

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 983 564**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/68** (2007.01)

**A61K 9/19** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61K 47/18** (2007.01)

**A61K 47/26** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.11.2014** **PCT/EP2014/075326**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.05.2015** **WO15075201**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2014** **E 14802428 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2024** **EP 3071237**

54 Título: **Formulación liofilizada de conjugado de anticuerpos y fármaco**

30 Prioridad:

**21.11.2013 US 201361907001 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la  
traducción de la patente:  
**23.10.2024**

73 Titular/es:

**GENMAB A/S (100.0%)**  
**Carl Jacobsens Vej 30**  
**2500 Valby, DK**

72 Inventor/es:

**VALBJØRN, JESPER;**  
**JING, XIAONA;**  
**ROBY, KELLY ANN;**  
**PAUL, TIMOTHY WARREN;**  
**SACHA, GREGORY ALLAN;**  
**PEASE, NATHAN ALAN y**  
**WILLUMSEN, BODIL**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

### Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o  
Bemerkungen) en el folleto original publicado por la  
Oficina Europea de Patentes

ES 2 983 564 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Formulación liofilizada de conjugado de anticuerpos y fármaco

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a una formulación liofilizada adecuada en particular para conjugados de anticuerpos y fármaco (ADC), a formulaciones reconstituidas de los mismos y a métodos de preparación y uso de tales formulaciones liofilizadas y reconstituidas en, por ejemplo, terapia contra el cáncer.

## 10 Antecedentes de la invención

Los ADC son agentes muy potentes y específicos para el tratamiento del cáncer y otras afecciones, donde la porción de anticuerpo se une específicamente a su antígeno en una célula diana, de tal manera que el fármaco pueda ejercer su efecto citotóxico u otro efecto terapéutico en la célula diana, opcionalmente después de la internalización. Se han descrito varios ADC, entre ellos ADC basados en anticuerpos anti-factor tisular (anti-TF) (véase, por ejemplo, el documento WO 2011157741 A2 (D1), que describe los ADC de la presente invención).

Al igual que otros productos farmacéuticos proteicos, sin embargo, los anticuerpos son propensos a la degradación tales como oxidación, desamidación y fragmentación así como formación de partículas y agregados. Para proporcionar un producto farmacéutico ADC que sea estable durante el transporte y el almacenamiento, los vehículos, los excipientes y/o los estabilizantes en la formulación farmacéutica deben seleccionarse cuidadosamente. La estabilidad a largo plazo de un anticuerpo o ADC también puede mejorarse preparando una formulación liofilizada o secada por congelación, usando excipientes optimizados para este fin. Muchas de estas formulaciones para anticuerpos o preparaciones de ADC se han descrito en la bibliografía de patentes, véanse, por ejemplo, el documento WO9704801, el documento WO9856418, el documento WO20111753, el documento WO2096457, el documento WO3009817, el documento WO3039485, el documento US8372396, el documento WO2004004639, el documento WO2004016286, el documento WO2004055164, el documento WO 2004071439, el documento WO2006014965, el documento WO2006044908 y el documento WO2007019232.

Para los ADC, existe un desafío adicional porque la conjugación del fármaco en sí misma puede reducir la estabilidad y alterar las propiedades fisicoquímicas del anticuerpo. Por ejemplo, se ha informado que la conjugación del resto farmacológico DM1 con el anticuerpo anti-HER2 trastuzumab dio como resultado la desestabilización del dominio CH2 del anticuerpo (Wakankar et al, 2010). Además, siendo a menudo los fármacos citotóxicos hidrófobos, el conjugado de ADC en su conjunto puede ser menos soluble que el anticuerpo no conjugado, volviéndose de esta manera más propenso a la agregación, la formación de partículas y la adsorción superficial. Normalmente, tanto las formulaciones de anticuerpos como las de ADC incluyen un tensioactivo, frecuentemente polisorbato 20 u 80, para reducir la agregación y la adsorción (véase, por ejemplo, la bibliografía de patentes citada anteriormente). Por ejemplo, brentuximab vedotina (nombre comercial ADCETRIS®) es un ADC basado en un anticuerpo anti-CD30 enlazado al derivado de auristatina MMAE, provisto como un polvo liofilizado que, cuando se reconstituye en agua, contiene 5 mg/ml de ADC, 70 mg/ml de trehalosa dihidrato, 5,6 mg/ml de citrato sódico dihidrato, 0,21 mg/ml de ácido cítrico monohidrato y 0,20 mg/ml de polisorbato 80, a un pH de aproximadamente 6,6.

En consecuencia, los tensioactivos se usan comúnmente en preparaciones farmacéuticas y generalmente se perciben como ingredientes farmacéuticos aceptables. Como se ha mencionado anteriormente, los tensioactivos se usan comúnmente para reducir la formación de agregados durante la fabricación y la formulación de anticuerpos (véase, por ejemplo, Vázquez-Rey y Lang, 2011, Biotech, Bioeng. 108:7 p 1494). Sin embargo, es una preocupación general de la formulación farmacéutica reducir el uso de compuestos no activos tanto como sea posible. Esta preocupación es tanto para reducir el coste del medicamento resultante, como también para reducir los posibles efectos no deseados del excipiente. Por ejemplo, muchos tensioactivos son más o menos tóxicos debido a su naturaleza anfífila y su capacidad para reaccionar con membranas biológicas. No es raro observar CL50 de tensioactivos en organismos acuáticos tan bajos como 10 mg/l. Además, la autooxidación o la exposición a la luz de los polisorbatos puede dar lugar a la formación de peróxido de hidrógeno que, a su vez, puede oxidar la molécula de anticuerpo y dar lugar a un producto inestable (Kerwin, 2008; Singh *et al.*, 2012). Esto no solo reduce la eficacia del ADC, sino que puede dar lugar a la formación de productos de degradación de los mismos potencialmente nocivos.

De hecho, una formulación sin tensioactivos de un ADC huC242-DM1 que contiene ácido succínico 50 mM, pH 6,0 y 5,0 % de sacarosa descrita inicialmente en el documento WO2004004639 como adecuada para, por ejemplo, liofilización, se informó más tarde en el documento WO2007019232A2 que la liofilización no aborda adecuadamente la formación de partículas y agregados.

Los ADC de la presente invención se divulgan en el documento WO2011157741 (D1) y también en Breij et al, Cancer Res 2013;73(8 Supl): Resumen n.º 1234 (D2), sin embargo, estos documentos no divulgan la formulación liofilizada descrita en el presente documento.

Carter *et al.* (D3) analiza los conjugados AMP cíclico-enzima y la liofilización de dichos para superar los problemas de

estabilidad de estos conjugados.

Rowland *et al.* (D4) divulga un inmunoconjugado anti-CD19-idarrubicina y la estabilidad del mismo. No se divulgan los excipientes de la formulación de ADC. D4 divulga que el ADC puede liofilizarse y que tiene la mayor estabilidad como una formulación liofilizada almacenada a - 20 °C.

Selva *et al.*, (D5) describen el efecto beneficioso de la trehalosa como un estabilizante para la liofilización de un ADC pero no divulgan concentraciones de la misma ni otros excipientes.

Roy *et al.*, (D6) divulga el efecto de la formulación y la humedad sobre la estabilidad de una preparación de ADC liofilizado y enseña una formulación de proporciones iguales en peso de manitol, glicina y ADC en un tampón fosfato de baja fuerza iónica.

