X<sub>1</sub>= N, A, V, W, S, T, R, H G, I o V</p> <p>X<sub>2</sub>= A, N, I, L, T o V</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 31C6 VH<br>PARENTAL<br>CONSENSO | 169 | <p>EVQLX<sub>1</sub>QSGX<sub>2</sub>EX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>KPGX<sub>5</sub>SVKX<sub>6</sub>SCKAS<br/>         GYTFSSYVMHWVX<sub>7</sub>QX<sub>8</sub>PGQX<sub>9</sub>LEWIGYI<br/> <u>DPYN</u></p> <p><u>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub>AKYX<sub>12</sub>X<sub>13</sub>KFX<sub>14</sub>GX<sub>15</sub>X<sub>16</sub>TLTX<sub>17</sub>DX<sub>18</sub></u><br/> <u>SX<sub>19</sub>STX<sub>20</sub>YMELSX<sub>21</sub>LX<sub>22</sub>SX<sub>23</sub>DX<sub>24</sub>X<sub>25</sub>VY</u><br/>         YCARGGPYGX<sub>26</sub><u>YFDV</u>WGX<sub>27</sub>GTTVTVSS</p> <p>X<sub>1</sub>= Q o V</p> <p>X<sub>2</sub>= P o A</p> <p>X<sub>3</sub>=V o L</p> |

|                       |     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|-----------------------|-----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                       |     | $X_4 = V \circ K$<br>$X_5 = S \circ A$<br>$X_6 = M \circ V$<br>$X_7 = K \circ R$<br>$X_8 = K \circ A$<br>$X_9 = G \circ R$<br>$X_{10} = D, R, L, K, F, S, Y \circ V$<br>$X_{11} = G, R, N, Q, E, L, K, S, Y \circ V$<br>$X_{12} = N, A \circ S$<br>$X_{13} = E \circ Q$<br>$X_{14} = K \circ Q$<br>$X_{15} = R \circ K$<br>$X_{16} = A \circ V$<br>$X_{17} = S \circ R$<br>$X_{18} = K \circ T$<br>$X_{19} = S, I, A \circ T$<br>$X_{20} = A \circ V$<br>$X_{21} = R \circ S$<br>$X_{22} = T \circ R$<br>$X_{23} = D \circ E$<br>$X_{24} = S \circ T$<br>$X_{25} = A \circ V$<br>$X_{26} = W, A, D, E, F, G, I, K, N, Q, R, S, T, V \circ Y$<br>$X_{27} = A \circ Q$ |
| 31C6 VH<br>HUMANIZADA | 170 | EVQLVQSGAEVKKPGX <sub>1</sub> SVKVSCKASGY<br>TFSS <u>Y</u> VMH <u>W</u> VVRQAPGQX <sub>2</sub> LEWIG<br><u>Y</u> IDPYNX <sub>3</sub> X <sub>4</sub> AKYX <sub>5</sub> X <sub>5</sub> KFX <sub>7</sub> <u>GRVTLTX</u> <sub>8</sub> DX                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |

|                                 |     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|---------------------------------|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CONSENSO                        |     | <p><u>9SX<sub>10</sub>STX<sub>11</sub>YMELSX<sub>12</sub>LRSX<sub>13</sub>DT</u><br/> <u>X<sub>14</sub>VYYCARGGPYGX<sub>15</sub>YFDVWGQGTTVT</u><br/> VSS</p> <p>X<sub>1</sub>= A o S</p> <p>X<sub>2</sub>= R o G</p> <p>X<sub>3</sub>= D, R, L, K, F, S, Y o V</p> <p>X<sub>4</sub>= G, R, N, Q, E, L K, S, Y o V</p> <p>X<sub>5</sub>= N, A o S</p> <p>X<sub>6</sub>= E o Q</p> <p>X<sub>7</sub>= K o Q</p> <p>X<sub>8</sub>= R o S</p> <p>X<sub>9</sub>= T o K</p> <p>X<sub>10</sub>= A, T o I</p> <p>X<sub>11</sub>= A o V</p> <p>X<sub>12</sub>= S o R</p> <p>X<sub>13</sub>= E o D</p> <p>X<sub>14</sub>= A o V</p> <p>X<sub>15</sub>= W, A, D, E, F, G, I, K, N, Q, R, S, T, V o Y</p> |
| 31C6 VL<br>PARENTAL<br>CONSENSO | 171 | <p><u>DIQMTQSPX<sub>1</sub>SLSASVGX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>VTITCRASEH</u><br/> <u>IYSYLSWYQQKX<sub>4</sub>GKX<sub>5</sub>PX<sub>6</sub>LLX<sub>7</sub>YX<sub>8</sub>X<sub>9</sub>KT</u><br/> <u>LAEGVPSRFSGSGSGTX<sub>10</sub>FX<sub>11</sub>LX<sub>12</sub>IX<sub>13</sub>SL</u><br/> <u>QPEDX<sub>14</sub>X<sub>15</sub>TYYCQH HFGSPLTFGX<sub>16</sub>GTX<sub>17</sub>LEX<sub>18</sub>K</u></p> <p>X<sub>1</sub>= A o S</p> <p>X<sub>2</sub>= E o D</p> <p>X<sub>3</sub>= T o R</p> <p>X<sub>4</sub>= Q o P</p> <p>X<sub>5</sub>= S, A o V</p>                                                                                                                                             |

|                                       |     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|---------------------------------------|-----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                       |     | $X_6 = Q \text{ o } K$<br>$X_7 = V \text{ o } I$<br>$X_8 = N, A, Y, W, S, T, I \text{ o } V$<br>$X_9 = A, N, I, L, T \text{ o } V$<br>$X_{10} = Q \text{ o } D$<br>$X_{11} = S \text{ o } T$<br>$X_{12} = K \text{ o } T$<br>$X_{13} = N \text{ o } S$<br>$X_{14} = F \text{ o } V$<br>$X_{15} = G \text{ o } A$<br>$X_{16} = A \text{ o } Q$<br>$X_{17} = T \text{ o } R$<br>$X_{18} = L \text{ o } I$ |
| 31C6 L – VL<br>HUMANIZADA<br>CONSENSO | 172 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <u>RASEHIY</u><br>SYLSWYQQKPGKX <sub>1</sub> PKLLIY<br><u>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>KT</u> LAEGVPSRFGSGSGTX <sub>4</sub> FTLTIS<br>LQPEDX <sub>5</sub> ATYYC <u>QH</u> HFGSPLTFGQGTRLE<br>IK<br>$X_1 = A \text{ o } V$<br>$X_2 = N, A, Y, W, S, T, I \text{ o } V$<br>$X_3 = A, N, I, L, T \text{ o } V$<br>$X_4 = D \text{ o } Q$<br>$X_5 = F \text{ o } V$                    |
| 31C6 H -CDR3<br>CONSENSO              | 173 | GGPYGXYFDV<br>$X_{15} = W, A, D, E, F, G, I, K, N, Q, R, S, T, V \text{ o } Y$                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 31C6 H -CDR3                          | 174 | GGPYGAYFDV                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |

|              |     |            |
|--------------|-----|------------|
| VARIANTE     |     |            |
| 31C6 H -CDR3 | 175 | GGPYGDYFDV |
| VARIANTE     |     |            |
| 31C6 H -CDR3 | 176 | GGPYGEYFDV |
| VARIANTE     |     |            |
| 31C6 H -CDR3 | 177 | GGPYGFYFDV |
| VARIANTE     |     |            |
| 31C6 H -CDR3 | 178 | GGPYGGYFDV |
| VARIANTE     |     |            |
| 31C6 H -CDR3 | 179 | GGPYGIYFDV |
| VARIANTE     |     |            |
| 31C6 H -CDR3 | 180 | GGPYGKYFDV |
| VARIANTE     |     |            |
| 31C6 H -CDR3 | 181 | GGPYGNYFDV |
| VARIANTE     |     |            |
| 31C6 H -CDR3 | 182 | GGPYGQYFDV |
| VARIANTE     | 183 | GGPYGRYFDV |
| 31C6 H -CDR3 | 184 | GGPYGSYFDV |
| VARIANTE     | 185 | GGPYGTYFDV |
| 31C6 H -CDR3 | 186 | GGPYGVYFDV |
| VARIANTE     | 187 | GGPYGYFDV  |

En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este comprende tres CDR de la cadena ligera de CDRL1, CDRL2 y CDRL3 y/o tres CDR de la cadena pesada de CDRH1, CDRH2 y CDRH3.

- 5 En una forma de realización, el anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este comprende una CDRH1 que comprende la SEQ ID NO:35, una CDRH2 que comprende la SEQ ID NO:36, una CDRH3 que comprende cualquiera de las SEQ ID NO:37, 103, 104, 105, 106, 107, o 160, una CDRL1 que comprende la SEQ ID NO:38, una CDRL2 que comprende

cualquiera de las SEQ ID NO:39, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, o 69, y una CDRL3 que comprende cualquiera de las SEQ ID NO:40, 98, 99, 100, 101, 102, o 162.

En otra forma de realización, el anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este comprende una CDRH1 que comprende la SEQ ID NO:81, una CDRH2 que  
5 comprende la SEQ ID NO:82, una CDRH3 que comprende la SEQ ID NO:83, una CDRL1 que comprende la SEQ ID NO:84, una CDRL2 que comprende la SEQ ID NO:85, y una CDRL3 que comprende la SEQ ID NO:86.

En otra forma de realización, el anticuerpo anti-TIGIT o el fragmento de fijación al antígeno de este comprende una CDRH1 que comprende la SEQ ID NO:108, una CDRH2 que  
10 comprende cualquiera de las SEQ ID NO:109, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 154, 155 o 167, una CDRH3 que comprende cualquiera de las SEQ ID NO:110, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186 o 187, una CDRL1 que comprende la SEQ ID NO:111, una CDRL2 que comprende cualquiera de las SEQ ID NO:112, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142 o 168, y una CDRL3 que  
15 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:113.

En una forma de realización, el anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este comprende una CDRH1 que comprende la SEQ ID NO:35, una CDRH2 que comprende la SEQ ID NO:36, una CDRH3 que comprende la SEQ ID NO:37, una CDRL1 que comprende la SEQ ID NO:38, una CDRL2 que comprende la SEQ ID NO:39, y una CDRL3 que  
20 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:40.

En una forma de realización, el anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este comprende una CDRH1 que comprende la SEQ ID NO:108, una CDRH2 que comprende cualquiera de las SEQ ID NO:109, 154 o 145, una CDRH3 que comprende la SEQ ID NO:110, una CDRL1 que comprende la SEQ ID NO:111, una CDRL2 que comprende la SEQ ID  
25 NO:112, y una CDRL3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:113.

En otra forma de realización, el anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este comprende una CDRH1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:108, una CDRH2 que comprende la SEQ ID NO: 154, una CDRH3 que comprende la SEQ ID NO:110, una CDRL1 que comprende la SEQ ID NO:111, una CDRL2 que comprende  
30 la SEQ ID NO:112, y una CDRL3 que comprende la SEQ ID NO:113.

En una forma de realización, el anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este comprende una región de la cadena pesada variable y una región variable de la cadena ligera variable. En una forma de realización, el anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este comprende una región de la cadena pesada variable que comprende la SEQ ID  
35 NO:41 y una región de la cadena ligera variable que comprende la SEQ ID NO:42.

En una forma de realización, el anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este comprende una región de la cadena pesada variable que comprende la SEQ ID NO:87 y una región de la cadena ligera variable que comprende la SEQ ID NO:88.

En una forma de realización, el anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este comprende una región de la cadena pesada variable que comprende la SEQ ID NO: 114 y una región de la cadena ligera variable que comprende la SEQ ID NO:115.

5 En una forma de realización, el anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este comprende una región de la cadena pesada variable que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 43-58, 65-75 y 87 y una región de la cadena ligera variable que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 59-64, 76-80 y 88.

10 En una forma de realización, el anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este comprende una región de la cadena pesada variable que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 144-149 y una región de la cadena ligera variable que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 150-153.

15 En una forma de realización, el anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este comprende una región de la cadena pesada variable que comprende una región de la cadena pesada variable que comprende la SEQ ID NO:148 y una región de la cadena ligera variable que comprende la SEQ ID NO:152.

En una forma de realización, el anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este comprende una región de la cadena pesada variable que comprende la SEQ ID NO:147 y una región de la cadena ligera variable que comprende la SEQ ID NO:150.

20 En una forma de realización, el anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este comprende una región de la cadena pesada variable que comprende la SEQ ID NO:148 y una región de la cadena ligera variable que comprende la SEQ ID NO:153.

En una forma de realización, el anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este comprende una región de la cadena pesada variable que comprende la SEQ ID NO:163 y una región de la cadena ligera variable que comprende la SEQ ID NO:165.

25 En una forma de realización, el anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este comprende una región de la cadena pesada variable que comprende la SEQ ID NO:169 y una región de la cadena ligera variable que comprende la SEQ ID NO:171.

30 En una forma de realización, el anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este comprende una región de la cadena pesada variable que comprende la SEQ ID NO:164 y una región de la cadena ligera variable que comprende la SEQ ID NO:166.

En una forma de realización, el anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este comprende una región de la cadena pesada variable que comprende la SEQ ID NO:170 y una región de la cadena ligera variable que comprende la SEQ ID NO:172.

35 TABLA 5. Secuencias de anticuerpos anti-TIGIT de ejemplo

| Descripción | SEQ ID NO | SECUENCIA |
|-------------|-----------|-----------|
| 14D7 H -    | 188       | GAWMD     |

|                                                     |     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|-----------------------------------------------------|-----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CDR1                                                |     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 14D7 H -<br>CDR2                                    | 189 | EIRTKVNNHATNYGESVKG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 14D7 H -<br>CDR3                                    | 190 | ALYDGFYFDY                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 14D7 L -<br>CDR1                                    | 191 | SASSSVSSGYLY                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 14D7 L -<br>CDR2                                    | 192 | GTSTLAS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 14D7 L -<br>CDR3                                    | 193 | HQWSSFPYT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 14D7 VH<br>PARENTAL                                 | 194 | EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCVASGFTFSGAWMDWVRQSP<br>EKGLEWVAEIRTKVNNHATNYGESVKGRFTISRDDSKSSVYLQ<br>MNNLRAEDSGIYYCRGALYDGFYFDYWGQGTTTLTVSS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 14D7 VL<br>PARENTAL                                 | 195 | QIVLTQSPAIMASAPGEKVNLTCSASSSVSSGYLYWYQQKPGSS<br>PKLWIYGTSTLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISNMEAEDAASYF<br>CHQWSSFPYTFGGGTKLEMK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Hu14D7 VH<br>Secuencia<br>de consenso<br>humanizado | 196 | EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSGAX <sub>1</sub> X <sub>2</sub> DWVRQAP<br>GKGLEWVAEIRTKVNNHATNYGESVKGRFTISRDX <sub>3</sub> SKX <sub>4</sub> X <sub>5</sub> V<br>YLQX <sub>6</sub> X <sub>7</sub> X <sub>8</sub> LRAEDX <sub>9</sub> AVYYCRGALYX <sub>10</sub> X <sub>11</sub> FYFDYWGQGTTLTVSS<br><br>X <sub>1</sub> = W, A, R, N, D, Q, E, G, H, I, L, K, F, P, S, T, Y, V<br>X <sub>2</sub> = M, V, L, I, G, A, S, T<br>X <sub>3</sub> = D, A, R, N, Q, E, G, H, I, L, K, F, S, T, Y, V<br>X <sub>4</sub> = S, N<br>X <sub>5</sub> = T, S<br>X <sub>6</sub> = M, L<br>X <sub>7</sub> = N, S<br>X <sub>8</sub> = S, N<br>X <sub>9</sub> = T, S<br>X <sub>10</sub> = D, A, R, N, Q, E, G, H, I, L, K, F, P, S, T, W, Y, V<br>X <sub>11</sub> = G, A, R, N, D, Q, E, H, I, L, K, F, P, S, T, W, Y, V |
| Hu14D7 VH1<br>(Cadena VH<br>humanizada)             | 197 | EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSGAWMDWVRQAP<br>GKGLEWVAEIRTKVNNHATNYGESVKGRFTISRDDSKSTVYL<br>QMNSLRAEDTAVYYCRGALYDGFYFDYWGQGTTLTVSS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| Hu14D7 VH2<br>(Cadena VH                            | 198 | EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSGAWMDWVRQAP<br>GKGLEWVAEIRTKVNNHATNYGESVKGRFTISRDDSKSSVYL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |

|                                                     |     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|-----------------------------------------------------|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| humanizada)                                         |     | QMNSLRAEDTAVYYCRG <u>ALYDGFYFDY</u> WGQGT <u>LVTVSS</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Hu14D7 VH3<br>(Cadena VH<br>humanizada)             | 199 | EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSGAWMDWVRQAP<br>GKGLEWVAE <u>IRTKVNNHATNYGESVKGRFTISRDDSKNTVYL</u><br>QMNSLRAEDTAVYYCRG <u>ALYDGFYFDY</u> WGQGT <u>LVTVSS</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Hu14D7 VL<br>Secuencia<br>de consenso<br>humanizado | 200 | EIVLTQSPATLSLSPGERAX <sub>1</sub> LSC <u>SASSSVSSGYLYWYQQKPGQ</u><br>APX <sub>7</sub> LX <sub>2</sub> IYGTSTLASGX <sub>8</sub> PARFSGSGSGTDYTLTISX <sub>3</sub> EPEDX <sub>4</sub> A<br>VYYCHQX <sub>5</sub> SSFPYTFGQGTKLEX <sub>6</sub> K<br>X <sub>1</sub> = T, S<br>X <sub>2</sub> = W, A, R, N, D, Q, E, G, H, I, L, K, F, P, S, T, Y, V<br>X <sub>3</sub> = L, V, I<br>X <sub>4</sub> = F, V, L, I, T<br>X <sub>5</sub> = W, A, R, N, D, Q, E, G, H, I, L, K, F, P, S, T, Y, V<br>X <sub>6</sub> = I, L<br>X <sub>7</sub> = K, R<br>X <sub>8</sub> = V, I |
| Hu14D7V L1<br>(Cadena VL<br>humanizada)             | 201 | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC <u>SASSSVSSGYLYWYQQKPGQA</u><br>PKLWIYGTSTLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISLEPEDFAVYY<br>CHQWSSFPYTFGQGTKLEIK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Hu14D7V L2<br>(Cadena VL<br>humanizada)             | 202 | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC <u>SASSSVSSGYLYWYQQKPGQA</u><br>PRLWIYGTSTLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISLEPEDFAVYY<br>CHQWSSFPYTFGQGTKLEIK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Hu14D7V L3<br>(Cadena VL<br>humanizada)             | 203 | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC <u>SASSSVSSGYLYWYQQKPGQA</u><br>PRLWIYGTSTLASGIPARFSGSGSGTDYTLTISLEPEDFAVYYC<br>HQWSSFPYTFGQGTKLEIK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 26B10 H -<br>CDR1                                   | 204 | EFTMH                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 26B10 H -<br>CDR2                                   | 205 | GLKPDNGGISYNQKFKG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 26B10 H -<br>CDR3                                   | 206 | GAYRYDADY                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 26B10 L -<br>CDR1                                   | 207 | KASQDVKTAVA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 26B10 L -<br>CDR2                                   | 208 | SASYRNT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 26B10 L -<br>CDR3                                   | 209 | QQHYSTPFT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 26B10 VH<br>PARENTAL                                | 210 | EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTEFTMHVWVKQSHG<br>KSLEWIGGLKPDNGGISYNQKFKGRATLAVDKSSNTAYMELR                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |

|                                                    |     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|----------------------------------------------------|-----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                    |     | SLTSEDSAVYYCARGAYYRYDADYWGQGTTLTVSS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 26B10 VL<br>PARENTAL                               | 211 | DIVLTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVKTAVAWYQQKSGQ<br>SPKLLIYSASYRNTGVPDRFTGSGSGTDFTFTIDSVQAEDLAVY<br>FCQQHYSTPFTFGTGKLELK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 26B10 VH<br>Secuencia<br>de consenso<br>humanizado | 212 | EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKX <sub>1</sub> SGYTFTEFTX <sub>2</sub> HWVX <sub>3</sub> QAP<br>GKGLEWIGGLKPD <sub>4</sub> X <sub>5</sub> GISYNQKFKGRATLTVDX <sub>6</sub> STX <sub>7</sub> TAYX<br>8ELSSLRSED <sub>9</sub> AVYYCARGAYYRYX <sub>10</sub> X <sub>11</sub> DYWGQGTTLTVSS<br>X <sub>1</sub> = T, V<br>X <sub>2</sub> = M, V, L, I, G, A, S, T<br>X <sub>3</sub> = K, R<br>X <sub>4</sub> = N, A, R, D, Q, E, G, H, I, L, K, F, P, S, T, W, Y, V<br>X <sub>5</sub> = G, A, R, N, D, Q, E, H, I, L, K, F, P, S, T, W, Y, V<br>X <sub>6</sub> = k, t, d, s<br>X <sub>7</sub> = N, S<br>X <sub>8</sub> = M, V, L, I, G, A, S, T<br>X <sub>9</sub> = T, S<br>X <sub>10</sub> = D, A, R, N, Q, E, G, H, I, L, K, F, P, S, T, W, Y, V<br>X <sub>11</sub> = A, R, N, D, Q, E, G, H, I, L, K, F, P, S, T, W, Y, V, M |
| Hu26B10 VH1<br>(Cadena VH<br>humanizada)           | 213 | EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKTSGYTFTEFTMHWVKQAPG<br>KGLEWIGGLKPDNGGISYNQKFKGRATLTVDKSTNTAYMELS<br>SLRSED <sub>9</sub> AVYYCARGAYYRYDADYWGQGTTLTVSS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Hu26B10 VH2<br>(Cadena VH<br>humanizada)           | 214 | EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKTSGYTFTEFTMHWVRQAPG<br>KGLEWIGGLKPDNGGISYNQKFKGRATLTVDKSTSTAYMELSS<br>LRSED <sub>9</sub> AVYYCARGAYYRYDADYWGQGTTLTVSS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Hu26B10 VH3<br>(Cadena VH<br>humanizada)           | 215 | EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKVSGYTFTEFTMHWVRQAPG<br>KGLEWIGGLKPDNGGISYNQKFKGRATLTVD <sub>1</sub> STSTAYMELSS<br>LRSED <sub>9</sub> AVYYCARGAYYRYDADYWGQGTTLTVSS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 26B10 VL<br>Secuencia de<br>consenso<br>humanizado | 216 | DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVKTAVAWYQQKPGK<br>APKLLIYSASYRX <sub>1</sub> X <sub>2</sub> GVP<br>X <sub>3</sub> RFSGSGSGTDFTX <sub>4</sub> TISSLQPEDFATYYCQQHYSTPFTFGQGT<br>KLEIK<br>X <sub>1</sub> = N, Q, D, E<br>X <sub>2</sub> = T, S, A<br>X <sub>3</sub> = D, S<br>X <sub>4</sub> = F, L                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Hu26B10 VL1                                        | 217 | DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVKTAVAWYQQKPGK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |

