

COMPOSICIÓN QUE COMPRENDE UN FRAGMENTO DE UNIÓN A ANTÍGENO PD-L1 Y USO DE LA MISMA

CAMPO TÉCNICO

La presente solicitud se refiere al campo de la biomedicina y, en particular, a una composición que comprende un fragmento de unión a antígeno PD-L1 y al uso del mismo.

ANTECEDENTES

Se ha detectado la expresión de PD-L1 en varios tipos de cáncer murinos y humanos, como el cáncer de pulmón humano, el cáncer de ovario, el cáncer de colon, el melanoma y varios mielomas. Los resultados existentes muestran que el PD-L1 con alta expresión de células tumorales juega un papel importante en el escape inmune del tumor mediante el aumento de la apoptosis de las células T.

Las formas de dosificación de los fármacos anticuerpos incluyen una formulación inyectable, una formulación liofilizada o similares. Para productos de uso frecuente y administración crónica, se prefiere la administración subcutánea. Esto permitirá que el paciente se administre a sí mismo, aumentará la comodidad, rapidez y cumplimiento del tratamiento, ahorrará una gran cantidad de gastos para el departamento de atención médica y mejorará la calidad de vida del paciente.

Por lo tanto, es necesario desarrollar formulaciones de anticuerpos PD-L1 de alta concentración.

RESUMEN

La presente solicitud proporciona una composición que comprende un fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a PD-L1 y un excipiente. La composición comprende al menos una de las siguientes prestaciones: 1) que comprende el fragmento de unión a antígeno a una concentración elevada (por ejemplo, 200 mg/mL); 2) viscosidad adecuada; 3) capaz de utilizarse para inyección subcutánea y aliviar el dolor de un sujeto; 4) buena estabilidad (por ejemplo, estabilidad acelerada y/o estabilidad a largo plazo); 5) evitar los efectos secundarios causados por la transfusión; 6) componentes sencillos, preparación sencilla y bajo costo.

La presente solicitud proporciona una composición que comprende un fragmento de unión a antígeno y un excipiente, en la que el fragmento de unión a antígeno comprende un dominio variable único de inmunoglobulina capaz de unirse específicamente a PD-L1 y que comprende CDR1-3, en la que CDR3 comprende una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 47, y en la que el excipiente se selecciona de uno o más del grupo que consiste en: prolina, manitol, sacarosa, glicina y clorhidrato de L-arginina.

En otras incorporaciones, el excipiente también puede seleccionarse de uno o más del grupo que consiste en: prolina, sacarosa, manitol, sorbitol, glicerol y clorhidrato de L-arginina.

En ciertas incorporaciones, el excipiente se selecciona preferentemente entre uno o más del grupo que consiste en: prolina, sacarosa, manitol, sorbitol y glicerol; más preferentemente, el excipiente es uno o más de prolina, sacarosa, manitol y sorbitol.

En ciertas incorporaciones, el excipiente es L-prolina, o el excipiente es sacarosa, o el excipiente es manitol, o el excipiente es sorbitol.

En ciertas incorporaciones, la CDR2 comprende una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 46.

En determinadas incorporaciones, la CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 45 o 48.

En ciertas incorporaciones, el dominio variable único de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de los SEQ ID NO: 1-6.

En ciertas incorporaciones, la PD-L1 es PD-L1 humana.

En ciertas incorporaciones, el fragmento de unión a antígeno comprende una región Fc de una inmunoglobulina.

En ciertas incorporaciones, el N-terminal de la región Fc de la inmunoglobulina está unido directa o indirectamente al C-terminal del dominio variable único de la inmunoglobulina.

En ciertas incorporaciones, el N-terminal de la región Fc de la inmunoglobulina está unido al C-terminal del dominio variable único de la inmunoglobulina mediante un enlazador.

En ciertas incorporaciones, el enlazador comprende una secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID Nos: 42-44.

En ciertas incorporaciones, la región Fc de la inmunoglobulina comprende una región Fc derivada de una inmunoglobulina seleccionada del grupo que consiste en: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

En ciertas incorporaciones, la región Fc de la inmunoglobulina no tiene actividad ADCC; y/o, la región Fc de la inmunoglobulina no tiene actividad CDC.

En ciertas incorporaciones, la región Fc de la inmunoglobulina se deriva de un ser humano.

En ciertas incorporaciones, la región Fc de la inmunoglobulina se deriva de IgG humana.

En ciertas incorporaciones, la región Fc de la inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID Nos: 7-9.

En determinadas incorporaciones, el fragmento de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 14-31.

En ciertas incorporaciones, el fragmento de unión a antígeno se encuentra en una concentración de aproximadamente 1 mg/mL a aproximadamente 300 mg/mL.

En ciertas incorporaciones, el fragmento de unión a antígeno está en una concentración de aproximadamente 5 mg/mL a aproximadamente 250 mg/mL.

En determinadas incorporaciones, el fragmento de unión a antígeno está en una concentración de aproximadamente 1 mg/mL a aproximadamente 220 mg/mL.

En ciertas incorporaciones, el fragmento de unión a antígeno está en una concentración de aproximadamente 20 mg/mL a aproximadamente 220 mg/mL.

En ciertas incorporaciones, el fragmento de unión a antígeno está en una concentración de aproximadamente 50 mg/mL a aproximadamente 200 mg/mL.

En determinadas incorporaciones, el fragmento de unión a antígeno está en una concentración de aproximadamente 100 mg/mL a aproximadamente 280 mg/mL.

En ciertas incorporaciones, el fragmento de unión a antígeno está en una concentración de aproximadamente 150 mg/mL a aproximadamente 250 mg/mL.

En ciertas incorporaciones, el fragmento de unión a antígeno está en una concentración de aproximadamente 180 mg/mL a aproximadamente 250 mg/mL.

En determinadas incorporaciones, el fragmento de unión al antígeno está en una concentración de aproximadamente 180 mg/ml a aproximadamente 220 mg/ml.

En ciertas incorporaciones, el excipiente está en una concentración de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 500 mM.

En determinadas incorporaciones, el excipiente comprende prolina en una concentración de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 390 mM.

En ciertas incorporaciones, el excipiente comprende prolina en una concentración de aproximadamente 150 mM a aproximadamente 250 mM.

En ciertas incorporaciones, el excipiente comprende prolina en una concentración de aproximadamente 150 mM a aproximadamente 220 mM.

En ciertas incorporaciones, el excipiente comprende L-prolina en una concentración de aproximadamente 150 mM a aproximadamente 220 mM.

En ciertas incorporaciones, el excipiente comprende L-prolina en una concentración de aproximadamente 165 mM a aproximadamente 275 mM.

En ciertas incorporaciones, el excipiente comprende manitol en una concentración de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 500 mM.

En ciertas incorporaciones, el excipiente comprende sacarosa en una concentración de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 500 mM.

En ciertas incorporaciones, el excipiente comprende sacarosa en una concentración de aproximadamente 90 mM a aproximadamente 500 mM.

En ciertas incorporaciones, el excipiente comprende glicina en una concentración de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 500 mM.

En ciertas incorporaciones, el excipiente comprende glicina en una concentración de aproximadamente 150 mM a aproximadamente 250 mM.

En ciertas incorporaciones, el excipiente comprende clorhidrato de L-arginina en una concentración de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 500 mM.

En ciertas incorporaciones, el excipiente comprende clorhidrato de L-arginina en una concentración de aproximadamente 150 mM a aproximadamente 500 mM.

En ciertas incorporaciones, el excipiente comprende sorbitol en una concentración de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 500 mM.

En ciertas incorporaciones, el excipiente comprende sorbitol en una concentración de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 300 mM.

En ciertas incorporaciones, el excipiente comprende glicerol en una concentración de 50 mM a aproximadamente 500 mM.

En ciertas incorporaciones, el excipiente comprende glicerol en una concentración de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 300 mM.

En ciertas incorporaciones, la composición tiene un pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 7,5.

En determinadas incorporaciones, la composición tiene un pH de aproximadamente 5,9 a aproximadamente 6,9.

En ciertas incorporaciones, la composición tiene un pH de aproximadamente 6,3 a aproximadamente 6,5.

En ciertas incorporaciones, la composición tiene un pH de aproximadamente 6,4.

En ciertas incorporaciones, la composición comprende un componente amortiguador, en el que el componente amortiguador se selecciona de uno o más del grupo que consiste en: acetato de sodio-ácido acético, histidina-ácido acético, clorhidrato de L-histidina-L-histidina, fosfato de sodio y ácido cítrico-hidróxido de sodio.

En ciertas incorporaciones, el componente amortiguador se selecciona de uno o más del grupo que consiste en: acetato de sodio-ácido acético, clorhidrato de L-histidina-L-histidina y ácido cítrico-hidróxido de sodio; preferentemente, el componente amortiguador es acetato de sodio-ácido acético o clorhidrato de L-histidina-L-histidina.

En ciertas incorporaciones, el componente amortiguador está en una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 50 mM.

En ciertas incorporaciones, el componente amortiguador comprende acetato de sodio-ácido acético en una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 35 mM.

En ciertas incorporaciones, el componente amortiguador comprende acetato de sodio-ácido acético en una concentración de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 30 mM.

En ciertas incorporaciones, el componente amortiguador comprende acetato de sodio-ácido acético en una concentración de aproximadamente 20 mM.

En ciertas incorporaciones, el componente amortiguador comprende clorhidrato de L-histidina-L-histidina a una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 35 mM, preferentemente de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 30 mM, y más preferentemente 20 mM. En ciertas incorporaciones, la composición comprende un tensioactivo, en el que el tensioactivo se selecciona de uno o más del grupo que consiste en: polisorbato 20, polisorbato 80 y poloxámero 188.

En determinadas incorporaciones, el tensioactivo se encuentra en una concentración de aproximadamente 0 mg/mL a aproximadamente 0,8 mg/mL.

En determinadas incorporaciones, el tensioactivo comprende polisorbato 20 en una concentración de aproximadamente 0 mg/mL a aproximadamente 0,4 mg/mL.

En determinadas incorporaciones, el tensioactivo comprende polisorbato 20 en una concentración de aproximadamente 0,2 mg/mL a aproximadamente 0,4 mg/mL.

En determinadas incorporaciones, el tensioactivo comprende polisorbato 20 en una concentración de aproximadamente 0,1 mg/mL a aproximadamente 0,3 mg/mL.

En determinadas incorporaciones, el tensioactivo comprende polisorbato 20 en una concentración de aproximadamente 0,2 mg/mL.

En ciertas incorporaciones, el tensioactivo comprende polisorbato 80 en una concentración de aproximadamente 0,05 mg/mL a aproximadamente 1 mg/mL, preferentemente de 0,1 mg/mL a 0,5 mg/mL, más preferentemente de 0,1 mg/mL a 0,3 mg/mL, e incluso más preferentemente 0,2 mg/mL.

En ciertas incorporaciones, el tensioactivo comprende poloxámero 188 en una concentración de aproximadamente 0,05 mg/mL a aproximadamente 5 mg/mL, preferiblemente de 0,1 mg/mL a aproximadamente 3 mg/mL, y más preferiblemente de 0,2 mg/mL a aproximadamente 2 mg/mL.

En ciertas incorporaciones, la composición comprende: 1) aproximadamente 20 mg/mL a aproximadamente 220 mg/mL del fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento; 2) aproximadamente 5 mM a aproximadamente 35 mM de ácido acetato-acético sódico; 3) aproximadamente 50 mM a aproximadamente 390 mM de prolina; y 4) aproximadamente 0 mg/mL a aproximadamente 0,4 mg/mL de polisorbato 20; y la composición tiene un pH de aproximadamente 5,9 a aproximadamente 6,9.

En ciertas incorporaciones, la composición comprende: 1) aproximadamente 50 mg/mL a aproximadamente 220 mg/mL del fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento; 2) aproximadamente 10 mM a aproximadamente 30 mM de ácido acetato-acético de sodio; 3) aproximadamente 150 mM a aproximadamente 250 mM de prolina; y 4) aproximadamente 0,2 mg/mL a aproximadamente 0,4 mg/mL de polisorbato 20; y la composición tiene un pH de aproximadamente 6,3 a aproximadamente 6,5.

En ciertas incorporaciones, la composición comprende: 1) aproximadamente 150 mg/mL a aproximadamente 250 mg/mL del fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento; 2) aproximadamente 10 mM a aproximadamente 30 mM de ácido acetato-acético de sodio; 3) aproximadamente 150 mM a aproximadamente 250 mM de prolina; y 4) aproximadamente 0,2 mg/mL a aproximadamente 0,4 mg/mL de polisorbato 20; y la composición tiene un pH de aproximadamente 6,3 a aproximadamente 6,5.

En ciertas incorporaciones, la composición comprende: 1) aproximadamente 200 mg/mL del fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento; 2) aproximadamente 20 mM de acetato de sodio-ácido acético; 3) aproximadamente 220 mM de prolina; y 4) aproximadamente 0,2 mg/mL de polisorbato 20; y la composición tiene un pH de aproximadamente 6,4.

En ciertas incorporaciones, la composición comprende: 1) aproximadamente 100 mg/mL a aproximadamente 280 mg/mL del fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento; 2) aproximadamente 5 mM a aproximadamente 35 mM de ácido acetato-acético sódico; 3) aproximadamente 50 mM a aproximadamente 500 mM de sacarosa; y 4) aproximadamente 0,05 mg/mL a aproximadamente 0,4 mg/mL de polisorbato 20; y la composición tiene un pH de aproximadamente 5,9 a aproximadamente 6,9.

En ciertas incorporaciones, la composición comprende: 1) aproximadamente 150 mg/mL a aproximadamente 250 mg/mL del fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento; 2) aproximadamente 10 mM a aproximadamente 30 mM de ácido acetato-acético de sodio; 3) aproximadamente 50 mM a aproximadamente 300 mM de sacarosa; y 4) aproximadamente 0,1 mg/mL a aproximadamente 0,3 mg/mL de polisorbato 20; y la composición tiene un pH de aproximadamente 6,3 a aproximadamente 6,5.

En ciertas incorporaciones, la composición comprende: 1) aproximadamente 100 mg/mL a aproximadamente 280 mg/mL del fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento; 2) aproximadamente 5 mM a aproximadamente 35 mM de ácido acetato-acético de sodio; 3) aproximadamente 50 mM a aproximadamente 500 mM de manitol; y 4) aproximadamente 0,05 mg/mL a aproximadamente 0,4 mg/mL de polisorbato 20; y la composición tiene un pH de aproximadamente 5,9 a aproximadamente 6,9.

En ciertas incorporaciones, la composición comprende: 1) aproximadamente 150 mg/mL a aproximadamente 250 mg/mL del fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento; 2) aproximadamente 10 mM a aproximadamente 30 mM de ácido acetato-acético sódico; 3) aproximadamente 100 mM a aproximadamente 300 mM de manitol; y 4) aproximadamente 0,1 mg/mL a aproximadamente 0,3 mg/mL de polisorbato 20; y la composición tiene un pH de aproximadamente 6,3 a aproximadamente 6,5.

En ciertas incorporaciones, la composición comprende: 1) aproximadamente 100 mg/mL a aproximadamente 280 mg/mL del fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento; 2) aproximadamente 5 mM a aproximadamente 35 mM de ácido acetato-acético sódico; 3) aproximadamente 50 mM a aproximadamente 500 mM de sorbitol; y 4) aproximadamente 0,05 mg/mL a aproximadamente 0,4 mg/mL de polisorbato 20; y la composición tiene un pH de aproximadamente 5,9 a aproximadamente 6,9.

En ciertas incorporaciones, la composición comprende: 1) aproximadamente 150 mg/mL a aproximadamente 250 mg/mL del fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento; 2) aproximadamente 10 mM a aproximadamente 30 mM de ácido acetato-acético de sodio; 3)

aproximadamente 100 mM a aproximadamente 300 mM de sorbitol; y 4) aproximadamente 0,1 mg/mL a aproximadamente 0,3 mg/mL de polisorbato 20; y la composición tiene un pH de aproximadamente 6,3 a aproximadamente 6,5.

En ciertas incorporaciones, la composición comprende: 1) aproximadamente 100 mg/mL a aproximadamente 280 mg/mL del fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento; 2) aproximadamente 5 mM a aproximadamente 35 mM de ácido acetato-acético sódico; 3) aproximadamente 50 mM a aproximadamente 500 mM de glicerol; y 4) aproximadamente 0,05 mg/mL a aproximadamente 0,4 mg/mL de polisorbato 20; y la composición tiene un pH de aproximadamente 5,9 a aproximadamente 6,9.