Chen *et al.*, (D7) es un resumen que analiza brevemente el desarrollo de una formulación liofilizada de un ADC anti-BR96-doxorrubicina y enseña una formulación que comprende un tampón fosfato con 5 mg/ml de maltosa o sacarosa como lioprotector. Se informa que la formulación liofilizada almacenada a 50 grados durante 3 meses mantuvo la potencia pero tuvo un ligero aumento en los agregados y la doxorrubicina libre.

Sigue existiendo la necesidad de formulaciones farmacéuticas libres de tensioactivos para ADC que sean estables durante el transporte y el almacenamiento y sustancialmente libres de partículas, agregados y productos de degradación.

### Sumario de la invención

Los presentes inventores han descubierto formulaciones liofilizadas de ADC anti-TF en que los ADC anti-TF permanecen estables y no forman agregados o partículas cuando se reconstituyen. Muy sorprendentemente, estos pueden prepararse sin la inclusión de tensioactivos tales como polisorbato 20 u 80 y/o sin sales inorgánicas. Por lo tanto, la divulgación proporciona formulaciones liofilizadas estables, libres de tensioactivos de ADC anti-TF con excipientes farmacéuticamente aceptables que comprenden: componentes tampón que limitan los cambios de pH durante la etapa de liofilización, al menos un agente estabilizante, normalmente un azúcar no reductor que forma una fase amorfa con el TF ADC en estado sólido y al menos un agente de carga, opcionalmente en donde la formulación liofilizada puede estar esencialmente libre de cualquier sal.

En consecuencia, en un aspecto principal, la invención se refiere a una formulación liofilizada de un conjugado de anticuerpos y fármaco (ADC) anti-factor tisular (TF), la formulación liofilizada obtenible u obtenida liofilizando una formulación acuosa que comprende de aproximadamente 9 a aproximadamente 11 g/l de dicho ADC anti-TF y excipientes farmacéuticamente aceptables que comprenden de aproximadamente 29 a aproximadamente 31 mM de tampón histidina que tiene un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5; de aproximadamente 84 a aproximadamente 92 mM de sacarosa y de aproximadamente 158 a aproximadamente 172 mM de manitol y en donde:

a. la formulación está libre de tensioactivo,

b. la porción de anticuerpo anti-TF del ADC comprende una región pesada variable (VH) que comprende una región CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 6, una región CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 7 y una región CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 8 y una región ligera variable (VL) que comprende una región CDR1 que tiene la secuencia amino secuencia de ácido expuesta en SEQ ID NO: 46, una región CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 47 y una región CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 48 o una variante que tiene como máximo 1, 2 o 3 modificaciones de aminoácidos, más preferentemente sustituciones de aminoácidos tales como sustituciones de aminoácidos conservativas en dichas secuencias,

c. la porción farmacológica del ADC es vcMMAE.

La invención se refiere además a una formulación líquida farmacéuticamente aceptable obtenida reconstituyendo la formulación liofilizada de la invención en un diluyente acuoso estéril y a un método para preparar la formulación liofilizada.

Estos y otros aspectos y realizaciones se describen con más detalle en las siguientes secciones.

### Leyendas de las figuras

La Figura 1 muestra el porcentaje de especies HMW (A), principal (B) y LMW (C) obtenidas mediante análisis SEC para las muestras HuMax-TF DOE almacenadas durante cuatro semanas. Para estos gráficos de barras, las formulaciones se organizaron en orden creciente de pH de izquierda a derecha para cada subgrupo de tampón más excipiente. Para cada par de barras, la barra izquierda representa 2-8 °C y la barra derecha 45 °C. Véase el Ejemplo 2 para más detalles.

La Figura 2 muestra los efectos de diversas formulaciones en el porcentaje de área del pico para especies ácidas (A), principales (B) y básicas (C) observadas usando cIEF para las muestras HuMax-TF DOE almacenadas durante una semana. Para estos gráficos de barras, las formulaciones se organizan en orden creciente de pH de izquierda a derecha para cada subgrupo de tampón más excipiente. Para cada par de barras, la barra izquierda representa 2-8 °C y la barra derecha 45 °C. Véase el Ejemplo 4 para más detalles.

La Figura 3 muestra el efecto del pH en el porcentaje de HMW para HuMax TF ADC como se determina mediante SEC cuando se almacena a 40 °C durante 2 semanas. Véase el Ejemplo 5 para más detalles.

La Figura 4 muestra el efecto del pH sobre el porcentaje de especies ácidas determinado por iCE para soluciones HuMax TF ADC almacenadas a 40 °C durante 2 semanas. Véase el Ejemplo 5 para más detalles.

La Figura 5A muestra el efecto del sorbitol y PS80 (polisorbato 80) sobre el porcentaje del pico principal de carga (por iCE) de soluciones HuMax TF ADC preparadas a pH 6,0 y almacenadas a 40 °C durante 2 semanas. Véase el Ejemplo 5 para más detalles.

La Figura 5B muestra el efecto del sorbitol y PS80 (polisorbato 80) sobre el pico principal (por SEC) de soluciones HuMax TF ADC preparadas a pH 6,0 y almacenadas a 40 °C durante 2 semanas. Véase el Ejemplo 5 para más detalles.

La Figura 6 muestra una comparación entre las formulaciones líquidas y liofilizadas sobre el porcentaje de isoformas de carga principal de HuMax-TF-ADC almacenado a 40 °C durante 2 semanas. Véase el Ejemplo 6 para más detalles.

La Figura 7 muestra resultados ilustrativos de datos de estabilidad acelerada para diferentes formulaciones liofilizadas para HuMax-TF-ADC. (A) Los agregados aumentan a 50 °C por SEC. (B) La isoforma de carga principal disminuye a 40 °C mediante icIEF. Véase el Ejemplo 8 para más detalles.

La Figura 8 muestra distribuciones de tamaño de partículas DLS para las formulaciones liofilizadas A, B y C después de almacenamiento a 40 °C durante 2 meses. Véase el Ejemplo 8 para más detalles.

La Figura 9 muestra espectros FTIR de segunda derivada para las formulaciones A, B y C después del almacenamiento a 50 °C durante 2 semanas. La distribución de números muestra la cantidad de partículas en los contenedores de diferentes tamaños. Véase el Ejemplo 8 para más detalles.

La Figura 10 muestra un termograma de flujo de calor DSC para la Formulación B. Véase el Ejemplo 11 para más detalles.

La Figura 11 muestra las secuencias VH y VL de anticuerpos anti-TF ilustrativos para su uso en las formulaciones de ADC de la presente invención. Se resaltan las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 según Kabat: las secuencias en cursiva representan la región CDR1, las secuencias subrayadas representan la región CDR2 y las secuencias en negrita representan la región CDR3.

La Figura 12 muestra el porcentaje de pico principal promedio de SEC para las formulaciones de 5 mg/ml y 30 mg/ml después del almacenamiento a 40 °C durante hasta 2 meses. Véase el Ejemplo 12.

Figura 13. Muestra el porcentaje promedio de especies de alto peso molecular de SEC para las formulaciones de 5 mg/ml y 30 mg/ml después del almacenamiento a 40 °C durante hasta 2 meses. Véase el Ejemplo 12.

Figura 14. Muestra el porcentaje de pico principal de iCE para formulaciones de HuMax-TF-ADC de 5 mg/ml y 30 mg/ml después del almacenamiento a 40 °C durante 2 meses. Véase el Ejemplo 12.

La Figura 15 muestra el porcentaje de especies ácidas de iCE para formulaciones de HuMax-TF-ADC de 5 mg/ml y 30 mg/ml después del almacenamiento a 40 °C durante 2 meses. Véase el Ejemplo 12.