|                                                 |     |                                                                                                                                                     |
|-------------------------------------------------|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (Cadena VL humanizada)                          |     | APKLLIY <u>S</u> ASYRNTGVPD <u>R</u> FSGSGSGTDFTFTISLQPEDFATYY<br>CQQHYSTPFTFGQGTKLEIK                                                              |
| Hu26B10 VL2<br>(Cadena VL humanizada)           | 218 | DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDVKTAVAWYQQKPGK<br>APKLLIY <u>S</u> ASYRNTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDFATYY<br>CQQHYSTPFTFGQGTKLEIK                        |
| Hu26B10 VL3<br>(Cadena VL humanizada)           | 219 | DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDVKTAVAWYQQKPGK<br>APKLLIY <u>S</u> ASYRNTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY<br>CQQHYSTPFTFGQGTKLEIK                        |
| 14D7 H –<br>CDR3<br>(D104E)                     | 220 | ALYEGFYFDY                                                                                                                                          |
| 14D7 H –<br>CDR3<br>(G105A)                     | 221 | ALYDAFYFDY                                                                                                                                          |
| 14D7 H –<br>CDR3 (G105S)                        | 222 | ALYDSFYFDY                                                                                                                                          |
| Hu14D7 VH1<br>(Cadena VH humanizada)<br>(D104E) | 223 | EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFS <u>G</u> AWMDWVRQAP<br>GKGLEWVAEIRTKVNNHATNYGESVKGRFTISRDDSKSTVYL<br>QMNSLRAEDTAVYYCRG <u>ALYEGFYFDY</u> WGQGTLLTVSS |
| Hu14D7 VH1<br>(Cadena VH humanizada)<br>(G105A) | 224 | EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFS <u>G</u> AWMDWVRQAP<br>GKGLEWVAEIRTKVNNHATNYGESVKGRFTISRDDSKSTVYL<br>QMNSLRAEDTAVYYCRG <u>ALYDAFYFDY</u> WGQGTLLTVSS |
| Hu14D7 VH1<br>(Cadena VH humanizada)<br>(G105S) | 225 | EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFS <u>G</u> AWMDWVRQAP<br>GKGLEWVAEIRTKVNNHATNYGESVKGRFTISRDDSKSTVYL<br>QMNSLRAEDTAVYYCRG <u>ALYDSFYFDY</u> WGQGTLLTVSS |
| Hu14D7 VH2<br>(Cadena VH humanizada)<br>(D104E) | 226 | EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFS <u>G</u> AWMDWVRQAP<br>GKGLEWVAEIRTKVNNHATNYGESVKGRFTISRDDSKSSVYL<br>QMNSLRAEDTAVYYCRG <u>ALYDEFYFDY</u> WGQGTLLTVSS |
| Hu14D7 VH2<br>(Cadena VH humanizada)<br>(G105A) | 227 | EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFS <u>G</u> AWMDWVRQAP<br>GKGLEWVAEIRTKVNNHATNYGESVKGRFTISRDDSKSSVYL<br>QMNSLRAEDTAVYYCRG <u>ALYDAFYFDY</u> WGQGTLLTVSS |
| Hu14D7 VH2<br>(Cadena VH                        | 228 | EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFS <u>G</u> AWMDWVRQAP<br>GKGLEWVAEIRTKVNNHATNYGESVKGRFTISRDDSKSSVYL                                                    |

|                                                    |     |                                                                                                                                                                |
|----------------------------------------------------|-----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| humanizada)<br>(G105S)                             |     | QMNSLRAEDTAVYYCRG <u>ALYDSFYFDY</u> WGQGT <del>L</del> TVSS                                                                                                    |
| Hu14D7 VH3<br>(Cadena VH<br>humanizada)<br>(D104E) | 229 | EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSGAWMDWVRQAP<br>GKGLEWVAE <u>IRTKVNNHATNYGESVKGRFTISRDDSKNTVYL</u><br>QMNSLRAEDTAVYYCRG <u>ALYEGFYFDY</u> WGQGT <del>L</del> TVSS |
| Hu14D7 VH3<br>(Cadena VH<br>humanizada)<br>(G105A) | 230 | EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSGAWMDWVRQAP<br>GKGLEWVAE <u>IRTKVNNHATNYGESVKGRFTISRDDSKNTVYL</u><br>QMNSLRAEDTAVYYCRG <u>ALYDAFYFDY</u> WGQGT <del>L</del> TVSS |
| Hu14D7 VH3<br>(Cadena VH<br>humanizada)<br>(G105S) | 231 | EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSGAWMDWVRQAP<br>GKGLEWVAE <u>IRTKVNNHATNYGESVKGRFTISRDDSKNTVYL</u><br>QMNSLRAEDTAVYYCRG <u>ALYDSFYFDY</u> WGQGT <del>L</del> TVSS |
| 14D7 L -<br>CDR3<br>(W92A)                         | 232 | HQASSFPYT                                                                                                                                                      |
| 14D7 L -<br>CDR3(W92D)                             | 233 | HQDSSFPYT                                                                                                                                                      |
| 14D7 L -<br>CDR3(W92E)                             | 234 | HQESSFPYT                                                                                                                                                      |
| 14D7 L -<br>CDR3(W92F)                             | 235 | HQFSSFPYT                                                                                                                                                      |
| 14D7 L -<br>CDR3(W92G)                             | 236 | HQGSSFPYT                                                                                                                                                      |
| 14D7 L -<br>CDR3<br>(W92H)                         | 237 | HQHSSFPYT                                                                                                                                                      |
| Hu14D7V L1<br>(cadena VL<br>humanizada)<br>(W92A)  | 238 | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC <u>SASSSVSSGYLY</u> WYQQKPGQA<br>PKLWIYGTSTLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISILEPEDFAVYY<br><u>CHQASSFPYT</u> FGQGTKLEIK                          |
| Hu14D7V L1<br>(cadena VL<br>humanizada)<br>(W92D)  | 239 | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC <u>SASSSVSSGYLY</u> WYQQKPGQA<br>PKLWIYGTSTLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISILEPEDFAVYY<br><u>CHQDSSFPYT</u> FGQGTKLEIK                          |
| Hu14D7V L1<br>(cadena VL                           | 240 | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC <u>SASSSVSSGYLY</u> WYQQKPGQA<br>PKLWIYGTSTLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISILEPEDFAVYY                                                          |

|                                                   |     |                                                                                                                                        |
|---------------------------------------------------|-----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| humanizada)<br>(W92E)                             |     | <u>CHQESSFPYT</u> FGQGTKLEIK                                                                                                           |
| Hu14D7V L1<br>(cadena VL<br>humanizada)<br>(W92F) | 241 | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCS <u>SASSSVSSGYLY</u> WYQQKPGQA<br>PKLWIYGTSTLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISILEPEDFAVYY<br><u>CHQFSSFPYT</u> FGQGTKLEIK |
| Hu14D7V L1<br>(cadena VL<br>humanizada)<br>(W92G) | 242 | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCS <u>SASSSVSSGYLY</u> WYQQKPGQA<br>PKLWIYGTSTLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISILEPEDFAVYY<br><u>CHQGSSFPYT</u> FGQGTKLEIK |
| Hu14D7V L1<br>(cadena VL<br>humanizada)<br>(W92H) | 243 | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCS <u>SASSSVSSGYLY</u> WYQQKPGQA<br>PKLWIYGTSTLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISILEPEDFAVYY<br><u>CHQHSSFPYT</u> FGQGTKLEIK |
| Hu14D7V L2<br>(cadena VL<br>humanizada)<br>(W92A) | 244 | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCS <u>SASSSVSSGYLY</u> WYQQKPGQA<br>PRLWIYGTSTLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISILEPEDFAVYY<br><u>CHQASSFPYT</u> FGQGTKLEIK |
| Hu14D7V L2<br>(cadena VL<br>humanizada)<br>(W92D) | 245 | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCS <u>SASSSVSSGYLY</u> WYQQKPGQA<br>PRLWIYGTSTLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISILEPEDFAVYY<br><u>CHQDSSFPYT</u> FGQGTKLEIK |
| Hu14D7V L2<br>(cadena VL<br>humanizada)<br>(W92E) | 246 | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCS <u>SASSSVSSGYLY</u> WYQQKPGQA<br>PRLWIYGTSTLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISILEPEDFAVYY<br><u>CHQESSFPYT</u> FGQGTKLEIK |
| Hu14D7V L2<br>(cadena VL<br>humanizada)<br>(W92F) | 247 | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCS <u>SASSSVSSGYLY</u> WYQQKPGQA<br>PRLWIYGTSTLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISILEPEDFAVYY<br><u>CHQFSSFPYT</u> FGQGTKLEIK |
| Hu14D7V L2<br>(cadena VL<br>humanizada)<br>(W92G) | 248 | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCS <u>SASSSVSSGYLY</u> WYQQKPGQA<br>PRLWIYGTSTLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISILEPEDFAVYY<br><u>CHQGSSFPYT</u> FGQGTKLEIK |
| Hu14D7V L2<br>(cadena VL<br>humanizada)<br>(W92H) | 249 | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCS <u>SASSSVSSGYLY</u> WYQQKPGQA<br>PRLWIYGTSTLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISILEPEDFAVYY<br><u>CHQHSSFPYT</u> FGQGTKLEIK |

|                                                   |     |                                                                                                                                        |
|---------------------------------------------------|-----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Hu14D7V L3<br>(cadena VL<br>humanizada)<br>(W92A) | 250 | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCS <u>SASSSVSSGYLY</u> WYQQKPGQA<br>PRLWIYGTSTLASGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYC<br><u>HQASSEFPYTFGQGTKLEIK</u> |
| Hu14D7V L3<br>(cadena VL<br>humanizada)<br>(W92D) | 251 | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCS <u>SASSSVSSGYLY</u> WYQQKPGQA<br>PRLWIYGTSTLASGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYC<br><u>HQDSSFPYTFGQGTKLEIK</u>  |
| Hu14D7V L3<br>(cadena VL<br>humanizada)<br>(W92E) | 252 | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCS <u>SASSSVSSGYLY</u> WYQQKPGQA<br>PRLWIYGTSTLASGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYC<br><u>HQESSFPYTFGQGTKLEIK</u>  |
| Hu14D7V L3<br>(cadena VL<br>humanizada)<br>(W92H) | 253 | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCS <u>SASSSVSSGYLY</u> WYQQKPGQA<br>PRLWIYGTSTLASGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYC<br><u>HQFSSFPYTFGQGTKLEIK</u>  |
| Hu14D7V L3<br>(cadena VL<br>humanizada)<br>(W92G) | 254 | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCS <u>SASSSVSSGYLY</u> WYQQKPGQA<br>PRLWIYGTSTLASGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYC<br><u>HQGSSFPYTFGQGTKLEIK</u>  |
| Hu14D7V L3<br>(cadena VL<br>humanizada)<br>(W92H) | 255 | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCS <u>SASSSVSSGYLY</u> WYQQKPGQA<br>PRLWIYGTSTLASGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYC<br><u>HQHSSFPYTFGQGTKLEIK</u>  |
| 26B10 H -<br>CDR2 (N55Q)                          | 256 | GLKPDQGGISYNQKFKG                                                                                                                      |
| 26B10 H -<br>CDR2(N55D)                           | 257 | GLKPDDGGISYNQKFKG                                                                                                                      |
| 26B10 H -<br>CDR2(N56A)                           | 258 | GLKPDNAGISYNQKFKG                                                                                                                      |
| 26B10 H -<br>CDR2(N55T)                           | 259 | GLKPD <del>T</del> GGISYNQKFKG                                                                                                         |
| 26B10 H -<br>CDR2(N55S)                           | 260 | GLKPD <del>S</del> GGISYNQKFKG                                                                                                         |
| 26B10 H -<br>CDR2(N55G)                           | 261 | GLKPD <del>G</del> GGISYNQKFKG                                                                                                         |
| 26B10 H -<br>CDR2 (G56S)                          | 262 | GLKPDNSGISYNQKFKG                                                                                                                      |

|                                                    |     |                                                                                                                                             |
|----------------------------------------------------|-----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 26B10 H -<br>CDR2(G56T)                            | 263 | GLKPDNTGISYNQKFKG                                                                                                                           |
| Hu26B10 VH1<br>(Cadena VH<br>humanizada)(N<br>55Q) | 264 | EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKTSGYTFTEFTMHWVKQAPG<br>KGLEWIGGLKPDQGGISYNQKFKGRATLTVDKSTNTAYMELS<br>SLRSEDTAVYYCARGAYRYDADYWGQGTLVTVSS              |
| Hu26B10 VH1<br>(Cadena VH<br>humanizada)(N<br>55D) | 265 | EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKTSGYTFTEFTMHWVKQAPG<br>KGLEWIGGLKPD <del>D</del> GGISYNQKFKGRATLTVDKSTNTAYMELS<br>SLRSEDTAVYYCARGAYRYDADYWGQGTLVTVSS |
| Hu26B10 VH1<br>(Cadena VH<br>humanizada)(G<br>56A) | 266 | EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKTSGYTFTEFTMHWVKQAPG<br>KGLEWIGGLKPDNAGISYNQKFKGRATLTVDKSTNTAYMELS<br>SLRSEDTAVYYCARGAYRYDADYWGQGTLVTVSS              |
| Hu26B10 VH1<br>(Cadena VH<br>humanizada)(N<br>55T) | 267 | EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKTSGYTFTEFTMHWVKQAPG<br>KGLEWIGGLKPD <del>T</del> GGISYNQKFKGRATLTVDKSTNTAYMELS<br>SLRSEDTAVYYCARGAYRYDADYWGQGTLVTVSS |
| Hu26B10 VH1<br>(Cadena VH<br>humanizada)(N<br>55S) | 268 | EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKTSGYTFTEFTMHWVKQAPG<br>KGLEWIGGLKPD <del>S</del> GGISYNQKFKGRATLTVDKSTNTAYMELSS<br>LRSEDTAVYYCARGAYRYDADYWGQGTLVTVSS |
| Hu26B10 VH1<br>(Cadena VH<br>humanizada)(N<br>55G) | 269 | EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKTSGYTFTEFTMHWVKQAPG<br>KGLEWIGGLKPD <del>G</del> GGISYNQKFKGRATLTVDKSTNTAYMELS<br>SLRSEDTAVYYCARGAYRYDADYWGQGTLVTVSS |
| Hu26B10 VH1<br>(Cadena VH<br>humanizada)(G<br>56S) | 270 | EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKTSGYTFTEFTMHWVKQAPG<br>KGLEWIGGLKPDNSGISYNQKFKGRATLTVDKSTNTAYMELSS<br>LRSEDTAVYYCARGAYRYDADYWGQGTLVTVSS              |
| Hu26B10 VH1<br>(Cadena VH<br>humanizada)(G<br>56T) | 271 | EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKTSGYTFTEFTMHWVKQAPG<br>KGLEWIGGLKPDNTGISYNQKFKGRATLTVDKSTNTAYMELS<br>SLRSEDTAVYYCARGAYRYDADYWGQGTLVTVSS              |
| Hu26B10 VH2<br>(Cadena VH<br>humanizada)(N<br>55Q) | 272 | EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKTSGYTFTEFTMHWVRQAPG<br>KGLEWIGGLKPDQGGISYNQKFKGRATLTVDKSTSTAYMELS<br>SLRSEDTAVYYCARGAYRYDADYWGQGTLVTVSS              |

|                                                    |     |                                                                                                                                                   |
|----------------------------------------------------|-----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Hu26B10 VH2<br>(Cadena VH<br>humanizada)(N<br>55D) | 273 | EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKTSGYTFTEFTMHWVRQAPG<br>KGLEWIGGLKPD <b>D</b> GGISYNQKFKGRATLTVDKSTSTAYMELSS<br>LRSEDTAVYYCARGA <u>YYRYDADY</u> WGQGTLVTVSS |
| Hu26B10 VH1<br>(Cadena VH<br>humanizada)(G<br>56A) | 274 | EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKTSGYTFTEFTMHWVRQAPG<br>KGLEWIGGLKPD <b>N</b> AGISYNQKFKGRATLTVDKSTSTAYMELSS<br>LRSEDTAVYYCARGA <u>YYRYDADY</u> WGQGTLVTVSS |
| Hu26B10 VH2<br>(Cadena VH<br>humanizada)(N<br>55T) | 275 | EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKTSGYTFTEFTMHWVRQAPG<br>KGLEWIGGLKPD <b>T</b> GGISYNQKFKGRATLTVDKSTSTAYMELSS<br>LRSEDTAVYYCARGA <u>YYRYDADY</u> WGQGTLVTVSS |
| Hu26B10 VH2<br>(Cadena VH<br>humanizada)(N<br>55S) | 276 | EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKTSGYTFTEFTMHWVRQAPG<br>KGLEWIGGLKPD <b>S</b> GGISYNQKFKGRATLTVDKSTSTAYMELSS<br>LRSEDTAVYYCARGA <u>YYRYDADY</u> WGQGTLVTVSS |
| Hu26B10 VH2<br>(Cadena VH<br>humanizada)(N<br>55G) | 277 | EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKTSGYTFTEFTMHWVRQAPG<br>KGLEWIGGLKPD <b>G</b> GGISYNQKFKGRATLTVDKSTSTAYMELS<br>SLRSEDTAVYYCARGA <u>YYRYDADY</u> WGQGTLVTVSS |
| Hu26B10 VH2<br>(Cadena VH<br>humanizada)(G<br>56S) | 278 | EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKTSGYTFTEFTMHWVRQAPG<br>KGLEWIGGLKPD <b>N</b> SGISYNQKFKGRATLTVDKSTSTAYMELSS<br>LRSEDTAVYYCARGA <u>YYRYDADY</u> WGQGTLVTVSS |
| Hu26B10 VH2<br>(Cadena VH<br>humanizada)(G<br>56T) | 279 | EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKTSGYTFTEFTMHWVRQAPG<br>KGLEWIGGLKPD <b>N</b> TGISYNQKFKGRATLTVDKSTSTAYMELSS<br>LRSEDTAVYYCARGA <u>YYRYDADY</u> WGQGTLVTVSS |
| Hu26B10 VH3<br>(Cadena VH<br>humanizada)(N<br>55Q) | 280 | EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKVSGYTFTEFTMHWVRQAPG<br>KGLEWIGGLKPD <b>Q</b> GGISYNQKFKGRATLTVDKSTSTAYMELSS<br>LRSEDTAVYYCARGA <u>YYRYDADY</u> WGQGTLVTVSS |
| Hu26B10 VH3<br>(Cadena VH<br>humanizada)(N<br>55D) | 281 | EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKVSGYTFTEFTMHWVRQAPG<br>KGLEWIGGLKPD <b>D</b> GGISYNQKFKGRATLTVDKSTSTAYMELSS<br>LRSEDTAVYYCARGA <u>YYRYDADY</u> WGQGTLVTVSS |
| Hu26B10 VH3<br>(Cadena VH)                         | 282 | EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKVSGYTFTEFTMHWVRQAPG<br>KGLEWIGGLKPD <b>N</b> AGISYNQKFKGRATLTVDKSTSTAYMELSS                                                |

|                                          |     |                                                                                                                                             |
|------------------------------------------|-----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| humanizada)(G56A)                        |     | LRSEDTAVYYCARG <u>AYYRYDADY</u> WGQGTLVTVSS                                                                                                 |
| Hu26B10 VH3 (Cadena VH humanizada)(N55T) | 283 | EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKVSGYTFTEFTMHWVRQAPG KGLEWIGGLKPD <u>TGGISYNQKFK</u> GRATLTVDTSTSTAYMELSS LRSEDTAVYYCARG <u>AYYRYDADY</u> WGQGTLVTVSS |
| Hu26B10 VH3 (Cadena VH humanizada)(N55S) | 284 | EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKVSGYTFTEFTMHWVRQAPG KGLEWIGGLKPD <u>SGGISYNQKFK</u> GRATLTVDTSTSTAYMELSS LRSEDTAVYYCARG <u>AYYRYDADY</u> WGQGTLVTVSS |
| Hu26B10 VH3 (Cadena VH humanizada)(N55G) | 285 | EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKVSGYTFTEFTMHWVRQAPG KGLEWIGGLKPD <u>G</u> GGISYNQKFKGRATLTVDTSTSTAYMELSS LRSEDTAVYYCARG <u>AYYRYDADY</u> WGQGTLVTVSS |
| Hu26B10 VH3 (Cadena VH humanizada)(G56S) | 286 | EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKVSGYTFTEFTMHWVRQAPG KGLEWIGGLKPD <u>NS</u> GISYNQKFKGRATLTVDTSTSTAYMELSS LRSEDTAVYYCARG <u>AYYRYDADY</u> WGQGTLVTVSS |
| Hu26B10 VH3 (Cadena VH humanizada)(G56T) | 287 | EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKVSGYTFTEFTMHWVRQAPG KGLEWIGGLKPD <u>NT</u> GISYNQKFKGRATLTVDTSTSTAYMELSS LRSEDTAVYYCARG <u>AYYRYDADY</u> WGQGTLVTVSS |
| epítipo de hTIGIT (24-41)                | 288 | SSTTAQVNWEQQDQL                                                                                                                             |
| epítipo de hTIGIT (85-93)                | 289 | IYHTYPDGT                                                                                                                                   |
| epítipo de hTIGIT (96-100)               | 290 | GRIFL                                                                                                                                       |

En una forma de realización, el anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno comprende una CDRH1 que comprende la SEQ ID NO:188, una CDRH2 que comprende la SEQ ID NO:189, una CDRH3 que comprende cualquiera de las SEQ ID NO:190, 220, 221, o 222, una CDRL1 que comprende la SEQ ID NO:191, una CDRL2 que comprende la SEQ ID NO:192, y una CDRL3 que comprende cualquiera de las SEQ ID NO:193, 232, 233, 234, 235, 236, o 237.