En ciertas incorporaciones, la composición comprende: 1) aproximadamente 150 mg/mL a aproximadamente 250 mg/mL del fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento; 2) aproximadamente 10 mM a aproximadamente 30 mM de ácido acetato-acético sódico; 3) aproximadamente 100 mM a aproximadamente 300 mM de glicerol; y 4) aproximadamente 0,1 mg/mL a aproximadamente 0,3 mg/mL de polisorbato 20; y la composición tiene un pH de aproximadamente 6,3 a aproximadamente 6,5.

En ciertas incorporaciones, la composición comprende: 1) aproximadamente 150 mg/mL a aproximadamente 250 mg/mL del fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento; 2) aproximadamente 10 mM a aproximadamente 30 mM de clorhidrato de L-histidina-L-histidina; 3) aproximadamente 150 mM a aproximadamente 250 mM de prolina; y 4) aproximadamente 0,2 mg/mL a aproximadamente 0,4 mg/mL de polisorbato 20; y la composición tiene un pH de aproximadamente 6,3 a aproximadamente 6,5.

En ciertas incorporaciones, la composición comprende: 1) aproximadamente 150 mg/mL a aproximadamente 250 mg/mL del fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento; 2) aproximadamente 10 mM a aproximadamente 30 mM de clorhidrato de L-histidina-L-histidina; 3) aproximadamente 150 mM a aproximadamente 250 mM de prolina; y 4) aproximadamente 0,2 mg/mL a aproximadamente 0,4 mg/mL de polisorbato 20; y la composición tiene un pH de aproximadamente 6,3 a aproximadamente 6,5.

En ciertas incorporaciones, la composición comprende: 1) aproximadamente 150 mg/mL a aproximadamente 250 mg/mL del fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento; 2) aproximadamente 10 mM a aproximadamente 30 mM de clorhidrato de L-histidina-L-histidina; 3) aproximadamente 100 mM a aproximadamente 300 mM de manitol; y 4) aproximadamente 0,1 mg/mL a aproximadamente 0,3 mg/mL de polisorbato 20; y la composición tiene un pH de aproximadamente 6,3 a aproximadamente 6,5.

En ciertas incorporaciones, la composición comprende: 1) aproximadamente 150 mg/mL a aproximadamente 250 mg/mL del fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento; 2) aproximadamente 10 mM a aproximadamente 30 mM de clorhidrato de L-histidina-L-histidina; 3) aproximadamente 100 mM a aproximadamente 300 mM de sorbitol; y 4) aproximadamente 0,1 mg/mL a aproximadamente 0,3 mg/mL de polisorbato 20; y la composición tiene un pH de aproximadamente 6,3 a aproximadamente 6,5.

En ciertas incorporaciones, la composición comprende: 1) aproximadamente 150 mg/mL a aproximadamente 250 mg/mL del fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento; 2) aproximadamente 10 mM a aproximadamente 30 mM de clorhidrato de L-histidina-L-histidina; 3) aproximadamente 100 mM a aproximadamente 300 mM de glicerol; y 4) aproximadamente 0,1 mg/mL a

aproximadamente 0,3 mg/mL de polisorbato 20; y la composición tiene un pH de aproximadamente 6,3 a aproximadamente 6,5.

En ciertas incorporaciones, la composición se utiliza para inyección.

En determinadas incorporaciones, la composición se utiliza para inyección subcutánea.

En ciertas incorporaciones, la composición es una formulación.

En ciertas incorporaciones, la composición es una formulación líquida.

En otro aspecto, la presente solicitud proporciona un kit que comprende la composición descrita en el presente documento y un recipiente que contiene la composición descrita en el presente documento.

En ciertas incorporaciones, el recipiente es un vial de vidrio.

En ciertas incorporaciones, la composición en el recipiente tiene un volumen de aproximadamente 0,5 mL a aproximadamente 5,0 mL.

En ciertas incorporaciones, la composición en el recipiente tiene un volumen de aproximadamente 0,5 ml a aproximadamente 1,5 mL.

En otro aspecto, la presente solicitud proporciona el uso de la composición descrita en el presente documento y/o el kit descrito en el presente documento en la preparación de un medicamento para prevenir, aliviar y/o tratar un tumor.

En ciertas incorporaciones, el tumor comprende un tumor PD-L1 positivo.

En ciertas incorporaciones, el tumor comprende un tumor sólido maligno.

En otro aspecto, la presente solicitud proporciona el uso de la composición descrita en el presente documento y/o el kit descrito en el presente documento en la preparación de un medicamento para prevenir, aliviar y/o tratar una enfermedad infecciosa.

En ciertas incorporaciones, la enfermedad infecciosa comprende una enfermedad causada por una infección viral, una infección bacteriana, una infección fúngica y/o una infección parasitaria

Otros aspectos y ventajas de la presente solicitud resultarán evidentes para los expertos en la materia a partir de la siguiente descripción detallada. En la siguiente descripción detallada sólo se muestran y describen incorporaciones ejemplares de la presente solicitud. Como reconocerán los expertos en la materia, el contenido de la presente solicitud permite a los expertos en la materia realizar cambios en las incorporaciones específicas divulgadas sin apartarse del espíritu y alcance de la invención implicada en la presente solicitud. En consecuencia, las descripciones de los dibujos y la especificación son sólo ilustrativas y no restrictivas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las características específicas de la invención objeto de la presente solicitud se exponen en las reivindicaciones anexas. Las características y ventajas de la invención objeto de la presente solicitud se comprenderán mejor si se hace referencia a las incorporaciones a modo de ejemplo y a los dibujos que se describen en detalle a continuación. A continuación se describen brevemente los dibujos.

La FIG. 1 muestra los resultados de detección de los valores de T_m de las fórmulas que contienen el fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento.

La FIG. 2 muestra los resultados de detección de la tendencia a la agregación de las fórmulas que contienen el fragmento de unión a antígeno aquí descrito.

La FIG. 3 muestra los resultados de detección del contenido del pico principal SEC-HPLC de las fórmulas que contienen el fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento.

La FIG. 4 muestra los resultados de detección del contenido de agregados SEC-HPLC de las fórmulas que contienen el fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento.

La FIG. 5 muestra los resultados de detección del componente ácido por WCX-HPLC de las fórmulas que contienen el fragmento de unión a antígeno aquí descrito.

La FIG. 6 muestra los resultados de detección de la viscosidad de las fórmulas que contienen el fragmento de unión a antígeno aquí descrito.

La FIG. 7 muestra los resultados de la detección de la actividad de unión de las fórmulas que contienen el fragmento de unión a antígeno aquí descrito.

La FIG. 8 muestra los resultados de detección de la actividad de bloqueo de las fórmulas que contienen el fragmento de unión a antígeno aquí descrito.

La FIG. 9 muestra los resultados de detección del contenido del pico principal de SEC-HPLC de las fórmulas que contienen el fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento.

La FIG. 10 muestra los resultados de detección del contenido de agregados SEC-HPLC de las fórmulas de formulación del fragmento de unión a antígeno aquí descrito.

La FIG. 11 muestra los resultados de detección del componente ácido WCX-HPLC de las fórmulas de formulación del fragmento de unión a antígeno aquí descrito.

DESCIPCIÓN DETALLADA

Las incorporaciones de la presente invención se describen a continuación con referencia a ejemplos específicos, y otras ventajas y efectos de la presente invención serán fácilmente evidentes para los expertos en la materia a partir de la divulgación de la presente especificación.

Definiciones de los Términos

En la presente solicitud, el término "fragmento de unión a antígeno" se refiere generalmente a una o más porciones de un anticuerpo que conservan la capacidad de interactuar específicamente con un epítipo de

un antígeno (por ejemplo, por unión, impedimento estérico o similar). La función de unión al antígeno de un anticuerpo también puede conseguirse mediante: una cadena pesada que comprenda un fragmento de Fv, ScFv, dsFv, Fab, Fab' or F(ab')₂, o una cadena ligera que comprenda un fragmento de Fv, scFv, dsFv, Fab, Fab' or F(ab')₂. (1) Fragmentos Fab, es decir, fragmentos monovalentes compuestos por dominios VL, VH, CL y CH; (2) fragmentos F(ab')₂, fragmentos bivalentes compuestos por dos fragmentos Fab unidos por un enlace disulfuro en la región bisagra; (3) fragmentos Fd formados por dominios VH y CH; (4) fragmentos Fv formados por dominios VL y VH de un brazo único de un anticuerpo; (5) fragmentos dAb formados por dominios VH (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546); (6) regiones aisladas determinantes de la complementariedad (CDR), y (7) combinaciones de dos o más CDR aisladas que opcionalmente pueden estar unidas por un enlazador. Por ejemplo, también puede incluirse la molécula monovalente de cadena única Fv (scFv) formada por el emparejamiento de VL y VH (véase Bird et al., (1988) Science 242: 423-426; y Huston et al., (1988). Por ejemplo, también puede incluirse el anticuerpo VHH que carece de la cadena ligera de un anticuerpo y solo tiene regiones variables de cadena pesada (véase, por ejemplo, Kang Xiaozhen et al., Chinese Journal of Biotechnology. 2018, 34(12): 1974-1984). La "porción de unión a antígeno" también puede incluir una proteína de fusión de inmunoglobulina que comprende un dominio de unión seleccionado entre: (1) un polipéptido de dominio de unión fusionado a un polipéptido de región bisagra de inmunoglobulina; (2) una región constante CH₂ de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada a la región bisagra; y (3) una región constante CH₃ de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada a la región constante CH₂.

En la presente solicitud, el término "excipiente" se refiere generalmente a cualquier material elegido según se desee para cualquier tipo o forma de producto deseado para la composición. Por ejemplo, la forma del producto puede incluir líquido, gránulos, polvo, pasta, aerosol, comprimidos o gel. El excipiente puede no afectar a la forma de presencia o estabilidad del fragmento de unión a antígeno o a cualquier actividad biológica del fragmento de unión a antígeno (por ejemplo, unión específica al antígeno correspondiente). En la presente solicitud, el excipiente puede actuar como estabilizante para mejorar la estabilidad de la composición y/o la estabilidad del fragmento de unión a antígeno en la composición.

En la presente solicitud, el término "PD-L1" se refiere en general al ligando 1 de la proteína de muerte celular programada, que también puede denominarse CD274 o B7H1. En la presente solicitud, la PD-L1 puede ser PD-L1 de origen mamífero. Por ejemplo, la PD-L1 puede ser de origen primate o de origen roedor (por ejemplo, ratón o rata). La PD-L1 humana puede tener la secuencia de aminoácidos que se muestra en NCBI accession No. NP_054862.1. El PD-L1 puede incluir PD-L1 nativo y también puede incluir variantes, isoformas, especies homólogas de PD-L1 y análogos que tengan al menos un epítipo común con PD-L1.

En la presente solicitud, el término "dominio variable de inmunoglobulina" se refiere generalmente a una molécula polipeptídica que consta de cuatro "regiones marco", es decir, "región marco 1" o "FR1", "región marco 2" o "FR2", "región marco 3" o "FR3" y "región marco 4" o "FR4", y tres "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR", es decir, "región determinante de la complementariedad 1" o "CDR1", "región determinante de la complementariedad 2" o "CDR2" y "región determinante de la complementariedad 3" o "CDR3". El dominio variable de inmunoglobulina puede tener la estructura terciaria de una proteína. En la presente solicitud, el dominio variable de inmunoglobulina puede tener la función de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, PD-L1). El dominio variable de inmunoglobulina puede comprender la estructura de FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4.

En la presente solicitud, el término "dominio variable único de inmunoglobulina" se refiere en general al dominio variable de inmunoglobulina que tiene una función de unión específica a un antígeno (por ejemplo, PD-L1) de forma independiente. Por ejemplo, el dominio variable único de inmunoglobulina puede unirse específicamente a un antígeno o a un epítipo del mismo sin emparejarse con otros dominios variables de

inmunoglobulina. Por ejemplo, el dominio variable único de inmunoglobulina puede ser una región variable de cadena pesada VH y/o una región variable de cadena ligera VL. En la presente solicitud, el dominio variable único de inmunoglobulina puede ser un VHH. En la presente solicitud, el VHH también puede denominarse anticuerpo de cadena pesada, nanocuerpo o anticuerpo de dominio único. Las CDR del VHH pueden dividirse según el método Kabat (véase "Sequence of proteins of immunological interest", US Public Health Services, NIH Bethesda, MD). Por ejemplo, en la secuencia de aminoácidos de VHH, los aminoácidos en las posiciones 1-30 son FR1, los aminoácidos en las posiciones 31-35 son CDR1, los aminoácidos en las posiciones 36-49 son FR2, los aminoácidos en las posiciones 50-65 son CDR2, los aminoácidos en las posiciones 66-94 son FR3, los aminoácidos en las posiciones 95-102 son CDR3, y los aminoácidos en las posiciones 103-113 son FR4. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que el número total de residuos de aminoácidos en cada CDR puede variar y puede no corresponder al número total de residuos de aminoácidos indicado por la numeración de Kabat (es decir, una o más posiciones según la numeración de Kabat pueden no estar ocupadas en la secuencia real, o la secuencia real puede contener más residuos de aminoácidos que el número permitido por la numeración de Kabat), y por lo tanto la numeración según Kabat puede o no corresponder a la numeración real de residuos de aminoácidos en la secuencia real.

En la presente solicitud, el término "composición" se refiere generalmente a una mezcla que comprende el fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento. La composición puede comprender al menos un componente farmacéuticamente aceptable, como un excipiente descrito en el presente documento.

En la presente solicitud, el término "formulación" se refiere generalmente a un producto que comprende el fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento en una cantidad o proporción predeterminada y cualquier producto que se produzca incorporando directa o indirectamente una cantidad predeterminada del fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento en una combinación. Las formulaciones descritas en el presente documento pueden incluir formulaciones farmacéuticas, es decir, un producto que comprende el fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento y el excipiente y cualquier producto resultante, directa o indirectamente, de la combinación, complejación o agregación de dos o más componentes cualesquiera. La formulación puede presentarse en forma líquida.

En la presente solicitud, el término "componente amortiguador" se refiere generalmente a un agente que tiene la función de proporcionar un efecto amortiguador (por ejemplo, contra el cambio de pH). Por ejemplo, el componente amortiguador puede ajustar los cambios de pH debidos a la adición y/o liberación de sustancias ácidas o básicas. Por ejemplo, el componente amortiguador puede incluir ácidos débiles y bases conjugadas de los mismos, y también puede incluir bases débiles y ácidos conjugados de las mismas.

En la presente solicitud, el término "tensioactivo" se refiere generalmente a un agente que puede proteger una proteína (por ejemplo, el fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento) de la tensión inducida por la interfaz aire/solución o la tensión inducida por la solución/superficie para reducir la agregación de la proteína o minimizar la formación de partículas en la composición. El tensioactivo puede comprender grupos hidrófobos e hidrófilos. El tensioactivo puede comprender una mezcla o combinación de uno o más tensioactivos. El tensioactivo puede incluir un tensioactivo no iónico.

En la presente solicitud, el término "PD-L1 positivo" generalmente significa que la proporción de células que expresan PD-L1 en una muestra de tejido de ensayo que comprende células tumorales y células inflamatorias infiltrantes del tumor es superior a la proporción de células correspondiente a un nivel que califica la muestra como expresiva de PD-L1 de superficie celular. Por ejemplo, la proporción de células puede determinarse mediante inmunohistoquímica (IHC). En la presente solicitud, la PD-L1 positiva puede

ser que al menos aproximadamente el 0,01%, al menos aproximadamente el 0,5%, al menos aproximadamente el 1%, al menos aproximadamente el 2%, al menos aproximadamente el 3%, al menos aproximadamente el 4%, al menos aproximadamente el 5%, al menos aproximadamente el 6%, al menos aproximadamente el 7%, al menos aproximadamente el 8%, al menos aproximadamente el 9%, al menos aproximadamente el 10%, al menos aproximadamente el 15%, al menos aproximadamente el 20%, al menos aproximadamente el 25%, o al menos.

En la presente solicitud, el término "tumor" se refiere generalmente al daño causado por el crecimiento anormal de las células. Por ejemplo, el tumor puede formar una masa tisular separada por proliferación celular rápida e incontrolada. La masa tisular puede ser benigna, premaligna o maligna. El tumor puede considerarse maligno cuando tiene una estructura y/o función que le permite crecer ilimitadamente y/o atacar tejidos normales. El tumor maligno puede utilizarse indistintamente con cáncer.

En determinadas incorporaciones, el fragmento de unión al antígeno está en una concentración de aproximadamente 180 mg/ml a aproximadamente 220 mg/ml.