Figura 16. Muestra el porcentaje de especies básicas de iCE para formulaciones de HuMax -TF-ADC de 5 mg/ml y 30 mg/ml después del almacenamiento a 40 °C durante 2 meses. Véase el Ejemplo 12.

Figura 17. Muestra el % de SEC de pico principal promedio para HuMax-TF-ADC para muestras en solución almacenadas a 25 °C durante hasta 48 horas.

Figura 18. Muestra el % de SEC promedio de especies de alto peso molecular para muestras en solución almacenadas a 25 °C durante hasta 48 horas.

Figura 19. Muestra el % de pico principal promedio de iCE para muestras en solución almacenadas a 25 °C durante

hasta 48 horas.

Figura 20. Muestra el % de iCE promedio de especies ácidas para muestras en solución almacenadas a 25 °C durante hasta 48 horas.

Figura 21. Muestra el % de iCE de especies básicas para muestras en solución almacenadas a 25 °C durante hasta 48 horas.

Figura 22. Muestra el porcentaje promedio de SEC de pico principal para formulaciones liofilizadas de glicina y citrato almacenadas a 40 °C durante hasta 2 meses.

Figura 23. Muestra el porcentaje promedio de SEC de especies de alto peso molecular para formulaciones liofilizadas de glicina y citrato almacenadas a 40 °C durante hasta 2 meses.

Figura 24. Muestra el porcentaje de iCE de pico principal para formulaciones de HuMax-TF-ADC preparadas con glicina o citrato después de almacenamiento a 40 °C durante 2 meses.

Figura 25. Muestra el porcentaje de iCE de especies ácidas para formulaciones de HuMax-TF-ADC preparadas con glicina o citrato después de almacenamiento a 40 °C durante 2 meses.

Figura 26. Muestra el porcentaje de iCE de especies básicas para formulaciones de HuMax-TF-ADC preparadas con glicina o citrato después de almacenamiento a 40 °C durante 2 meses.

Figura 27. Muestra el porcentaje de iCE del pico principal para la formulación liofilizada de HuMax-TF-ADC de 10 mg/ml preparada con 20 mM o 50 mM de histidina a pH 5, 6 o 7 y almacenada a 40 °C durante 2 meses.

Figura 28. Muestra el porcentaje de iCE de especies ácidas para la formulación de HuMax-TF-ADC de 10 mg/ml preparada con histidina 20 mM o 50 mM a pH 5, 6 o 7 y almacenada a 40 °C durante 2 meses.

Figura 29. Muestra el porcentaje de iCE de especies básicas para la formulación de HuMax-TF-ADC de 10 mg/ml preparada con histidina 20 mM o 50 mM a pH 5, 6 o 7 y almacenada a 40 °C durante 2 meses.

Figura 30. Muestra el porcentaje de SEC del pico principal para la formulación de HuMax-TF-ADC de 10 mg/ml preparada con histidina 20 mM o 50 mM a pH 5, 6 o 7 y almacenada a 40 °C durante 2 meses.

Figura 31. Muestra el porcentaje promedio de SEC de especies de alto peso molecular para la formulación HuMax-TF-ADC de 10 mg/ml preparada con histidina 20 mM o 50 mM a pH 5, 6 o 7 y almacenada a 40 °C durante 2 meses.

## Divulgación detallada de la invención

### Definiciones

Los términos y expresiones "liofilizado" y "secado por congelación" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a un material que se deshidrata congelando primero y después reduciendo la presión circundante para permitir que el agua congelada en el material se sublime.

El término "tampón" como se usa en el presente documento denota un tampón farmacéuticamente aceptable. El término "tampón" abarca aquellos agentes que mantienen el valor del pH de una solución, por ejemplo, en un intervalo aceptable e incluye, pero no se limita a, histidina, TRIS® (tris (hidroximetil) aminometano), citrato, succinato, glicolato y similares, como se describe en el presente documento. Generalmente, el "tampón" como se usa en el presente documento tiene un pKa y una capacidad tampón adecuada para el intervalo de pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 7, preferentemente de aproximadamente 5,5 a 6,5, tal como aproximadamente pH 6 o aproximadamente pH 6,0.

La expresión "agente de carga" incluye agentes que pueden proporcionar estructura adicional a un producto liofilizado (por ejemplo, para proporcionar una torta farmacéuticamente aceptable). Los agentes de carga comúnmente usados incluyen manitol, glicina, sacarosa y similares. Además de proporcionar una torta farmacéuticamente aceptable, los agentes de carga también imparten normalmente cualidades útiles a la composición liofilizada, tales como modificar la temperatura de colapso, proporcionar protección contra congelación y descongelación, mejorar aún más la estabilidad de la proteína durante el almacenamiento a largo plazo, y similares. Estos agentes también pueden servir como modificadores de la tonicidad.

El término "estabilizante" como se usa en el presente documento incluye agentes que proporcionan estabilidad a una proteína, por ejemplo, que sirve como un crioprotector durante la congelación y/o un lioprotector durante un proceso de (secado por) congelación o "deshidratación". Los estabilizantes adecuados incluyen azúcares o sacáridos no reductores y alcoholes de azúcar tales como sacarosa, trehalosa, manitol, xilitol y similares, así como aminoácidos

tales como glicina, alanina y lisina. Los estabilizantes también pueden servir como agentes de carga, agentes modificadores de la tonicidad y/o de aumento de la viscosidad. Las abreviaturas "cIEF", "icIEF" e "iCE" se usan indistintamente en el presente documento y todos significan "isoelectroenfoque capilar".

Un "tensoactivo" como se usa en el presente documento es un compuesto que se usa normalmente en formulaciones farmacéuticas para prevenir la adsorción de fármacos a superficies o su agregación. Adicionalmente, los tensoactivos reducen la tensión superficial (o tensión interfacial) entre dos líquidos o entre un líquido y un sólido. Por ejemplo, un tensoactivo ilustrativo puede reducir significativamente la tensión superficial cuando está presente en concentraciones muy bajas (por ejemplo, el 5 % p/p o menos, tal como el 3 % p/p o menos, tal como el 1 % p/p o menos). Los tensoactivos son anfífilos, lo que significa que generalmente están compuestos por grupos tanto hidrófilos como hidrófobos o lipófilos, siendo de esta manera capaces de formar micelas o estructuras autoensambladas similares en soluciones acuosas. Los tensoactivos conocidos para uso farmacéutico incluyen monooleato de glicerol, cloruro de bencetonio, docusato sódico, fosfolípidos, polietilén alquil éteres, lauril sulfato sódico y tricaprilina (tensoactivos aniónicos); cloruro de benzalconio, citrimida, cloruro de cetilpiridinio y fosfolípidos (tensoactivos catiónicos); y alfa tocoferol, monooleato de glicerol, alcohol miristílico, fosfolípidos, poloxámeros, polioxietilén alquil éteres, derivados de aceite de ricino polioxietilénado, ésteres de ácidos grasos de polioxietilén sorbitano, esteratos de polioxietilén, hidroxistearato de polioxilo 15, polioxiglicéridos, polisorbatos, dilaurato de propilenglicol, monolaurato de propilenglicol, ésteres de sorbitán palmitato de sacarosa, estearato de sacarosa, tricaprilina y TPGS (tensoactivos no iónicos y zwitteriónicos).

Un "diluyente" de interés en el presente documento es uno que es farmacéuticamente aceptable (seguro y no tóxico para la administración a un ser humano) y es útil para la preparación de una formulación reconstituida. Los diluyentes ilustrativos incluyen agua esterilizada, agua bacteriostática para inyección (BWFI), una solución tamponada con pH (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato), solución salina estéril, solución de Ringer o solución de dextrosa.