En una forma de realización, el anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este comprende una CDRH1 que comprende la SEQ ID NO:204, una CDRH2 que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 205, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, o 263, una CDRH3 que comprende la SEQ ID NO:206, una CDRL1 que comprende la SEQ ID NO:207, una CDRL2 que comprende la SEQ ID NO:208, y una CDRL3 que comprende la SEQ ID NO:209.

En una forma de realización, el anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este comprende una región de la cadena pesada variable y una región variable de la cadena ligera variable. En una forma de realización, el anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este comprende una región de la cadena pesada variable que comprende la SEQ ID NO:194 y una región de la cadena ligera variable que comprende la SEQ ID NO:195.

En una forma de realización, el anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este comprende una región de la cadena pesada variable que comprende la SEQ ID NO:196 y una región de la cadena ligera variable que comprende la SEQ ID NO:200.

En una forma de realización, el anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este comprende una región de la cadena pesada variable que comprende la SEQ ID NO: 210 y una región de la cadena ligera variable que comprende la SEQ ID NO:211.

En una forma de realización, el anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este comprende una región de la cadena pesada variable que comprende la SEQ ID NO: 212 y una región de la cadena ligera variable que comprende la SEQ ID NO:216.

En una forma de realización, el anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este comprende una región de la cadena pesada variable que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 197, 198, 199, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, y 231 y una región de la cadena ligera variable que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 201, 202, 203, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, y 255.

En una forma de realización, el anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este comprende una región de la cadena pesada variable que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 213, 214, 215, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, y 286 y una región de la cadena ligera variable que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 217, 218, y 219.

Los anticuerpos anti-TIGIT adicionales que pueden utilizarse en las formulaciones descritas en la presente pueden incluir aquellos descritos, por ejemplo, e la solicitud internacional PCT N.º WO 2016/106302; WO 2016/011264; y WO 2009/126688.

TABLA 6: Secuencias de cadena pesada de ejemplo

|                                        |     |                                                                                                                                                                                         |
|----------------------------------------|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Dominio constante de la cadena pesada– | 291 | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS<br>GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH<br>KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK<br>DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT |
|----------------------------------------|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|                                                               |     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|---------------------------------------------------------------|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| IgG1                                                          |     | KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP<br>PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP<br>SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRW<br>QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK                                                                                                                                                                                      |
| Dominio<br>constante de la<br>cadena pesada–<br>IgG4<br>S228P | 292 | TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA<br>LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDPK<br>SNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE<br>QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS<br>KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE<br>WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV<br>FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| Dominio<br>constante de<br>cadena ligera<br>kappa             | 293 | VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN<br>ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE<br>VTHQGLSSPVTKSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                |

- En cualquiera de las formas de realización mencionadas anteriormente, el anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este es un anticuerpo que comprende cualquiera de las cadenas pesadas variables descritas anteriormente y cualquier dominio
- 5 constante de cadena pesada humana. En una forma de realización, el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este de la invención es del isotipo IgG, y comprende un IgG1, IgG2, IgG3 humano o dominio constante de IgG4 humano de cadena pesada humana. En una forma de realización, el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este de la invención comprende el dominio constante de IgG1 de cadena pesada humana (SEQ ID NO: 291) o una variante de
- 10 este, en donde la variante comprende hasta 20 sustituciones de aminoácidos. En una forma de realización, el anticuerpo o un fragmento de fijación al antígeno de este de la invención es un anticuerpo comprende un dominio constante de IgG1 de cadena pesada humana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 291. En una forma de realización, el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este de la invención comprende el dominio constante de
- 15 IgG1 de cadena pesada humana en donde el dominio constante de IgG1 está afucosilado. En una forma de realización, el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este de la invención comprende el dominio constante de IgG4 de cadena pesada humana o una variante de este, en donde la variante comprende hasta 20 sustituciones de aminoácidos. En otra forma de realización, el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este de la invención comprende
- 20 un dominio constante de IgG4 de cadena pesada humana, en donde el aminoácido en la posición 228 (mediante el esquema de numeración EU) ha sido sustituido de Ser a Pro. En una forma de realización, el anticuerpo o un fragmento de fijación al antígeno de este de la invención

comprende un dominio constante de IgG4 de cadena pesada humana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 292.

En cualquiera de las formas de realización mencionadas anteriormente, el anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este puede comprender cualquiera de las cadenas ligeras variables descritas anteriormente y un dominio constante de cadena ligera humana. En una forma de realización, el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este de la invención comprende el dominio constante de cadena ligera kappa humana o una variante de este, en donde la variante comprende hasta 20 sustituciones de aminoácidos. En otra forma de realización, el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este de la invención comprende el dominio constante de cadena ligera lambda humana o una variante de este, en donde la variante comprende hasta 20 sustituciones de aminoácidos. En una forma de realización, el anticuerpo o un fragmento de fijación al antígeno de este de la invención comprende un dominio constante de cadena ligera kappa humana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 293.

#### Formulaciones

Las formulaciones de la invención minimizan la formación de agregados (especies de alto peso molecular) y partículas de anticuerpo, especies de alto y bajo peso molecular, minimizan la oxidación de los residuos de metionina y aseguran que el anticuerpo retenga la actividad biológica a lo largo del tiempo.

En un aspecto, la presente invención incluye varias formulaciones de un anticuerpo anti-TIGIT o un fragmento de fijación al antígeno de este. Por ejemplo, la presente formulación incluye formulaciones que comprenden (i) un anticuerpo anti-TIGIT o un fragmento de fijación al antígeno de este, (ii) un amortiguador (por ejemplo, L-histidina o acetato), (iii) un azúcar no reductor (por ejemplo, sacarosa); (iv) un tensioactivo no iónico (por ejemplo, polisorbato 80); y (v) un antioxidante (por ejemplo, L-metionina). En una forma de realización, la formulación comprende además un anticuerpo anti-PD1. En una forma de realización, la formulación comprende además un quelante. En una forma de realización, el quelante está presente en una cantidad de alrededor de 1  $\mu\text{m}$  a alrededor de 50  $\mu\text{m}$ . En una forma de realización, el quelante es ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA). En otra forma de realización, el quelante es EDTA.

En otro aspecto, la presente invención también incluye varias coformulaciones de un anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este y un anticuerpo anti-PD-1 humana o fragmento de fijación al antígeno de este. En una forma de realización, la formulación comprende (i) un anticuerpo anti-TIGIT o un fragmento de fijación al antígeno de este, (ii) un anticuerpo anti-PD-1 humana o fragmento de fijación al antígeno de este, (iii) un amortiguador (por ejemplo, L-histidina o acetato), (iv) un azúcar no reductor (por ejemplo, sacarosa); (v) un tensioactivo no iónico (por ejemplo, polisorbato 80); y (vi) un antioxidante (por ejemplo, L-metionina). En una forma de realización, la formulación comprende además un quelante. En una forma de realización, el quelante está presente en una cantidad de alrededor de 1  $\mu\text{m}$  a alrededor

de 50  $\mu$ m. En una forma de realización, el quelante es ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA). En otra forma de realización, el quelante es EDTA.

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden incluir amortiguadores.

Los amortiguadores que son útiles en las formulaciones farmacéuticas y métodos de la invención incluyen succinato (sodio o potasio), L-histidina, fosfato (sodio o potasio), Tris (tris (hidroximetil) aminometano), dietanolamina, citrato (sodio), acetato (sodio) y similares. En una forma de realización de la invención, el amortiguador está presente en la formulación en una concentración de alrededor de 1-20 mM (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20 mM). En formas de realización específicas de la invención, el amortiguador es histidina, por ejemplo, amortiguador de L-histidina.

El amortiguador de la invención tiene un pH en el rango de alrededor de 4,5 a alrededor de 6,5, alrededor de 5,0 – 6,2; alrededor de 5,5 – 6,0; y preferentemente tiene un pH de alrededor de 5,8. Al alcanzar la formulación de ejemplo, se exploró la idoneidad de la histidina, y amortiguadores de acetato en el rango de pH de 5,0-6,0. Cuando se menciona un rango de valores de pH, tal como “un pH entre 5,5 pH and 6,0,” se pretende que el rango incluya los valores mencionados. Por ejemplo, un rango de alrededor de 5,0 a alrededor de 6,0 incluye 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9 y 6,0. A menos que se indique lo contrario, el pH se refiere al pH después de la reconstitución de las formulaciones liofilizadas de la presente invención. El pH se mide típicamente a 25 °C mediante una bombilla de vidrio estándar de medición de pH. Como se usa en la presente, una solución que comprende “amortiguador de histidina con X pH” se refiere a una solución con X pH y que comprende el amortiguador de histidina, es decir, se pretende que el pH se refiera al pH de la solución.

En una forma de realización de la invención, la formulación anti-TIGIT y la coformulación de anti-TIGIT y anti-PD-1 humana comprende un azúcar no reductor. Como se usa en la presente, “azúcar no reductor” es un azúcar que no es capaz de actuar como un agente reductor ya que no contiene o no puede convertirse para contener un grupo aldehído libre o un grupo cetona libre. Los ejemplos de azúcar no reductor incluyen, entre otros, disacáridos tales como sacarosa y trehalosa. En una forma de realización de la invención, el azúcar no reductor está presente en una cantidad que varía de alrededor de 1-10 % (p/v) (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 %). En otra forma de realización, el azúcar no reductor está presente en una cantidad de alrededor de 6 % a alrededor de 8 % (p/v) (6, 7, o 8 %). En una forma de realización adicional, el azúcar no reductor está presente en una cantidad de alrededor de 6 % (p/v). En una forma de realización adicional, el azúcar no reductor está presente en una cantidad de alrededor de 7 % (p/v). En una forma de realización adicional, el azúcar no reductor está presente en una cantidad de alrededor de 8 % (p/v). En una forma de realización, el azúcar no reductor es sacarosa, trehalosa o rafinosa. En otra forma de realización, el azúcar no reductor es sacarosa. En una forma de realización adicional, la sacarosa está presente en 6-8 % p/v. En una forma de realización, la sacarosa está presente en alrededor de 6 % (p/v). En una forma de realización, la

sacarosa está presente en alrededor de 7 % (p/v). En una forma de realización, la sacarosa está presente en alrededor de 8 % (p/v).

Las formulaciones de la invención también comprenden un tensioactivo. Como se usa en la presente, el tensioactivo es un agente activo de superficie que es de naturaleza anfipática. Los tensioactivos se pueden agregar a las formulaciones para proporcionar estabilidad, reducir y/o prevenir agregación o para prevenir y/o inhibir daño a las proteínas durante las condiciones de procesamiento tales como purificación, filtración, secado por congelación, transporte, almacenamiento y entrega. En la presente invención, un tensioactivo puede ser útil para proporcionar estabilidad adicional a los ingredientes activos.

Los tensioactivos no iónicos que pueden ser útiles en las formulaciones, que incluyen las coformulaciones de la invención, incluyen, entre otros, ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitán (polisorbato, que se venden bajo el nombre comercial Tween® (Uniquema Americas LLC, Wilmington, DE)) que incluyen Polisorbato-20 (monolaurato de polioxietilensorbitán), Polisorbato-40 (monopalmitato de polioxietilensorbitán), Polisorbato-60 (monoestearato de polioxietilensorbitán), y Polisorbato-80 (monooleato de polioxietilensorbitán); alquiléteres de polioxietileno tales como Brij® 58 (Uniquema Americas LLC, Wilmington, DE) y Brij® 35; polaxámeros (por ejemplo, polaxámero 188); Triton® X-100 (Union Carbide Corp., Houston, TX) y Triton® X-114; NP40; Span 20, Span 40, Span 60, Span 65, Span 80 y Span 85; copolímeros de etilen- y propilenglicol (por ejemplo, la serie pluronic® de tensioactivos no iónicos tales como pluronic® F68, pluronic® 10R5, pluronic® F108, pluronic® F127, pluronic® F38, pluronic® L44, pluronic® L62 (BASF Corp., Ludwigshafen, Alemania); y dodecilsulfato de sodio (SDS). En una forma de realización, el tensioactivo no iónico es polisorbato 80 o polisorbato 20. En una forma de realización, el tensioactivo no iónico es polisorbato 20. En una forma de realización, el tensioactivo no iónico es polisorbato 80.

La cantidad de tensioactivo no iónico a incluirse en las formulaciones de la invención es una cantidad suficiente para llevar a cabo la función deseada, es decir, una cantidad mínima necesaria para estabilizar el ingrediente farmacéutico activo (es decir, anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este, o tanto el anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno y el anticuerpo anti-PD-1 humana o fragmento de fijación al antígeno de este) en la formulación. Todos los porcentajes para los tensioactivo no iónicos se enumeran como % p/v. Típicamente, el tensioactivo está presente en una concentración desde alrededor de 0,008 % a alrededor de 0,1 % p/v. En algunas formas de realización de este aspecto de la invención, el tensioactivo está presente en la formulación en una cantidad desde alrededor de 0,01 % a alrededor de 0,1 %; desde alrededor de 0,01 % a alrededor de 0,09 %; desde alrededor de 0,01 % a alrededor de 0,08 %; desde alrededor de 0,01 % a alrededor de 0,07 %; desde alrededor de 0,01 % a alrededor de 0,06 %; desde alrededor de 0,01 % a alrededor de 0,05 %; desde alrededor de 0,01 % a alrededor de 0,04 %; desde alrededor de 0,01 % a alrededor de 0,03 %, desde alrededor de 0,01 % a alrededor de 0,02 %, desde alrededor de 0,015 % a alrededor de

0,04 %; desde alrededor de 0,015 % a alrededor de 0,03 %, desde alrededor de 0,015 % a alrededor de 0,02 %, desde alrededor de 0,02 % a alrededor de 0,04 %, desde alrededor de 0,02 % a alrededor de 0,035 %, o desde alrededor de 0,02 % a alrededor de 0,03 %. En formas de realización específicas, el tensioactivo está presente en una cantidad de alrededor de 0,02 %. En formas de realización alternativas, el tensioactivo está presente en una cantidad de alrededor de 0,01 %, alrededor de 0,015 %, alrededor de 0,025 %, alrededor de 0,03 %, alrededor de 0,035 %, o alrededor de 0,04 %.

En formas de realización de ejemplo de la invención, el tensioactivo es un tensioactivo no iónico seleccionado del grupo que consiste en: Polisorbato 20 y Polisorbato 80. En formas de realización preferidas, el tensioactivo es Polisorbato 80.

En formas de realización específicas, las formulaciones, que incluyen las coformulaciones, de la invención comprenden alrededor de 0,01 % a alrededor de 0,04 % p/v de polisorbato 80. En formas de realización adicionales, las formulaciones descritas en la presente comprenden polisorbato 80 en una cantidad de alrededor de 0,008 % p/v, alrededor de 0,01 % p/v. En una forma de realización, la cantidad de polisorbato 80 es de alrededor de 0,015 % p/v. En otra forma de realización, la cantidad de polisorbato 80 es de alrededor de 0,02 % p/v. En una forma de realización adicional, la cantidad de polisorbato 80 es de alrededor de 0,025 % p/v. En otra forma de realización, la cantidad de polisorbato 80 es de alrededor de 0,03 % p/v. En una forma de realización adicional, la cantidad de polisorbato 80 es de alrededor de 0,035 % p/v. En otra forma de realización, la cantidad de polisorbato 80 es de alrededor de 0,04 % p/v. En una forma de realización adicional, la cantidad de polisorbato 80 es de alrededor de 0,045 % p/v. En formas de realización particulares, las formulaciones de la invención comprenden alrededor de 0,02 % p/v de polisorbato 80.

Las formulaciones, que incluyen las coformulaciones, de la presente invención también comprenden metionina, o una sal de aquel farmacéuticamente aceptable de esta, como un antioxidante. En una forma de realización, la metionina es L-metionina. En otra forma de realización, la metionina es una sal farmacéuticamente aceptable de L-metionina, tal como, por ejemplo, metionina HCl. En una forma de realización de la invención, la metionina está presente en la formulación en una concentración de alrededor de 1-20 mM (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20 mM). En otra forma de realización, la metionina está presente de alrededor de 5mM a alrededor de 10 mM (5, 6, 7, 8, 9 y 10 mM). En otra forma de realización, la metionina está presente en alrededor de 10mM.

Las formulaciones, que incluyen las coformulaciones, de la presente invención también pueden comprender además un agente quelante. En una forma de realización de la invención, el agente quelante está presente en la formulación en una concentración de alrededor de 5-30  $\mu$ M (por ejemplo, 5, 10, 15, 20, 25, o 30  $\mu$ M). En una forma de realización, el agente quelante es DTPA. En otra forma de realización, el agente quelante es EDTA.

### Composiciones farmacéuticas liofilizadas

Las formulaciones liofilizadas de las proteínas terapéuticas proporcionan varias ventajas. Las formulaciones liofilizadas en general ofrecen mejor estabilidad química que las formulaciones de solución, y por lo tanto incrementan la semivida. Una formulación liofilizada puede también reconstituirse en diferentes concentraciones según los factores clínicos, tales como una vía de administración o dosificación. Por ejemplo, una formulación liofilizada puede reconstituirse en una concentración alta (es decir, en un volumen pequeño) si fuera necesario para una administración subcutánea, o a una concentración más baja si se administra de manera intravenosa. Las altas concentraciones también pueden ser necesarias si se requiere una dosificación alta para un sujeto en particular, en especial si se administra de manera subcutánea en donde el volumen de inyección debe ser minimizado. Una de tales formulaciones liofilizadas de anticuerpo se describe en la patente estadounidense N.º 6.267.958, que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad. Las formulaciones liofilizadas de otra proteína terapéutica se describen en la patente estadounidense N.º 7.247.707, que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

Típicamente, la formulación liofilizada se prepara antes de la reconstitución en una concentración alta de un producto de fármaco (DP, en una forma de realización de ejemplo, pembrolizumab de anticuerpo ant-PD-1 humanizado, o fragmento de fijación al antígeno de este), es decir antes de la reconstitución en un volumen bajo de agua. La dilución subsecuente con agua o amortiguador isotónico puede luego utilizarse más fácilmente para diluir el DP a una concentración más baja. Típicamente, los excipientes están incluidos en una formulación de liofilización de la presente invención a niveles que resultarán en una formulación aproximadamente isotónica cuando se reconstituye a una concentración alta de DP, por ejemplo, para administración subcutánea. La reconstitución en un volumen más alto de agua para obtener una concentración de DP más baja necesariamente reducirá la tonicidad de la solución reconstituida, pero tal reducción puede no tener mucha significancia en una administración que no es subcutánea, es decir, intravenosa. Si la isotonicidad se desea a una concentración de DP más baja, el polvo liofilizado puede reconstituirse en el volumen bajo estándar de agua y luego diluirse adicionalmente con diluyente isotónico, tal como cloruro de sodio al 0,9 %.

Las formulaciones liofilizadas de la presente invención se forman mediante liofilización (secado por congelación) de una solución de pre-liofilización. El secado por congelación se logra al congelar la formulación y posteriormente agregar agua a una temperatura adecuada para un secado primario. Bajo esta condición, la temperatura del producto está por debajo del punto eutéctico o la temperatura de colapso de la formulación. Típicamente, la temperatura de almacenamiento para el secado primario variará de alrededor de -30 a 25 °C (siempre que el producto permanezca congelado durante el secado primario) a una presión adecuada, que varía típicamente desde alrededor de 50 a 250 mTorr. La formulación, tamaño y tipo del recipiente que contiene la muestra (por ejemplo, un vial de vidrio) y el volumen de líquido determinarán el

tiempo necesario para el secado, que puede variar de unas cuantas horas a varios días (por ejemplo, 40-60 h). Una etapa de secado secundario se puede llevar a cabo a alrededor de 0-40 °C, que depende principalmente del tipo y tamaño del recipiente y el tipo de proteína empleada. El tiempo del secado secundario será determinado por el nivel de humedad residual deseado en el producto y por lo general toma al menos alrededor de 5 h. Típicamente, el contenido de humedad de una formulación liofilizada es menor a alrededor de 5 % y preferentemente menor a alrededor de 3 %. La presión puede ser la misma que se emplea durante la etapa de secado primario. Las condiciones de secado por congelación puede variar según la formulación y el tamaño del vial.

En algunas instancias, puede ser deseable liofilizar la formulación de proteína en un recipiente en el cual se lleva a cabo la reconstitución de la proteína para evitar la etapa de transferencia. En esta instancia, el recipiente puede ser, por ejemplo, un vial de 3, 5, 10, 20, 50 o 100 cc.