En la presente solicitud, el término "enfermedad infecciosa" se refiere generalmente a las reacciones inflamatorias tisulares y sistémicas locales causadas por la invasión del cuerpo humano por agentes patógenos, como virus, bacterias, hongos, parásitos y similares, y toxinas específicas.

En la presente solicitud, el término "aproximadamente" se refiere generalmente al intervalo de error habitual para el valor correspondiente. La referencia en el presente documento a "aproximadamente" para un valor o un parámetro incluye (y describe) los esquemas para ese valor o parámetro en sí. En caso de duda o si no existe un significado aceptable comúnmente entendido para el rango de error de un valor o parámetro concreto en la técnica, "aproximadamente" significa $\pm 5\%$ de dicho valor o parámetro.

Descripción Detallada de la Invención

En un aspecto, la presente solicitud proporciona una composición, que puede comprender un fragmento de unión a antígeno y un excipiente, en el que el fragmento de unión a antígeno puede comprender un dominio variable único de inmunoglobulina capaz de unirse específicamente a PD-L1, el dominio variable único de inmunoglobulina puede comprender una secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de los SEQ ID Nos: 1-6, y el excipiente se selecciona de uno o más del grupo que consiste en: prolina, manitol, sacarosa, glicina y clorhidrato de L-arginina.

Fragmento de unión a antígeno

En la presente solicitud, el fragmento de unión a antígeno puede unirse específicamente a PD-L1. Por ejemplo, el PD-L1 puede ser PD-L1 humano.

En la presente solicitud, el fragmento de unión a antígeno puede comprender una región Fc de una inmunoglobulina. Por ejemplo, el fragmento de unión a antígeno puede consistir en una secuencia de aminoácidos de la fórmula A-L-B, en la que A representa un dominio variable único de inmunoglobulina, L representa un enlazador de aminoácidos o está ausente, y B representa una región Fc de inmunoglobulina humana.

Por ejemplo, el N-terminal de la región Fc de la inmunoglobulina puede estar unido directa o indirectamente al C-terminal del dominio variable único de la inmunoglobulina.

Por ejemplo, el N-terminal de la región Fc de la inmunoglobulina puede estar unido al C-terminal del dominio variable único de la inmunoglobulina mediante un enlazador.

En la presente solicitud, el dominio variable único de inmunoglobulina puede comprender la región CDR1-3 que determina la complementariedad del antígeno. Por ejemplo, la CDR1 puede comprender una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 45 o 48. Por ejemplo, la CDR2 puede comprender una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 46. Por ejemplo, la CDR3 puede comprender una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 47. Por ejemplo, la CDR1 puede comprender una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 45; la CDR2 puede comprender una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 46; y la CDR3 puede comprender una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 47. Por ejemplo, la CDR1 puede incluir una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 48; la CDR2 puede incluir una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 46; y la CDR3 puede incluir una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 47.

En la presente solicitud, el enlazador puede tener una longitud de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 residuos de aminoácidos. Por ejemplo, el enlazador puede no tener estructura secundaria o superior. Por ejemplo, el enlazador puede ser un enlazador flexible. Por ejemplo, el enlazador puede ser GGGGS, GS o GAP. Por ejemplo, el enlazador puede comprender una secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de los SEQ ID Nos: 42-44.

Por ejemplo, la región Fc de la inmunoglobulina puede comprender una región Fc derivada de una inmunoglobulina seleccionada del grupo que consiste en: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. La región constante de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana puede tener secuencias de aminoácidos mostradas en las entradas P01857, P01859, P01860 y P01861, respectivamente, en la base de datos de proteínas en www.uniprot.org.

Por ejemplo, la región Fc de la inmunoglobulina puede derivarse de un ser humano. Por ejemplo, la región Fc de la inmunoglobulina puede derivarse de una IgG humana. Por ejemplo, la región Fc de la inmunoglobulina puede derivarse de la IgG1 humana.

En la presente solicitud, la región Fc de la inmunoglobulina puede no tener actividad ADCC; y/o, la región Fc de la inmunoglobulina puede no tener actividad CDC. Por ejemplo, la región Fc de la inmunoglobulina puede perder actividad ADCC y/o actividad CDC debido a mutación. Por ejemplo, la región Fc de la inmunoglobulina puede comprender una secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID Nos: 7-9.

En determinadas incorporaciones, el fragmento de unión al antígeno está en una concentración de aproximadamente 180 mg/ml a aproximadamente 220 mg/ml.

En la presente solicitud, el fragmento de unión a antígeno puede unirse específicamente a PD-L1 con un valor de KD inferior a 1×10^{-7} M, inferior a 1×10^{-8} M, inferior a 1×10^{-9} M, inferior a 1×10^{-10} M o inferior a 1×10^{-11} M.

En la presente solicitud, el fragmento de unión a antígeno puede unirse específicamente a PD-L1 humano y bloquear la interacción de PD-L1 y PD-1. En la presente solicitud, el fragmento de unión a antígeno puede unirse específicamente a PD-L1 humano y bloquear la interacción de PD-L1 y CD80.

En la presente solicitud, el fragmento de unión a antígeno puede inhibir el crecimiento del tumor en al menos un 10%, al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80% o más.

En la presente solicitud, el fragmento de unión a antígeno puede ser resistente al tratamiento con álcalis y/o al tratamiento de oxidación. Por ejemplo, el fragmento de unión a antígeno aún conserva la capacidad de unirse específicamente a PD-L1 después de al menos 8 horas de tratamiento con un álcali fuerte (por ejemplo, bicarbonato de amonio). Como otro ejemplo, el fragmento de unión a antígeno aún conserva la capacidad de unirse específicamente a PD-L1 después de al menos 2 horas de tratamiento con un agente oxidante (por ejemplo, peróxido de hidrógeno al 1%).

En la presente solicitud, el fragmento de unión a antígeno puede comprender una secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID Nos: 14-31.

En la presente solicitud, el fragmento de unión a antígeno puede comprender variantes funcionales del fragmento de unión a antígeno y fragmentos del mismo, derivados del fragmento de unión a antígeno y fragmentos del mismo, análogos del fragmento de unión a antígeno y fragmentos del mismo y/u homólogos del fragmento de unión a antígeno y fragmentos del mismo.

La variante funcional puede ser un polipéptido que tiene sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que una secuencia natural o codificada por sustancialmente la misma secuencia de nucleótidos que la secuencia natural y capaz de tener una o más de las actividades de la secuencia natural. Por ejemplo, la variante funcional puede ser una secuencia obtenida modificando los residuos de una secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de los SEQ ID Nos: 14-31 conservando al menos una función endógena (por ejemplo, puede unirse específicamente a PD-L1 humana). Por ejemplo, la modificación puede comprender adición, delección, sustitución, modificación, reemplazo y/o variación de al menos un residuo de aminoácido.

El derivado puede comprender una secuencia obtenida realizando cualquier sustitución, variación, modificación, reemplazo, supresión y/o adición de uno (o más) residuos de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID Nos: 14-31 conservando al menos una función endógena.

El homólogo puede ser una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80%, 85%, 90%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% o 99,9% de identidad con la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de los SEQ ID Nos: 14-31. Para determinar la identidad de secuencia, pueden realizarse alineaciones de secuencia por diversos medios conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, utilizando software como BLAST, BLAST-2, ALIGN, NEEDLE, Megalign (DNASTAR) y similares. Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros adecuados para la alineación, incluidos los algoritmos necesarios para lograr una alineación óptima en toda la longitud de las secuencias comparadas. El análogo puede comprender un simulante de un polipéptido que conserve al menos una función endógena del fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento.

El fragmento de unión a antígeno aquí descrito puede tener delecciones, inserciones o sustituciones de residuos de aminoácidos, y los residuos de aminoácidos sufren cambios silenciosos y dan lugar a una proteína funcionalmente equivalente. Las sustituciones intencionadas de aminoácidos pueden realizarse basándose en la similitud de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad y/o naturaleza anfipática de los residuos, siempre que se mantenga la función endógena.

En la composición descrita en el presente documento, el fragmento de unión a antígeno puede estar en una concentración de aproximadamente 1 mg/mL a aproximadamente 220 mg/mL. Por ejemplo, el fragmento de unión a antígeno puede estar en una concentración de aproximadamente 20 mg/mL a aproximadamente 220 mg/mL. Por ejemplo, el fragmento de unión a antígeno puede tener una concentración de aproximadamente 30 mg/mL a aproximadamente 220 mg/mL, de aproximadamente 40 mg/mL a aproximadamente 220 mg/mL, de aproximadamente 50 mg/mL a aproximadamente 220 mg/mL, de aproximadamente 30 mg/mL a aproximadamente 200 mg/mL, de aproximadamente 40 mg/mL a aproximadamente 200 mg/mL o de aproximadamente 50 mg/mL a aproximadamente 200 mg/mL. Por ejemplo, el fragmento de unión a antígeno puede estar en una concentración de aproximadamente 1 mg/mL a aproximadamente 300 mg/mL. Por ejemplo, el fragmento de unión a antígeno puede estar específicamente en una concentración de aproximadamente 5 mg/mL, 10 mg/mL, 20 mg/mL, 30 mg/mL, 40 mg/mL, 50 mg/mL, 60 mg/mL, 70 mg/mL, 80 mg/mL, 90 mg/mL, 100 mg/mL, 110 mg/mL, 120 mg/mL, 130 mg/mL, 140 mg/mL, 150 mg/mL, 160 mg/mL, 170 mg/mL, 180 mg/mL, 190 mg/mL, 200 mg/mL, 210 mg/mL, 220 mg/mL, 230 mg/mL, 240 mg/mL, 250 mg/mL, 260 mg/mL, 270 mg/mL, 280 mg/mL, 290 mg/mL o 300 mg/mL. Por ejemplo, el fragmento de unión a antígeno puede estar en una concentración de aproximadamente 5 mg/mL a aproximadamente 250 mg/mL, aproximadamente 10 mg/mL a aproximadamente 290 mg/mL, aproximadamente 20 mg/mL a aproximadamente 290 mg/mL, aproximadamente 30 mg/mL a aproximadamente 290 mg/mL, aproximadamente 50 mg/mL a aproximadamente 290 mg/mL, aproximadamente 60 mg/mL a aproximadamente 280 mg/mL, aproximadamente 70 mg/mL a aproximadamente 280 mg/mL, aproximadamente 80 mg/mL a aproximadamente 280 mg/mL, aproximadamente 100 mg/mL a aproximadamente 280 mg/mL, aproximadamente 110 mg/mL a aproximadamente 250 mg/mL, aproximadamente 130 mg/mL a aproximadamente 250 mg/mL, aproximadamente 150 mg/mL a aproximadamente 250 mg/mL, aproximadamente 160 mg/mL a aproximadamente 250 mg/mL, aproximadamente 170 mg/mL a aproximadamente 250 mg/mL, aproximadamente 180 mg/mL a aproximadamente 250 mg/mL, aproximadamente 120 mg/mL a aproximadamente 220 mg/mL, aproximadamente 140 mg/mL a aproximadamente 220 mg/mL, aproximadamente 150 mg/mL a aproximadamente 220 mg/mL, aproximadamente 175 mg/mL a aproximadamente 220 mg/mL, o aproximadamente 190 mg/mL a aproximadamente 220 mg/mL.

Por ejemplo, el fragmento de unión a antígeno puede estar en una concentración de aproximadamente 50 mg/mL a aproximadamente 200 mg/mL. Por ejemplo, el fragmento de unión a antígeno puede estar en una concentración de aproximadamente 50 mg/mL; por ejemplo, el fragmento de unión a antígeno puede estar en una concentración de aproximadamente 200 mg/mL.

Excipientes y otros ingredientes

Por ejemplo, el excipiente puede estar en una concentración de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 500 mM. Por ejemplo, el excipiente puede estar en una concentración de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 500 mM, aproximadamente 100 mM a aproximadamente 500 mM, aproximadamente 150 mM a aproximadamente 500 mM, aproximadamente 160 mM a aproximadamente 500 mM, aproximadamente 165 mM a aproximadamente 500 mM, aproximadamente 170 mM a aproximadamente 500 mM, aproximadamente 100 mM a aproximadamente 300 mM, aproximadamente 150 mM a aproximadamente 300 mM, aproximadamente 160 mM a aproximadamente 300 mM, aproximadamente 165 mM a aproximadamente 300 mM, aproximadamente 170 mM a aproximadamente 300 mM, aproximadamente 100 mM a aproximadamente 275 mM, aproximadamente 150 mM a aproximadamente 275 mM, aproximadamente 160 mM a aproximadamente 275 mM, aproximadamente 165 mM a aproximadamente 275 mM, aproximadamente 170 mM a aproximadamente 275 mM, aproximadamente 100 mM a aproximadamente 220 mM, aproximadamente 150 mM a

aproximadamente 220 mM, aproximadamente 160 mM a aproximadamente 220 mM, aproximadamente 165 mM a aproximadamente 220 mM, o aproximadamente 170 mM a aproximadamente 220 mM.

[illegible]

Por ejemplo, el excipiente puede comprender glicina, que puede estar en una concentración de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 500 mM. Por ejemplo, la glicina puede estar en una concentración de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 150 mM a aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 160 mM a aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 165 mM a aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 170 mM a aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 390 mM a aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 390 mM, de aproximadamente 150 mM a aproximadamente 390 mM, de aproximadamente 160 mM a aproximadamente 390 mM, de aproximadamente 165 mM a aproximadamente 390 mM, de aproximadamente 170 mM a aproximadamente 390 mM, de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 300 mM, de aproximadamente 150 mM a aproximadamente 300 mM, de aproximadamente 160 mM a aproximadamente 300 mM, de aproximadamente 165 mM a aproximadamente 300 mM, de aproximadamente 170 mM a aproximadamente 300 mM, de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 275 mM, de aproximadamente 150 mM a aproximadamente 275 mM, de aproximadamente 160 mM a aproximadamente 275 mM, de aproximadamente 165 mM a aproximadamente 275 mM, de aproximadamente 170 mM a aproximadamente 275 mM, de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 250 mM, de aproximadamente 150 mM a aproximadamente 250 mM, de aproximadamente 160 mM a aproximadamente 250 mM, de aproximadamente 165 mM a aproximadamente 250 mM, de aproximadamente 170 mM a aproximadamente 250 mM, de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 220 mM, de aproximadamente 150 mM a aproximadamente 220 mM, de aproximadamente 160 mM a aproximadamente 220 mM, de aproximadamente 165 mM a aproximadamente 220 mM, o de aproximadamente 170 mM a aproximadamente 220 mM.

Por ejemplo, el excipiente puede comprender clorhidrato de L-arginina, que puede estar en una concentración de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 500 mM. Por ejemplo, el clorhidrato de L-arginina puede estar en una concentración de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 150 mM a aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 160 mM a aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 165 mM a aproximadamente 500 mM, aproximadamente 170 mM a aproximadamente 500 mM, 50 mM a aproximadamente 390 mM, aproximadamente 100 mM a aproximadamente 390 mM, aproximadamente 150 mM a aproximadamente 390 mM, aproximadamente 160 mM a aproximadamente 390 mM, aproximadamente 165 mM a aproximadamente 390 mM , aproximadamente 170 mM a aproximadamente 390 mM, aproximadamente 100 mM a aproximadamente 300 mM, aproximadamente 150 mM a aproximadamente 300 mM, aproximadamente 160 mM a aproximadamente 300 mM, aproximadamente 165 mM a aproximadamente 300 mM, aproximadamente 170 mM a aproximadamente 300 mM, aproximadamente 100 mM a aproximadamente 275 mM, aproximadamente 150 mM a aproximadamente 275 mM, aproximadamente 160 mM a aproximadamente 275 mM, aproximadamente 165 mM a aproximadamente 275 mM, aproximadamente 170 mM a aproximadamente 275 mM, aproximadamente 100 mM a aproximadamente 250 mM, aproximadamente 150 mM a aproximadamente 250 mM, aproximadamente 160 mM a aproximadamente 250 mM, aproximadamente 165 mM a aproximadamente 250 mM, aproximadamente 170 mM a aproximadamente 250 mM, aproximadamente 100 mM a aproximadamente 220 mM, aproximadamente 150 mM a aproximadamente 220 mM, aproximadamente 160 mM a aproximadamente 220 mM, aproximadamente 165 mM a aproximadamente 220 mM, o aproximadamente 170 mM a aproximadamente 220 mM.