Como se usa en el presente documento, una "fracción terapéutica" significa un compuesto que ejerce un efecto terapéutico o preventivo cuando se administra a un sujeto, particularmente cuando se suministra como un ADC como se describe en el presente documento. Una fracción "citotóxica" o "citostática" es un compuesto que es perjudicial para (por ejemplo, destruye) las células. Algunas fracciones citotóxicas o citostáticas para uso en ADC son hidrófobas, lo que significa que tienen una solubilidad limitada o nula en agua, por ejemplo, 1 g/l o menos (muy ligeramente soluble), tal como 0,8 g/l o menos, tal como 0,6 g/l o menos, tal como 0,4 g/l o menos, tal como 0,3 g/l o menos, tal como 0,2 g/l o menos, tal como 0,1 g/l o menos (prácticamente insoluble). Los restos citotóxicos o citostáticos hidrófobos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, determinados inhibidores de la microtubulina tales como auristatina y sus derivados, por ejemplo, MMAF y MMAE.

El término "inmunoglobulina" se refiere a una clase de glucoproteínas estructuralmente relacionadas que consisten en dos pares de cadenas polipeptídicas, un par de cadenas ligeras (L) y un par de cadenas pesadas (H), las cuatro interconectadas por enlaces disulfuro. La estructura de las inmunoglobulinas ha sido bien caracterizada. Véase, por ejemplo, Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Brevemente, cada cadena pesada normalmente comprende una región variable de la cadena pesada (abreviada en el presente documento como VH o V<sub>H</sub>) y una región constante de la cadena pesada (CH o C<sub>H</sub>). La región constante de la cadena pesada está compuesta por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera normalmente comprende una región variable de la cadena ligera (abreviada en el presente documento como VL o V<sub>L</sub>) y una región constante de la cadena ligera (CL o C<sub>L</sub>). La región constante de la cadena ligera normalmente está compuesta por un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad (o regiones hipervariables, que pueden ser hipervariables en secuencia y/o en forma de bucles definidos estructuralmente), también denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL comprenden normalmente tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (véase también Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196, 901 917 (1987)). Normalmente, la numeración de los restos de aminoácidos en esta región se realiza mediante el método descrito en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991) (expresiones tales como numeración de restos de dominio variable como en Kabat o según Kabat en el presente documento se refieren a este sistema de numeración para dominios variables de la cadena pesada o dominios variables de la cadena ligera). Usando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real de un péptido puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales correspondientes a un acortamiento de o inserción en, una FR o una CDR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de la cadena pesada puede incluir un único inserto de aminoácido (resto 52a según Kabat) después del resto 52 de CDR2 VH y restos insertados (por ejemplo, restos 82a, 82b y 82c, etc. según Kabat) después del resto 82 de FR de la cadena pesada. La numeración de Kabat de los restos puede determinarse para un anticuerpo dado mediante alineación en las regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "convencional".

El término "anticuerpo" (Ab, por sus siglas en inglés) en el contexto de la presente invención se refiere a una molécula de inmunoglobulina, un fragmento de una molécula de inmunoglobulina o un derivado de cualquiera de los mismos, que tiene la capacidad de unirse específicamente a un antígeno en condiciones fisiológicas normales con una semivida de períodos de tiempo significativos, tal como al menos aproximadamente 30 minutos, al menos aproximadamente

45 minutos, al menos aproximadamente una hora, al menos aproximadamente dos horas, al menos aproximadamente cuatro horas, al menos aproximadamente 8 horas, al menos aproximadamente 12 horas, aproximadamente 24 horas o más, aproximadamente 48 horas o más, aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7 o más días, etc., o cualquier otro período relevante funcionalmente definido (tal como un tiempo suficiente para inducir, promover, mejorar y/o modular una respuesta fisiológica asociada a la unión del anticuerpo al antígeno y/o tiempo suficiente para que el anticuerpo reclute una actividad efectora). Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de la molécula de inmunoglobulina contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos (Ab) pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del hospedador, incluyendo diversas células del sistema inmunológico (tales como las células efectoras) y componentes del sistema del complemento tales como C1q, el primer componente de la ruta clásica de activación del complemento. Como se ha indicado anteriormente, el término anticuerpo en el presente documento, salvo que se especifique lo contrario o que el contexto lo contradiga claramente, incluye fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente al antígeno. Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término "anticuerpo" incluyen (i) un fragmento Fab' o Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1 o un anticuerpo monovalente como se describe en el documento WO2007059782 (Genmab A/S); (ii) fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab enlazados por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste esencialmente en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste esencialmente en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, Nature 341, 544 546 (1989)), que consiste esencialmente en un dominio VH y también llamado anticuerpos de dominio (Holt *et al.*; Trends Biotechnol. nov de 2003;21(11):484-90); (vi) de camélido o nanocuerpos (Revs et al; Expert Opin Biol Ther. enero de 2005;5(1):111-24) y (vii) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada. Adicionalmente, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, estén codificados por genes separados, pueden unirse, usando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite formarse como una única cadena de proteína en la cual las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como anticuerpos monocatenarios o Fv monocatenarios (scFv), véanse, por ejemplo, Bird *et al.*, Science 242, 423 426 (1988) y Huston *et al.*, PNAS USA 85, 5879 5883 (1988)). Dichos anticuerpos de cadena sencilla están incluidos dentro del término anticuerpo a menos que se indique lo contrario o se indique claramente por el contexto. Aunque tales fragmentos se incluyen generalmente dentro del significado de anticuerpo, colectivamente y cada uno de forma independiente son características únicas de la presente invención, exhibiendo diferentes propiedades biológicas y utilidad. Estos y otros fragmentos de anticuerpos útiles en el contexto de la presente invención se analizan más detalladamente en el presente documento. También debe entenderse que el término anticuerpo, salvo que se indique lo contrario, también incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (mAb), anticuerpos biespecíficos, polipéptidos similares a anticuerpos, tales como anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados, y fragmentos de anticuerpos que conservan la capacidad de unirse específicamente al antígeno (fragmentos de unión a antígeno) proporcionados por cualquier técnica conocida, tales como escisión enzimática, síntesis peptídica y técnicas de expresión recombinante. Un anticuerpo como se genera puede poseer cualquier isotipo.

En el contexto de la presente invención el término "ADC" se refiere a un conjugado de anticuerpos y fármaco, que en el contexto de la presente invención se refiere a un anticuerpo anti-TF que está acoplado a otro resto como se describe en la presente solicitud. Puede, por ejemplo, acoplarse con un enlazador a, por ejemplo, cisteína o con otros métodos de conjugación a otros aminoácidos. La fracción puede, por ejemplo, ser un fármaco o una toxina o similares.

Un "anticuerpo anti-TF" es un anticuerpo como se describe anteriormente, que se une específicamente al factor tisular de antígeno o al antígeno del factor tisular. Los términos y expresiones "factor tisular", "TF", "CD142", "antígeno del factor tisular", "antígeno TF" y "antígeno CD142" se usan indistintamente en el presente documento y, salvo que se indique lo contrario, incluye cualquier variante, isoforma y homólogo de especies del factor tisular humano que se expresan de forma natural en células o se expresan en células transfectadas con el gen del factor tisular. En una realización, la secuencia de aminoácidos del factor tisular comprende la forma madura de la secuencia de registro de Genbank NP\_001984.1. Los anticuerpos anti-TF, en particular, anticuerpos humanos anti-TF, pueden producirse y caracterizarse de acuerdo con los métodos descritos en el documento WO2011/157741.