Las formulaciones liofilizadas de la presente invención se reconstituyen de manera previa a la administración. La proteína puede reconstituirse a una concentración de alrededor de 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 75, 80, 90 or 100 mg/ml o a concentraciones más altas tales como 150mg/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 proteína después de la reconstitución es de alrededor de 10-300 mg/ml. En una forma de realización, la concentración de proteína después de la reconstitución es de alrededor de 20-250 mg/ml. En una forma de realización, la concentración de proteína después de la reconstitución es de alrededor de 150-250 mg/ml. En una forma de realización, la concentración de proteína después de la reconstitución es de alrededor de 180-220 mg/ml. En una forma de realización, la concentración de proteína después de la reconstitución es de alrededor de 50-150 mg/ml. En una forma de realización, la concentración de proteína después de la reconstitución es de alrededor de 100 mg/ml. En una forma de realización, la concentración de proteína después de la reconstitución es de alrededor de 75 mg/ml. En una forma de realización, la concentración de proteína después de la reconstitución es de alrededor de 50 mg/ml. En una forma de realización, la concentración de proteína después de la reconstitución es de alrededor de 25 mg/ml. Las altas concentraciones de proteína son particularmente útiles cuando se pretende administración subcutánea de la formulación reconstituida. Sin embargo, para otras vías de administración, tales como administración intravenosa, pueden ser deseables concentraciones más bajas de la proteína (por ejemplo, desde alrededor de 5-50 mg/ml).

La reconstitución generalmente toma lugar en una temperatura de alrededor de 25 °C para asegurar hidratación completa, aunque si se desea se pueden emplear otras temperaturas. El tiempo necesario para la reconstitución dependerá, por ejemplo, del tipo de diluyente, cantidad de excipientes y proteínas. Los diluyentes de ejemplo incluyen agua estéril, agua bacteriostática para inyección (BWFI), una solución amortiguada con pH (por ejemplo, solución salina amortiguada con fosfato), solución salina estéril, solución de Ringer o solución de dextrosa.

### Composiciones farmacéuticas líquidas

Una formulación líquida de anticuerpos se puede elaborar al tomar la sustancia farmacológica (por ejemplo, anti-PD-1 humanizado) que está en forma líquida (por ejemplo, pembrolizumab en una formulación farmacéutica acuosa) e intercambiar el amortiguador al amortiguador deseado como la última etapa del proceso de purificación. En esta forma de realización no hay etapa de liofilización. La sustancia farmacológica en el amortiguador final está concentrada a una concentración deseada. Los excipientes tales como sacarosa y polisorbato 80 se agregan a la sustancia farmacológica y esta se diluye mediante el amortiguador apropiado a una concentración de proteínas final. La sustancia farmacológica formulada final se filtra mediante filtros de 0,22  $\mu\text{m}$  y se vierte en un recipiente final (por ejemplo, viales de vidrio).

### III. Métodos de uso

La invención también se refiere a un método para tratar el cáncer en un sujeto, donde el método comprende administrar una cantidad eficaz de cualquiera de las formulaciones de la invención, es decir, cualquier formulación descrita en la presente, al sujeto. En algunas formas de realización específicas del método, la formulación se administra a un sujeto mediante administración intravenosa. En otras formas de realización, la formulación se administra al sujeto mediante administración subcutánea. En una forma de realización, la invención comprende un método de tratamiento contra el cáncer en un paciente humano que comprende administrar cualquier formulación de la invención al paciente.

En cualquiera de los métodos de la invención, el cáncer se puede seleccionar del grupo que consiste en: melanoma, cáncer pulmonar, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de cuello, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer gástrico, mieloma múltiple, hepatocarcinoma, linfoma, cáncer renal, mesotelioma, cáncer de ovarios, cáncer de esófago, cáncer de ano, cáncer de las vías biliares, cáncer colorrectal, cáncer de cuello uterino, cáncer de tiroides, cáncer de glándulas salivales, cáncer de próstata (por ejemplo, adenocarcinoma de próstata resistente al tratamiento hormonal), cáncer de páncreas, cáncer de colon, cáncer de esófago, cáncer de hígado, cáncer de tiroides, glioblastoma, glioma, y otras neoplasias.

En algunas formas de realización, el cáncer de pulmón es un cáncer de pulmón de células no pequeñas.

En formas de realización alternativas, el cáncer de pulmón es cáncer de pulmón de células pequeñas.

En algunas formas de realización, el linfoma es linfoma de Hodgkin.

En algunas formas de realización, el linfoma es linfoma no Hodgkin. En formas de realización particulares, el linfoma es linfoma mediastinal de linfocitos B grandes.

En algunas formas de realización, el cáncer es cáncer de mama triple negativo.

En formas de realización adicionales, el cáncer de mama es cáncer de mama ER+/HER2-.

En algunas formas de realización, el cáncer de vejiga es cáncer urotelial.

En algunas formas de realización, el cáncer de cabeza y cuello es cáncer de nasofaringe.

En algunas formas de realización, el cáncer es cáncer de tiroides. En otras formas de realización, el cáncer es cáncer de glándulas salivales. En otras formas de realización, el cáncer es carcinoma  
5 de células escamosas de cabeza y cuello.

En una forma de realización, la invención comprende un método de tratamiento contra el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) en un paciente humano que comprende administrar una formulación de la invención al paciente. En formas de realización específicas, el paciente tiene un tumor con alta expresión de PD-L1 [(Puntuación de proporción tumoral (TPS)  $\geq 50\%$ )] y no fue tratado previamente con quimioterapia que contiene platino. En otras formas de  
10 realización, el paciente tiene un tumor con expresión de PD-L1 (TPS  $\geq 1\%$ ) y fue tratado previamente con quimioterapia que contiene platino. En aun otras formas de realización, el paciente tiene un tumor con expresión de PD-L1 (TPS  $\geq 1\%$ ) y no fue tratado previamente con quimioterapia que contiene platino. En formas de realización específicas, el paciente tuvo una  
15 progresión de enfermedad mientras o luego de recibir la quimioterapia que contiene platino. En ciertas formas de realización, la TPS de PD-L1 se determina mediante una prueba aprobada por la FDA. En ciertas formas de realización, el tumor del paciente no tiene anomalías genómicas EGFR o ALK. En ciertas formas de realización, el tumor del paciente tiene una anomalía genómica EGFR o ALK y tuvo progresión de la enfermedad mientras o después de recibir  
20 tratamiento para las anomalías EGFR o ALK antes de recibir el anticuerpo anti-PD-1, o fragmento de fijación al antígeno de este.

En algunas formas de realización, el cáncer es cáncer colorrectal metastático con altos niveles de inestabilidad de microsatélites (MSI-H).

En algunas formas de realización, el cáncer es cáncer colorrectal metastático con altos  
25 niveles de inestabilidad de microsatélites (MSI-H).

En algunas formas de realización, el cáncer es un tumor sólido con un alto nivel de inestabilidad de microsatélites (MSI-H).

En algunas formas de realización, el cáncer es un tumor sólido con una alta carga mutacional.

En algunas formas de realización, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en:  
30 melanoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas, linfoma de Hodgkin clásico recidivante o resistente, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer urotelial, cáncer de esófago, cáncer gástrico y hepatocarcinoma.

En otras formas de realización de los métodos de tratamiento anteriores, el cáncer es una  
35 neoplasia Heme. En ciertas formas de realización, la neoplasia Heme es leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia mieloide crónica (CML), linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBCL), DLBCL EBV positivo, linfoma mediastinal primario de linfocitos B grandes, linfoma de linfocitos B grandes

rico en linfocitos T/histiocitos, linfoma folicular, linfoma de Hodgkin (HL), linfoma de células del manto (MCL), mieloma múltiple (MM), proteína de leucemia de célula mieloide-1 (Mcl-1), síndrome mielodisplásico (MDS), linfoma no Hodgkin (NHL), o linfoma linfocítico pequeño (SLL).

5 Las neoplasias que demuestran supervivencia mejorada libre de enfermedad y supervivencia en general en relación a la presencia de linfocitos que infiltran tumores en el material de biopsia o quirúrgico, por ejemplo, melanoma, cáncer colorrectal, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer de estómago/esófago, cáncer de mama, cáncer de páncreas y cáncer de ovarios, están abarcadas en los métodos y tratamientos descritos en la presente. Tales subtipos  
10 de cáncer son conocidos por ser susceptibles al control inmunitario mediante linfocitos T. Adicionalmente, se incluyen neoplasias resistentes o recurrentes cuyo crecimiento puede inhibirse mediante los anticuerpos descritos en la presente.

Los tipos de cáncer que se pueden beneficiar del tratamiento con las formulaciones descritas en la presente incluyen aquellos asociados con la infección persistente con virus tales  
15 como virus de inmunodeficiencia humana, virus de la hepatitis de clase A, B y C, virus de Epstein Barr, virus del papiloma humano que son conocidos por estar causalmente relacionados a, por ejemplo, el sarcoma de Kaposi, cáncer de hígado, cáncer de nasofaringe, linfoma, tipos de cáncer de cuello uterino, vulva, ano, pene y cavidad oral.

Las formulaciones también se pueden utilizar para prevenir o tratar infecciones y  
20 enfermedades infecciosas. Por lo tanto, la invención proporciona un método para el tratamiento de una infección crónica en un sujeto mamífero que comprende administrar una cantidad eficaz de una formulación de la invención al sujeto. En algunas formas de realización específicas del método, la formulación se administra a un sujeto mediante administración intravenosa. En otras formas de realización, la formulación se administra al sujeto mediante administración  
25 subcutánea.

Estos agentes se pueden usar solos, o en combinación con vacunas para estimular la respuesta inmunitaria a patógenos, toxinas y autoantígenos. Los anticuerpos o fragmento de fijación al antígeno de este se pueden utilizar para estimular la respuesta inmunitaria contra virus  
30 infecciosos contra humanos, que incluyen, entre otros: virus de inmunodeficiencia humana, virus de la hepatitis de clase A, B y C, virus de Epstein Barr, citomegalovirus humano, virus del papiloma humano y virus de la herpes. Los anticuerpos anti-PD-1 antagonistas o fragmentos de anticuerpo se pueden utilizar para estimular la respuesta inmunitaria contra la infección con parásitos bacteriales o fúngicos, y otros patógenos. Las infecciones virales con hepatitis B y C y VIH están entre aquellas que se consideran infecciones virales crónicas.

35 Las formulaciones de la invención se pueden administrar a un paciente en combinación con uno o más de los "agentes terapéuticos adicionales". Los agentes terapéuticos adicionales pueden ser un agente bioterapéutico (que incluye, entre otros, anticuerpos contra VEGF, EGFR, Her2/neu, receptores VEGF, otros receptores del factor de crecimiento, CD20, CD40, CD-40L,

OX-40, 4-1BB e ICOS), un agente inmunógeno (por ejemplo, células cancerosas atenuadas, antígenos tumorales, células presentadoras de antígenos, tales como células dendríticas impulsadas por ácidos nucleicos o antígenos derivados de tumores, citocinas inmunoestimulantes (por ejemplo, IL-2, IFN $\alpha$ 2, GM-CSF), y células transfectadas con genes que codifican citocinas inmunoestimulantes, tales como GM-CSF).

Como se establece anteriormente, en algunas formas de realización de los métodos de la invención, el método comprende además administrar un agente terapéutico adicional. En formas de realización particulares, el agente terapéutico adicional es un anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de fijación al antígeno de este, un anticuerpo anti-GITR, o fragmento de fijación al antígeno de este, un anticuerpo anti-CTL4, o fragmento de fijación al antígeno de este, un anticuerpo anti-CD27 o fragmento de fijación al antígeno de este. En una forma de realización, el agente terapéutico adicional es un vector viral de la enfermedad de Newcastle que expresa IL-12. En otra forma de realización, el agente terapéutico adicional es dinaciclib. En otras formas de realización adicionales, el agente terapéutico adicional es un agonista STING.

Las vías de administración adecuadas pueden, por ejemplo, incluir administración parenteral, que incluye administración intramuscular, subcutánea, así como también intratecal, intraventricular directa, intravenosa, intraperitoneal. Los fármacos se pueden administrar en una variedad de maneras convencionales, tales como inyección intraperitoneal, parenteral, intraarterial o intravenosa. Los modos de administración en los cuales se debe limitar el volumen de solución (por ejemplo, administración subcutánea) requieren una formulación liofilizada para permitir la reconstitución en una concentración alta.

La selección de una dosis de un agente terapéutico adicional depende de varios factores, que incluyen la tasa de producción de suero o tejido de la entidad, el nivel de síntomas, la inmunogenicidad de la entidad y la accesibilidad de las células diana, tejido u órgano en el individuo a ser tratado. La dosis del agente terapéutico adicional debe ser una cantidad que proporcione un nivel aceptable de efectos secundarios. Por consiguiente, la cantidad de dosis y la frecuencia de dosis para cada agente terapéutico adicional (por ejemplo, agente bioterapéutico o quimioterapéutico) dependerá en parte del agente terapéutico particular, la gravedad del cáncer a ser tratado y las características del paciente. Hay disponibles ciertas pautas para seleccionar las dosis adecuadas de anticuerpos, citocinas y moléculas pequeñas. Véase, por ejemplo, Wawrzynczak (1996) *Antibody Therapy*, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK; Kresina (ed.) (1991) *Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis*, Marcel Dekker, Nueva York, NY; Bach (ed.) (1993) *Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases*, Marcel Dekker, 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<sup>ma</sup> edición); Medical Economics Company;

ISBN: 1563634457; 57<sup>ma</sup> edición (noviembre de 2002). El régimen de dosis adecuado es determinada por el médico, por ejemplo, mediante parámetros o factores que se sabe o se sospecha en la técnica que afectan el tratamiento o que se prevé afectarán el tratamiento, y dependerá, por ejemplo, de la historia clínica del paciente (por ejemplo, tratamiento previo), el tipo y estadio del cáncer a ser tratado y los biomarcadores de respuesta a uno o más de los agentes terapéuticos en el tratamiento conjunto.

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

Una formulación farmacéutica de anticuerpos se puede administrar mediante infusión continua, o mediante dosis en intervalos de, por ejemplo, 1-7 veces por semana, una semana, dos semanas, tres semanas, mensual, bimestral, etc. Un protocolo de dosis específica preferido es aquel que comprende la dosis máxima o la frecuencia de dosis que evita efectos secundarios no deseados significativos. Una dosis semanal total es por lo general al menos 0,05 µg/kg, 0,2 µg/kg, 0,5 µg/kg, 1 µg/kg, 10 µg/kg, 100 µg/kg, 0,2 mg/kg, 1,0 mg/kg, 2,0 mg/kg, 10 mg/kg, 25 mg/kg, 50 mg/kg por peso corporal o mayor. Véase, por ejemplo, Yang *et al.* (2003) *New Engl. J. Med.* 349:427-434; Herold *et al.* (2002) *New Engl. J. Med.* 346:1692-1698; Liu *et al.* (1999) *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* 67:451-456; Portielji *et al.* (20003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:133-144. La dosis deseada de una molécula terapéutica pequeña, por ejemplo, mimético peptídico, producto natural o químico orgánico, es aproximadamente el mismo para el anticuerpo o polipéptido, en una base moles/kg.

Las formas de realización de la invención también incluyen una o más de las formulaciones biológicas que se describen en la presente (i) para su uso en, (ii) para uso como medicamento o composición para, o (iii) para uso en la preparación de un medicamento para: (a) tratamiento (por ejemplo, del cuerpo humano); (b) medicina; (c) inducción de o incremento de una respuesta inmunitaria antitumoral (d) disminución del número de uno o más marcadores de tumor en un paciente; (e) ralentización o retraso del crecimiento de un tumor o cáncer hematológico; (f) ralentización o retraso de una enfermedad relacionada a PD-1 o una enfermedad relacionada a anti-TIGIT; (g) ralentización o retraso de la progresión del cáncer; (h) estabilización de una enfermedad relacionada a PD-1 o una enfermedad anti-TIGIT; (i)

inhibición del crecimiento o supervivencia de las células tumorales; (j) eliminación o reducción del tamaño de uno o mas tumores o lesiones cancerígenos; (k) reducción de la progresión, aparición o gravedad de una enfermedad relacionada a PD-1 o una enfermedad anti-TIGIT; (l) reducción de la gravedad o duración de los síntomas clínicos de una enfermedad relacionada a PD-1 o anti-TIGIT tal como el cáncer (m) prolongación de la supervivencia de un paciente en relación a la supervivencia esperada en un paciente similar sin tratamiento n) inducción de la remisión completa o parcial de una afección cancerígena y otra enfermedad relacionada a PD-1 o anti-TIGIT, o) tratamiento del cáncer o p) tratamiento de infecciones crónicas.

## MÉTODOS GENERALES

Los métodos estándar en biología molecular se describen en Sambrook, Fritsch y Maniatis (1982 & 1989 2<sup>da</sup> edición, 2001 3<sup>ra</sup> edición) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Sambrook y Russell (2001) *Molecular Cloning, 3<sup>ra</sup> edición*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Wu (1993) *Recombinant DNA*, Vol. 217, Academic Press, San Diego, CA). Los métodos estándar también aparecen en Ausbel, *et al.* (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol.1-4, John Wiley and Sons, Inc. Nueva York, NY, que describe la clonación en células bacterianas y mutagénesis de ADN (Vol. 1), clonación en células mamarias y levadura (Vol. 2), expresión de proteínas y glicoconjugados (Vol. 3), y bioinformática (Vol. 4).

Los métodos para la purificación de proteínas que incluyen inmunoprecipitación, cromatografía, electroforesis, centrifugado y cristalización se describen en (Coligan, *et al.* (2000) *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., Nueva York). El análisis químico, la modificación química, la modificación después de la traducción, la producción de proteínas de fusión, la glicosilación de proteínas se describen (véase, por ejemplo, Coligan, *et al.* (2000) *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 2, John Wiley and Sons, Inc., Nueva York; Ausubel, *et al.* (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 3, John Wiley and Sons, Inc., NY, NY, págs. 16.0.5-16.22.17; Sigma-Aldrich, Co. (2001) *Products for Life Science Research*, St. Louis, MO; págs. 45-89; Amersham Pharmacia Biotech (2001) *BioDirectory*, Piscataway, N.J., págs. 384-391). La producción, purificación y fragmentación de anticuerpos monoclonales y policlonales se describe (Coligan, *et al.* (2001) *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., Nueva York; Harlow y Lane (1999) *Using Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Harlow y Lane, *supra*). Las técnicas estándar para la caracterización de las interacciones ligando/receptor están disponibles (véase, por ejemplo, Coligan, *et al.* (2001) *Current Protocols in Immunology*, Vol. 4, John Wiley, Inc., Nueva York).

Los anticuerpos monoclonales, policlonales y humanizados se pueden preparar (véase, por ejemplo, Sheperd y Dean (eds.) (2000) *Monoclonal Antibodies*, Oxford Univ. Press, Nueva York, NY; Kontermann and Dubel (eds.) (2001) *Antibody Engineering*, Springer-Verlag, Nueva York; Harlow y Lane (1988) *Antibodies A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory

Press, Cold Spring Harbor, NY, págs. 139-243; Carpenter, *et al.* (2000) *J. Immunol.* 165:6205; He, *et al.* (1998) *J. Immunol.* 160:1029; Tang *et al.* (1999) *J. Biol. Chem.* 274:27371-27378; Baca *et al.* (1997) *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684; Chothia *et al.* (1989) *Nature* 342:877-883; Foote y Winter (1992) *J. Mol. Biol.* 224:487-499; patente estadounidense N.º 6.329.511).

5 Una alternativa a la humanización es usar colecciones de anticuerpos humanos expresados en fagos o colecciones de anticuerpos humanos en ratones transgénicos (Vaughan *et al.* (1996) *Nature Biotechnol.* 14:309-314; Barbas (1995) *Nature Medicine* 1:837-839; Mendez *et al.* (1997) *Nature Genetics* 15:146-156; Hoogenboom and Chames (2000) *Immunol. Today* 21:371-377; Barbas *et al.* (2001) *Phage Display: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor  
10 Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York; Kay *et al.* (1996) *Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual*, Academic Press, San Diego, CA; de Bruin *et al.* (1999) *Nature Biotechnol.* 17:397-399).

La purificación del antígeno no es necesaria para la generación de anticuerpos. Los animales se pueden inmunizar con células que portan el antígeno de interés. Los esplenocitos se  
15 pueden luego aislar de los animales inmunizados, y los esplenocitos se pueden fusionar con una línea celular de mieloma para obtener un hibridoma (véase, por ejemplo, Meyaard *et al.* (1997) *Immunity* 7:283-290; Wright *et al.* (2000) *Immunity* 13:233-242; Preston *et al.*, *supra*; Kaithamana *et al.* (1999) *J. Immunol.* 163:5157-5164).

Los anticuerpos se pueden conjugar, por ejemplo, a moléculas de fármaco pequeñas,  
20 enzimas, liposomas, polietilenglicol (PEG). Los anticuerpos son útiles para tratamiento, diagnóstico, kit u otros fines, e incluyen anticuerpos acoplados, por ejemplo, a colorantes, radioisótopos, enzimas o metales, por ejemplo, oro coloidal (véase, por ejemplo, Le Doussal *et al.* (1991) *J. Immunol.* 146:169-175; Gibellini *et al.* (1998) *J. Immunol.* 160:3891-3898; Hsing y Bishop (1999) *J. Immunol.* 162:2804-2811; Everts *et al.* (2002) *J. Immunol.* 168:883-889).