Por ejemplo, el excipiente puede comprender sorbitol, que puede estar en una concentración de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 500 mM. Por ejemplo, el sorbitol puede estar en una concentración de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 130 mM a aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 150 mM a aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 80 mM a aproximadamente 400 mM , aproximadamente 100 mM a aproximadamente 400 mM, aproximadamente 150 mM a aproximadamente 400 mM, aproximadamente 180 mM a aproximadamente 400 mM, aproximadamente 100 mM a aproximadamente 350 mM, aproximadamente 130 mM a aproximadamente 350 mM, aproximadamente 150 mM a aproximadamente 350 mM, aproximadamente 170 mM a aproximadamente 350 mM, aproximadamente 190 mM a aproximadamente 350 mM, aproximadamente 75 mM a aproximadamente 300 mM, aproximadamente 100 mM a aproximadamente 300 mM, aproximadamente 120 mM a aproximadamente 300 mM, aproximadamente 150 mM a aproximadamente 300 mM, aproximadamente 170 mM a aproximadamente 300 mM, aproximadamente 180 mM a aproximadamente 300 mM, aproximadamente 200 mM a aproximadamente 300 mM, aproximadamente 100 mM a aproximadamente 275 mM, aproximadamente 120 mM a aproximadamente 275 mM, aproximadamente 150 mM a aproximadamente 275 mM, aproximadamente 180 mM a aproximadamente 275 mM, aproximadamente 100 mM a aproximadamente 250 mM, aproximadamente 130 mM a aproximadamente 250 mM, aproximadamente 150 mM a aproximadamente 250 mM, aproximadamente 160 mM a aproximadamente 250 mM, aproximadamente 170 mM a aproximadamente 250 mM, aproximadamente 180 mM a aproximadamente 250 mM , aproximadamente 100 mM a aproximadamente 220 mM, aproximadamente 120 mM a aproximadamente 220 mM, aproximadamente 140 mM a aproximadamente 220 mM, aproximadamente 160 mM a aproximadamente 220 mM, o aproximadamente 180 mM a aproximadamente 220 mM.

Por ejemplo, el excipiente puede comprender glicerol, que puede estar en una concentración de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 500 mM. Por ejemplo, el sorbitol puede estar en una concentración de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 130 mM a aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 150 mM a aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 80 mM a aproximadamente 400 mM , aproximadamente 100 mM a aproximadamente 400 mM, aproximadamente 150 mM a aproximadamente 400 mM, aproximadamente 180 mM a aproximadamente 400 mM, aproximadamente 100 mM a aproximadamente 350 mM, aproximadamente 130 mM a aproximadamente 350 mM, aproximadamente 150 mM a aproximadamente 350 mM, aproximadamente 170 mM a aproximadamente 350 mM, aproximadamente 190 mM a aproximadamente 350 mM, aproximadamente 75 mM a aproximadamente 300 mM, aproximadamente 100 mM a aproximadamente 300 mM, aproximadamente 120 mM a aproximadamente 300 mM, aproximadamente 150 mM a aproximadamente 300 mM, aproximadamente 170 mM a aproximadamente 300 mM, aproximadamente 180 mM a aproximadamente 300 mM, aproximadamente 200 mM a aproximadamente 300 mM, aproximadamente 100 mM a aproximadamente 275 mM, aproximadamente 120 mM a aproximadamente 275 mM, aproximadamente 150 mM a aproximadamente 275 mM, aproximadamente 180 mM a aproximadamente 275 mM, aproximadamente 100 mM a aproximadamente 250 mM, aproximadamente 130 mM a aproximadamente 250 mM, aproximadamente 150 mM a aproximadamente 250 mM, aproximadamente 160 mM a aproximadamente 250 mM, aproximadamente 170 mM a aproximadamente 250 mM, aproximadamente 180 mM a aproximadamente 250 mM , aproximadamente 100 mM a aproximadamente 220 mM, aproximadamente 120 mM a aproximadamente 220 mM, aproximadamente 140 mM a aproximadamente 220 mM, aproximadamente 160 mM a aproximadamente 220 mM, o aproximadamente 180 mM a aproximadamente 220 mM.

En la presente solicitud, el excipiente puede comprender un estabilizador. El estabilizador puede ser un componente que ayude a mantener la integridad estructural de la composición. Por ejemplo, el

estabilizador puede ayudar a mantener la integridad estructural de la composición durante la congelación, liofilización y/o almacenamiento. Por ejemplo, el estabilizador puede actuar como un agente osmótico que mitiga la desnaturalización de proteínas (por ejemplo, el fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento).

El excipiente descrito en el presente documento puede comprender además un antioxidante, que puede seleccionarse de uno o más del grupo que consiste en metionina, fenol, cresol, ácido ascórbico, glutatión, tiosulfato de sodio, ácido cítrico y nicotinamida. Por ejemplo, el excipiente descrito en el presente documento puede comprender además L-metionina en una concentración de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 100 mM, aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 100 mM, aproximadamente 1 mM a aproximadamente 100 mM, aproximadamente 2 mM a aproximadamente 100 mM, aproximadamente 5 mM a aproximadamente 100 mM, aproximadamente 0,2 mM a aproximadamente 50 mM, aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM, aproximadamente 3 mM a aproximadamente 50 mM, aproximadamente 4 mM a aproximadamente 50 mM, aproximadamente 5 mM a aproximadamente 50 mM, aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 30 mM, de aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 30 mM, de aproximadamente 0,6 mM a aproximadamente 30 mM, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 30 mM, de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 30 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 30 mM, de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 20 mM, aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 20 mM, aproximadamente 1 mM a aproximadamente 20 mM, aproximadamente 2 mM a aproximadamente 20 mM, aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 10 mM, aproximadamente 0,2 mM a aproximadamente 10 mM, aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 10 mM, aproximadamente 0,8 mM a aproximadamente 10 mM, aproximadamente 1 mM a aproximadamente 10 mM, aproximadamente 1,5 mM a aproximadamente 10 mM, aproximadamente 2 mM a aproximadamente 10 mM, aproximadamente 2,5 mM a aproximadamente 10 mM, aproximadamente 3 mM a aproximadamente 10 mM, aproximadamente 4 mM a aproximadamente 10 mM, o aproximadamente 5 mM a aproximadamente 10 mM.

El excipiente descrito en el presente documento puede comprender además un agente quelante, que puede ser EDTA disódico en una concentración de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 10 mM, aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 10 mM, aproximadamente 1 mM a aproximadamente 10 mM, aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 5 mM, aproximadamente 0,2 mM a aproximadamente 5 mM, aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 5 mM, aproximadamente 0,4 mM a aproximadamente 5 mM, aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 5 mM, aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 3 mM, aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 3 mM, aproximadamente 0,6 mM a aproximadamente 3 mM, aproximadamente 0,7 mM a aproximadamente 3 mM, aproximadamente 0,8 mM a aproximadamente 3 mM, aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 2 mM, aproximadamente 0,2 mM a aproximadamente 2 mM, aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 2 mM, aproximadamente 0,75 mM a aproximadamente 2 mM, aproximadamente 0,9 mM a aproximadamente 2 mM, o aproximadamente 1 mM a aproximadamente 2 mM.

Por ejemplo, la composición puede tener un pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 7,5. Por ejemplo, la composición puede tener un pH de aproximadamente 5,9 a aproximadamente 6,9. Por ejemplo, la composición puede tener un pH de aproximadamente 5,9 a aproximadamente 6,8, de aproximadamente 5,9 a aproximadamente 6,7, de aproximadamente 5,9 a aproximadamente 6,6, de aproximadamente 5,9 a aproximadamente 6,5, de aproximadamente 5,9 a aproximadamente 6,4, de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 6,9, de aproximadamente 6,1 a aproximadamente 6,9, aproximadamente 6,2 a aproximadamente 6,9, aproximadamente 6,3 a aproximadamente 6,9, aproximadamente 6,4 a aproximadamente 6,9, aproximadamente 6,0 a aproximadamente 6,5, aproximadamente 6,1 a aproximadamente 6,5, aproximadamente 6,2 a aproximadamente 6,5, aproximadamente 6,3 a aproximadamente 6,5, o aproximadamente 6,4 a aproximadamente 6,5. Por ejemplo, la composición

puede tener un pH de aproximadamente 6,3 a aproximadamente 6,5. Por ejemplo, la composición puede tener un pH de aproximadamente 6,4

Por ejemplo, la composición puede comprender un componente amortiguador, en donde el componente amortiguador se selecciona de uno o más del grupo que consiste en: acetato de sodio-ácido acético, histidina-ácido acético, clorhidrato de L-histidina-L-histidina, fosfato de sodio y ácido cítrico-hidróxido de sodio.

Por ejemplo, el componente amortiguador puede estar en una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 50 mM. Por ejemplo, el componente amortiguador puede estar en una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 50 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 45 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 40 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 35 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 30 mM, aproximadamente 5 mM a aproximadamente 25 mM, aproximadamente 5 mM a aproximadamente 20 mM, aproximadamente 5 mM a aproximadamente 50 mM, o aproximadamente 5 mM a aproximadamente 30 mM. Por ejemplo, el componente amortiguador puede estar en una concentración de aproximadamente 10 mM a 50 mM. Por ejemplo, el componente amortiguador puede estar en una concentración de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 45 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 40 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 35 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 30 mM, aproximadamente 10 mM a aproximadamente 25 mM, aproximadamente 10 mM a aproximadamente 20 mM, aproximadamente 20 mM a aproximadamente 50 mM, o aproximadamente 20 mM a aproximadamente 30 mM.

Por ejemplo, el componente amortiguador puede comprender acetato de sodio-ácido acético, que puede estar en una concentración de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM. Por ejemplo, el acetato de sodio-ácido acético puede estar en una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 5 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 45 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 40 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 35 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 30 mM, aproximadamente 5 mM a aproximadamente 25 mM, aproximadamente 5 mM a aproximadamente 20 mM, aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM, aproximadamente 10 mM a aproximadamente 45 mM, aproximadamente 10 mM a aproximadamente 40 mM, aproximadamente 10 mM a aproximadamente 35 mM , de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 30 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 25 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 20 mM, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 50 mM, o de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 30 mM. Por ejemplo, el componente amortiguador puede comprender acetato de sodio-ácido acético, que puede estar en una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 35 mM. Por ejemplo, el componente amortiguador puede comprender acetato de sodio-ácido acético, que puede estar en una concentración de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 30 mM. Por ejemplo, el componente amortiguador puede comprender acetato de sodio-ácido acético, que puede estar en una concentración de aproximadamente 20 mM.

Por ejemplo, el componente amortiguador puede comprender clorhidrato de L-histidina-L-histidina, que puede estar en una concentración de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM. Por ejemplo, el clorhidrato de L-histidina-L-histidina puede estar en una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 5 mM, aproximadamente 5 mM a aproximadamente 45 mM, aproximadamente 5 mM a aproximadamente 40 mM, aproximadamente 5 mM a aproximadamente 35 mM, aproximadamente 5 mM a aproximadamente 30 mM, aproximadamente 5 mM a aproximadamente 25 mM, aproximadamente 5 mM a aproximadamente 20 mM, aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM, aproximadamente 10 mM a aproximadamente 45 mM, aproximadamente 10 mM a aproximadamente 40 mM, aproximadamente 10 mM a aproximadamente 35 mM, aproximadamente 10 mM a aproximadamente 30 mM,

aproximadamente 10 mM a aproximadamente 25 mM, aproximadamente 10 mM a aproximadamente 20 mM, aproximadamente 20 mM a aproximadamente 50 mM, o aproximadamente 20 mM a aproximadamente 30 mM. Por ejemplo, el componente amortiguador puede comprender clorhidrato de L-histidina-L-histidina, que puede estar en una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 35 mM. Por ejemplo, el componente amortiguador puede comprender clorhidrato de L-histidina-L-histidina, que puede estar en una concentración de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 30 mM. Por ejemplo, el componente amortiguador puede comprender clorhidrato de L-histidina-L-histidina, que puede estar en una concentración de aproximadamente 20 mM.

Por ejemplo, la composición puede comprender un tensioactivo, en donde el tensioactivo puede seleccionarse de uno o más del grupo que consiste en: polisorbato 20, polisorbato 80 y poloxámero 188. La concentración del tensioactivo se expresa en mg/ml o % (p/v) en la presente solicitud, y los expertos en la técnica entenderán que la conversión de los dos es posible. Por ejemplo, un 0,02 % de tensioactivo se puede convertir en 0,2 mg/ml.

Por ejemplo, el tensioactivo puede estar en una concentración de aproximadamente 0 mg/ml a aproximadamente 0,8 mg/ml. Por ejemplo, el tensioactivo puede estar en una concentración de aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 0,8 mg/ml. Por ejemplo, el tensioactivo puede estar en una concentración de aproximadamente 0 mg/ml a aproximadamente 0,8 mg/ml, aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 0,8 mg/ml, aproximadamente 0,2 mg/ml a aproximadamente 0,8 mg/ml, aproximadamente 0,3 mg/ml a aproximadamente 0,8 mg/ml, aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 0,3 mg/ml, aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 0,2 mg/ml, aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 0,3 mg/ml, aproximadamente 0 mg/ml a aproximadamente 0,4 mg/mL, aproximadamente 0,05 mg/mL a aproximadamente 0,4 mg/mL, aproximadamente 0,05 mg/mL a aproximadamente 0,2 mg/mL, aproximadamente 0,2 mg/mL a aproximadamente 0,4 mg/mL, o aproximadamente 0 mg/mL a aproximadamente 0,2 mg/ml.

Por ejemplo, el tensioactivo puede comprender polisorbato 20, que puede estar en una concentración de aproximadamente 0 mg/ml a aproximadamente 0,8 mg/ml. Por ejemplo, el polisorbato 20 puede estar en una concentración de aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 0,8 mg/ml. Por ejemplo, el polisorbato 20 puede estar en una concentración de aproximadamente 0 mg/ml a aproximadamente 0,8 mg/ml, aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 0,8 mg/ml, aproximadamente 0,2 mg/ml a aproximadamente 0,8 mg/ml, aproximadamente 0,3 mg/ml a aproximadamente 0,8 mg/ml, aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 0,3 mg/ml, aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 0,2 mg/ml, aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 0,3 mg/ml, aproximadamente 0 mg/ml a aproximadamente 0,4 mg/ml, aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 0,4 mg/ml, aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 0,2 mg/ml, aproximadamente 0,2 mg/ml a aproximadamente 0,4 mg/ml o aproximadamente 0 mg/ml a aproximadamente 0,2 mg/ml. Por ejemplo, el tensioactivo puede comprender polisorbato 20, que puede estar en una concentración de aproximadamente 0,2 mg/ml a aproximadamente 0,4 mg/ml. Por ejemplo, el tensioactivo puede comprender polisorbato 20, que puede estar en una concentración de aproximadamente 0,2 mg/ml. Por ejemplo, el tensioactivo puede comprender polisorbato 20, que puede estar en una concentración de aproximadamente 0,4 mg/ml.

Por ejemplo, el tensioactivo puede comprender polisorbato 80, que puede estar en una concentración de aproximadamente 0 mg/ml a aproximadamente 0,8 mg/ml. Por ejemplo, el polisorbato 80 puede estar en una concentración de aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 0,8 mg/ml. Por ejemplo, el polisorbato 80 puede estar en una concentración de aproximadamente 0 mg/ml a aproximadamente 0,8 mg/ml, aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 0,8 mg/ml, aproximadamente 0,2 mg/ml a aproximadamente 0,8 mg/ml, aproximadamente 0,3 mg/ml a aproximadamente 0,8 mg/ml,

aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 0,3 mg/ml, aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 0,2 mg/ml, aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 0,3 mg/ml, aproximadamente 0 mg/ml a aproximadamente 0,4 mg/ml, aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 0,4 mg/ml, aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 0,2 mg/ml, aproximadamente 0,2 mg/ml a aproximadamente 0,4 mg/ml o aproximadamente 0 mg/ml a aproximadamente 0,2 mg/ml. Por ejemplo, el tensioactivo puede comprender polisorbato 80, que puede estar en una concentración de aproximadamente 0,2 mg/ml a aproximadamente 0,4 mg/ml. Por ejemplo, el tensioactivo puede comprender polisorbato 80, que puede estar en una concentración de aproximadamente 0,2 mg/ml. Por ejemplo, el tensioactivo puede comprender polisorbato 80, que puede estar en una concentración de aproximadamente 0,4 mg/ml.

Por ejemplo, el tensioactivo puede comprender poloxámero 188, y el poloxámero 188 puede estar en una concentración de aproximadamente 0,05 mg/mL a aproximadamente 5 mg/mL, aproximadamente 0,08 mg/mL a aproximadamente 5 mg/mL, aproximadamente 0,1 mg/mL a aproximadamente 5 mg/ml, aproximadamente 0,2 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 3 mg/ml, aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 3 mg/ml, aproximadamente 0,15 mg/ml a aproximadamente 3 mg/ml mg/ml, de aproximadamente 0,2 mg/ml a aproximadamente 3 mg/ml, de aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 2 mg/ml, de aproximadamente 0,075 mg/ml a aproximadamente 2 mg/ml, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 2 mg/ml, aproximadamente 0,15 mg/ml a aproximadamente 2 mg/ml, aproximadamente 0,2 mg/ml a aproximadamente 2 mg/ml, aproximadamente 0,3 mg/ml a aproximadamente 2 mg/ml, o aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 2 mg/ml.