La expresión "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas mediante mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*).

En una realización preferida, se aísla el anticuerpo del ADC o del ADC de la invención. Un "anticuerpo aislado" o "ADC aislado" como se usa en el presente documento, pretende referirse a un anticuerpo o ADC que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a TF está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de TF). Un conjugado de anticuerpos y fármaco aislado como se usa en el presente documento pretende referirse a un conjugado de anticuerpos y fármaco que también está sustancialmente libre de "toxina libre", en donde "toxina libre" pretende significar toxina que no está conjugada con el anticuerpo. La expresión "sustancialmente libre de" como se usa con respecto a la toxina puede significar en particular que menos del 5 %, tal como menos del 4 %,

o menos del 3 %, o menos del 2 %, o menos del 1,5 %, o menos del 1 %, o menos del 0,5 % de fármaco no conjugado está presente cuando se determina como se describe en el Ejemplo 16 en el documento WO2011157741. Un anticuerpo aislado o un conjugado de anticuerpos y fármaco aislado que se une específicamente a un epítipo, una isoforma o una variante del TF humano puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, por ejemplo, de otras especies (tales como homólogos de especies de factor tisular). Por otra parte, un anticuerpo aislado o ADC puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos. En una realización de la presente invención, dos o más anticuerpos monoclonales o ADC "aislados" que tienen diferentes especificidades de unión a antígeno se combinan en una composición bien definida. En una realización, los dos o más anticuerpos monoclonales aislados o ADC se unen a TF en dos o más epítopos diferentes. En otra realización, puede ser una mezcla de mAb o ADC con especificidad de unión para TF y uno o más mAb o ADC con una segunda especificidad de unión que no es TF.

Cuando se usa en el presente documento en el contexto de dos o más anticuerpos, la expresión "compite con" o "compite de forma cruzada con" indica que el anticuerpo compete con otro anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo de "referencia" en la unión a un antígeno. Por ejemplo, dos o más anticuerpos que compiten por la unión a TF pueden analizarse usando el ensayo descrito en el Ejemplo 12 del documento WO10066803, en el cual se realizan estudios de competencia cruzada de anticuerpos mediante ELISA tipo sándwich. Brevemente, los pocillos de la placa se recubren durante la noche con un anticuerpo anti-TF que va a probarse (por ejemplo, a +4 grados Celsius con un anticuerpo anti-TF que va a probarse usando 100 microlitros por pocillo de 0,5 o 2 microgramos/ml de anticuerpo en tampón PBS). Los pocillos de ELISA se lavaron con PBS, se bloquearon durante una hora a temperatura ambiente con suero al 2 % (v/v) (por ejemplo, suero de pollo), en PBS y se lavaron nuevamente con PBS. Posteriormente, se añaden 50 microlitros de anticuerpo de referencia anti-TF (10 microgramos/ml) seguidos de 50 microlitros de TF de dominio extracelular marcado con His (TFECDHis) (0,5 o 1 microgramos/ml) y se incuban durante 1 hora a TA (mientras se agita). Las placas se lavan 3 veces con PBST (PBS+tween al 0,05 %) y se incuban con un anticuerpo anti-his-biotinilado diluido 1:2000 (por ejemplo, anti-his biotina BAM050) durante una hora a TA (mientras se agita). Las placas se lavan y se incuban con estreptavidina conjugada con un compuesto detectable directa o indirectamente (por ejemplo, Estreptavidina-poli-HRP (Sanquin, Ámsterdam, Holanda)) durante 20 minutos a TA, y se lavan nuevamente. A continuación, la cantidad de estreptavidina unida se detecta y/o se cuantifica. Por ejemplo, si el compuesto detectable indirectamente es HRP, la reacción se desarrolla aún más con ABTS (Roche Diagnostics) a TA en la oscuridad, se detiene después de 15 minutos añadiendo ácido oxálico al 2 % (p/v) y se mide la absorbancia a 405 nm. El ensayo también puede revertirse, porque los pocillos de la placa pueden recubrirse con anticuerpo de referencia, a los cuales se añade después el anticuerpo de prueba junto con el TF. Para algunos pares de anticuerpos, la competición como en el ensayo del Ejemplo 12 del documento WO10066803 solo se observa cuando un anticuerpo se recubre sobre la placa y el otro se usa para competir, y no viceversa. La expresión "compite con" cuando se usa en el presente documento también pretende cubrir dichas combinaciones de anticuerpos.

Las expresiones "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" como se usan en el presente documento se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. El anticuerpo monoclonal o su composición pueden ser anticuerpos conjugados con fármaco de acuerdo con la presente invención. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra una especificidad de unión única y afinidad por un epítipo particular. En consecuencia, la expresión "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que presentan una única especificidad de unión que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos monoclonales humanos pueden generarse mediante un hibridoma que incluye un linfocito B obtenido de un animal no humano transgénico o transcromosómico, tal como un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada y un transgén de cadena ligera humanos, fusionado a una célula inmortalizada. Usando biología molecular bien conocida en la técnica, las secuencias de ADNc y/o de aminoácidos de un anticuerpo monoclonal humano pueden determinarse a continuación de tal manera que el anticuerpo, opcionalmente con otro isotipo, pueda producirse de forma recombinante.

Como se usa en el presente documento, los términos u expresiones "unión" o "unión específica" en el contexto de la unión de un anticuerpo a un antígeno predeterminado normalmente es una unión con una afinidad correspondiente a una KD, la constante de disociación en el equilibrio de una interacción particular anticuerpo-antígeno, de aproximadamente  $10^{-7}$  M o menos, tal como aproximadamente  $10^{-8}$  M o menos, tal como aproximadamente  $10^{-9}$  M o menos, aproximadamente  $10^{-10}$  M o menos o aproximadamente  $10^{-11}$  M o incluso menos cuando se determina mediante, por ejemplo, tecnología de resonancia de plasmón de superficie (SPR, por sus siglas en inglés) en un instrumento BIAcore 3000 que usa el antígeno como el ligando y el anticuerpo como el analito, y se une al antígeno predeterminado con una afinidad correspondiente a una KD que es al menos diez veces menor, tal como al menos 100 veces menor, por ejemplo, al menos 1.000 veces menor, tal como al menos 10.000 veces menor, por ejemplo, al menos 100.000 veces menor que su afinidad por la unión a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) distinto del antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado. La cantidad con la que la afinidad es menor depende de la KD del anticuerpo, de tal manera que cuando la KD del anticuerpo es muy baja (es decir, el anticuerpo es altamente específico), la cantidad con la que la afinidad por el antígeno es menor que la afinidad por un antígeno no específico puede ser de al menos 10.000 veces.

La presente invención también proporciona, en una realización, formulaciones de anticuerpos que comprenden variantes funcionales de la región VL, la región VH o una o más CDR de los anticuerpos descritos en el presente



documento. Una variante funcional de una VL, una VH o una CDR usadas en el contexto de un anticuerpo anti-TF aún permiten que el anticuerpo retenga al menos una proporción sustancial (al menos aproximadamente el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 %, el 95 % o más) de la afinidad/avidez y/o la especificidad/selectividad del anticuerpo original y, en algunos casos, dicho anticuerpo anti-TF puede estar asociado con una mayor afinidad, selectividad y/o especificidad que el anticuerpo original.