25 Los métodos para citometría de flujo, que incluye separación de células activadas por fluorescencia (FACS), están disponibles (véase, por ejemplo, Owens, *et al.* (1994) *Flow Cytometry Principles for Clinical Laboratory Practice*, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ; Givan (2001) *Flow Cytometry*, 2<sup>da</sup> edición.; Wiley-Liss, Hoboken, NJ; Shapiro (2003) *Practical Flow Cytometry*, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ). Los reactivos fluorescentes adecuados  
30 para la modificación de ácidos nucleicos, incluyen cebadores de ácido nucleico y sondas, polipéptidos y anticuerpos para su uso, por ejemplo, como reactivos de diagnóstico, están disponibles (Molecular Probes (2003) *Catalogue*, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR; Sigma-Aldrich (2003) *Catalogue*, San Luis, MO).

Los métodos estándar de histología del sistema inmune están descritos (véase, por  
35 ejemplo, Muller-Harmelink (ed.) (1986) *Human Thymus: Histopathology and Pathology*, Springer Verlag, Nueva York, NY; Hiatt, *et al.* (2000) *Color Atlas of Histology*, Lippincott, Williams, and Wilkins, Phila, PA; Louis, *et al.* (2002) *Basic Histology: Text and Atlas*, McGraw-Hill, Nueva York, NY).

Los paquetes de software y las bases de datos para determinar, por ejemplo, fragmentos antigénicos, secuencias líder, plegamiento de proteínas, dominios funcionales, sitios de glicosilación y alineación de secuencias, están disponibles (véase, por ejemplo, GenBank, Vector NTI® Suite (Informax, Inc, Bethesda, MD); GCG Wisconsin Package (Accelrys, Inc., San Diego, CA); DeCypher® (TimeLogic Corp., Crystal Bay, Nevada); Menne, *et al.* (2000) *Bioinformatics* 16: 741-742; Menne, *et al.* (2000) *Bioinformatics Applications Note* 16:741-742; Wren, *et al.* (2002) *Comput. Methods Programs Biomed.* 68:177-181; von Heijne (1983) *Eur. J. Biochem.* 133:17-21; von Heijne (1986) *Nucleic Acids Res.* 14:4683-4690).

## 10 Métodos analíticos

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

El contenido iso-asp en las muestras se mide mediante el Sistema de detección de isoaspartato Isoquant (Promega). El kit que utiliza la Metiltransferasa de enzima de metiltransferasa de isoaspartato de la proteína (PIMT) para detectar específicamente la presencia de residuos de ácido isoaspártico en la proteína diana. PIMT cataliza la transferencia de un grupo metilo de S-adenosil-L-metionina a ácido isoaspártico en la posición .alfa.-carboxilo, que genera S-adenosil-L-homocisteína (SAH) en el proceso. Esta es una molécula relativamente pequeña, y por lo general se puede aislar y cuantificar mediante HPLC de fase inversa a través de los estándares de SAH HPLC proporcionados en el kit.

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

Todas las publicaciones que se mencionan se incorporan en la presente por referencia, a

fin de describir las metodologías y materiales que se pueden usar en relación con la presente invención.

Tras describir las diferentes formas de realización de la invención en la presente con referencia a los dibujos adjuntos, se entiende que la invención no se limita a esas formas de realización precisas, y que un experto en la materia puede llevar a cabo varios cambios y modificaciones en estas sin apartarse del alcance o espíritu de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.

## EJEMPLOS

### EJEMPLO 1

#### **Cribado de amortiguador de formulación anti-TIGIT**

Se realizó un estudio de desarrollo de formulación de alto rendimiento para tres anticuerpos anti-TIGIT, cada uno de ellos con los siguientes CDR: HCDR1 de SEQ ID NO: 108, HCDR2 de SEQ ID NO: 154, HCDR3 de SEQ ID NO: 110, LCDR1 de SEQ ID NO: 111, LCDR2 de SEQ ID NO: 112, y LCDR3 de SEQ ID NO: 113, para evaluar (1) los riesgos biofísicos/bioquímicos; (2) las condiciones de pre-formulación (pH, sal y amortiguador) y (3) la compatibilidad con la formulación de la plataforma. Las muestras fueron analizadas por espectrofotometría UV/Vis para turbidez (A350) como sustituto de agregados más grandes, cromatografía de exclusión de tamaño (UP-SEC) para detectar la formación de especies de alto peso molecular, enfoque isoeléctrico capilar (cIEF) para medir el efecto del estrés sobre la distribución de cargas en la superficie de la molécula, reducción de la electroforesis capilar de dodecilsulfato de sodio (CE-SDS) para detectar la escisión proteolítica de las cadenas pesadas o ligeras, y el análisis de partículas subvisibles para detectar agregados subvisibles.

La pantalla de formulación de alto rendimiento se compone de 1 mg/ml de anticuerpos anti-TIGIT formulados en una selección de tres especies de amortiguadores: Amortiguador de acetato con valores de pH que varían de 5,0 a 6,2, amortiguador de citrato con valores de pH que varían de 5,6 a 6,8 y amortiguador de L-histidina con valores de pH que varían de 5,0 a 6,8. Por lo tanto, se examinaron valores de pH que varían de 5,0 a 6,8 y una resistencia iónica de 0-150 mM NaCl. Las muestras se estresaron a 50 °C durante 10 días y se analizó su estabilidad térmica mediante fluorescencia de barrido diferencial (DSF), estabilidad coloidal mediante cromatografía de exclusión de tamaño (UP-SEC), propensión a la agregación mediante el uso de guayaba (un ensayo de caracterización subvisible en función de la citometría de flujo), turbidez (mediciones A350), perfil de variantes de carga (cIEF) y perfil de fragmentación mediante el uso de Caliper.

En función de los resultados obtenidos del estudio, la formulación, que impartió la máxima estabilidad a la proteína fue de 10 mM de L-Histidina en el rango de pH de 5,6 a 6,2. 10 mM de L-Histidina en el rango de pH de 5,6 a 6,2 mostró una agregación mínima monitoreada por UP-SEC con  $\Delta$ SEC principal que varía entre -1,63 a -1,85 % (en comparación con el rango

principal de SEC de -2,0 a -5,0 % en otras condiciones de amortiguador y pH) (datos no mostrados). El perfil del cIEF mostró una disminución del área relativa del pico de las especies principales y básicas y se observó un aumento del área relativa del pico de las variantes ácidas en las muestras después de 10 días a 50 °C (cIEF principal que varía entre -9,0 a -11,3 %) (datos no mostrados). Una disminución de las variantes básicas y un aumento de las variantes ácidas al exponerse a temperaturas elevadas es una ocurrencia común para los mAbs. La adición de sal redujo la estabilidad de la proteína a través de las composiciones estudiadas.

## EJEMPLO 2

### Estudio de rango de pH de la formulación Anti-TIGIT

En este estudio, se examinó un anticuerpo anti-TIGIT con los siguientes CDR: HCDR1 de SEQ ID NO: 108, HCDR2 de SEQ ID NO: 154, HCDR3 de SEQ ID NO: 110, LCDR1 de SEQ ID NO: 111, LCDR2 de SEQ ID NO: 112, y LCDR3 de SEQ ID NO: 113, a una concentración de 50 mg/ml en un amortiguador de 10 mM de L-Histidina. Se agregó sacarosa al 7 % (p/v) a la formulación para aumentar la estabilidad a granel (como estabilizador y modificador de tonicidad no iónica) de la molécula. El anticuerpo anti-TIGIT se formuló en amortiguador de 10 mM de L-Histidina, sacarosa al 7 % a pH 5,5, pH 6,0 y pH 6,5. La estabilidad de tales formulaciones se evaluó de la siguiente manera:

- (1) La estabilidad de la molécula se controló en condiciones de estabilidad térmica y de almacenamiento acelerada (5 °C, 25 °C y 40 °C por hasta 6 meses), protegida de la luz.
- (2) También se realizaron estudios de estabilidad para el estrés de congelación-descongelación y el estrés de agitación.
- (3) El estudio de agitación se realizó en formulaciones que contenían concentraciones variables de polisorbato 80 (PS-80) para evaluar la concentración de PS-80 en la formulación.
- (4) Se realizó un estudio de estrés por luz para evaluar el requerimiento de L-metionina en las formulaciones.

### *Materiales y métodos*

#### Estudio de estabilidad térmica (3 meses)

Se formuló 50 mg/ml de anticuerpo anti-TIGIT en amortiguador de 10 mM de L-Histidina, sacarosa al 7 %, 0,2 mg/ml de polisorbato 80 a pH 5,5, pH 6,0 o pH 6,5. Las formulaciones resultantes se esterilizaron por filtración y se llenaron en viales 2R, se taponaron con clorobutilo y se taparon con tapas de aluminio con sellos. El estudio de estabilidad se realizó a 5 °C (humedad ambiente), 25 °C (60 % de humedad relativa) y 40 °C (75 % de humedad relativa). Las muestras se analizaron utilizando UP-SEC, HP-IEX, cIEF (muestras

seleccionadas), MFI, CE-SDS ("NR" no reducido y "R" reducido), mapeo de péptidos reducido (MFI y el mapeo de péptidos reducido se realizó en puntos temporales seleccionados).

Se estableció un estudio de estabilidad térmica de 1 mes para el anticuerpo anti-TIGIT de 25 mg/ml formulado en amortiguador de 10 mM de L-Histidina, sacarosa al 7 %, 0,2 mg/ml de PS-80, pH 6,0. La formulación resultante se esterilizó por filtración y se llenó en viales 2R, se tapó con tapones de clorobutilo y se tapó con sellos de aluminio. El estudio de estabilidad se realizó a 5 °C (humedad ambiente), 25 °C (60 % de humedad relativa) y 40 °C (75 % de humedad relativa) durante un mes. Las muestras se analizaron utilizando UP-SEC, cIEF y CE-SDS (NR y R).

#### 10 Estudio de estabilidad en agitación

Se formuló un anticuerpo anti-TIGIT de 50 mg/ml en amortiguador de 10 mM de L-Histidina, sacarosa al 7 %, pH 6,0 con diversas concentraciones de polisorbato 80 (0, 0,1 y 0,2 mg/ml). Las formulaciones resultantes se esterilizaron por filtración y se llenaron en viales 2R (1,2 ml de volumen de llenado), se taparon con tapones de clorobutilo y se taparon con tapas de aluminio con sellos. Las muestras se agitaron en posición horizontal a 300 RPM durante hasta 7 días a 18-22 °C. Las muestras se analizaron utilizando UP-SEC, MFI, CE-SDS (NR y R)

#### Estabilidad de congelación-descongelación

El anticuerpo anti-TIGIT de 50 mg/ml se formuló en amortiguador de 10 mM de L-Histidina, sacarosa al 7 %, 0,2 mg/ml de polisorbato 80, pH 6,0. La formulación resultante se esterilizó por filtración y se llenó en viales 2R, se tapó con tapones de clorobutilo y se tapó con tapas de aluminio con sellos. Las muestras se sometieron a 5 ciclos de congelación-descongelación de -80 °C a 18-22 °C (al menos 24 horas en condiciones de congelación y a temperatura ambiente hasta que se descongelen por completo). Las muestras se analizaron utilizando UP-SEC, MFI, CE-SDS (NR y R).

#### 25 Estudio de estabilidad de estrés por luz

Los primeros estudios de desarrollo indicaron la presencia de un residuo de triptófano expuesto, así como algunas metioninas que eran susceptibles de oxidación bajo estrés por luz. Los estudios se establecieron bajo condiciones de estrés lumínico ICH luz visible (CWF, 0,1x ICH, 0,2x ICH, 0,5x ICH, 1x ICH) en formulaciones con y sin L-metionina (Formulación 1: amortiguador de 10 mM de L-Histidina, sacarosa al 7 %, 0,2 mg/ml de polisorbato 80, pH 6,0 y Formulación 2: amortiguador de 10 mM de L-Histidina, L-metionina de 10 mM, sacarosa al 7 %, 0,2 mg/ml de polisorbato 80, pH 6,0). Las muestras se analizaron utilizando UP-SEC, cIEF, CE-SDS (NR y R) y mapeo de péptidos reducido.

#### *Resultados*

#### 35 Resultados de estabilidad térmica

Formulación de 50 mg/ml: Para todos los ensayos indicativos de estabilidad probados, no se observaron cambios significativos a 5 °C a todos los valores de pH después de 3 meses (datos no mostrados). A 25 °C y 40 °C, el pH 5,5 y pH 6,0 mostraron una estabilidad similar y estas condiciones fueron más estables que pH 6,5 (datos no mostrados). Las tasas de degradación a pH 6,5 para los ensayos UP-SEC, CE-SDS (NR) y cIEF a 25 °C y 40 °C fueron relativamente más altas que las observadas a pH 5,5 y pH 6,0 y también en comparación con la molécula de referencia. Por lo tanto, se consideró adecuado un rango de pH de 5,5 a 6,0 (pI de 8,7). No se observó oxidación, desamidación o isomerización para el anticuerpo anti-TIGIT después de 3 meses a todas las temperaturas y valores de pH.

formulación de 25 mg/ml: Se observó degradación a 25 °C y 40 °C para todos los ensayos probados. Se encontró que las tasas de degradación eran similares a las condiciones de 50 mg/ml (véase arriba).

#### Estudio de estabilidad en agitación

Las formulaciones que no contenían polisorbato 80 mostraron partículas visibles al final de 7 días. El análisis de partículas subvisible mostró que las partículas de 10 µm o más se redujeron significativamente en la formulación que contenía una concentración de 0,2 mg/ml de polisorbato 80. No se observaron diferencias significativas entre las muestras utilizando los otros ensayos.

#### Estabilidad de congelación-descongelación

No se observaron cambios en la estabilidad de la molécula después de 5 ciclos de congelación-descongelación en todos los ensayos probados.

#### Estudio de estabilidad de estrés por luz

Se observó degradación cuando las muestras de ambas formulaciones se expusieron a estrés por luz a 0,5x ICH o superior cuando se analizaron con UP-SEC, cIEF, CE-SDS (NR y R). Las condiciones de configuración por debajo de 0,5x ICH no mostraron degradación significativa para ambas formulaciones. Los datos de mapeo de péptidos reducidos en condiciones de estrés por luz 0,5x y superiores mostraron oxidación de residuos de triptófano y metionina. La L-metionina de 10 mM en la formulación redujo los niveles de oxidación de los residuos de metionina pero no afectó los niveles de oxidación del triptófano.

#### *Conclusión*

En función de lo anterior, el amortiguador de 10 mM de L-Histidina, 10 mM de L-metionina, sacarosa al 7 %, 0,2 mg/ml de polisorbato 80, pH 5,5-6,0 se considera adecuado para impartir estabilidad para soportar la vida útil en condiciones refrigeradas.

### EJEMPLO 3

#### **Estudios de pH adicionales**

Se formuló un anticuerpo anti-TIGIT con los siguientes CDR: HCDR1 de SEQ ID NO: 108, HCDR2 de SEQ ID NO: 154, HCDR3 de SEQ ID NO: 110, LCDR1 de SEQ ID

NO: 111, LCDR2 de SEQ ID NO:112, y LCDR3 de SEQ ID NO: 113 y en una cadena principal IgG1 en seis amortiguadores de histidina de 10 mM con diferentes pH (que varían entre 5,0 y 6,5). La estabilidad térmica en diferentes formulaciones fue estudiada a 2~8 °C, 25 °C y 40 °C durante 8 semanas.

5

| <b>Formulación</b> | <b>Anticuerpo anti-TIGIT</b> | <b>Amortiguador</b>  | <b>pH</b> | <b>Sacarosa (% p/v)</b> | <b>Polisorbato 80 (% p/v)</b> |
|--------------------|------------------------------|----------------------|-----------|-------------------------|-------------------------------|
| 1                  | 50 mg/ml                     | 10 mM de L-Histidina | pH=5,0    | 7 %                     | 0,02 %                        |
| 2                  | 50 mg/ml                     | 10 mM de L-Histidina | pH=5,3    | 7 %                     | 0,02 %                        |
| 3                  | 50 mg/ml                     | 10 mM de L-Histidina | pH=5,6    | 7 %                     | 0,02 %                        |
| 4                  | 50 mg/ml                     | 10 mM de L-Histidina | pH=5,9    | 7 %                     | 0,02 %                        |
| 5                  | 50 mg/ml                     | 10 mM de L-Histidina | pH=6,2    | 7 %                     | 0,02 %                        |
| 6                  | 50 mg/ml                     | 10 mM de L-Histidina | pH=6,5    | 7 %                     | 0,02 %                        |

Se prepararon amortiguadores de histidina de diferentes pH (5,0~6,5) al titular amortiguador de 10 mM de L-histidina en amortiguador de 10 mM de L-histidina-HCl. El anticuerpo anti-TIGIT fue intercambiado por seis diferentes amortiguadores de histidina con diferente pH a través de cuatro o cinco rondas de ultrafiltración usando el dispositivo centrífugo bajo la condición de 4 °C y 4500 rpm~5000 rpm (105~260 min en cada ronda). Tras el intercambio de amortiguador, se agregó la cantidad específica de sacarosa y solución de reserva de polisorbato 80 (1 %, p/p) a soluciones de pH diferente para alcanzar la cantidad diana y se agregó también la cantidad adecuada de amortiguador de histidina correspondiente para ajustar la concentración de anticuerpos a alrededor de 50 mg/ml.

A continuación, las formulaciones se filtraron asépticamente con un filtro de membrana de 0,22-µm. 3 ml de cada muestra se llenaron asépticamente en viales de vidrio de 6 ml para el estudio de estabilidad térmica de T0, 4 semanas (4W) y 8 semanas (8W). 1 ml de cada muestra se llenó asépticamente en viales de vidrio de 6 ml para el estudio de estabilidad térmica de dos semanas (2W). Los viales llenos se taponaron y se prensó el sellado inmediatamente después del llenado. Todas las etapas anteriores se realizaron en campana de bioseguridad. Esos viales se colocaron en cajas cubiertas y se almacenaron en diferentes condiciones de temperatura para el estudio de estabilidad térmica.

## Resultados y análisis

La apariencia de todas las muestras permaneció igual en cuatro semanas en todas las condiciones.

Sin embargo, después de 8 semanas, las muestras a  $2 \sim 8^\circ\text{C}$  y  $25^\circ\text{C}$  se mostraron ligeramente amarillentas y

las muestras a  $40^\circ\text{C}$  mostraron un color amarillento más profundo. Todas las muestras fueron ligeramente opalescentes y

libre de partículas visibles durante el período de estudio. No se observó un cambio considerable en la concentración de proteínas de todas las muestras durante el estudio.

La estabilidad coloidal de las muestras se evaluó mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para determinar la pureza en la cual el porcentaje de monómero, los porcentajes de especies de alto peso molecular (HMW) y los picos de elución tardía (especies LMW). El análisis se realizó utilizando un sistema Agilent 1260 Infinity con la columna de cromatografía de exclusión por tamaño TSKGel G3000SWXL ( $300 \times 7,8\text{ mm}$ ,  $5\text{ }\mu\text{m}$ ). La fase móvil fue de 50 mM PB, 300 mM NaCl, pH  $7,0 \pm 0,2$  y la velocidad de flujo se fijó en 1,0 ml/min. Las muestras se diluyeron a 10 mg/ml para inyección y se detectaron a 280 nm con un detector UV.

Los datos de UPSEC se presentan en la siguiente tabla:

|                     |     |      | 2-8 °C |      |      | 25 °C |      |      | 40 °C |      |      |
|---------------------|-----|------|--------|------|------|-------|------|------|-------|------|------|
|                     | pH  | T0   | 2W     | 4W   | 8W   | 2W    | 4W   | 8W   | 2W    | 4W   | 8W   |
| % de pico principal | 5   | 97,7 | 97,5   | 97,4 | 97,5 | 97,7  | 97,4 | 97   | 97,2  | 96   | 94,5 |
|                     | 5,3 | 97,7 | 97,5   | 97,7 | 97,4 | 97,6  | 97,2 | 96,8 | 96,5  | 96,2 | 94,6 |
|                     | 5,6 | 97,6 | 97,4   | 97,6 | 97,3 | 97,1  | 97,1 | 96,8 | 97    | 96,1 | 94,8 |
|                     | 5,9 | 97,5 | 97,3   | 97,5 | 97,3 | 97,3  | 97   | 96,5 | 96,2  | 96   | 94,7 |
|                     | 6,2 | 97,3 | 97,2   | 97,5 | 97,1 | 97,1  | 96,8 | 96,5 | 96,4  | 95,7 | 94,3 |
|                     | 6,5 | 97,3 | 97,1   | 97,4 | 97,1 | 96,9  | 96,6 | 96,2 | 95,8  | 95,5 | 94,6 |
|                     |     |      |        |      |      |       |      |      |       |      |      |
| % HMW               | 5   | 2,3  | 2,5    | 2,6  | 2,5  | 2,3   | 2,4  | 2,8  | 2,4   | 2,8  | 3,4  |
|                     | 5,3 | 2,3  | 2,5    | 2,3  | 2,6  | 2,4   | 2,5  | 2,9  | 2,8   | 2,9  | 3,7  |
|                     | 5,6 | 2,4  | 2,6    | 2,4  | 2,7  | 2,7   | 2,7  | 3    | 2,8   | 3,2  | 3,9  |
|                     | 5,9 | 2,5  | 2,7    | 2,5  | 2,7  | 2,7   | 2,8  | 3,2  | 3,3   | 3,3  | 4,1  |
|                     | 6,2 | 2,7  | 2,8    | 2,5  | 2,9  | 2,9   | 3    | 3,3  | 3,3   | 3,6  | 4,6  |
|                     | 6,5 | 2,7  | 2,9    | 2,6  | 2,9  | 3,1   | 3,2  | 3,5  | 3,7   | 3,9  | 4,3  |
|                     |     |      |        |      |      |       |      |      |       |      |      |
| % LMW               | 5   | N.D. | N.D.   | N.D. | N.D. | N.D.  | 0,2  | 0,3  | 0,4   | 1,3  | 2,1  |
|                     | 5,3 | N.D. | N.D.   | N.D. | N.D. | N.D.  | 0,2  | 0,2  | 0,6   | 0,8  | 1,7  |
|                     | 5,6 | N.D. | N.D.   | N.D. | N.D. | 0,2   | 0,2  | 0,2  | 0,2   | 0,7  | 1,3  |
|                     | 5,9 | N.D. | N.D.   | N.D. | N.D. | N.D.  | 0,2  | 0,3  | 0,5   | 0,7  | 1,2  |
|                     | 6,2 | N.D. | N.D.   | N.D. | N.D. | N.D.  | 0,2  | 0,2  | 0,3   | 0,7  | 1,1  |
|                     | 6,5 | N.D. | N.D.   | N.D. | N.D. | N.D.  | 0,2  | 0,2  | 0,5   | 0,7  | 1,1  |

Como se muestra en la tabla anterior, el % de pico principal de SEC se mantuvo estable en 2~8 °C en todas las muestras, sin embargo, a 25 °C y 40 °C, se observó una disminución significativa en el % de pico principal. La velocidad de disminución del % del pico principal fue más rápida en las muestras a 40 °C que en las muestras a 25 °C. A 40°C durante ocho semanas, el % de HMW fue mayor en las muestras de pH 6,2 y 6,5, mientras que el % de LMW fue mayor en las muestras de pH 5,0 y 5,3.