En la presente solicitud, la composición puede comprender el fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento y el excipiente descrito en el presente documento, y puede tener un pH de aproximadamente 5,9 a aproximadamente 6,9. Por ejemplo, la composición puede comprender el fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento, el excipiente descrito en el presente documento y el componente amortiguador descrito en el presente documento, y puede tener un pH de aproximadamente 5,9 a aproximadamente 6,9. Por ejemplo, la composición puede comprender el fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento, el excipiente descrito en el presente documento, el componente amortiguador descrito en el presente documento y el tensioactivo descrito en el presente documento, y puede tener un pH de aproximadamente 5,9 a aproximadamente 6,9.

En la presente solicitud, la composición puede comprender el fragmento de unión al antígeno descrito en el presente documento y prolina, y puede tener un pH de aproximadamente 5,9 a aproximadamente 6,9. Por ejemplo, la composición puede comprender el fragmento de unión al antígeno descrito en el presente documento, prolina y acetato de sodio-ácido acético, y puede tener un pH de aproximadamente 5,9 a aproximadamente 6,9. Por ejemplo, la composición puede comprender el fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento, prolina, acetato de sodio-ácido acético y polisorbato 20, y puede tener un pH de aproximadamente 5,9 a aproximadamente 6,9. Por ejemplo, la composición puede comprender el fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento, prolina, acetato de sodio-ácido acético y polisorbato 20, y puede tener un pH de aproximadamente 6,3 a aproximadamente 6,5.

Por ejemplo, la composición puede comprender: 1) aproximadamente 20 mg/ml a aproximadamente 220 mg/ml del fragmento de unión al antígeno descrito en el presente documento; 2) aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM de acetato de sodio-ácido acético; 3) aproximadamente 50 mM a aproximadamente 500 mM de prolina; y 4) aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 0,8 mg/ml de polisorbato 20; y la composición puede tener un pH de aproximadamente 5,9 a aproximadamente 6,9.

Por ejemplo, la composición puede consistir en: 1) aproximadamente 20 mg/ml a aproximadamente 220 mg/ml del fragmento de unión al antígeno descrito en el presente documento; 2) aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM de acetato de sodio-ácido acético; 3) aproximadamente 50 mM a aproximadamente 500 mM de prolina; y 4) aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 0,8 mg/ml de polisorbato 20; y la composición puede tener un pH de aproximadamente 5,9 a aproximadamente 6,9.

Por ejemplo, la composición puede comprender: 1) aproximadamente 20 mg/ml a aproximadamente 220 mg/ml del fragmento de unión al antígeno descrito en el presente documento; 2) aproximadamente 5 mM a aproximadamente 35 mM de acetato de sodio-ácido acético; 3) aproximadamente 50 mM a aproximadamente 390 mM de prolina; y 4) aproximadamente 0 mg/ml a aproximadamente 0,4 mg/ml de polisorbato 20; y la composición puede tener un pH de aproximadamente 5,9 a aproximadamente 6,9.

Por ejemplo, la composición puede consistir en: 1) aproximadamente 20 mg/ml a aproximadamente 220 mg/ml del fragmento de unión al antígeno descrito en el presente documento; 2) aproximadamente 5 mM a aproximadamente 35 mM de acetato de sodio-ácido acético; 3) aproximadamente 50 mM a aproximadamente 390 mM de prolina; y 4) aproximadamente 0 mg/ml a aproximadamente 0,4 mg/ml de polisorbato 20; y la composición puede tener un pH de aproximadamente 5,9 a aproximadamente 6,9.

Por ejemplo, la composición puede comprender: 1) aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml del fragmento de unión al antígeno descrito en el presente documento; 2) aproximadamente 10 mM a aproximadamente 30 mM de acetato de sodio-ácido acético; 3) aproximadamente 150 mM a aproximadamente 250 mM de prolina; y 4) aproximadamente 0,2 mg/ml a aproximadamente 0,4 mg/ml de polisorbato 20; y la composición puede tener un pH de aproximadamente 6,3 a aproximadamente 6,5.

Por ejemplo, la composición puede consistir en: 1) aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml del fragmento de unión al antígeno descrito en el presente documento; 2) aproximadamente 10 mM a aproximadamente 30 mM de acetato de sodio-ácido acético; 3) aproximadamente 150 mM a aproximadamente 250 mM de prolina; y 4) aproximadamente 0,2 mg/ml a aproximadamente 0,4 mg/ml de polisorbato 20; y la composición puede tener un pH de aproximadamente 6,3 a aproximadamente 6,5.

Por ejemplo, la composición puede comprender: 1) aproximadamente 200 mg/ml del fragmento de unión al antígeno descrito en el presente documento; 2) aproximadamente 20 mM de acetato de sodio-ácido acético; 3) aproximadamente 220 mM de prolina; y 4) aproximadamente 0,2 mg/ml de polisorbato 20; y la composición puede tener un pH de aproximadamente 6,4.

Por ejemplo, la composición puede consistir en: 1) aproximadamente 200 mg/ml del fragmento de unión al antígeno descrito en el presente documento; 2) aproximadamente 20 mM de acetato de sodio-ácido acético; 3) aproximadamente 220 mM de prolina; y 4) aproximadamente 0,2 mg/ml de polisorbato 20; y la composición puede tener un pH de aproximadamente 6,4.

En la presente solicitud, la composición se puede usar para inyección. En la presente solicitud, la composición se puede usar para inyección subcutánea. Por ejemplo, la composición también se puede usar para inyección subcutánea, inyección intramuscular, inyección intravenosa, administración parenteral o infusión intravenosa.

En la presente solicitud, la composición puede ser una formulación. Por ejemplo, la composición puede ser una formulación líquida.

En otro aspecto, la presente solicitud proporciona un kit que comprende la composición descrita en el presente documento y un recipiente que contiene la composición descrita en el presente documento.

Por ejemplo, el recipiente puede comprender un vial (por ejemplo, un vial de vidrio), una ampolla, una jeringa, una pluma de inyección y/o una bolsa intravenosa. En la presente solicitud, el recipiente puede ser estéril. Por ejemplo, el recipiente puede comprender un vial de vidrio.

Por ejemplo, el kit puede comprender un dispositivo de administración que puede administrar la composición descrita en el presente documento. Por ejemplo, el dispositivo de administración puede comprender un vial, una ampolla, una jeringa, una pluma de inyección y/o una bolsa intravenosa.

En la presente solicitud, la composición en el recipiente puede tener un volumen de aproximadamente 0,5 ml a aproximadamente 5,0 ml. Por ejemplo, la composición en el recipiente puede tener un volumen de aproximadamente 0,5 ml a aproximadamente 1,5 ml. Por ejemplo, la composición puede tener un volumen de aproximadamente 1,5 ml. Por ejemplo, la composición puede tener un volumen de aproximadamente 1,0 ml. En la presente solicitud, en el recipiente, el fragmento de unión al antígeno puede estar en una concentración de aproximadamente 200 mg/1,0 ml/vial o aproximadamente 300 mg/1,5 ml/vial.

En otro aspecto, la presente solicitud proporciona el uso de la composición descrita en el presente documento y/o el kit descrito en el presente documento en la preparación de un medicamento para prevenir, aliviar y/o tratar un tumor.

La presente solicitud proporciona el uso de la composición descrita en el presente documento y/o el kit descrito en el presente documento para prevenir, aliviar y/o tratar un tumor.

La presente solicitud proporciona un método para prevenir, aliviar y/o tratar un tumor, que comprende el siguiente paso: administrar la composición descrita en el presente documento y/o el kit descrito en el presente documento a un sujeto que lo necesite.

En la presente solicitud, el tumor puede comprender un tumor positivo para PD-L1. Por ejemplo, el tumor puede comprender un tumor sólido maligno.

En la presente solicitud, el tumor puede comprender un tumor con inestabilidad de microsatélites (MSI-H)/reparación deficiente de errores de coincidencia (dMMR) (por ejemplo, un tumor sólido pantumoral MSI-H/dMMR). Por ejemplo, el tumor puede comprender un cáncer colorrectal avanzado o un cáncer gástrico con inestabilidad de microsatélites (MSI-H)/reparación deficiente de errores de coincidencia (dMMR). Por ejemplo, el tumor puede comprender un cáncer del tracto biliar que no es adecuado para la resección quirúrgica o es metastásico, y/o un adenocarcinoma gástrico o de la unión gastroesofágica no tratado que no es adecuado para la resección o es metastásico.

En otro aspecto, la presente solicitud también proporciona el uso de la composición descrita en el presente documento y/o el kit descrito en el presente documento en la preparación de un medicamento para prevenir, aliviar y/o tratar una enfermedad infecciosa.

La presente solicitud proporciona el uso de la composición descrita en el presente documento y/o el kit descrito en el presente documento para prevenir, aliviar y/o tratar una enfermedad infecciosa.

La presente solicitud proporciona un método para prevenir, aliviar y/o tratar una enfermedad infecciosa, que comprende el siguiente paso: administrar la composición descrita en el presente documento y/o el kit descrito en el presente documento a un sujeto que lo necesite.

En la presente solicitud, la enfermedad infecciosa comprende una enfermedad causada por una infección viral, una infección bacteriana, una infección fúngica y/o una infección parasitaria.

La presente solicitud también proporciona un método para producir la composición descrita en el presente documento y/o el kit descrito en el presente documento. El método puede comprender mezclar, en cualquier orden, cualquier componente relevante necesario para preparar la composición descrita en el presente documento. Por ejemplo, el método puede comprender preparar una premezcla (o una solución premezclada) del excipiente, el componente tampón y/o el tensioactivo. Por ejemplo, el método puede comprender formar un sistema amortiguador. El sistema de almacenamiento intermedio puede comprender el componente de almacenamiento intermedio descrito en el presente documento. El método descrito en el presente documento puede comprender eliminar partículas (por ejemplo, mediante filtración).

Sin estar sujeto a ninguna teoría, los siguientes ejemplos pretenden únicamente ilustrar las formulaciones, métodos de preparación, uso, etc., de la presente solicitud, pero no limitar el alcance de la presente solicitud.

Ejemplos

Elementos y métodos de detección:

(1) Espectroscopia de fluorescencia endógena: se utilizan los espectros de fluorescencia de los aminoácidos (triptófano, tirosina y fenilalanina) en la molécula de proteína capaz de exhibir fluorescencia endógena en ambientes polares y no polares. Si el espectro de fluorescencia se desplaza al rojo, es decir, la longitud de onda de emisión máxima cambia, se puede determinar la consistencia de las estructuras de orden superior de la proteína, es decir, la transformación mutua de las estructuras de orden superior. Las muestras se diluyeron a 40 mg/ml y se utilizó un espectrómetro de fluorescencia intrínseca de alto rendimiento optim1000 (Pall). El rango de temperatura de la prueba fue de 20-95 °C y el intervalo de prueba fue de 1 °C. La tendencia de agregación de las muestras se determinó basándose en los resultados de SLS (dispersión de luz estática) a una longitud de onda de 473 nm, y la temperatura de desnaturalización fue un valor medido en BCM (media baricéntrica). La evaluación se realizó con base en los valores de Tm (temperatura de media desnaturalización) calculados según la fórmula.

(2) SEC-HPLC (cromatografía de exclusión por tamaño): se hizo referencia a la cromatografía de exclusión por tamaño (Reglas Generales 0514, Volumen III de la Chinese Pharmacopoeia 2015) para detectar el contenido de monómeros del producto, así como polímeros y fragmentos. La columna cromatográfica fue TOSOH G3000 7,8 x 300 mm, 5 µm; la fase móvil fue Na₂HPO₄ 20 mM, NaCl 300 mM; la longitud de onda de detección fue de 280 nm.

(3) WCX-HPLC (cromatografía de intercambio catiónico débil): se hizo referencia a la cromatografía líquida de alta resolución (Reglas Generales 0512, Volumen III de la Farmacopea China 2015) para detectar el contenido del componente principal, el componente ácido y el componente básico del producto. La columna cromatográfica fue Propac WCX-10 4 × 250 mm, 10 µm; la fase móvil fue Na₂HPO₄ 10 mM, Na₂HPO₄ 10 mM + NaCl 500 mM; la longitud de onda de detección fue de 280 nm.

(4) Actividad de unión y bloqueo: se hizo referencia a los métodos de prueba descritos en los Ejemplos 5.2 y 5.3 del documento WO 2017/020802A1.

(5) Viscosidad: la viscosidad se midió en modo automático utilizando microVISC, un microviscómetro portátil de rheosense en EE. UU. (6) Presión osmótica: la presión osmótica se detectó mediante un método de osmolaridad.

Instrumentos: un osmómetro; reactivos: solución de calibración de 300 mosm/Kg, solución de calibración de 900 mosm/Kg y cloruro de sodio Materiales consumibles: tubos de centrifuga, papel sin polvo, etc.;

Procedimientos experimentales: se agregaron 100 µL de la muestra a un tubo de muestra y se debe garantizar que no se generaran burbujas en el tubo de muestra; el tubo de muestra se colocó sobre la sonda de detección después de que la sonda de muestra y la sonda secundaria se limpiaron con papel sin polvo; la sonda de detección se bajó y el tubo de muestra estaba en una trampa fría, y se presionó la tecla "Entrar" para iniciar la prueba. La muestra de prueba se sometió a un ensayo paralelo (ensayado 2 veces). Calibración de punto cero: dentro de ±2; Calibración de 300 puntos, dentro de ±4; y calibración de 900 puntos: dentro de ±8.

(7) Pureza CE-SDS: después de ser desnaturalizada (condición no reducida) o desnaturalizada y reducida (condición reducida), la muestra se colocó en un aparato de electroforesis capilar para análisis electroforético y el cálculo se llevó a cabo de acuerdo con un método de normalización de área.

(8) Contenido de proteínas: se hizo referencia al Método 6 de Determinación del Contenido de Proteínas (Reglas Generales 0731, Volumen III de la Chinese Pharmacopoeia 2015), y el contenido de proteínas se calculó según el valor de absorbancia de la proteína a una longitud de onda de 280 nm y el coeficiente de extinción teórico de la proteína mediante el uso del espectrofotómetro micro-ultravioleta Nanodrop 2000.

(9) Medición de turbiedad: el valor de absorbancia de la muestra a 340 nm se midió en el espectrofotómetro Agilent 8453.

(10) Partículas insolubles: el número de partículas $\geq 10\text{ }\mu\text{m}$ y $\geq 25\text{ }\mu\text{m}$ en la muestra se midió en el analizador de micropartículas insolubles AccuSizer 780SIS.

(11) Dispersión dinámica de la luz (DLS): el diámetro medio de las partículas (diámetro medio Z) y el coeficiente de distribución (PDI) se midieron en un analizador de tamaño de partículas tipo PUNK.

Preparación de proteína de unión a antígeno:

La proteína de unión a antígeno comprende un dominio variable único de inmunoglobulina capaz de unirse específicamente a PD-L1, y el dominio variable único de inmunoglobulina puede comprender una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2. En lo sucesivo, la proteína de unión a antígeno se denominará “anticuerpo monoclonal PD-L1”. El anticuerpo monoclonal PD-L1 se obtuvo mediante un método de síntesis artificial de secuencias de aminoácidos. El anticuerpo monoclonal PD-L1 comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en una cualquiera de las SEQ ID NO: 14-31, en particular una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 21.

La prolina a la que se hace referencia en los Ejemplos incluye L-prolina.