Estas variantes funcionales normalmente conservan una identidad de secuencia significativa con respecto al anticuerpo original. El porcentaje de identidad entre dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % identidad =  $n.^{\circ}$  de posiciones idénticas/ $n.^{\circ}$  total de posiciones x 100), teniendo en cuenta el número de huecos y la longitud de cada hueco, que es necesario introducir para una alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias pueden lograrse usando un algoritmo matemático, como se describe a continuación.

Para los fines de la presente invención, la identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) como se implementa en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice *et al.*, 2000, Trends Genet. 16: 276-277), preferentemente versión 5.0.0 o posterior. Los parámetros usados son una penalización por apertura de hueco de 10, penalización de extensión de hueco de 0,5 y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión EMBOSS de BLOSUM62). La salida de Needle denominada "identidad más larga" (obtenida usando la opción -nobrief) se usa como el porcentaje de identidad y se calcula como sigue:

$$(\text{Restos idénticos} \times 100) / (\text{Longitud de la alineación} - \text{Número total de huecos en la alineación}).$$

Para los fines de la presente invención, la identidad de secuencia entre dos secuencias de desoxirribonucleótidos se determina usando el algoritmo Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, anteriormente) como se implementa en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice *et al.*, 2000, anteriormente), preferentemente la versión 5.0.0 o posterior. Los parámetros usados son una penalización por apertura de hueco de 10, penalización de extensión de hueco de 0,5 y la matriz de sustitución EDNAFULL (versión EMBOSS de NCBI NUC4.4). La salida de Needle denominada "identidad más larga" (obtenida usando la opción -nobrief) se usa como el porcentaje de identidad y se calcula como sigue:

La secuencia de las variantes de CDR puede diferir de la secuencia de las CDR de las secuencias de anticuerpos originales mediante sustituciones en su mayoría conservativas; por ejemplo, al menos aproximadamente el 35 %, aproximadamente el 50 % o más, aproximadamente el 60 % o más, aproximadamente el 70 % o más, aproximadamente el 75 % o más, aproximadamente el 80 % o más, aproximadamente el 85 % o más, aproximadamente el 90 % o más, aproximadamente el 95 % o más, tal como aproximadamente el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de las sustituciones en la variante son reemplazos conservativos de restos de aminoácidos.

La secuencia de las variantes de CDR puede diferir de la secuencia de las CDR de las secuencias de anticuerpos originales mediante sustituciones en su mayoría conservativas; por ejemplo, al menos 10, tal como al menos 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 de las sustituciones en la variante son reemplazos conservativos de restos de aminoácidos.

En el contexto de la presente invención, las sustituciones conservativas pueden definirse mediante sustituciones dentro de las clases de aminoácidos reflejadas en una o más de las siguientes tres tablas:

#### Clases de restos de aminoácidos para sustituciones conservativas

Restos ácidos	Asp (D) y Glu (E)
Restos básicos	Lys (K), Arg (R) e His (H)
Restos hidrófilos sin carga	Ser (S), Thr (T), Asn (N) y Gln (Q)
Restos alifáticos sin carga	Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L) e Ile (I)
Restos no polares sin carga	Cys (C), Met (M) y Pro (P)
Restos aromáticos	Phe (F), Tyr (Y) y Trp (W)

#### Clases de sustitución de restos de aminoácidos conservativas alternativas

1	A	S	T
2	D	E	
3	N	Q	
4	R	K	

(continuación)

5	I	L	M
6	F	Y	W

**Clasificaciones físicas y funcionales alternativas de restos de aminoácidos**

Restos que contienen grupos alcohol	S y T
Restos alifáticos	I, L, V y M
Restos asociados a cicloalqueno	F, H, W e Y
Restos hidrófobos	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W e Y
Restos cargados negativamente	D y E
Restos polares	C, D, E, H, K, N, Q, R, S y T
Restos cargados positivamente	H, K y R
Restos pequeños	A, C, D, G, N, P, S, T y V
Restos muy pequeños	A, G y S
Restos implicados en la formación de giros	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P y T
Restos flexibles	Q, T, K, S, G, P, D, E y R

Los grupos de sustitución más conservativa incluyen: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina y asparagina-glutamina. También pueden diseñarse grupos adicionales de aminoácidos usando los principios descritos en, por ejemplo, Creighton (1984) *Proteins: Structure and Molecular Properties* (2ª Ed. 1993), W.H. Freeman and Company.

En una realización de la presente invención, la conservación en términos de propiedades hidropáticas/hidrófilas y peso/tamaño del resto también se retiene sustancialmente en una CDR variante en comparación con una CDR de un anticuerpo de los ejemplos (por ejemplo, la clase de peso, la puntuación hidropática o ambas de las secuencias son al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 % o más (por ejemplo, aproximadamente el 99 %) retenidas). Por ejemplo, las sustituciones conservativas de restos pueden basarse también o como alternativa en el remplazo de grupos de conservación basados en el peso fuertes o débiles, que son conocidos en la técnica.

La retención de restos similares también o alternativamente puede medirse mediante una puntuación de similitud, como se determina mediante el uso de un programa BLAST (por ejemplo, BLAST 2.2.8 disponible a través del NCBI usando la configuración convencional BLOSUM62, Apertura de Hueco=11 y Extensión de Hueco=1). Las variantes adecuadas exhiben normalmente al menos aproximadamente el 45 %, tal como al menos aproximadamente el 55 %, al menos aproximadamente el 65 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 % o más (por ejemplo, aproximadamente el 99 %) de similitud con el péptido original.

Como se usa en el presente documento, "isotipo" se refiere a la clase de inmunoglobulina (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE o IgM) que está codificada por los genes de la región constante de la cadena pesada.

El término "epítipo" significa una proteína determinante capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. Los epítopos habitualmente consisten en agrupaciones de moléculas de superficie tales como cadenas laterales de aminoácidos o de azúcares y habitualmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítopos conformacionales y no conformacionales se distinguen porque la unión al primero pero no al segundo se pierde en presencia de disolventes desnaturizantes. El epítipo puede comprender restos de aminoácidos directamente implicados en la unión (también denominados componente inmunodominante del epítipo) y otros restos de aminoácidos, que no están directamente implicados en la unión, tales como restos de aminoácidos que se bloquean eficazmente por el péptido de unión a antígeno específicamente (en otras palabras, el resto de aminoácido está dentro de la huella del péptido de unión a antígeno específicamente).

"Tratamiento" se refiere a la administración de una cantidad eficaz de un compuesto terapéuticamente activo de la presente invención con el fin de aliviar, mejorar, detener o erradicar (curar) síntomas o cuadros clínicos.

Una "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a las dosificaciones y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr un resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado de anticuerpos y fármaco anti-TF puede variar de acuerdo con factores tales como el cuadro clínico, la edad, el sexo y el peso del individuo y la capacidad del conjugado de anticuerpos y fármaco

anti-TF de provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una en que los efectos tóxicos o adversos del anticuerpo o de la porción de anticuerpo se ven superados por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

## 5 Realizaciones específicas de la invención

La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de determinadas composiciones acuosas de ADC anti-TF que, cuando se liofilizan, proporcionan formulaciones liofilizadas estables adecuadas para fines farmacéuticos y para aplicaciones terapéuticas de los ADC anti-TF. Las formulaciones divulgadas en el presente documento también ofrecen la opción de excluir tensioactivos tales como, por ejemplo, polisorbato 20 y 80, sales inorgánicas tales como, por ejemplo, NaCl.