Para evaluar la estabilidad química de las formulaciones, se realizó un enfoque isoeléctrico capilar (cIEF) para evaluar la estabilidad química y controlar el cambio en el perfil de la variante de carga a lo largo del tiempo. En resumen, 20 µl (2,0 mg/ml) del estándar de referencia o la muestra se mezcló con 0,5 µl de marcador pI 5,85, 0,5 µl de marcador pI 9,77, 1 µl de Pharmalyte 3-10, 0,5 µl de Pharmalyte 5-8, 0,5 µl de Pharmalyte 8-10,5, 35 µl de metilcelulosa al 1 %, 37,5µl de urea 8 M. Se agregó agua purificada para formar un volumen final de 100 µl. La mezcla fue analizada con el analizador de enfoque isoeléctrico capilar iCE-3 equipado con un capilar de detección de columna entera recubierto de fluorocarbono. El enfoque se llevó a cabo en dos etapas: (1) 1,5 kV durante 1 min. y (2) 3 kV durante 8 min. Durante el experimento, la bandeja de muestreo automático se mantuvo a 5 °C.

Los datos del cIEF para evaluar los niveles de Variantes ácidas, % de pico principal y % de variantes básicas se encuentran en la siguiente Tabla.

|                     |     |      | 2-8 °C |      |      | 25 °C |      |      | 40 °C |      |      |
|---------------------|-----|------|--------|------|------|-------|------|------|-------|------|------|
|                     | pH  | T0   | 2W     | 4W   | 8W   | 2W    | 4W   | 8W   | 2W    | 4W   | 8W   |
| % de pico principal | 5   | 62,2 | 63     | 60   | 62,6 | 62,8  | 57,6 | 58,4 | 50,2  | 37,5 | 29,1 |
|                     | 5,3 | 62,2 | 63     | 59,9 | 62,4 | 62,8  | 57,7 | 58,6 | 50,6  | 39,1 | 30,2 |
|                     | 5,6 | 62,3 | 62,8   | 59,9 | 62,8 | 62,6  | 58,1 | 58,7 | 51,9  | 41,4 | 31   |
|                     | 5,9 | 62   | 62,9   | 59,7 | 62,5 | 62,8  | 58,1 | 58,4 | 51,7  | 41,2 | 32,4 |
|                     | 6,2 | 62,1 | 62,8   | 59,6 | 62,2 | 62,5  | 57,5 | 58,6 | 51,7  | 41,8 | 31,8 |
|                     | 6,5 | 62,2 | 62,9   | 59,4 | 62,5 | 61,9  | 56,1 | 57,4 | 51,1  | 40,4 | 33,2 |
| % de acidez         | 5   | 31,7 | 30,3   | 32,7 | 30,2 | 30,5  | 33,5 | 33,9 | 39,7  | 49,2 | 58,2 |
|                     | 5,3 | 31,8 | 30,6   | 32,3 | 30,6 | 30,5  | 34   | 34,1 | 40,3  | 49,5 | 59,4 |
|                     | 5,6 | 31,4 | 30,8   | 32,6 | 30,3 | 30,8  | 34,2 | 34,3 | 39,8  | 48,9 | 59,5 |
|                     | 5,9 | 31,9 | 30,7   | 33,1 | 30,6 | 30,9  | 34,3 | 34,8 | 40,7  | 48,8 | 59,1 |
|                     | 6,2 | 32,1 | 30,8   | 33,5 | 31,2 | 31,3  | 34,5 | 34,6 | 41    | 49   | 59,7 |
|                     | 6,5 | 31,5 | 31     | 33,3 | 31   | 31,9  | 35,5 | 35,8 | 41,5  | 50,3 | 58,5 |
| % básico            | 5   | 6    | 6,7    | 7,3  | 7,2  | 6,8   | 8,9  | 7,7  | 10    | 13,3 | 12,6 |
|                     | 5,3 | 6    | 6,4    | 7,7  | 7    | 6,7   | 8,3  | 7,3  | 9,1   | 11,3 | 10,3 |
|                     | 5,6 | 6,2  | 6,5    | 7,5  | 6,8  | 6,5   | 7,6  | 7,2  | 8,2   | 9,6  | 9,5  |

|  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|  | 5,9 | 6,1 | 6,4 | 7,3 | 6,9 | 6,3 | 7,5 | 6,7 | 7,6 | 9,9 | 8,4 |
|  | 6,2 | 5,9 | 6,4 | 6,9 | 6,6 | 6,3 | 8   | 6,8 | 7,2 | 9,3 | 8,6 |
|  | 6,5 | 6,3 | 6,2 | 7,2 | 6,4 | 6,2 | 8,4 | 6,8 | 7,3 | 9,4 | 8,3 |

Como se puede ver en la tabla anterior, a 2~8 °C, el % del pico principal cIEF, el % de pico ácido y

el % de pico básico fueron relativamente estables y comparables en todas las muestras.

- 5 A 2~8°C, el pico básico principal del FEM también aumentó; el aumento en las muestras de amortiguamiento de pH 5,0 y 5,3 fue mayor que el de otras muestras. A 25 °C, el % de pico principal, el % de pico ácido y el % de pico básico se mantuvieron estables durante las dos primeras semanas, pero cambiaron ligeramente después de cuatro semanas en las que el % de pico principal disminuyó, mientras
- 10 que el % del pico ácido aumentó correspondientemente). La tasa de cambio en diferentes formulaciones fue comparable. A 40 °C, se encontró una disminución significativa en el % de pico principal y un aumento notable en el % de pico de ácido en todas las formulaciones, incluso después de dos semanas, pero el grado de cambio fue similar en cada formulación. También se incrementó el % de pico básico; el aumento en las muestras de amortiguador de pH 5,0 y 5,3 fue
- 15 mayor que el de otras muestras.

- Para evaluar la pureza de las formulaciones, se realizó un análisis de Caliper no reducido. En resumen, el amortiguador de muestra comprado se mezcló con solución de sulfato de sodio al 10 % (SDS) en una relación de volumen de 20 a 1, y se agregó solución de N-etilmaleimida de 100 nM a la solución mezclada en una relación de volumen de 0,7 a 20 (referida a la solución de
- 20 desnaturalización de la muestra). El estándar o muestra se diluyó primero a 1 mg/ml, y 2 µl de estándar o muestra diluida se mezcló con 7 µl de solución desnaturizante de muestra. La mezcla se incubó a 70 °C durante 10 minutos. Se agregó 35 µl de agua purificada a la solución incubada, y se transfirió 42 µl de la solución mezclada a una placa de 96 cavidades para su análisis. La placa de muestra fue analizada con el LabChip GX II HT, utilizando el ensayo de
- 25 análisis de anticuerpo HT 200.

Los datos de análisis de Caliper no reducido para evaluar el porcentaje de pureza se muestran en la siguiente tabla:

|                            |     |      | 2-8 °C |      |      | 25 °C |      |      | 40 °C |      |      |
|----------------------------|-----|------|--------|------|------|-------|------|------|-------|------|------|
|                            | pH  | T0   | 2W     | 4W   | 8W   | 2W    | 4W   | 8W   | 2W    | 4W   | 8W   |
| <b>Caliper no reducido</b> |     |      |        |      |      |       |      |      |       |      |      |
| <b>% de pureza</b>         | 5   | 96   | 95,2   | 94,6 | 94,9 | 94,9  | 93,6 | 94,1 | 91,4  | 87,8 | 84,4 |
|                            | 5,3 | 96   | 95     | 94,7 | 94,9 | 94,8  | 93,8 | 94,1 | 92,7  | 89,5 | 86,4 |
|                            | 5,6 | 96,1 | 95     | 94,6 | 94,9 | 94,8  | 93,9 | 94,1 | 93    | 90,7 | 88,5 |
|                            | 5,9 | 96,3 | 94,9   | 94,5 | 94,9 | 94,8  | 93,9 | 94,2 | 93,4  | 91,1 | 89,3 |
|                            | 6,2 | 96,2 | 94,9   | 94,5 | 95   | 94,8  | 93,7 | 94,5 | 93,3  | 91,3 | 88,7 |

|  |     |    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|--|-----|----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|  | 6,5 | 96 | 95,1 | 94,4 | 94,9 | 94,7 | 93,4 | 94,1 | 93,2 | 90,7 | 89,3 |
|--|-----|----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|

Como se muestra en la Tabla anterior, a 2~8 °C durante ocho semanas, la pureza Caliper no reducido en cada formulación fue relativamente estable. A 25 °C durante ocho semanas, la pureza en cada formulación disminuyó ligeramente. A 40 °C, la pureza disminuyó

5 significativamente, especialmente cuando las muestras estaban en amortiguador de pH 5,0 y 5,3, la disminución fue mucho más rápida que la de otros. El tamaño de la molécula fue estable durante el estudio (datos no mostrados).

Para evaluar la pureza de las formulaciones, también se realizó un análisis de Caliper reducido. En resumen, el amortiguador de muestra comprado se mezcló con solución de SDS al

10 10 % a una relación de volumen de 20 a 1, y se agregó solución de ditiotretitol 1M a la solución mezclada a una relación de volumen de 0,7 a 20 (referida a la solución de desnaturalización de la muestra). El estándar o muestra se diluyó primero a 1 mg/ml, y 2 µl de estándar o muestra diluida se mezcló con 7 µl de solución desnaturalizante de muestra. La mezcla se incubó a 70 °C

15 µl de la solución mezclada a una placa de 96 cavidades para su análisis. La placa de muestra fue analizada con el LabChip GX II HT, utilizando el ensayo de análisis de anticuerpo HT 200.

Los datos de análisis de Caliper reducido para evaluar el porcentaje de pureza se muestran en la siguiente tabla:

|                         |     |      | 2-8 °C |      |      | 25 °C |      |      | 40 °C |      |      |
|-------------------------|-----|------|--------|------|------|-------|------|------|-------|------|------|
|                         | pH  | T0   | 2W     | 4W   | 8W   | 2W    | 4W   | 8W   | 2W    | 4W   | 8W   |
| % de pureza (Caliper_R) | 5   | 99,4 | 99,4   | 99,3 | 99,2 | 99,3  | 99,1 | 98,9 | 98    | 97,1 | 91,3 |
|                         | 5,3 | 99,4 | 99,4   | 99,2 | 99,2 | 99,3  | 99   | 99   | 98,5  | 97,7 | 94,9 |
|                         | 5,6 | 99,4 | 99,4   | 99,3 | 99,1 | 99,3  | 99,2 | 98,8 | 98,7  | 98,2 | 96,8 |
|                         | 5,9 | 99,4 | 99,4   | 99,2 | 99,1 | 99,2  | 99,2 | 98,8 | 99,1  | 98,6 | 96,8 |
|                         | 6,2 | 99,3 | 99,3   | 99,3 | 99,2 | 99,3  | 99,2 | 98,9 | 98,9  | 98,7 | 96,9 |
|                         | 6,5 | 99,3 | 99,4   | 99,2 | 99,1 | 99,3  | 99,2 | 98,8 | 98,9  | 98,5 | 97,5 |

Como se ha visto anteriormente, a 2~8 °C y 25 °C durante ocho semanas, la pureza de Caliper reducido en cada formulación era relativamente estable. A 40 °C, se encontró una

aparente disminución de la pureza de Caliper\_R en

todas las formulaciones. La pureza de las muestras en el amortiguador de pH 5,0 tuvo la mayor

25 disminución, seguida por las muestras en el amortiguador de pH 5,3. La tasa de disminución en los amortiguadores de pH 5,6, 5,9 y 6,2 fue comparable pero más lenta. La pureza de las muestras en el amortiguador de pH 6,5 tuvo la disminución más lenta. La disminución de la pureza se debió probablemente a la disminución del porcentaje de la cadena pesada (HC), mientras que el porcentaje de la cadena ligera (LC) se mantuvo estable en el estudio. La cadena

ligera de anticuerpos y el tamaño de la cadena pesada fueron estables en todas las muestras de más de 8W.

#### EJEMPLO 4

##### 5 **Formulación Anti-TIGIT sin metionina**

Se formuló un anticuerpo anti-TIGIT con los siguientes CDR: HCDR1 de SEQ ID NO: 108, HCDR2 de SEQ ID NO: 154, HCDR3 de SEQ ID NO: 110, LCDR1 de SEQ ID NO: 111, LCDR2 de SEQ ID NO: 112, y LCDR3 de SEQ ID NO: 113, a una concentración de 50 mg/ml en un amortiguador de 10 mM de L-histidina, sacarosa al 7 %, 0,2 mg/ml de PS-80 con un pH que varía entre 5,0 a 6,5. La estabilidad de la molécula se controló bajo condiciones de estabilidad térmica y de almacenamiento acelerada, protegida de la luz. Además de la estabilidad térmica, también se realizaron estudios de estabilidad de congelación-descongelación, estabilidad de agitación y estabilidad de estrés por luz. Se probó la estabilidad, incluyendo UP-SEC, cIEF, CE-SDS, MFI y mapeo de péptidos reducidos.

##### 15 *Resultados*

###### Estudio de estabilidad térmica (8 semanas)

Para todos los ensayos indicadores de estabilidad probados, el anticuerpo anti-TIGIT fue estable a 5 °C para todos los riesgos probados. Las tasas de degradación observadas usando UP-SEC, Caliper CE-SDS, cIEF, MFI fueron más altas a 40 °C que a 25 °C. A 25 °C y 40 °C, los siguientes resultados fueron notables:

UP-SEC: Se observó una disminución en el % de monómero para todos los valores de pH de 5,0 a 6,5. A los valores de pH más bajos (5,0 y 5,3), la disminución del pico principal se debió principalmente al aumento en % de especies de bajo peso molecular (LMW), mientras que el % de disminución de monómero a pH 6,5 se debió principalmente al aumento en % de especies de alto peso molecular (HMW). El % de disminución de monómero fue más alto a pH 6,5 después de 8 semanas de estabilidad acelerada (datos no mostrados).

cIEF: se observó la disminución del pico principal de cIEF para todos los valores de pH de 5,0 a 6,5 a 25 °C y 40 °C. En los valores de pH más altos (6,3-6,5), la disminución del pico principal se debió principalmente al aumento de las variantes ácidas, mientras que en pH 5,0 y 5,3, la disminución del pico principal se debió al aumento de las variantes tanto ácidas como básicas. (datos no mostrados)

CE-SDS (Caliper): La disminución del pico principal de CE-SDS no reducida se observó principalmente a 40 °C debido a la presencia de especies fragmentadas. Las formulaciones a valores de pH más bajos (5,0 y 5,3) mostraron una tasa de fragmentación relativamente más alta que el resto de los valores de pH.

El análisis de CE-SDS (Caliper) reducido reveló que a 5 °C y 25 °C durante ocho semanas, la pureza en cada formulación era relativamente estable. A 40 °C, se encontró una disminución aparente en la pureza en todas las formulaciones. La pureza de las muestras en el amortiguador de pH 5,0 tuvo la mayor disminución, seguida por las muestras en el amortiguador de pH 5,3.

MFI: Se observaron aumentos de partículas subvisibles para todas las formulaciones a 40 °C. pH 6,3 y 6,5 tuvieron los mayores incrementos en partículas subvisibles en relación con el resto de los amortiguadores.

Mapeo de péptidos reducido: Entre los riesgos identificados, solo M254 mostró un aumento relativo en la oxidación después de 8 semanas a 40 °C en relación con las muestras iniciales.

Conclusión: El amortiguador de 10 mM de L-Histidina, sacarosa al 7 %, 0,2 mg/ml de PS-80, pH 5,6-6,3 soportó adecuadamente la estabilidad de almacenamiento del anticuerpo anti-TIGIT durante 8 semanas.

#### Estudio de estabilidad en agitación

No se observaron cambios en los agregados solubles, las variantes cargadas, la fragmentación o las partículas subvisibles cuando la formulación anti-TIGIT de 50 mg/ml (en amortiguador de 10 mM de L-Histidina, sacarosa al 7 %, pH 5,8 y 0,01, 0,2 y 0,3 mg/ml de PS-80) se agitó ligeramente durante hasta 7 días a 100 RPM a 18-22 °C.

#### Estabilidad de congelación-descongelación

No se observaron cambios en los agregados solubles, variantes cargadas, fragmentación o partículas subvisibles a 50 mg/ml del anticuerpo anti-TIGIT (en amortiguador de 10 mM de L-Histidina, sacarosa al 7 %, 0,2 mg/ml de PS-80, pH 5,8) tras 5 ciclos de congelación/descongelación (congelado a -80 °C durante 2 horas y descongelado a temperatura ambiente durante 1 hora).

#### Estudio de estabilidad de estrés por luz

La formulación de 50 mg/ml fue sometida a 48 horas bajo estrés por luz visible (5000 lx). Bajo estas condiciones, hubo un cambio mínimo en los agregados solubles, variantes cargadas, partículas subvisibles, pH, concentración, fragmentación y oxidación bajo condiciones ICH de ~0,2x (12H de exposición a la luz). Bajo condiciones de ~1x (48H de exposición a la luz), hubo un aumento en los agregados solubles, variantes ácidas, fragmentación, partículas subvisibles y oxidación de metionina.

#### Conclusión

En función de estos estudios, el amortiguador de 10 mM de L-Histidina, sacarosa al 7 %, 0,2 mg/ml de PS-80, pH 5,3-6,3 pudo soportar la estabilidad del anticuerpo anti-TIGIT. Se

observó oxidación de metionina tras la exposición a estrés por luz severa. Como se indica en el ejemplo 2, la adición de 10 mM de L-metionina reduce la oxidación de los residuos de metionina.

EJEMPLO 5

5 Cribado de polisorbato 80

Se formuló un anticuerpo anti-TIGIT con los siguientes CDR: HCDR1 de SEQ ID NO: 108, HCDR2 de SEQ ID NO: 154, HCDR3 de SEQ ID NO: 110, LCDR1 de SEQ ID NO: 111, LCDR2 de SEQ ID NO:112, y LCDR3 de SEQ ID NO: 113, en cuatro (4) formulaciones de pH 5,8, amortiguador de 10 mM de L-Histidina, y con diferentes concentraciones de PS-80 (como se muestra a continuación). La estabilidad de la proteína en diferentes formulaciones se estudió en condiciones de agitación o sin agitación durante un período de 7 días a 20 °C.

| Formulación | anticuerpo anti-TIGIT | Amortiguador         | pH     | Sacarosa (% p/v) | Polisorbato 80 (mg/ml) |
|-------------|-----------------------|----------------------|--------|------------------|------------------------|
| 1           | 50 mg/ml              | 10 mM de L-Histidina | pH=5,8 | 7 %              | 0 mg/ml                |
| 2           | 50 mg/ml              | 10 mM de L-Histidina | pH=5,8 | 7 %              | 0,1 mg/ml              |
| 3           | 50 mg/ml              | 10 mM de L-Histidina | pH=5,8 | 7 %              | 0,2 mg/ml              |
| 4           | 50 mg/ml              | 10 mM de L-Histidina | pH=5,8 | 7 %              | 0,3 mg/ml              |

Las formulaciones se formularon con amortiguador de 10 mM de L-Histidina a pH 5,8 utilizando un sistema de intercambio de amortiguador de TFF a escala de laboratorio. Las proteínas formuladas con diferente contenido de polisorbato 80 se filtraron asépticamente con un filtro de membrana de 0,22-µm. 2 ml de cada muestra se llenaron asépticamente en viales de vidrio de 6 ml. Los viales llenos se taponaron y se prensó el sellado inmediatamente después del llenado Las muestras se dividieron en grupo de agitación y grupo sin agitación. En el grupo de agitación, esos viales se transfirieron a cajas cubiertas y luego se colocaron en el agitador del termostato y se agitaron a 100 rpm, 20 °C, durante un máximo de 7 días. En el grupo sin agitación, esos viales se transfirieron a cajas cubiertas y se colocaron en el agitador del termostato, pero el agitador se mantuvo quieto a 20 °C durante un máximo de 7 días.

Se estudió la estabilidad de los anticuerpos en las diferentes formulaciones con o sin agitación después de 3 y 7 días.