Ejemplo 1

Las siguientes fórmulas de formulación se obtienen según la Tabla 1:

Tabla 1. Diferentes composiciones de fórmulas de formulación en el experimento de detección

Fórmula	Contenido de anticuerpo monoclonal PD-L1 (mg/mL)	Sistema de amortiguación	Excipiente	Tensioactivo	pH
1	200±20	20 mM de acetato de sodio-ácido acético	250 mM de glicina	0,02% polisorbato 20	6,5
2	200±20	20 mM de acetato de sodio-ácido acético	250 mM de glicina	0,02% polisorbato 20	7,0
3	200±20	20 mM de acetato de sodio-ácido acético	250 mM de L-prolina	0,02% polisorbato 20	6,5
4	200±20	20 mM de acetato de sodio-ácido acético	250 mM de L-prolina	0,02% polisorbato 20	7,0
5	200±20	20 mM de fosfato de sodio	250 mM of glicinia	0,02% polisorbato 20	6,5
6	200±20	20 mM de fosfato de sodio	250 mM de glicina	0,02% polisorbato 20	7,0
7	200±20	20 mM de fosfato de sodio	250 mM de L-prolina	0,02% polisorbato 20	6,5
8	200±20	20 mM de fosfato de sodio	250 mM de L-prolina	0,02% polisorbato 20	7,0
9	200±20	20 de fosfato de sodio	250 mM de glicina	0.02% polisorbato 20	6,8
10	200±20	20 mM de ácido L-histidina-acético	250 mM de glicina	0,02% polisorbato 20	7,0
11	200±20	--	250 mM de glicina	0,02% polisorbato 20	7,0
12	200±20	--	250 mM de L-prolina	0,02% polisorbato 20	7,0
13	200±20	20 mM de fosfato de sodio	150 mM de clorhidrato de L-arginina	0,02% polisorbato 20	7,0
14	200±20	20 mM de fosfato de sodio	90 mg/mL de sacarosa	0,02% polisorbato 20	7,0
15	200±20	20 mM de fosfato de sodio	150 mM de clorhidrato de L-arginina	0,2% poloxámero 188	7,0
16	50±2	20 mM de fosfato de sodio		0,02% polisorbato 20	7,0
17	50±2	20 mM de fosfato de sodio	90 mg/mL de sacarosa	0,02% polisorbato 20	7,0
18	50±2	20 mM de fosfato de sodio	150 mM de clorhidrato de L-arginina	0,02% polisorbato 20	7,0
19	50±2	20 mM de fosfato de sodio	250 mM de glicina	0,02% polisorbato 20	7,0

Nota: - representa no adicionado

Las fórmulas de formulación en la Tabla 1 se analizan y detectan de acuerdo con la Tabla 2.

Tabla 2. Elementos de detección para el cribado de fórmulas de formulación

Elementos de detección	Duración de la investigación (día) (temperatura: 40±2 °C)		
	0	14	28
Espectros de fluorescencia endógena	√	--	--
SEC-HPLC	√	√	√
WCX-HPLC	√	√	√
Viscosidad	√	--	--

Actividad	√	--	√
Presión osmótica	√	--	--

1) Detección de espectros de fluorescencia endógena. Los valores de Tm y los resultados de detección de la tendencia de agregación correspondientes a las fórmulas 1-19 se muestran en la FIG. 1 y FIG. 2, respectivamente.

Los resultados de la FIG. 1 muestran que las fórmulas 1-4 y 12 eran más estables estructuralmente; los resultados en la FIG. 2 muestran que las fórmulas 1-4 y 10 eran menos propensas a formar agregados. Se puede observar que en esta detección, la estabilidad de las fórmulas 1-4 fue muy buena, es decir, el uso de acetato de sodio-ácido acético como sistema de amortiguación se correlaciona con una mejora adicional en la estabilidad.

Comparando los resultados de las fórmulas 1-2 y las fórmulas 3-4 por separado, se puede observar que un pH más bajo se correlaciona con una mejora adicional en la estabilidad.

2) Detección SEC-HPLC del contenido del pico principal

Los resultados del contenido del pico principal y los resultados del contenido de agregado correspondientes a las fórmulas 1-19 detectados por SEC-HPLC se muestran en la FIG. 3 y FIG. 4, respectivamente.

Los resultados muestran que bajo la condición de 28 días de alta temperatura, la pureza del anticuerpo monoclonal PD-L1 en todas las fórmulas excepto en la fórmula 11 fue superior al 97%, lo que demuestra que es necesario un sistema de amortiguación.

Comparando los resultados de las fórmulas 1, 3, 5 y 7 y las fórmulas 2, 4, 6 y 8, respectivamente, se puede observar que un pH más bajo se correlaciona con una mejora adicional en la estabilidad de la fórmula.

Comparando la estabilidad de las fórmulas 1 y 3 (pH 6,5, acetato de sodio-ácido acético como sistema amortiguador) y las fórmulas 5 y 7 (pH 6,5, fosfato de sodio como sistema amortiguador) por separado, se encuentra que la presencia de L-prolina se correlaciona con una mayor mejora en la estabilidad.

Comparando los resultados de las fórmulas 6 y 8 y las fórmulas 13 y 14 por separado, se encuentra que la inclusión de L-arginina o la inclusión de L-prolina se correlaciona con una mejora adicional en la estabilidad.

Comparando las fórmulas 2, 6 y 10, se encuentra que el uso de acetato de sodio-ácido acético como sistema amortiguador se correlaciona con una mejora adicional en la estabilidad.

Comparando los resultados de las fórmulas 14 y 16, las fórmulas 13 y 17 y las fórmulas 6 y 18 por separado, se encuentra que la estabilidad de las fórmulas no parecía verse afectada si el contenido del anticuerpo monoclonal PD-L1 era 50 mg/ml o 200. mg/mL.

3) Detección WCX-HPLC del contenido de componentes ácidos Los resultados del contenido de componente ácido detectado por WCX-HPLC se muestran en la FIG. 5, que puede demostrar la tendencia de cambio en el componente ácido (que puede incluir componentes generados por descomposición del anticuerpo monoclonal PD-L1 en condiciones de alta temperatura) en las fórmulas.

Comparando los resultados de las fórmulas 1, 3, 5 y 7 y las fórmulas 2, 4, 6 y 8, respectivamente, se puede observar que un pH más bajo se correlaciona con una reducción adicional del componente ácido de las fórmulas.

Comparando los componentes ácidos de la fórmula 1 y la fórmula 5, la fórmula 3 y la fórmula 7 y las fórmulas 2, 6 y 10 por separado, se encuentra que el uso de acetato de sodio-ácido acético como sistema amortiguador se correlaciona con una reducción adicional de los componentes ácidos de las fórmulas.

Comparando los componentes ácidos de las fórmulas 6, 8, 13 y 14, se encuentra que la inclusión de L-prolina se correlaciona con una reducción adicional en los componentes ácidos de las fórmulas.

Comparando los resultados de las fórmulas 14 y 16, las fórmulas 13 y 17 y las fórmulas 6 y 18 por separado, se puede observar que el contenido del componente ácido de las fórmulas no parecía verse afectado si el contenido del anticuerpo monoclonal PD-L1 era 50 mg/l. ml o 200 mg/ml.

4) Detección de viscosidad

Los resultados de la detección de la viscosidad se muestran en la FIG. 6. Excepto la fórmula 8, la viscosidad de otras fórmulas cumplió con el requisito de viscosidad de la inyección subcutánea.

Comparando los resultados de las fórmulas 14 y 16 y las fórmulas 13 y 17, por separado, se puede observar que cuando el contenido del anticuerpo monoclonal PD-L1 era de 200 mg/ml, la viscosidad aumentaba en comparación con la situación en la que el contenido del anticuerpo monoclonal PD-L1 fue de 50 mg/ml, pero la administración mediante inyección subcutánea no se vio afectada.

5) Detección de actividad

Se seleccionaron las fórmulas 1 y 3 para el ensayo de actividad bajo tratamiento a alta temperatura.

Los resultados de la actividad de unión y la actividad de bloqueo de ambas se muestran en la FIG. 7, figura. 8 y Tabla 3. El A-D en las Figs. 7-8 representan los resultados del día 0 de la fórmula 1, el día 0 de la fórmula 3, el día 28 de la fórmula 1 y el día 28 de la fórmula 3, respectivamente. Los resultados muestran que después de 28 días de tratamiento a alta temperatura, la actividad de la fórmula 1 y la fórmula 3 no fue significativamente diferente, y la actividad de cada una de las dos no fue significativamente diferente de su actividad el día 0.

Tabla 3. Actividad de unión y actividad de bloqueo de la fórmula 1 y la fórmula 3

	Fórmula 1		Fórmula 3	
	Día 0	Día 28	Día 0	Día 28
Actividad de unión EC50	39,25	42,57	39,98	39,35
Actividad de bloqueo EC50	401,8	389,8	388,9	388,3

Ejemplo 2

Con base en la selección de fórmulas en el Ejemplo 1, se examina más a fondo la influencia de los factores en el rendimiento de la fórmula, y las fórmulas de formulación para el estudio se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Diferentes composiciones de formulación en optimización de fórmulas

Fórmula	Tipos de examen	Contenido del anticuerpo monoclonal PD-L1	Amortiguador	Estabilizador	Tensioactivo	pH
19 A	Tipo de tensioactivo	200 mg/ml	20 mM de acetato de sodio-ácido acético	220 mM de L-prolina	0.02% polisorbato 20	6,4
20 A					0.02% polisorbato 80	
21 A					0.02% poloxamer P188	
22 A	Tipo de búfer		20 mM de ácido L-histidina-acético		0.02% polisorbato 20	
23 A			20 mM de ácido clorhídrico L-histidina-L-histidina			
24 A			20 mM de fosfato de sodio			
25 A			20 mM de ácido cítrico-hidróxido de sodio			
26 A	Tipo de estabilizado r		20 mM de acetato de sodio-ácido acético	90 mg/mL de sacarosa		
27 A				250 mM de glicina		
28 A				150 mM de clorhidrato de L-arginina		
29 A				150 mM de cloruro de sodio		
30 A	Anticuerpo monoclonal PD-L1		NA	NA	NA	NA
31 A	Anticuerpo monoclonal PD-L1 + estabilizado r		NA	220 mM de L-prolina	NA	NA
32 A	Anticuerpo monoclonal PD-L1 + tampón + estabilizado r		20 mM de acetato de sodio-ácido acético	220 mM de L-prolina	NA	6,4
33 A	Contenido del anticuerpo monoclonal PD-L1	20 mg/ml	20 mM de acetato de sodio-ácido acético	220 mM de L-prolina	0.02% polisorbato 20	6,4
34 A		220 mg/ml	20 mM de acetato de sodio-ácido acético	220 mM de L-prolina	0.02% polisorbato 20	6,4

Nota: NA - representa no agregado

Después de que las formulaciones se sometieran a aceleración durante 14 días y 28 días a alta temperatura ($40 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), se detectó la pureza del anticuerpo monoclonal PD-L1 mediante SEC-HPLC y el cambio en los componentes ácidos y básicos detectado mediante WCX. -Se evaluaron HPLC y se detectó la viscosidad de las muestras el día 0. Otros elementos complementarios de investigación y evaluación experimental para la composición de la formulación se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Elementos de detección para optimización de fórmulas de formulación

Elementos de detección	Duración de la investigación (día) (temperatura: 40±2 °C)		
	0	14	28
SEC-HPLC	√	√	√
WCX-HPLC	√	√	√
Viscosidad	√	--	--

Los resultados de la detección de SEC-HPLC se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Resultados de la detección por SEC-HPLC del estudio sobre la composición de las fórmulas de formulación

Fórmula	Tipos de examen	Día 0 (%)			Día 14 (%)			Día 28 (%)		
		Agregado	Monómero	Fragmento	Agregado	Monómero	Fragmento	Agregado	Monómero	Fragmento
19A	Tipo de tensioactivo	0,5	99,5	0	0,8	99,0	0,2	1,1	98,6	0,3
20 A		0,5	99,5	0	0,8	99,0	0,2	1,2	98,5	0,3
21 A		0,4	99,6	0	0,8	99,0	0,2	1,1	98,6	0,3
22 A	Tipo de amortiguador	0,3	99,7	0	0,6	99,2	0,2	0,8	98,9	0,3
23 A		0,3	99,7	0	0,6	99,2	0,2	0,8	98,9	0,3
24 A		0,4	99,6	0	0,9	98,9	0,2	1,2	98,4	0,4
25 A		0,4	99,5	0,1	0,7	99,1	0,2	0,9	98,8	0,3
26 A	Tipo de estabilizador	0,5	99,5	0	0,9	98,9	0,2	1,2	98,5	0,3
27 A		0,4	99,6	0	1,0	98,8	0,2	1,4	98,3	0,3
28 A		0,4	99,6	0	0,8	99,0	0,2	1,0	98,7	0,3
29 A		0,5	99,5	0	1,0	98,8	0,2	1,4	98,3	0,3
33 A	Contenido del anticuerpo monoclonal PD-L1	0,3	99,7	0	0,3	99,6	0,1	0,3	99,4	0,3
34 A		0,5	99,5	0	0,9	99,0	0,2	1,1	98,6	0,3

Los resultados de la detección de WCX-HPLC se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Resultados de la detección WCX-HPLC del estudio sobre la composición de las fórmulas de formulación

Fórmula	Tipos de examen	Día 0 (%)			Día 14 (%)			Día 28 (%)		
		Ácido componente	Componente principal	Básico componente	Ácido componente	Componente principal	Básico componente	Ácido componente	Componente principal	Básico componente
19A	Tipo de tensioactivo	4,4	92,2	3,4	7,7	87,7	4,6	10,7	83,4	5,9
20 A		4,5	91,9	3,6	7,7	87,3	5,0	10,7	83,2	6,1
21 A		4,4	92,0	3,6	7,8	87,0	5,1	10,7	83,9	5,5
22 A	Tipo de amortiguador	4,5	91,9	3,6	8,0	86,9	5,2	11,1	83,0	5,9
23 A		4,4	91,9	3,7	7,7	87,3	5,0	10,8	83,3	6,0
24 A		4,3	92,7	3,0	9,2	84,3	6,5	13,1	79,6	7,2
25 A		4,3	92,1	3,7	7,0	85,9	7,1	9,2	82,0	8,8
26 A		4,4	92,0	3,7	6,6	88,4	5,0	8,5	85,3	6,2

Fórmula	Tipos de examen	Día 0 (%)			Día 14 (%)			Día 28 (%)		
		Ácido componente	Componente principal	Básico componente	Ácido componente	Componente principal	Básico componente	Ácido componente	Componente principal	Básico componente
27 A	Tipo de estabilizador	4,4	90,9	4,8	9,5	85,5	4,9	13,3	81,0	5,7
28 A		5,7	90,9	3,4	7,4	87,0	5,7	10,0	83,4	6,6
29 A		4,3	92,2	3,5	6,3	88,5	5,2	7,6	85,9	6,5
33 A	Contenido del anticuerpo monoclonal PD-L1	4,4	92,0	3,6	8,4	86,5	5,1	11,4	82,7	5,9
34 A		4,3	92,0	3,7	7,6	87,2	5,1	10,1	84,1	5,7

(1) Estudio sobre la influencia del tipo de tensioactivo en la estabilidad de la formulación

El contenido del anticuerpo monoclonal PD-L1 fue de 200 mg/mL, se usó acetato de sodio-ácido acético 20 mM como amortiguador, se usó prolina 220 mM (L-prolina) como amortiguador y polisorbato 20 al 0,02%. Se seleccionaron polisorbato 80 y poloxámero P188 como tensioactivos. La proteína objetivo se detectó mediante SEC-HPLC y WCX-HPLC cuando las formulaciones se sometieron a una aceleración de 0 días, 14 días y 28 días, para examinar la influencia de diferentes tensioactivos en la estabilidad de las formulaciones (ver fórmulas de formulación 19A , 20A y 21A). Los resultados del estudio muestran que el polisorbato 20, el polisorbato 80 y el poloxámero P188 se pueden utilizar como tensioactivos de la formulación del anticuerpo monoclonal PD-L1.

(2) Estudio sobre la influencia del tipo de estabilizador en la estabilidad de la formulación

El contenido del anticuerpo monoclonal PD-L1 fue de 200 mg/ml, se usó acetato de sodio-ácido acético 20 mM como amortiguador, se usó polisorbato 20 al 0,02 % como tensioactivo, el pH fue de 6,4 y 220 mM de L- Como estabilizadores se seleccionaron prolina, 90 mg/mL de sacarosa, 250 mM de glicina, 150 mM de clorhidrato de L-arginina y 150 mM de cloruro de sodio. La proteína objetivo se detectó mediante SEC-HPLC y WCX-HPLC cuando las formulaciones se sometieron a una aceleración de 0 días, 14 días y 28 días, para examinar la influencia de diferentes estabilizadores en la estabilidad de las formulaciones (véanse las fórmulas de formulación 19A , 26A, 27A, 28A y 29A). Los resultados del estudio muestran que se pueden utilizar L-prolina, sacarosa, glicina, clorhidrato de L-arginina o cloruro de sodio como estabilizador de la formulación del anticuerpo monoclonal PD-L1.