Para garantizar la eficacia y la seguridad durante el transcurso de la vida útil de las composiciones farmacéuticas, la estabilidad de la composición se prueba. Normalmente, las pruebas de estabilidad incluyen pero no se limitan a pruebas con respecto a identidad, pureza y potencia de la composición. La estabilidad se prueba tanto a la temperatura de almacenamiento prevista como a temperatura o temperaturas elevadas. Las pruebas de pureza pueden incluir pero no se limitan a SDS-PAGE, CE-SDS, isoelectroenfoque, inmunoelectroforesis, transferencia Western, cromatografía de fase inversa, Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), intercambio iónico y cromatografía de afinidad. Otras pruebas pueden incluir, pero no se limitan a: apariencia visual tales como color y transparencia, particulados, pH, humedad y tiempo de reconstitución.

El perfil de degradación con respecto a, en particular, la pureza y la potencia, durante el transcurso del tiempo de estabilidad está íntimamente acoplado a la composición y/o la formulación del producto farmacéutico. En particular, la elección adecuada de la formulación puede cambiar significativamente el perfil de degradación. A menudo se añaden tensioactivos tales como, por ejemplo, polisorbato 20 a las composiciones farmacéuticas para reducir la formación de productos de degradación que limitan la vida útil. Los perfiles de degradación típicos de anticuerpos monoclonales y productos farmacológicos conjugados derivados de anticuerpos monoclonales incluyen la formación de agregados covalentes y no covalentes de alto peso molecular, fragmentos, productos de desamidación y oxidación. Particularmente, los productos de desamidación y oxidación así como otras especies ácidas habitualmente se desarrollan durante el transcurso del ensayo de estabilidad. En algunos casos, las especies ácidas limitan la vida útil aceptable de la composición farmacéutica. La formación de especies ácidas debido a, por ejemplo, desamidación, puede probarse mediante, por ejemplo, isoelectroenfoque capilar con imágenes (icIEF). En otros casos la formación de agregados de alto peso molecular limita la vida útil aceptable de la composición farmacéutica. La formación de agregados puede probarse, por ejemplo, mediante SEC (cromatografía de exclusión por tamaño), DLS, MFI, SDS-PAGE o CE-SDS.

Por ejemplo, una formulación de ADC anti-TF de la invención de estabilidad farmacéuticamente aceptable puede ser una en donde, cuando se almacene a una temperatura de aproximadamente  $5 \pm 3^\circ\text{C}$  o  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  durante un período mínimo de aproximadamente 3 meses, con preferencia aproximadamente 6 meses y con más preferencia aproximadamente 12 meses o más, tal como 18 meses o más, por ejemplo durante al menos 24 o incluso 36 meses, el porcentaje de agregados es menos de aproximadamente el 10 %, preferentemente menos de aproximadamente el 5 %, más preferentemente menos de aproximadamente el 2 %, cuando se determina usando análisis SEC, por ejemplo, de acuerdo con el Ejemplo 10. Adicionalmente o como alternativa, una formulación de ADC anti-TF estable de la invención puede ser una en donde, cuando se almacene a una temperatura de aproximadamente  $5 \pm 3^\circ\text{C}$  o  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  durante un período mínimo de aproximadamente 3 meses, con preferencia aproximadamente 6 meses y con más preferencia aproximadamente 12 meses o más, los cambios de la isoforma principal son menos del 15 %, preferentemente menos del 10 %, más preferentemente menos del 8 %, más preferentemente menos del 5 %, cuando se determina usando el análisis icIEF, por ejemplo, de acuerdo con el Ejemplo 10.

En el presente documento se divulga una formulación liofilizada de un conjugado de anticuerpos y fármaco (ADC) anti-factor tisular (TF), la formulación liofilizada obtenible u obtenida liofilizando una formulación acuosa que comprende dicho ADC anti-TF y excipientes farmacéuticamente aceptables, en donde la formulación está libre de tensioactivo.

La invención proporciona una formulación liofilizada de un conjugado de anticuerpos y fármaco (ADC) anti-factor tisular (TF), la formulación liofilizada obtenible u obtenida liofilizando una formulación acuosa que comprende de aproximadamente 9 a aproximadamente 11 g/l de dicho ADC anti-TF y excipientes farmacéuticamente aceptables que comprenden de aproximadamente 29 a aproximadamente 31 mM de tampón histidina que tiene un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5; de aproximadamente 84 a aproximadamente 92 mM de sacarosa y de aproximadamente 158 a aproximadamente 172 mM de manitol y en donde:

d. la formulación está libre de tensioactivo,

e. la porción de anticuerpo anti-TF del ADC comprende una región pesada variable (VH) que comprende una región CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 6, una región CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 7 y una región CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 8 y una región ligera variable (VL) que comprende una región CDR1 que tiene la secuencia amino

secuencia de ácido expuesta en SEQ ID NO:46, una región CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 47 y una región CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 48 o una variante que tiene como máximo 1, 2 o 3 modificaciones de aminoácidos, más preferentemente sustituciones de aminoácidos tales como sustituciones de aminoácidos conservativas en dichas secuencias,

5

f. la porción farmacológica del ADC es vcMMAE.

En otro aspecto de la divulgación los excipientes farmacéuticamente aceptables comprenden:

10 a) un tampón que limita los desplazamientos de pH durante la etapa de liofilización de tal manera que el pH se mantenga entre 5 y 7,

b) al menos un azúcar no reductor que forma una fase amorfa con el ADC anti-TF en estado sólido; y

15 c) al menos un agente de carga.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a una formulación liofilizada preparada liofilizando una formulación acuosa que comprende de aproximadamente 5 g/l a aproximadamente 30 g/l de ADC anti-TF y excipientes farmacéuticamente aceptables que comprenden de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 mM de tampón histidina que tiene un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 7, opcionalmente entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 6,5; de aproximadamente 10 a aproximadamente 250 mM de sacarosa o trehalosa; y de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 300 mM de manitol o glicina.

20

En otro aspecto, la divulgación se refiere a una formulación liofilizada preparada liofilizando una formulación acuosa que comprende de aproximadamente 7 g/l a aproximadamente 20 g/l de ADC anti-TF y excipientes farmacéuticamente aceptables que comprenden de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 mM de tampón histidina que tiene un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 7, opcionalmente entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 6,5; de aproximadamente 10 a aproximadamente 250 mM de sacarosa o trehalosa; y de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 300 mM de manitol o glicina.

30

En otro aspecto, la divulgación se refiere a una formulación liofilizada preparada liofilizando una formulación acuosa que comprende de aproximadamente 5 g/l a aproximadamente 30 g/l de ADC anti-TF y excipientes farmacéuticamente aceptables que comprenden de aproximadamente 25 a aproximadamente 40 mM de tampón histidina, tal como de aproximadamente 29 a aproximadamente 31 mM, que tiene un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 7, opcionalmente entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 6,5; de aproximadamente 10 a aproximadamente 250 mM de sacarosa o trehalosa; y de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 300 mM de manitol o glicina.

35

En otro aspecto, la divulgación se refiere a una formulación liofilizada preparada liofilizando una formulación acuosa que comprende de aproximadamente 5 g/l a aproximadamente 30 g/l de ADC anti-TF y excipientes farmacéuticamente aceptables que comprenden de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 mM de tampón histidina que tiene un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 7, opcionalmente entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 6,5; de aproximadamente 50 a 225 mM de sacarosa o trehalosa, tal como de aproximadamente 84 a aproximadamente 165 mM de sacarosa o trehalosa; y de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 300 mM de manitol o glicina.