Los datos de UPSEC para evaluar los niveles de especies de alto peso molecular (HMW o agregados), % monómero y LMW (especies de bajo peso molecular) se encuentran en la siguiente tabla:

|                                |             |      | 3 días        |         | 7 días        |         |
|--------------------------------|-------------|------|---------------|---------|---------------|---------|
|                                | Formulación | T0   | Sin agitación | 100 rpm | Sin agitación | 100 rpm |
| % de pico principal            | 1           | 97,1 | 97,2          | 97,2    | 97,1          | 97,2    |
|                                | 2           | 97   | 97,1          | 97,1    | 97            | 97      |
|                                | 3           | 97   | 97,1          | 97,1    | 96,9          | 96,9    |
|                                | 4           | 97,1 | 97,1          | 97,1    | 96,9          | 96,9    |
| % de alto peso molecular (HMW) | 1           | 2,9  | 2,8           | 2,8     | 2,9           | 2,8     |
|                                | 2           | 3    | 2,9           | 2,9     | 3             | 3       |
|                                | 3           | 3    | 2,9           | 2,9     | 3,1           | 3,1     |
|                                | 4           | 2,9  | 2,9           | 2,9     | 3,1           | 3,1     |
| % de bajo peso molecular (HMW) | 1           | N.D. | N.D.          | N.D.    | N.D.          | N.D.    |
|                                | 2           | N.D. | N.D.          | N.D.    | N.D.          | N.D.    |
|                                | 3           | N.D. | N.D.          | N.D.    | N.D.          | N.D.    |
|                                | 4           | N.D. | N.D.          | N.D.    | N.D.          | N.D.    |

5

Como puede observarse, el contenido de polisorbato 80 no generó un impacto significativo en la pureza SEC en la condición de con o sin agitación. El contenido de polisorbato no tuvo un impacto significativo en el pI, el porcentaje de pico principal, pico ácido y pico básico en el ensayo cIEF en condiciones de con o sin agitación hasta un máximo de 7 días.

10

|                     |   |      | 3 días        |         | 7 días        |         |
|---------------------|---|------|---------------|---------|---------------|---------|
|                     |   | T0   | Sin agitación | 100 rpm | Sin agitación | 100 rpm |
| % de pico principal | 1 | 61,5 | 61,4          | 61,4    | 62,4          | 62,3    |
|                     | 2 | 61,5 | 61,5          | 61,9    | 61,9          | 62,1    |
|                     | 3 | 61,2 | 60,8          | 60,5    | 61,5          | 61,6    |
|                     | 4 | 61,9 | 61,4          | 61,5    | 62            | 61,8    |
| % de acidez         | 1 | 30,9 | 31,1          | 30,5    | 31,1          | 30,6    |
|                     | 2 | 31,2 | 31,6          | 30,5    | 31,3          | 31,1    |
|                     | 3 | 31,5 | 32,2          | 32,3    | 31,5          | 31,6    |
|                     | 4 | 31,1 | 31,8          | 31,4    | 31,4          | 31,5    |
| % básico            | 1 | 7,6  | 7,5           | 8,1     | 6,5           | 7,1     |
|                     | 2 | 7,3  | 6,9           | 7,6     | 6,8           | 6,7     |

|  |   |     |     |     |     |     |
|--|---|-----|-----|-----|-----|-----|
|  | 3 | 7,3 | 7   | 7,2 | 6,9 | 6,8 |
|  | 4 | 7   | 6,7 | 7   | 6,7 | 6,7 |

El contenido de polisorbato 80 no tuvo un impacto significativo en la pureza de Caliper no reducido, con o sin agitación, hasta un máximo de 7 días como se muestra en la siguiente tabla.

5

|                            |             |      | 3 días        |         | 7 días        |         |
|----------------------------|-------------|------|---------------|---------|---------------|---------|
|                            | Formulación | T0   | Sin agitación | 100 rpm | Sin agitación | 100 rpm |
| <b>Caliper no reducido</b> |             |      |               |         |               |         |
| <b>% de pureza</b>         | 1           | 94,9 | 94,8          | 95      | 94,4          | 94,5    |
|                            | 2           | 94,9 | 94,8          | 94,6    | 94,7          | 94,4    |
|                            | 3           | 94,7 | 94,8          | 94,8    | 94,3          | 94,4    |
|                            | 4           | 94,9 | 94,8          | 94,6    | 94,3          | 94,3    |

También se realizó un análisis de Caliper reducido. El contenido de PS-80 no tuvo un impacto significativo en la pureza de Caliper reducido con o sin agitación en 7 días.

|                            |             |      | 3 días        |         | 7 días        |         |
|----------------------------|-------------|------|---------------|---------|---------------|---------|
|                            | Formulación | T0   | Sin agitación | 100 rpm | Sin agitación | 100 rpm |
| <b>Caliper no reducido</b> |             |      |               |         |               |         |
| <b>% de pureza</b>         | 1           | 99,2 | 99,2          | 99,2    | 99,2          | 99,2    |
|                            | 2           | 99,2 | 99,3          | 99,2    | 99,2          | 99,2    |
|                            | 3           | 99,1 | 99            | 99,2    | 99,2          | 99,2    |
|                            | 4           | 99,2 | 99,1          | 99,2    | 99,2          | 99,1    |

10

Con el fin de medir las partículas subvisibles, se extrajeron alrededor de 1500 µl de cada muestra del vial de vidrio y se analizaron mediante Micro-Flow Imaging (MFI) de acuerdo con el manual del usuario. Se informó la concentración de partículas en diferentes rangos de tamaño, incluidos 1 ~ 2 µm, 2 ~ 5 µm, 5 ~ 10 µm, 10 ~ 25 µm y > 25 µm (véase a continuación). El contenido de polisorbato 80 no tuvo un impacto significativo en la concentración de partículas con o sin agitación hasta un máximo de 7 días.

15

|              |               |      | 3 días        |         | 7 días        |         |
|--------------|---------------|------|---------------|---------|---------------|---------|
|              | Formulaciones | T0   | Sin agitación | 100 rpm | Sin agitación | 100 rpm |
| <b>1 µm≤</b> | 1             | 8318 | NA            | 9080    | 1205          | 2046    |

|                               |   |       |       |       |        |      |
|-------------------------------|---|-------|-------|-------|--------|------|
| <b>ECD &lt; 2 µm</b>          | 2 | 25396 | 10831 | 4429  | 7668   | 5898 |
|                               | 3 | 8048  | 2660  | 15877 | 2952   | 4932 |
|                               | 4 | 8867  | 2590  | 13115 | 9214   | 2728 |
| <b>2 µm ≤ ECD &lt; 5 µm</b>   | 1 | 1792  | 4516  | 2700  | 140    | 574  |
|                               | 2 | 6068  | 4215  | 711   | 1137   | 806  |
|                               | 3 | 818   | 363   | 3950  | 927    | 735  |
|                               | 4 | 1321  | 297   | 3476  | 2418   | 310  |
| <b>5 µm ≤ ECD &lt; 10 µm</b>  | 1 | 369   | NA    | 486   | 27     | 52   |
|                               | 2 | 770   | 647   | 79    | 237 63 | 63   |
|                               | 3 | 121   | 63    | 379   | 121    | 94   |
|                               | 4 | 104   | 80    | 253   | 167    | 61   |
| <b>10 µm ≤ ECD &lt; 25 µm</b> | 1 | 78    | NA    | 103   | 2      | 22   |
|                               | 2 | 135   | 73    | 7     | 59     | 5    |
|                               | 3 | 39    | 13    | 66    | 20     | 8    |
|                               | 4 | 14    | 25    | 34    | 16     | 8    |
| <b>ECD ≥ 25 µm</b>            | 1 | 0     | NA    | 6     | 0      | 2    |
|                               | 2 | 7     | 14    | 3     | 21     | 15   |
|                               | 3 | 10    | 10    | 10    | 2      | 2    |
|                               | 4 | 2     | 6     | 12    | 0      | 12   |

## EJEMPLO 6

**Adición del quelante**

Este estudio comparó la estabilidad de un anticuerpo anti-TIGIT con los siguientes CDR:

- 5 HCDR1 de SEQ ID NO: 108, HCDR2 de SEQ ID NO: 154, HCDR3 de SEQ ID NO: 110, LCDR1 de SEQ ID NO: 111, LCDR2 de SEQ ID NO: 112, y LCDR3 de SEQ ID NO: 113 en amortiguador de 10 mM de L-Histidina (pH = 5,8), polisorbato 80 al 0,02 % (p/v), 10 mM de L-Metionina ("L-Met"), sacarosa al 7 % p/v en presencia o ausencia de 20 uM o 50 uM DTPA.

- 10 Las tres formulaciones se llenaron en viales y se clasificaron en estabilidad a 5 °C (humedad ambiental), 25 °C (60 % de humedad relativa) y 40 °C (75 % de humedad relativa) durante dieciocho semanas protegidas de la luz.

| <b>Formulación</b> | <b>Anticuerpo anti-TIGIT</b> | <b>Amortiguador de L-histidina (pH 5,8)</b> | <b>% De Sacarosa (p/v)</b> | <b>L-Met</b> | <b>Polisorbato 80 (% p/v)</b> | <b>DTPA</b> |
|--------------------|------------------------------|---------------------------------------------|----------------------------|--------------|-------------------------------|-------------|
| 1                  | 50 mg/ml                     | 10 mM                                       | 7 %                        | 10 mM        | 0,02 %                        | 0           |
| 2                  | 50 mg/ml                     | 10 mM                                       | 7 %                        | 10 mM        | 0,02 %                        | 20 uM DTPA  |
| 3                  | 50 mg/ml                     | 10 mM                                       | 7 %                        | 10 mM        | 0,02 %                        | 50 uM DTPA  |

La estabilidad coloidal de las muestras se evaluó mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para determinar la pureza en la que se determinó el porcentaje de monómero, así como los porcentajes de especies de alto peso molecular (HMW) y picos de elución tardía (especies LMW). Los datos de UPSEC para evaluar los niveles de % de HMW (agregados), % monómero y % de LMW se encuentran en la siguiente tabla:

|               |       | 5 °C |      |      |      | 25 °C |      |      | 40 °C |      |      |      |
|---------------|-------|------|------|------|------|-------|------|------|-------|------|------|------|
|               | Form. | T0   | 4W   | 8W   | 18W  | 4W    | 8W   | 18W  | 2W    | 4W   | 8W   | 18W  |
| % de HMW      | 1     | 1,54 | N/A  | 1,57 | 1,57 | 1,53  | 1,57 | 1,64 | 1,51  | 1,61 | 1,72 | 2,2  |
|               | 2     | 1,57 | 1,59 | 1,59 | 1,57 | 1,56  | 1,57 | 1,59 | 1,51  | 1,56 | 1,65 | 1,94 |
|               | 3     | 1,61 | 1,61 | 1,61 | 1,58 | 1,56  | 1,57 | 1,59 | 1,53  | 1,57 | 1,63 | 1,91 |
| % de monómero | 1     | 98,2 | N/A  | 98,2 | 98,2 | 98,1  | 98,0 | 97,8 | 97,9  | 97,6 | 97,2 | 95,7 |
|               | 2     | 98,2 | 98,1 | 98,1 | 98,2 | 98,1  | 98,0 | 97,9 | 98,0  | 97,7 | 97,3 | 96,1 |
|               | 3     | 98,1 | 98,1 | 98,1 | 98,2 | 98,1  | 98,0 | 97,9 | 98,0  | 97,7 | 97,4 | 96,2 |
| % de LMW      | 1     | 0,30 | N/A  | 0,28 | 0,22 | 0,36  | 0,42 | 0,54 | 0,55  | 0,82 | 1,11 | 2,07 |
|               | 2     | 0,28 | 0,28 | 0,27 | 0,22 | 0,35  | 0,40 | 0,55 | 0,53  | 0,77 | 1,02 | 1,94 |
|               | 3     | 0,25 | 0,27 | 0,26 | 0,23 | 0,35  | 0,41 | 0,56 | 0,51  | 0,77 | 1,02 | 1,92 |

Como se muestra en la tabla anterior, a 5 °C, 25 °C y 40 °C, las tres formulaciones mostraron una tendencia de aumento en % de pico de HMW y % de pico de LMW (y una disminución consiguiente en % de pico de monómero) hasta un punto temporal de 18 semanas. A 25 °C, ambas formulaciones mostraron tendencias similares, pero cambios menores, en comparación con 40 °C. A 5 °C no se observaron cambios sustanciales. La Formulación 1 muestra un mayor aumento en % de HMW y % de LMW en comparación con la Formulación 2 (20 uM DTPA) y la formulación 3 (50 uM DTPA). Además, la Formulación 1 mostró una mayor disminución del % de monómero en comparación con la Formulación 2 y 3. Resultados similares se observaron con el análisis HP-IEC (datos no mostrados).

Para evaluar si DTPA puede proteger las formulaciones del estrés oxidativo, las tres formulaciones se llenaron en viales y se expusieron a la luz (0,5X ICH y 1X ICH). Como puede observarse en la siguiente tabla, la Formulación 1 muestra un mayor aumento en el % de oxidación de M254, M430 y W104 (las metioninas y triptófano que son susceptibles a la oxidación) en comparación con la Formulación 2 (20 uM DTPA) y la Formulación 3 (uM

DTPA). Por lo tanto, DTPA puede además mejorar la estabilidad de la formulación del anticuerpo anti-TIGIT.

|         | Formulación 1           | Formulación 1 |        | Formulación 2 |        | Formulación 3 |        |
|---------|-------------------------|---------------|--------|---------------|--------|---------------|--------|
|         | Control de la oscuridad | 0,5X ICH      | 1X ICH | 0,5X ICH      | 1X ICH | 0,5X ICH      | 1X ICH |
| LC_M4   | 0,2                     | 0,2           | 0,2    | 0,2           | 0,2    | 0,2           | 0,2    |
| HC_M34  | 0,3                     | 0,3           | 0,3    | 0,3           | 0,3    | 0,3           | 0,4    |
| HC_M81  | 0,2                     | 0,2           | 0,2    | 0,2           | 0,2    | 0,2           | 0,3    |
| HC_M254 | 3,6                     | 16,3          | 30,2   | 13,7          | 27,5   | 15,9          | 21,5   |
| HC_M430 | 1                       | 10,9          | 19,2   | 9,3           | 18,3   | 8,6           | 16,2   |
| HC_W104 | 0,6                     | 8,8           | 17,7   | 7,3           | 16,7   | 6,9           | 12,1   |

|             |       | 5 °C |      |      |      | 25 °C |      |      | 40 °C |      |      |      |
|-------------|-------|------|------|------|------|-------|------|------|-------|------|------|------|
|             | Form. | T0   | 4W   | 8W   | 18W  | 4W    | 8W   | 18W  | 2W    | 4W   | 8W   | 18W  |
| PS 80 Conc. | 1     | 0,24 | 0,23 | 0,23 | 0,22 | 0,20  | 0,18 | 0,16 | 0,19  | 0,17 | 0,16 | 0,13 |
|             | 2     | 0,24 | 0,23 | 0,23 | 0,21 | 0,20  | 0,18 | 0,16 | 0,19  | 0,16 | 0,16 | 0,14 |
|             | 3     | 0,22 | 0,22 | 0,22 | 0,21 | 0,19  | 0,17 | 0,15 | 0,18  | 0,16 | 0,15 | 0,13 |

5

EJEMPLO 7

Estabilidad a largo plazo de las formulaciones de anticuerpos Anti-TIGIT

10 Este ejemplo describe los datos de estabilidad a largo plazo de un anticuerpo anti-TIGIT formulado en un amortiguador de L-histidina, L-metionina, sacarosa, polisorbato 80 y agua para inyección de la siguiente manera:

| Ingredientes           |                                                | Concentración (mg/ml) | Cantidad (mg/vial) |
|------------------------|------------------------------------------------|-----------------------|--------------------|
| Activo                 | Anticuerpo anti-TIGIT                          | 50,0                  | 100,0              |
| Inactivo (Excipientes) | L-Histidina                                    | 0,465                 | 0,930              |
|                        | Monohidroclo ru r o de L-histidina monohidrato | 1,47                  | 2,94               |
|                        | L-Metionina                                    | 1,49                  | 2,98               |
|                        | Sacarosa                                       | 70                    | 140,0              |
|                        | Polisorbato 80                                 | 0,20                  | 0,40               |

|  |                     |    |                                     |
|--|---------------------|----|-------------------------------------|
|  | Agua para inyección | NA | <i>Cantidad suficiente a 2,0 ml</i> |
|--|---------------------|----|-------------------------------------|

Las soluciones se llenaron en un vial de vidrio USP Tipo 1 con tapón elastomérico y sello de aluminio. Los viales se incubaron en tres condiciones de almacenamiento diferentes: 5 °C (humedad ambiente), 25 °C (60 % de humedad), y 40 °C (75 % de humedad relativa). Los datos se recogen en el momento cero, 1 mes, 3 meses, 6 meses para todas las condiciones de almacenamiento, 9 meses (5 °C y 25 °C condiciones de almacenamiento), 12 meses (5 °C y 25 °C condiciones de almacenamiento), 18 meses (5 °C condiciones de almacenamiento), 24 meses (5 °C condiciones de almacenamiento) y 36 meses (5 °C condiciones).

#### Resultados

Los resultados demuestran la estabilidad física y química general del anticuerpo anti-TIGIT cuando se almacena en las condiciones recomendadas a largo plazo de 5 °C durante 18 meses. No se observó una pérdida medible de potencia y la pureza estaba dentro de las especificaciones bajo las condiciones de almacenamiento recomendadas. Los resultados se establecen en las siguientes tablas:

| 5 °C/humedad ambiente                                |                        |       |       |       |       |       |       |
|------------------------------------------------------|------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Atributo medido                                      | Punto temporal (meses) |       |       |       |       |       |       |
|                                                      | Inicial                | 1     | 3     | 6     | 9     | 12    | 18    |
| <b>Potencia biológica mediante ELISA de fijación</b> | 96                     | 92    | 100   | 94    | 101   | 92    | 99    |
| <b>% de pureza por UPSEC</b>                         |                        |       |       |       |       |       |       |
| Especies de alto peso molecular (%)                  | 1,33                   | 1,48  | 1,40  | 1,63  | 1,65  | 1,66  | 1,77  |
| Monómero (%)                                         | 98,7                   | 98,5  | 98,6  | 98,3  | 98,3  | 98,3  | *     |
| Especies de bajo peso molecular (%)                  | <QL                    | <QL   | <QL   | <QL   | <QL   | <QL   | <QL   |
| <b>% de variantes de carga por HP-IEX</b>            |                        |       |       |       |       |       |       |
| Variantes ácidas                                     | 21,46                  | 21,54 | 22,04 | 22,51 | 22,49 | 22,48 | 22,92 |
| Total principal                                      | 68,8                   | 68,4  | 67,9  | 67,3  | 67,1  | 67,3  | 67,1  |
| Variantes básicas                                    | 9,70                   | 10,11 | 10,06 | 10,15 | 10,38 | 10,20 | 9,95  |
| <b>% de pureza por CE-SDS no reducido</b>            | 96,4                   | 96,4  | 96,3  | 96,2  | 96,0  | 95,9  | 95,7  |

|                                                         |       |       |       |       |       |       |       |
|---------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <b>% de pureza por CE-SDS reducido</b>                  | 98,1  | 98,2  | 98,0  | 98,1  | 98,0  | 98,1  | 97,7  |
| <b>pH</b>                                               | 6,1   | 6,1   | 6,1   | 6,0   | 6,0   | 6,0   | 6,0   |
| <b>Concentración de proteína</b>                        | 51,7  | 51,4  | 51,2  | 51,0  | 51,5  | 50,9  | 51,5  |
| <b>UV A350</b>                                          | 0,150 | 0,142 | 0,138 | 0,144 | 0,146 | 0,145 | 0,150 |
| QL = Límite de cuantificación (0,4%)<br>* valor es 98,2 |       |       |       |       |       |       |       |

| 25 °C/60 % de humedad relativa                       |                        |       |       |       |       |       |
|------------------------------------------------------|------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Atributo medido                                      | Punto temporal (meses) |       |       |       |       |       |
|                                                      | Inicial                | 1     | 3     | 6     | 9     | 12    |
| <b>Potencia biológica mediante ELISA de fijación</b> | 96                     | 90    | 94    | 94    | 98    | 95    |
| <b>% de pureza por UPSEC</b>                         |                        |       |       |       |       |       |
| Especies de alto peso molecular (%)                  | 1,33                   | 1,57  | 1,48  | 1,72  | 1,77  | 1,83  |
| Monómero (%)                                         | 98,7                   | 98,4  | 98,3  | 97,9  | 97,7  | 97,4  |
| Especies de bajo peso molecular (%)                  | <QL                    | <QL   | <QL   | <QL   | 0,57  | 0,77  |
| <b>% de variantes de carga por HP-IEX</b>            |                        |       |       |       |       |       |
| Variantes ácidas                                     | 21,46                  | 23,19 | 28,74 | 34,16 | 39,86 | 44,04 |
| Total principal                                      | 68,8                   | 65,8  | 59,7  | 53,8  | 47,6  | 43,5  |
| Variantes básicas                                    | 9,70                   | 11,06 | 11,51 | 12,02 | 12,55 | 12,44 |
| <b>% de pureza por CE-SDS no reducido</b>            | 96,4                   | 96,0  | 95,2  | 94,4  | 93,2  | 92,1  |
| <b>% de pureza por CE-SDS reducido</b>               | 98,1                   | 98,0  | 97,8  | 97,4  | 96,7  | 96,1  |
| <b>pH</b>                                            | 6,1                    | 6,1   | 6,1   | 6,0   | 6,0   | 6,0   |
| <b>Concentración de proteína</b>                     | 51,7                   | 51,1  | 51,1  | 50,9  | 51,5  | 50,9  |
| <b>UV A350</b>                                       | 0,150                  | 0,150 | 0,163 | 0,179 | 0,196 | 0,209 |
| QL = Límite de cuantificación (0,4%)                 |                        |       |       |       |       |       |

| 40 °C/75 % de humedad relativa |
|--------------------------------|
|--------------------------------|

| Atributo medido                                      | Punto temporal (meses) |       |       |                |    |    |
|------------------------------------------------------|------------------------|-------|-------|----------------|----|----|
|                                                      | Inicial                | 1     | 3     | 6 <sup>c</sup> | 9  | 12 |
| <b>Potencia biológica mediante ELISA de fijación</b> | 96                     | 96    | 99    | 94             | ND | ND |
| <b>% de pureza por UPSEC</b>                         |                        |       |       |                |    |    |
| Especies de alto peso molecular (%)                  | 1,33                   | 1,64  | 1,78  | 2,63           | ND | ND |
| Monómero (%)                                         | 98,7                   | 97,9  | 96,9  | 93,8           | ND | ND |
| Especies de bajo peso molecular (%)                  | <QL                    | 0,43  | 1,28  | 3,53           | ND | ND |
| <b>% de variantes de carga por HP-IEX</b>            |                        |       |       |                |    |    |
| Variantes ácidas                                     | 21,46                  | 38,03 | 61,62 | 80,02          | ND | ND |
| Total principal                                      | 68,8                   | 47,8  | 25,1  | 10,0           | ND | ND |
| Variantes básicas                                    | 9,70                   | 14,17 | 13,29 | 9,95           | ND | ND |
| <b>% de pureza por CE-SDS no reducido</b>            | 96,4                   | 93,6  | 88,9  | 79,6           | ND | ND |
| <b>% de pureza por CE-SDS reducido</b>               | 98,1                   | 96,9  | 94,2  | 87,7           | ND | ND |
| <b>pH</b>                                            | 6,1                    | 6,1   | 6,1   | 6,0            | ND | ND |
| <b>Concentración de proteína</b>                     | 51,7                   | 52,0  | 51,2  | 51,4           | ND | ND |
| <b>UV A350</b>                                       | 0,150                  | 0,188 | 0,251 | 0,453          | ND | ND |
| QL = Límite de cuantificación (0,10 %)               |                        |       |       |                |    |    |

### Concentración de proteína

Los datos de estabilidad de la concentración de proteínas para todos los puntos temporales y condiciones no mostraron cambios notables en función del tiempo o condición de almacenamiento y todos los resultados estuvieron dentro de los criterios de aceptación de 45 - 55 mg/ml.