(3) Influencia del tipo de componente amortiguador en la estabilidad de la formulación

El contenido del anticuerpo monoclonal PD-L1 fue de 200 mg/ml, se usó L-prolina 220 mM como estabilizador, se usó polisorbato 20 al 0,02% como tensioactivo, el pH fue 6,4 y 20 mM de acetato de sodio-ácido acético. , Se seleccionaron como amortiguadores ácido L-histidina-acético, ácido clorhídrico L-histidina-L-histidina, fosfato de sodio y ácido cítrico-hidróxido de sodio. La proteína objetivo se detectó mediante SEC-HPLC y WCX-HPLC cuando las formulaciones se sometieron a una aceleración de 0 días, 14 días y 28 días, para examinar la influencia de diferentes amortiguadores en la estabilidad de las formulaciones (ver fórmulas de formulación 19A , 22A, 23A, 24A y 25A). Los resultados del estudio muestran que los amortiguadores acetato de sodio-ácido acético, L-histidina-ácido acético, L-histidina-ácido clorhídrico, fosfato de sodio, ácido cítrico-hidróxido de sodio, etc. se pueden utilizar como componente amortiguador del PD-L1. formulación de anticuerpos monoclonales. En particular, los resultados de detección de SEC-HPLC de las fórmulas que contienen estos sistemas de amortiguador no fueron significativamente diferentes; Los resultados de WCX-HPLC muestran que después de 28 días de aceleración a alta temperatura, el contenido del componente principal de la fórmula que contenía fosfato de sodio y el de la fórmula que contenía el sistema de ácido cítrico-hidróxido de sodio eran ligeramente

menores, y el contenido del componente principal de las fórmulas que contenían los sistemas de amortiguación de descanso estaban cerca.

(4) Influencia de la concentración del anticuerpo monoclonal PD-L1 en la estabilidad de la formulación

Los resultados del estudio de las fórmulas de formulación 33A, 34A y 19A muestran que las formulaciones que contienen anticuerpo monoclonal PD-L1 en una concentración de 20 mg/mL-220 mg/mL cumplieron todos los requisitos de estabilidad de la formulación bajo ciertas condiciones que involucran amortiguador, estabilizador, tensioactivo y /o pH.

Los resultados de la detección de viscosidad el día 0 se muestran en la Tabla 8. Los resultados muestran que: excepto que la fórmula 33A con baja concentración de anticuerpo monoclonal PD-L1 tenía una viscosidad relativamente baja, la viscosidad de otras fórmulas de formulación no fue significativamente diferente y todo estaba dentro de un rango aceptable en general. Esto significa que las formulaciones que contienen una concentración relativamente alta (por ejemplo, 220 mg/ml) de anticuerpo monoclonal PD-L1 tienen características de viscosidad adecuadas para la preparación de fármacos (por ejemplo, adecuadas para inyección, como inyección subcutánea). Puede verse que las composiciones descritas en el presente documento tienen una viscosidad adecuada, facilitando así la administración fácil (por ejemplo, inyección subcutánea) y rápida (por ejemplo, reduciendo el número de inyecciones y reduciendo en gran medida el tiempo de administración), y mejorando simultáneamente el cumplimiento y la accesibilidad de la administración para el paciente y la mejora de la calidad de vida del paciente.

Tabla 8. Resultados de la detección de viscosidad en el estudio sobre la composición de la formulación

Fórmula	Viscosidad (mPa.s)
19 A	18,200
20 A	18,270
21 A	18,470
22 A	17,080
23 A	17,250
24 A	16,390
25 A	20,480
26 A	22,980
27 A	17,440
28 A	17,280
29 A	19,690
33 A	1,239
34 A	22,640

Ejemplo 3

Las fórmulas de formulación se optimizaron aún más en función de los resultados de los Ejemplos 1 y 2, y se realizaron análisis adicionales del pH, los sistemas amortiguadores, los estabilizadores y los tensioactivos de las fórmulas.

1. Detección de pH

Se probó la estabilidad de diferentes fórmulas que contenían 200 ± 12 mg/ml de anticuerpo monoclonal PD-L1 dentro de un rango de pH de 5,0 a 7,5 a alta temperatura de 40 ± 2 °C. La diferencia de pureza de la proteína se detectó mediante SEC-HPLC y WCX-HPLC, y la diferencia de partículas y uniformidad de la proteína se detectó mediante micropartículas insolubles y DLS. La composición de la fórmula específica y los resultados de la detección se resumen en la Tabla 9.

Tabla 9. Resultados de la detección de 28 días de aceleración a alta temperatura de 40±2 °C dentro de un rango de pH de 4,5 a 7,5.

Contenido del anticuerpo monoclonal PD-L1	Otros componentes	pH	Monómero SEC-HPLC (%)	Componentes principales de WCX-HPLC (%)	Micropartícula insoluble		DLS	
					10 µm	25 µm	Z.Av. Diámetro (nm)	PDI
200±12 mg/mL	20 mM de acetato de sodio-ácido acético, 220 mM de L-prolina, 0,02% de polisorbato 20	4,5	No se detecta, ya que la solución es coloidal					
		5,0	97,3	83,7	43	8	16,41	3,28
		5,5	98,3	85,5	23	5	6,74	0,88
		6,4	98,4	83,3	18	3	10,29	0,37
	20 mM de PB, 220 mM de L-prolina, 0,02% de polisorbato 20	7,5	96,3	55,8	NA	NA	28,37	1,35

“NA” representa no detectado

Los resultados de la detección por SEC-HPLC muestran que el contenido de monómero se redujo significativamente en las condiciones de pH 5,0 y pH 7,5; Los resultados de la detección de WCX-HPLC muestran que el contenido del componente principal se redujo significativamente en condiciones de pH 7,5. Los resultados de la detección de partículas insolubles muestran que las partículas insolubles eran menos en la condición de pH más bajo, y el número de partículas insolubles tendía a reducirse aún más junto con el aumento del pH. El índice PDI refleja la homogeneidad de la solución y cuanto menor sea el valor, mejor será la uniformidad. Los resultados muestran que la uniformidad de la solución fue la mejor a pH 6,4, y el valor de PDI de la solución mostró una tendencia a disminuir primero y luego aumentar junto con el aumento del pH.

Basándose en los resultados anteriores, se examinó más a fondo la estabilidad del anticuerpo monoclonal PD-L1 dentro del intervalo de pH de 6,1-6,7. Se sometieron diferentes fórmulas que contenían 200 ± 12 mg/ml de anticuerpo monoclonal PD-L1 a una temperatura alta de 40 ± 2 °C, la diferencia de pureza de la proteína se detectó mediante SEC-HPLC y WCX-HPLC, y los valores de DO a 340 Se compararon nm para detectar la diferencia de turbidez. La composición de la fórmula específica y los resultados de la detección se resumen en la Tabla 10.

Tabla 10. Resultados de la detección de 28 días de aceleración a alta temperatura de 40±2 °C dentro de un rango de pH de 6,1-6,7

Contenido del anticuerpo monoclonal PD-L1	Otros componentes	pH	SEC-HPLC monómero (%)	Componente principal de WCX-HPLC (%)	OD340nm
200±12 mg/mL	20 mM de acetato de sodio-ácido acético, 220 mM de L-prolina, 0,02% de polisorbato 20	6,1	98,5	87,0	0,6343
		6,3	98,5	86,3	0,5763
		6,5	98,3	85,3	0,4717
		6,7	98,5	84,0	0,4982

Dentro del rango de pH de 6,1 a 6,7, los resultados de SEC-HPLC no muestran diferencias significativas entre las diferentes fórmulas; los resultados de WCX-HPLC muestran que el contenido del componente principal tendía a disminuir ligeramente a medida que aumentaba el pH; los resultados de turbidez detectados en OD340 nm tendieron a disminuir primero y luego aumentar junto con el aumento del pH.

2. Selección de estabilizadores y sistemas de amortiguación

Se seleccionaron sistemas de amortiguación de acetato de sodio-ácido acético, clorhidrato de L-histidina-L-histidina y citrato y se combinaron con diferentes estabilizadores para investigar más a fondo el efecto de los estabilizadores. Los estabilizadores evaluados incluyeron sacarosa, trehalosa y maltosa como azúcares, L-prolina, clorhidrato de L-arginina y metionina como aminoácidos, y manitol, sorbitol y glicerol como alcoholes; Se utilizó cloruro de sodio como control para la comparación simultánea.

La diferencia de pureza de la proteína se detectó mediante SEC-HPLC y WCX-HPLC, y la diferencia de partículas y uniformidad entre diferentes fórmulas se detectó mediante micropartículas insolubles y DLS. La composición de la fórmula específica y los resultados de la detección se muestran en las Tablas 11-13.

Tabla 11. Resultados de detección para diferentes estabilizadores después de 28 días de aceleración a alta temperatura de 40±2 °C en presencia del amortiguador acetato de sodio-ácido acético

Contenido del anticuerpo monoclonal PD-L1	Otros componentes	Estabilizador	Monómero SEC-HPLC (%)	Componente principal de WCX-HPLC (%)	Micropartícula insoluble		DLS		Viscosidad (cp 25 °C)
					10 μm	25 μm	Z.Av. Diámetro (nm)	PDI	
200±12 mg/mL	20 mM de acetato de sodio-ácido acético pH 6,4±0,1 0.02% polisorbato 20	220 mM de L-prolina	98,5	83,7	18	3	10,74	0,14	17,70
		50 mg/mL de sacarosa	98,4	85,0	40	8	12,14	0,29	20,64
		20 mg/mL de sacarosa	98,3	84,5	13	5	11,22	0,22	18,90
		150 mM de clorhidrato de L-arginina	98,3	83,2	18	5	16,91	0,17	17,36
		50 mM de clorhidrato de L-arginina	98,6	84,5	20	5	16,1	0,2	17,24
		50 mg/mL de manitol	98,4	85,2	15	5	13,27	0,22	21,04
		20 mg/mL de manitol	98,4	85,2	20	5	10,96	0,2	17,82
		40 mg/mL de sorbitol	98,4	84,9	30	5	10,88	0,28	19,49
		90 mg/mL de trehalosa	98,4	85,1	15	5	13,08	0,63	26,46
		80 mg/mL de maltosa	96,0	86,6	18	8	11,61	0,47	18,78
		20 mg/mL de glicerol	98,3	85,3	23	10	11,03	0,1	18,18
		220 mM de L-prolina	98,6	83,3	18	3	10,58	0,25	15,87

		+ 5 mM de L-metionina							
		220 mM de L-prolina + 1 mM de EDTA disódico	98,5	83,3	18	3	11,74	0,18	16,54
		100 mM de clorhidrato de L-arginina + 100 mM de L-prolina	98,6	83,4	20	0	16,76	0,26	17,55
		100 mM de cloruro de sodio	98,4	85,5	25	5	20,11	0,48	18,56

Después de 28 días de aceleración a alta temperatura, la apariencia inspeccionada visualmente mostró que, excepto que la fórmula que contenía maltosa era de color amarillo, otras fórmulas no mostraron diferencias significativas en la apariencia.

Los resultados de la detección por SEC-HPLC muestran que: excepto que la fórmula que contenía maltosa mostró un contenido de monómero relativamente bajo, otras fórmulas no mostraron diferencias significativas en los monómeros detectados (entre 98,3 % y 98,6 %); Los resultados de la detección de WCX-HPLC muestran que: excepto que la fórmula que contenía maltosa mostró un cambio en el patrón de picos, otras fórmulas no mostraron diferencias significativas en el componente principal detectado (entre 83,3% y 85,5%). Los resultados de la detección de partículas insolubles muestran que: no hubo diferencias significativas en la presencia de diferentes estabilizadores. Resultados de la detección DLS: los resultados del diámetro hidrodinámico promedio (Z. Av. Diámetro) muestran que la fórmula que contiene cloruro de sodio tenía un diámetro hidrodinámico relativamente mayor, y las otras fórmulas mostraron un tamaño de partícula promedio más pequeño; Los resultados del coeficiente de distribución (PDI) muestran que, excepto que las fórmulas que contienen trehalosa, maltosa y cloruro de sodio tuvieron valores >0,3, otras fórmulas no mostraron diferencias significativas y demostraron una buena uniformidad. Los resultados de la detección de viscosidad muestran que: la viscosidad de las fórmulas que contenían 50 mg/mL de sacarosa, 50 mg/mL de manitol y 90 mg/mL de trehalosa fue > 20 cp, y la de las otras fórmulas fue < 20 cp; la fórmula que contenía el antioxidante metionina era ligeramente menos viscosa que las fórmulas sin metionina.

Tabla 12. Resultados de detección para diferentes estabilizadores después de 28 días de aceleración a alta temperatura de 40±2 °C en presencia del amortiguador clorhidrato de L-histidina-L-histidina

Anticuerpo monoclonal PD-L1 Contenido	Otros componentes	Estabilizador	Monómero SEC-HPLC (%)	Componente principal de WCX-HPLC (%)	Micropartícula insoluble (por mL)		DLS	
					10 µm	25 µm	Z.Av. Diámetro (nm)	PDI
200±12 mg/mL	20 mM de clorhidrato de L-histidina-L-histidina pH 6,4±0,1 0.02% polisorbato 20	220 mM de L-prolina	98,6	83,2	38	3	11,54	0,15
		50 mg/mL de sacarosa	98,6	84,4	20	3	12,49	0,3
		20 mg/mL de sacarosa	98,6	84,5	60	15	11,74	0,2
		150 mM de clorhidrato de L-arginina	98,6	83,3	28	8	16,98	0,14
		50 mM de clorhidrato de L-arginina	98,6	84,2	43	5	17,59	0,20

		50 mg/mL de manitol	98,6	84,5	65	20	13,44	0,14
		20 mg/mL de manitol	98,6	84,7	20	3	12,49	0,08
		40 mg/mL de sorbitol	98,7	84,6	10	3	11,7	0,21
		90 mg/mL de trehalosa	98,7	84,6	30	3	14,9	0,41
		80 mg/mL de maltosa	97,5	86,8	25	5	13,04	0,39
		20 mg/mL de glicerol	98,7	84,9	30	8	12,18	0,01
		100 mM de clorhidrato de L-arginina + 100 mM de L-prolina	98,9	83,4	48	5	17,36	0,07
		100 mM de cloruro de sodio	98,7	84,6	30	10	21,25	0,07

Después de 28 días de aceleración a alta temperatura, la apariencia inspeccionada visualmente mostró que, excepto que la fórmula que contenía maltosa era de color amarillo, otras fórmulas no mostraron diferencias significativas en la apariencia.

Los resultados de la detección por SEC-HPLC muestran que: excepto que la fórmula que contenía maltosa mostró un contenido de monómero relativamente bajo, otras fórmulas no mostraron diferencias significativas en los monómeros detectados (entre 98,6 % y 98,9 %); Los resultados de la detección de WCX-HPLC muestran que: excepto que la fórmula que contiene maltosa mostró un cambio en el patrón de picos, otras fórmulas no mostraron diferencias significativas en el componente principal detectado (entre 83,2 % y 84,9 %). Los resultados de la detección de partículas insolubles muestran que: no hubo diferencias significativas en la presencia de diferentes estabilizadores. En la detección DLS, la Z. Av. Los resultados del diámetro muestran que la fórmula que contiene cloruro de sodio tenía un diámetro hidrodinámico relativamente mayor y las otras fórmulas mostraron un tamaño promedio de partícula más pequeño; Los resultados del PDI muestran que, excepto que las fórmulas que contienen trehalosa y maltosa tenían valores de PDI >0,3, otras fórmulas no mostraron diferencias significativas y demostraron una buena uniformidad.

Tabla 13. Resultados de detección para diferentes estabilizadores después de 28 días de aceleración a alta temperatura de 40±2 °C en presencia del amortiguador citrato

Anticuerpo monoclonal PD-L1 Contenido	Otros componentes	Estabilizador	Micropartícula insoluble (por mL)		DLS	
			10 µm	25 µm	Z.Av. Diámetro (nm)	PDI
200±12 mg/mL	20 mM de citrato, pH 6,4±0,1 0,02% Preadolescente 20	220 mM de L-prolina	15	5	21,27	0,45
		50 mg/mL de sacarosa	28	3	23,59	0,32
		150 mM de clorhidrato de L-arginina	25	8	18,3	0,08
		50 mg/mL de manitol	20	10	25,78	0,18
		100 mM de clorhidrato de L-arginina + 100 mM de L-prolina	45	5	18,31	0,2

Los resultados de la detección de partículas insolubles muestran que: no hubo diferencias significativas en la presencia de diferentes estabilizadores. Los resultados de la detección DLS muestran que: excepto que la Z. Av. Los valores de diámetro de las fórmulas que contienen clorhidrato de L-arginina no fueron muy diferentes de los valores obtenidos cuando se usaron otros sistemas amortiguador; las otras fórmulas que

contenían otros estabilizadores tenían diámetros hidrodinámicos relativamente grandes mostrados por los valores de diámetro Z. Av. en presencia del sistema amortiguador citrato en comparación con los valores obtenidos en presencia de otros dos sistemas amortiguador, lo que no es beneficioso para la estabilidad estructural de la proteína; los valores de PDI detectados para fórmulas que contenían diferentes estabilizadores fueron diferentes, y las fórmulas que contenían clorhidrato de L-arginina y manitol tuvieron valores de PDI relativamente pequeños y mostraron buena uniformidad.

3. Detección de tensioactivos

Se examinó la estabilidad del anticuerpo monoclonal PD-L1 en diferentes fórmulas, en particular la influencia de diferentes tensioactivos sobre la estabilidad de la proteína. La diferencia de pureza de la proteína se detectó mediante SEC-HPLC y WCX-HPLC en el experimento de aceleración (alta temperatura de $40 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$), las partículas insolubles se detectaron agitando durante 7 días a 150 rpm a $25 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, y DLS detectó partículas y diferencias de uniformidad en diferentes fórmulas. La composición de la fórmula específica y los resultados de la detección se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Resultados del examen y detección de diferentes tensioactivos

Contenido del anticuerpo monoclonal PD-L1	No.	20 mM de acetato de sodio-ácido acético	220 mM de L-prolina	Tensioactivo	Acelerando a $40\pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 28 días		Agitación a 150 rpm a $25\pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 7 días			
					Monómero de HPLC SEC (%)	Componente principal de WCX-HPLC (%)	Micropartícula insoluble (por mL)		DLS	
							10 μm	25 μm	Z.Av. Diámetro (nm)	PDI
200 $\pm$ 12 mg/mL	1	-	-	-	98,3	84,5	465	385	10,26	0,12
	2	+	-	-	98,1	85,0	980	775	9,83	0,31
	3	-	+	-	98,5	81,5	910	615	10,02	0,05
	4	+	+	-	98,6	83,7	625	300	10,02	0,36
	5	+	+	+0,02% Polisorbato 20	98,6	83,4	10	0	9,86	0,20
	6	+	+	+0,02% polisorbato 80	98,5	83,2	0	0	10,24	0,18
	7	+	+	+0.02% poloxamer 188	98,6	83,9	10	0	10,16	0,21

“-” representa no agregado a la fórmula y “+” representa agregado a la fórmula

Después de 28 días de aceleración a $40 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, los resultados de la detección por SEC-HPLC muestran que: diferentes fórmulas no mostraron diferencias significativas; Los resultados de la detección de WCX-HPLC muestran que: la fórmula que solo contenía 220 mM de L-prolina mostró una reducción relativamente significativa en el componente principal en comparación con otras fórmulas, y otras fórmulas no mostraron diferencias significativas en el componente principal.

Después de 7 días de agitación a 150 rpm a $25 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, los resultados de la detección de partículas insolubles muestran que el número de partículas insolubles de las fórmulas que contienen el tensioactivo era pequeño, mientras que el de otras fórmulas sin tensioactivo era relativamente grande. Los resultados de la detección DLS muestran que la adición de diferentes tensioactivos (polisorbato 20, polisorbato 80 o poloxámero 188) puede mejorar el valor de PDI, y las fórmulas que contienen diferentes tensioactivos no mostraron diferencias significativas en términos de este valor.

Ejemplo 4

Se realizó una optimización adicional del excipiente y el pH de la fórmula basándose en los resultados de los ejemplos anteriores, y se obtuvieron las siguientes fórmulas de formulación de acuerdo con la Tabla 15:

Tabla 15. Diferentes composiciones de fórmulas de formulación en experimento de confirmación

Fórmula	Contenido del anticuerpo monoclonal PD-L1 (mg/mL)	Sistema de amortiguación	Excipiente	Tensioactivo	pH
20	200±5	20 mM de acetato de sodio-ácido acético	150 mM de glicina	0,02% polisorbato 20	6,1
21	200±5	20 mM de acetato de sodio-ácido acético	150 mM de glicina	0,02% polisorbato 20	6,3
22	200±5	20 mM de acetato de sodio-ácido acético	150 mM de glicina	0,02% polisorbato 20	6,5
23	200±5	20 mM de acetato de sodio-ácido acético	150 mM de glicina	0,02% polisorbato 20	6,7
24	200±5	20 mM de acetato de sodio-ácido acético	220 mM de L-prolina	0,02% polisorbato 20	6,1
25	200±5	20 mM de acetato de sodio-ácido acético	220 mM de L-prolina	0,02% polisorbato 20	6,3
26	200±5	20 mM de acetato de sodio-ácido acético	220 mM de L-prolina	0,02% polisorbato 20	6,5
27	200±5	20 mM de acetato de sodio-ácido acético	220 mM de L-prolina	0,02% polisorbato 20	6,7
28	200±5	20 mM de acetato de sodio-ácido acético	150 mM de L-prolina	0,02% polisorbato 20	6,1
29	200±5	20 mM de acetato de sodio-ácido acético	150 mM de L-prolina	0,02% polisorbato 20	6,3
30	200±5	20 mM de acetato de sodio-ácido acético	150 mM de L-prolina	0,02% polisorbato 20	6,5
31	200±5	20 mM de acetato de sodio-ácido acético	150 mM de L-prolina	0,02% polisorbato 20	6,7

Las fórmulas de formulación en la Tabla 15 se analizan y detectan de acuerdo con la Tabla 16.

Tabla 16. Elementos de detección para confirmación de fórmulas de formulación

Elementos de detección	Duración de la investigación (día) (temperatura: 40±2 °C)		
	0	14	28
SEC-HPLC	√	√	√
WCX-HPLC	√	√	√
Presión osmótica	√	--	--

1) Detección SEC-HPLC del contenido del pico principal

Los resultados del contenido del pico principal y los resultados del contenido de agregado correspondientes a las fórmulas 20-31 detectados por SEC-HPLC se muestran en la FIG. 9 y FIG. 10, respectivamente. Comparando los resultados de las fórmulas 20-23, 24-27 y 28-31 por separado, se puede ver que la diferencia en el efecto del pH sobre la estabilidad no es significativa cuando el valor del pH está entre 6,1 y 6,7.

Comparando el contenido agregado de las fórmulas 20-23 y 28-31 por separado, se encuentra que la inclusión de L-prolina se correlaciona con una mejora adicional en la estabilidad. Comparando los resultados de las fórmulas 24-27 y 28-31 por separado, se encuentra que no hubo diferencia significativa en el efecto de 220 mM de L-prolina y 150 mM de L-prolina sobre la estabilidad.

2) Detección WCX-HPLC del contenido de componentes ácidos

Los resultados del contenido de componente ácido de las fórmulas 20-31 detectado por WCX (después de aceleración a alta temperatura de 40 ± 2 °C) se muestran en la FIG. 11.

Comparando los componentes ácidos de las fórmulas 20-23, fórmulas 24-27 y fórmulas 28-31 por separado, se puede observar que el contenido de componentes ácidos de las fórmulas a un pH de 6,1-6,7 tendió a aumentar junto con el aumento del pH, pero todo estaba dentro de un rango aceptable.

Comparando los componentes ácidos de las fórmulas 20-23 y 28-31 por separado, se encuentra que la inclusión de L-prolina se correlaciona con una mejora adicional en la estabilidad.

Comparando los componentes ácidos de las fórmulas 24-27 y 28-31 por separado, se encuentra que no hubo diferencias significativas en el efecto de 220 mM de L-prolina y 150 mM de L-prolina sobre la estabilidad.

3) Detección de la presión osmótica

Los resultados de la detección de presión osmótica se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17. Resultados de la detección de presión osmótica

Fórmula	Excipiente	Presión osmótica (mOsmoL/kg)
20	150 mM de glicina	306
24	220 mM de L-prolina	373
28	150 mM de L-prolina	296

La presión osmótica inferior a 600 mOsmoL/kg está dentro de los límites seguros para la infusión según los estándares del INS (infusión nurses society) y, por lo tanto, la presión osmótica de las fórmulas 20, 24 y 28 está dentro de los límites seguros.

Ejemplo 5

A través de una serie de experimentos sobre el contenido de proteínas, el rango de pH, la selección de amortiguadores y la selección de estabilizadores, se selecciona una combinación preferida (acetato de sodio-ácido acético como sistema amortiguador, L-prolina como estabilizador y polisorbato 20 como tensioactivo). . La influencia de la concentración de acetato de sodio-ácido acético, la concentración de L-prolina, la concentración de polisorbato 20, el contenido de la proteína del anticuerpo monoclonal PD-L1 y el pH en la estabilidad de la proteína se examinó más a fondo mediante el diseño experimental del DoE. Los 5 factores se examinaron utilizando el diseño clásico de detección de dos niveles del software JMP15.0, mediante el cual se obtuvieron 18 combinaciones diseñando 2 niveles y 1 repetición de 1 punto central. El diseño experimental se muestra en la Tabla 18 a continuación.

Tabla 18. Diferentes composiciones de fórmulas de formulación en el experimento DOE

Fórmula	Contenido del anticuerpo monoclonal PD-L1 (mg/mL)	Concentración de acetato de sodio (mM)	Concentración de L-prolina (mM)	Concentración de polisorbato 20 (%)	pH
1A	50	35	50	0	5.9
2 A	50	35	390	0	6.9

Fórmula	Contenido del anticuerpo monoclonal PD-L1 (mg/mL)	Concentración de acetato de sodio (mM)	Concentración de L-prolina (mM)	Concentración de polisorbato 20 (%)	pH
3 A	220	5	390	0,04	5,9
4 A	135	20	220	0,02	6,4
5 A	220	5	390	0	6,9
6 A	50	35	50	0,04	6,9
7 A	220	35	390	0,04	6,9
8 A	220	35	390	0	5,9
9 A	220	35	50	0,04	5,9
10 A	50	5	50	0,04	5,9
11 A	50	5	50	0	6,9
12 A	50	35	390	0,04	5,9
13 A	50	5	390	0	5,9
14 A	220	35	50	0	6,9
15 A	220	5	50	0	5,9
16 A	50	5	390	0,04	6,9
17 A	135	20	220	0,02	6,4
18 A	220	5	50	0,04	6,9

Después de acelerarse durante 14 días y 28 días a alta temperatura (40 ± 2 °C), las fórmulas anteriores se detectaron mediante SEC-HPLC para el contenido de monómero y mediante WCX-HPLC para el contenido de componente principal, y los resultados se resumen en la Tabla 19.

Tabla 19. Resultados de detección de diferentes fórmulas en el diseño experimental de composición de formulación del DOE

No.	Monómero SEC-HPLC (%)			Componente principal de WCX-HPLC (%)		
	Día 0	Día 14	Día 28	Día 0	Día 14	Día 28
1A	99,6	99,5	99,1	92,4	89,6	86,5
2A	99,4	99,0	98,8	92,1	84,3	77,3
3A	99,5	98,9	98,6	92,0	88,9	85,1
4A	99,6	99,0	98,7	92,2	87,8	83,4
5A	99,4	98,5	98,1	91,8	83,1	75,7
6A	99,3	98,6	98,6	92,2	86,0	80,8
7A	99,3	98,5	98,0	91,9	84,2	77,8
8A	99,5	98,8	98,5	92,2	88,4	85,0
9A	99,5	98,8	98,3	92,3	89,5	85,9
10A	99,6	99,3	99,1	92,5	89,7	87,2
11A	99,6	99,1	98,7	92,6	85,9	80,2
12A	99,3	99,3	99,2	93,6	89,2	85,8
13A	99,6	99,4	99,3	92,7	89,1	85,9
14A	99,3	98,6	97,8	92,8	86,5	81,5
15A	99,5	98,7	98,3	92,2	89,1	86,1

No.	Monómero SEC-HPLC (%)			Componente principal de WCX-HPLC (%)		
	Día 0	Día 14	Día 28	Día 0	Día 14	Día 28
16A	99,5	99,1	98,9	92,6	82,5	74,2
17A	99,6	99,0	98,8	93,4	88,1	83,1
18A	99,3	98,3	97,7	91,8	85,9	81,1

Los resultados muestran que: la concentración del sistema amortiguador acetato de sodio (5-35 mM), la concentración del estabilizador L-prolina (50-390 mM) y la concentración de polisorbato 20 (0-0.04%) no tuvieron influencia significativa. en el monómero SEC-HPLC y el componente principal WCX-HPLC en la detección de proteínas, y el cambio fue pequeño dentro de los rangos enumerados. El contenido de proteína y el pH influyeron en el monómero SEC-HPLC y el componente principal WCX-HPLC en la detección de proteínas, y el cambio fue grande dentro de los rangos enumerados. Después de 28 días de alta temperatura, la pureza del monómero SEC-HPLC fue no inferior al 95 % cuando la concentración de proteína era de 50-220 mg/ml, y el componente principal de WCX-HPLC fue no inferior al 74 % cuando el pH estaba entre 5,9. y 6.9, que estaban ambos en un rango aceptable y por lo tanto se determinó que el cambio era aceptable.

Ejemplo 6

Se realizó un estudio de estabilidad acelerada sobre la fórmula preferida. La composición de la fórmula de la muestra fue la siguiente: 200 ± 20 mg/mL de proteína de anticuerpo monoclonal PD-L1, 20 mM de acetato de sodio-ácido acético, 220 mM de L-prolina y 0,02 % de polisorbato 20, pH 6,4 ± 0,1. . Las alícuotas de muestra se colocaron en viales, se almacenaron a 25 ± 2 °C durante 9 meses y se tomaron muestras al final de los meses 0, 3, 6 y 9. Según los elementos clave del examen para la detección de estabilidad, la pureza del monómero de la muestra (SEC-HPLC), la pureza del componente principal en la distribución de carga (WCX-HPLC), la electroforesis en gel capilar reducida y no reducida (CE- SDS), el contenido de proteínas, etc., se examinaron y los resultados se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20. Datos del estudio de estabilidad acelerado (25±2 °C, 9 meses)

Índices de detección	Condición de examen: 25±2 °C (mes)			
	0	3	6	9
Monómero SEC-HPLC (%)	99,6	99,2	99,1	98,8
Componente principal de WCX-HPLC (%)	92,5	86,5	83,8	78,0
Pureza reducida CE-SDS (%)	98,0	96,0	94,9	93,8
Pureza no reducida CE-SDS (%)	98,5	96,5	94,4	92,1
Contenido de proteínas (mg/mL)	184,1	187,1	186,8	187,2

Los resultados muestran que cuando la muestra se almacenó a 25 ± 2 °C durante 9 meses, todos los índices de la muestra estaban dentro del rango aceptable en comparación con los resultados del día 0. Esto sugiere que la fórmula de formulación de la presente invención aún puede mantener su estabilidad después de haber sido almacenado a temperatura ambiente durante 9 meses.

Ejemplo 7

Se realizó un estudio de estabilidad a largo plazo con la fórmula preferida. La composición de la fórmula de la muestra fue la siguiente: 200 ± 20 mg/mL de proteína de anticuerpo monoclonal PD-L1, 20 mM de acetato de sodio-ácido acético, 220 mM de L-prolina y 0,02 % de polisorbato 20, pH 6,4 ± 0,1. Las alícuotas

de muestra se colocaron en viales, se almacenaron a $5 \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18 meses y se tomaron muestras al final de los meses 0, 6, 12 y 18. Según los elementos clave del examen para la detección de estabilidad, la pureza del monómero de la muestra (SEC-HPLC), la pureza del componente principal en la distribución de carga (WCX-HPLC), la electroforesis en gel capilar reducida y no reducida (CE-SDS), el contenido de proteínas, etc., se examinaron y los resultados son mostrado en la Tabla 21.

Tabla 21. Datos de largo plazo ($5\pm3^{\circ}\text{C}$, 18 meses) estudio de estabilidad

Índices de detección	Condición de examen: $5\pm3^{\circ}\text{C}$ (mes)			
	0	6	12	18
Monómero SEC-HPLC (%)	99,6	99,4	99,4	99,2
Componente principal de WCX-HPLC (%)	92,0	90,2	89,2	89,7
Pureza reducida CE-SDS (%)	97,9	97,8	97,3	96,1
Pureza no reducida CE-SDS (%)	98,6	98,2	97,8	99,9
Contenido de proteínas (mg/mL)	19,.7	19,.6	190,2	191,5

Los resultados muestran que cuando la muestra se almacenó a $5 \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18 meses, los índices relacionados de detección de la muestra estuvieron todos dentro del rango aceptable en comparación con los resultados del día 0. Esto sugiere que la fórmula de formulación de la presente invención aún puede mantener su estabilidad después de haber sido almacenado a $5\pm3\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18 meses.

La descripción detallada anterior se proporciona a modo de ilustración y ejemplo, y no pretende limitar el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Diversas variantes de las realizaciones actualmente enumeradas en la presente solicitud serán evidentes para aquellos con experiencia habitual en la técnica y están destinadas a estar dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas y equivalentes de las mismas.