### pH

No hubo cambios significativos en el pH para las condiciones de 5 C, 25 C y 40 C. La Figura 1 muestra los datos de pH desde el punto temporal 0 a 9 meses.

### 10 Polisorbato 80

El contenido de polisorbato 80 a las condiciones de almacenamiento recomendadas de 5 °C disminuyó ligeramente a 0,13 mg/ml a los 9 y 18 meses (no se muestran datos de 18 meses). Se observó una tendencia decreciente en el polisorbato 80 a 25 °C (acelerado) y 40 °C (estresado). A 40 °C la concentración de polisorbato 80 disminuyó a 0,06 mg/ml a los 6 meses y el contenido de polisorbato 80 a 25 °C disminuyó a 0,07 mg/ml a los 9 meses. Los datos de concentración de polisorbato 80 durante un máximo de 9 meses se presentan en la Figura 2.

#### Potencia de fijación por ELISA

No hubo una tendencia evidente en ningún momento o condición en los resultados de ELISA obtenidos. Los datos de potencia de hasta 9 meses se presentan en la Figura 3.

#### 10 Pureza por UP-SEC

Los datos de pureza por UP-SEC se ilustran a continuación en la Figura 4 para el % de monómeros, la Figura 5 para el % de especies de alto peso molecular, y la Figura 6 para el % de especies de bajo peso molecular, hasta 9 meses.

En las condiciones de almacenamiento recomendadas de 5 °C, se produce una ligera disminución del % de monómero con un ligero aumento correspondiente en las especies de alto peso molecular durante 18 meses de estabilidad. El % de especies de bajo peso molecular desde inicial hasta los 18 meses está por debajo del límite de cuantificación (<QL) que es igual al 0,4 %. En la condición de 25 °C, el % de monómero disminuyó desde el inicial hasta los 12 meses con un aumento correspondiente en el % de especies de alto peso molecular. A los 9 y 12 meses, el % de especies de bajo peso molecular fueron reportadas por encima del QL.

En la condición estresante de 40 °C, el % de monómero disminuyó de 98,7 % a 93,8 % con los correspondientes aumentos en las especies de alto peso molecular de 1,33 % a 2,63 % y en las especies de bajo peso molecular de <QL a 3,53 %. Este resultado no fue inesperado dada la naturaleza de las condiciones de almacenamiento.

#### 25 CD-SDS reducido y no reducido

Las Figuras 7 y 8 muestran los datos de pureza hasta 9 meses según lo determinado por CD-SDS reducido y no reducido. No hubo tendencias notables en el CE-SDS reducido (% cadena pesada y ligera) o no reducido (% IgG intacto) en la condición de almacenamiento a largo plazo de 5 °C y los resultados estuvieron dentro de los criterios de aceptación de productos de GMP de  $\geq 90,0$  %. En la condición acelerada de 25 °C, se observó una tendencia decreciente para la condición no reducida. Para la condición de CE-SDS reducido, también se observó una tendencia a la disminución. Tanto para CE-SDS reducido como para no reducido, todos los resultados hasta el plazo de 9 meses estuvieron dentro de los criterios de aceptación de las GMP. A la condición de estrés de 40 °C, a los 6 meses, tanto los resultados de CD-SDS reducido como los de CD-SDS no reducido estaban por debajo de los criterios de aceptación del 90,0 % establecidos para el producto farmacéutico GMP. El resultado de CE-SDS no reducido cayó

fuera de especificación a los 3 meses con un resultado de 88,9 % y luego disminuyó aún más a los 6 meses a 79,6 %. Para CE-SDS reducido, el % de cadena pesada y el % de cadena ligera disminuyó de 94,2 % a los 3 meses a 87,7 % a los 6 meses. Esta disminución no fue inesperada a 40 °C considerando la naturaleza de la condición.

#### 5 Variantes de carga por HP-IEX

A 5 °C (almacenamiento a largo plazo), hay un ligero aumento en el % de variantes ácidas desde la inicial a 21,46 % a 9 meses a 22,49 % con una ligera disminución correspondiente en el total principal de 68,8 % a 67,1 % a 9 meses. El % de las variantes básicas comienzan a aumentar ligeramente a los 9 meses con un aumento del 10,15 % a los 6 meses al 10,38% a los 9 meses. A 25 °C (acelerado), el total principal disminuyó de 68,8 % en el punto temporal inicial a 47,6 % a los 9 meses. Junto con una disminución en el total principal, se observó un aumento correspondiente en las variantes ácidas de 21,46 % a 39,86 % y un ligero aumento en las variantes básicas de 9,70 % a 11,51 %. A 40 °C (estresado), hubo una considerable disminución del total principal a 10,1 % a los 6 meses, junto con un aumento considerable correspondiente en las variantes ácidas a 80,02 % y en las variantes básicas a 9,95 %.

#### Materia particulada

La materia particulada se midió por mHIAC. Los resultados en la condición de 5 °C estaban muy por debajo de los criterios de aceptación de  $\leq 6000$  partículas por contenedor para  $\geq 10 \mu\text{m}$  y  $\leq 600$  partículas por contenedor para  $\geq 25 \mu\text{m}$  desde el mes inicial hasta los 9 meses. A 25 °C, se reportó un aumento de partículas  $\geq 10 \mu\text{m}$  de 13 partículas por contenedor en el punto temporal inicial a 460 partículas por contenedor a los 9 meses. Hubo una disminución de partículas para las partículas  $\geq 25 \mu\text{m}$  con un resultado de 3 partículas por contenedor a los 9 meses. Todos los puntos temporales para los datos 25C estuvieron dentro de los criterios de aceptación tanto para el análisis  $\geq 10 \mu\text{m}$  como para el  $\geq 25 \mu\text{m}$ . Los datos a 40 °C mostraron un aumento drástico de partículas  $\geq 10 \mu\text{m}$  con 8258 partículas por contenedor a los 9 meses. Este resultado quedó fuera de los criterios de aceptación de  $\leq 600$  partículas por contenedor. El resultado para partículas  $\geq 25 \mu\text{m}$  aumentó en el punto temporal de estabilidad de 9 meses a 124 partículas por contenedor que cumplen los criterios de aceptación  $\geq 25 \mu\text{m}$  ( $\leq 600$  partículas por contenedor).

#### Turbidez

La turbidez se determinó a partir de la absorbancia espectrofotométrica a 350 nm. En las condiciones de almacenamiento a más largo plazo de 5 °C, no hubo cambios notables hasta los 9 meses. En la condición 25C, hay un ligero aumento a los 3 meses con un resultado de 0,163 UA y continúa aumentando hasta los 9 meses con un resultado de 0,196 UA. A los 40C, hay un

aumento más pronunciado a partir de 1 mes con 0,188 UA y luego aumenta considerablemente a 0,453 UA a los 9 meses.

Conclusiones

En función de los datos, en la fecha de prueba de 18 meses, no se observaron cambios o tendencias importantes en las condiciones de almacenamiento de 5 C durante los estudios de estabilidad para el pH, la concentración de proteínas, la apariencia y las partículas visibles (datos no mostrados) y la potencia y la materia particulada (datos no mostrados). Con la excepción de un ligero aumento del color y una disminución del contenido de PS-80 a 0,13 mg/ml, no se observaron cambios ni tendencias notables en ninguna prueba de estabilidad a 5 °C.

En función de los datos de estabilidad a largo plazo de 5C, la formulación anti-TIGIT que contiene amortiguador de L-histidina, sacarosa, polisorbato 80 y L-metionina tiene una vida útil esperada de 30 meses. Se espera que las formulaciones que comprenden además un quelante reduzcan la degradación del polisorbato 80 que se observó.

EJEMPLO 8

**Coformulación de un anticuerpo anti-TIGIT y un anticuerpo anti-PD-1.**

La coformulación de dos anticuerpos en una sola formulación es más conveniente para los pacientes y aumenta el cumplimiento de la dosis de los dos anticuerpos juntos. La coformulación de dos anticuerpos en una sola formulación es más conveniente para los pacientes y aumenta el cumplimiento de la dosis de los dos anticuerpos juntos. Se formuló un anticuerpo anti-TIGIT con los siguientes CDR: HCDR1 de SEQ ID NO: 108, HCDR2 de SEQ ID NO: 154, HCDR3 de SEQ ID NO: 110, LCDR1 de SEQ ID NO: 111, LCDR2 de SEQ ID NO:112, y LCDR3 de SEQ ID NO: 113 en una cadena principal de IgG1 se coformuló con pembrolizumab. En función de las interacciones proteína-proteína (mostradas abajo), se encontró que la coformulación (mostrada abajo) era estable a través del pH 5,0-6,0. Por lo tanto, se eligió la coformulación (P1T1) a pH 5,0, 5,5 y 6,0 y se colocó en estabilidad térmica adicional a 5 °C, 25 °C y 4 0°C junto con los dos controles (anticuerpo PD1 y anticuerpo anti-TIGIT).

| <u>Coformulacione</u><br><u>s</u> | <u>Relación</u><br><u>pembrolizumab/anti</u><br><u>-TIGIT Ab (p/p)</u> | <u>Pembrolizumab</u> | <u>Anticuerpo</u><br><u>anti-TIGIT</u> | <u>Concentración total</u> |
|-----------------------------------|------------------------------------------------------------------------|----------------------|----------------------------------------|----------------------------|
| <b>P1T1</b>                       | 1:1                                                                    | 20 mg/ml             | 20 mg/ml                               | 40 mg/ml                   |
| <b>P1 (Control)</b>               | 1:0                                                                    | 20 mg/ml             | Ninguno                                | 20 mg/ml                   |
| <b>T1 (Control)</b>               | 0:1                                                                    | Ninguno              | 20 mg/ml                               | 10 mg/ml                   |

Las formulaciones se prepararon como formulaciones líquidas de la siguiente manera:

| Formulación         | Amortiguador        | pH        | Crioprotector / Modificador de tonicidad | Tensioactivo   | Antioxidante   |
|---------------------|---------------------|-----------|------------------------------------------|----------------|----------------|
| <b>P1T1</b>         | L-Histidina (10 mM) | 5, 5,5, 6 | Sacarosa (7 %)                           | PS-80 (0,02 %) | 10 mM de L-Met |
| <b>P1 (Control)</b> | L-Histidina (10 mM) | 5, 5,5, 6 | Sacarosa (7 %)                           | PS-80 (0,02 %) | 10 mM de L-Met |
| <b>T1 (Control)</b> | L-Histidina (10 mM) | 5, 5,5, 6 | Sacarosa (7 %)                           | PS-80 (0,02 %) | 10 mM de L-Met |

5 Cada formulación se llenó a 1 ml en viales de 2R. La estabilidad se medirá mediante inspección visual, concentración de proteínas, Microwflow Imaging (MFI) (evaluación de partículas), cromatografía de exclusión de tamaño de modo mixto (SEC) (evaluación de agregación), IEX (evaluación de variantes de carga) y UP-SEC (evaluación de agregación). El protocolo de estabilidad térmica es el siguiente:

|                                     | T0              | 1 mes           | 2 Meses         | 3 Meses         | 5 Meses         | Extra           |
|-------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 5 °C<br>(humedad ambiente)          | 1 combo+ 2 mono | 1 combo+ 2 mono | 1 combo+ 2 mono | 1 combo+ 2 mono | 1 combo+ 2 mono | 1 combo+ 2 mono |
| 25 °C<br>(60 % de humedad relativa) |                 | 1 combo+ 2 mono | 1 combo+ 2 mono | 1 combo+ 2 mono | 1 combo+ 2 mono | 1 combo+ 2 mono |
| 40 °C<br>(75 % de humedad relativa) |                 | 1 combo+ 2 mono | 1 combo+ 2 mono | 1 combo+ 2 mono | 1 combo+ 2 mono | 1 combo+ 2 mono |

10 Se midieron las interacciones proteína-proteína, que son indicativas de la estabilidad coloidal y térmica de las diferentes coformulaciones. Una interacción repulsiva proteína-proteína, como lo indica un valor del parámetro de interacción de difusión positiva (KD) de KD >0, indica una formulación estable con baja propensión a la agregación. Se encontró que el Kd de la coformulación tiene un valor positivo de KD que es indicativo de una interacción repulsiva

y estabilizadora proteína-proteína que indicaría una menor propensión al agregado y una coformulación estable.

En función del parámetro de interacción de difusión positiva (KD) o  $KD > 0$ , se espera que los anticuerpos, cuando se formulan conjuntamente, se comporten bien, de forma similar a

5 las formulaciones de anticuerpos simples.

## REIVINDICACIONES:

1. Una formulación que comprende:

(i) alrededor de 10 mg/ml a alrededor de 200 mg/ml de un anticuerpo anti-TIGIT o  
5 fragmento de fijación al antígeno de este;

(ii) alrededor de 5 mM a alrededor de 20 mM de amortiguador;

(iii) al rededor de 6 % a alrededor de 8 % en peso/volumen (p/v) de un azucar no  
reductor;

(iv) alrededor de 0,01 % a alrededor de 0,10 % (p/v) de tensioactivo no iónico; y

10 (v) alrededor de 1 mM a alrededor de 20 mM de antioxidante.

2. La formulación de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este comprende tres cadenas ligeras CDR que comprenden CDRL1 de SEQ ID NO: 111, CDRL2 de SEQ ID NO. 112, CDRL3 de SEQ ID NO.  
15 113 y tres cadenas pesadas de CDR que comprenden CDRH1 de SEQ ID NO: 108, CDRH2 de SEQ ID NO. 154, y CDRH3 de SEQ ID NO: 110.

3. La formulación de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde el anticuerpo anti-TIGIT o un fragmento de fijación al antígeno de este que comprende una región variable de  
20 cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 148 y una región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 152.

4. La formulación de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el anticuerpo anti-TIGIT comprende (i) un dominio constante de cadena pesada humana IgG1 que comprende la  
25 secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:291 y un dominio constante de cadena ligera kappa humana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:293; o (ii) un dominio constante de cadena pesada humana IgG4 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:292 y un dominio constante de cadena ligera kappa humana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:293

30 5. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la formulación tiene un pH entre 5,3 y 6,2.

6. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el amortiguador es un amortiguador de L-histidina, el azúcar no reductor es sacarosa, el tensioactivo no iónico es polisorbato 80 y el antioxidante es L-metionina; en donde la formulación comprende:

- 5 (i) alrededor de 10 mg/ml a alrededor de 200 mg/ml de un anticuerpo anti- TIGIT o un fragmento de fijación al antígeno de este;
- (ii) alrededor de 5 mM a alrededor de 20 mM de un amortiguador de L-histidina;;
- (iii) alrededor de 6 % a alrededor de 8 % (p/v) de sacarosa;
- (iv) alrededor de 0,01 % a alrededor de 0,10 % (p/v) de polisorbato 80; y
- 10 (v) alrededor de 1 mM a alrededor de 20 mM de L-metionina.

7. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicación 1-6, que comprende alrededor de 8mM a alrededor de 12 mM de un amortiguador de L-histidina.

- 15 8. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicación 6-7, que comprende alrededor de 5mM a alrededor de 10mM de L-metionina.

9. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-8, que comprende polisorbato 80 en una relación de peso de aproximadamente 0,02 % (p/v).

20

10. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende alrededor de 10 mg/ml a alrededor de 100 mg/ml de un anticuerpo anti-TIGIT o un fragmento de fijación al antígeno de este.

- 25 11. La formulación de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la concentración del anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de fijación al antígeno de este es alrededor de 10 mg/ml, 12,5 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml, 75 mg/ml o 100 mg/ml.

- 30 12. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11 que comprende alrededor de 25 mg/ml del anticuerpo anti-TIGIT, 10 mM de amortiguador de L-histidina, alrededor de 7 % p/v de sacarosa, alrededor de 0,02 % p/v de polisorbato 80, y alrededor de 10 mM de L-metionina.

13. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11 que comprende alrededor de 50 mg/ml del anticuerpo anti-TIGIT, 10 mM de amortiguador de L-histidina, alrededor de 7 % p/v de sacarosa, alrededor de 0,02 % p/v de polisorbato 80, y alrededor de 10 mM de L-metionina.

5

14. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11 que comprende alrededor de 75 mg/ml del anticuerpo anti-TIGIT, 10 mM de amortiguador de L-histidina, alrededor de 7 % p/v de sacarosa, alrededor de 0,02 % p/v de polisorbato 80, y alrededor de 10 mM de L-metionina.

10

15. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11 que comprende alrededor de 100 mg/ml del anticuerpo anti-TIGIT, 10 mM de amortiguador de L-histidina, alrededor de 7 % p/v de sacarosa, alrededor de 0,02 % p/v de polisorbato 80, y alrededor de 10 mM de L-metionina.

15

16. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en donde la formulación tiene un pH entre 5,5 y 6,3.

17. La formulación de acuerdo con la reivindicación 16, en donde la formulación tiene un pH alrededor de 5,8 - 6,0.

20

18. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-17, que comprende además un anticuerpo anti-PD1 o un fragmento de fijación al antígeno de este.

19. La formulación de acuerdo con la reivindicación 18, en donde el anticuerpo anti-PD1 humana o fragmento de fijación al antígeno de este comprende tres CDR de cadena ligera de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:3 y tres CDR de cadena pesada de SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:8.

25

20. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18-19, en donde el anticuerpo anti-PD-1 humana o fragmento de fijación al antígeno de este comprende una región ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:4, y una región pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:9.

30

35

21. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16-19, en donde la formulación comprende un anticuerpo anti-PD-1 humana que es pembrolizumab.

22. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18-21, donde la  
5 relación entre el anticuerpo anti-PD-1 humana y el anticuerpo anti-TIGIT es de 1:1.

23. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18-22 que comprende alrededor de 20 mg/ml del anticuerpo anti-PD-1, alrededor de 20 mg/ml del anticuerpo anti-TIGIT, 10 mM de amortiguador de L-histidina, alrededor de 7 % p/v de sacarosa,  
10 alrededor de 0,02 % p/v de polisorbato 80, y alrededor de 10 mM de L-metionina.

24. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-23, que comprende adicionalmente un quelante.

15 25. La formulación de acuerdo con la reivindicación 24, en donde el quelante es DTPA.

26. La formulación de acuerdo con las reivindicaciones 1-25, en donde la formulación está contenida en un vial de vidrio o un dispositivo de inyección.

20 27. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-26, que es una formulación líquida, que está congelada a por lo menos -70° C, o que es una solución reconstituida de una formulación liofilizada.

28. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-27, en donde  
25 después de 12 meses a 5 °C:

(i) el % de monómero del anticuerpo anti-TIGIT es  $\geq 95$  % según lo determinado por la cromatografía de exclusión de tamaño;

(ii) el % de la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo anti-TIGIT es  $\geq 90$  % según lo determinado mediante CE-SDS reducido;

30 (iii) el % de la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo anti-TIGIT es  $\geq 95$  % según lo determinado mediante CE-SDS reducido;

(iv) el % de IgC intacto del anticuerpo anti-TIGIT es  $\geq 90$  % según lo determinado mediante CE-SDS no reducido; y/o

35 (v) el % de IgC intacto del anticuerpo anti-TIGIT es  $\geq 95$  % según lo determinado mediante CE-SDS no reducido.

29. Un método para el tratamiento del cáncer o una infección crónica en un paciente humano que lo necesite, en donde el método comprende administrar una cantidad eficaz de la formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-28.

5           30. El uso de la formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-28 para preparar un medicamento para el tratamiento del cáncer o una infección crónica.

## RESUMEN DE LA DIVULGACIÓN

La presente invención se refiere a formulaciones estables de anticuerpos contra receptores de linfocitos T con dominios Ig e ITIM (TIGIT), que opcionalmente además contienen un anticuerpo anti receptor de muerte programada 1 humana (PD-1) o un fragmento de fijación al antígeno de este. También se proporcionan métodos para tratar varios tipos de cáncer e infecciones crónicas con las formulaciones de la invención.

5