40

En otro aspecto, la divulgación se refiere a una formulación liofilizada preparada liofilizando una formulación acuosa que comprende de aproximadamente 5 g/l a aproximadamente 30 g/l de ADC anti-TF y excipientes farmacéuticamente aceptables que comprenden de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 mM de tampón histidina que tiene un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 7, opcionalmente entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 6,5; de aproximadamente 10 a aproximadamente 250 mM de sacarosa o trehalosa; y aproximadamente 100 mM a aproximadamente 274 mM, tal como de aproximadamente 158 a aproximadamente 274, tal como de aproximadamente 158 a aproximadamente 172 mM de manitol o glicina.

45

50

En otro aspecto, la divulgación se refiere a una formulación liofilizada preparada liofilizando una formulación acuosa que comprende de aproximadamente 5 g/l a aproximadamente 30 g/l de ADC anti-TF y excipientes farmacéuticamente aceptables que comprenden de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 mM de tampón histidina que tiene un pH entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 6,5; de aproximadamente 50 a aproximadamente 225 mM de sacarosa o trehalosa; y de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 274 mM de manitol o glicina.

55

En otro aspecto, la divulgación se refiere a una formulación liofilizada preparada liofilizando una formulación acuosa que comprende de aproximadamente 5 g/l a aproximadamente 30 g/l de ADC anti-TF y excipientes farmacéuticamente aceptables que comprenden de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 mM de tampón histidina que tiene un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 7, opcionalmente entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 6,5; de aproximadamente 84 a aproximadamente 165 mM de sacarosa o trehalosa; y de aproximadamente 100 a aproximadamente 274 mM de manitol o glicina.

60

65

En otro aspecto, la divulgación se refiere a una formulación liofilizada preparada liofilizando una formulación acuosa

que comprende de aproximadamente 5 g/l a aproximadamente 30 g/l de ADC anti-TF y excipientes farmacéuticamente aceptables que comprenden de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 mM de tampón histidina que tiene un pH de entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 6,5; de aproximadamente 84 a aproximadamente 146 mM de sacarosa; y de aproximadamente 158 mM a aproximadamente 274 mM de manitol.

5 En otro aspecto, la divulgación se refiere a una formulación liofilizada preparada liofilizando una formulación acuosa que comprende de aproximadamente 5 g/l a aproximadamente 30 g/l de ADC anti-TF y excipientes farmacéuticamente aceptables que comprenden de aproximadamente 25 a aproximadamente 40 mM de tampón histidina que tiene un pH entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 6,5; de aproximadamente 84 a aproximadamente 92 mM de sacarosa; y de aproximadamente 158 a aproximadamente 274 mM de manitol.

10 En otro aspecto, la divulgación se refiere a una formulación liofilizada preparada liofilizando una formulación acuosa que comprende de aproximadamente 7 g/l a aproximadamente 20 g/l de ADC anti-TF y excipientes farmacéuticamente aceptables que comprenden de aproximadamente 25 a aproximadamente 40 mM de tampón histidina que tiene un pH entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 6,5; de aproximadamente 84 a aproximadamente 92 mM de sacarosa; y de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 274 mM de manitol o glicina.

15 En otro aspecto, la divulgación se refiere a una formulación liofilizada preparada liofilizando una formulación acuosa que comprende de aproximadamente 7 g/l a aproximadamente 20 g/l, tales como de aproximadamente 9 a aproximadamente 11 g/l de ADC anti-TF y excipientes farmacéuticamente aceptables que comprenden de aproximadamente 25 a aproximadamente 40 mM de tampón de histidina que tiene un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5; de aproximadamente 84 a aproximadamente 92 mM de sacarosa o trehalosa; y de aproximadamente 158 a aproximadamente 172 mM de manitol o glicina.

20 En una realización, la invención se refiere a una formulación liofilizada preparada liofilizando una formulación acuosa que comprende de aproximadamente 9 a aproximadamente 11 g/l de ADC anti-TF y excipientes farmacéuticamente aceptables que comprenden de aproximadamente 29 a aproximadamente 31 mM de tampón histidina que tiene un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5; de aproximadamente 84 a aproximadamente 92 mM de sacarosa; y de aproximadamente 158 a aproximadamente 172 mM de manitol o glicina.

25 En otra realización, la invención se refiere a una formulación liofilizada preparada liofilizando una formulación acuosa que comprende de aproximadamente 9 a aproximadamente 11 g/l de ADC anti-TF, tal como aproximadamente 10 mg/ml de ADC anti-TF y excipientes farmacéuticamente aceptables que comprenden aproximadamente 30 mM de tampón de histidina que tiene un pH de aproximadamente 6; aproximadamente 88 mM de sacarosa; y aproximadamente 165 mM de manitol o glicina.

30 En otro aspecto, la divulgación se refiere a una formulación liofilizada preparada liofilizando una formulación acuosa que comprende aproximadamente 10 mg/ml de ADC anti-TF y excipientes farmacéuticamente aceptables que comprenden de aproximadamente 25 a aproximadamente 40 mM de tampón histidina, tal como tampón histidina 30-35 mM, tal como aproximadamente 30 mM y que tiene un pH de aproximadamente 6; aproximadamente 88 mM de sacarosa; y aproximadamente 165 mM de manitol.

35 En otra realización, la invención se refiere a una formulación liofilizada preparada liofilizando una formulación acuosa que comprende de aproximadamente 9 a aproximadamente 11 g/l de ADC anti-TF, tal como aproximadamente 10 mg/ml de ADC anti-TF en donde el ADC anti-TF es ADC TF HuMax (IgG1, vcMMAE), que es un ADC compuesto por un anticuerpo monoclonal humano IgG1,κ 011 contra TF conjugado mediante un enlazador de valina citrulina escindible mediante proteasa al fármaco monometil auristatina E (vcMMAE), y excipientes farmacéuticamente aceptables que comprenden aproximadamente un tampón histidina 30 mM que tiene un pH de aproximadamente 6; aproximadamente 88 mM de sacarosa; y aproximadamente 165 mM de manitol o glicina.

40 En una divulgación separada y específica, las formulaciones están esencialmente libres de tensioactivos.

Las formulaciones de la invención están libres de tensioactivos.

45 En otro aspecto, la divulgación se refiere a una formulación liofilizada de un ADC anti-TF, la formulación liofilizada preparada liofilizando una formulación acuosa que comprende excipientes farmacéuticamente aceptables que comprenden: un tampón que limita los desplazamientos de pH durante la etapa de liofilización, al menos un azúcar no reductor que forma una fase amorfa con el ADC anti-TF en estado sólido y al menos un agente de carga, en donde el ADC anti-TF comprende un enlazador de fármaco que se selecciona de mcMMAF, mcMMAE, vcMMAF y vcMMAE y un anticuerpo anti-TF que comprende regiones VH y VL seleccionadas del grupo que consiste en: una región VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y una región VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45; una región VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33 y una región VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 73; una región VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 y una región VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 77; o una región VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41; opcionalmente en donde la formulación liofilizada está

esencialmente libre de cualquier tensioactivo.

En un aspecto de la divulgación, el resto de anticuerpo del ADC de una cualquiera de las realizaciones anteriores comprende las CDR de VH y VL, opcionalmente las secuencias VH (SEQ ID NO:5) y VL (SEQ ID NO:45), del anticuerpo 011 humano anti-TF y un enlazador de fármacos que es mMMAE, vcMMAE, vcMMAF o mMMAF.

En un aspecto de la divulgación, el resto de anticuerpo del ADC de una cualquiera de las realizaciones anteriores comprende las CDR de VH y VL, opcionalmente las secuencias VH (SEQ ID NO:33) y VL (SEQ ID NO:73), del anticuerpo 098 humano anti-TF y un enlazador de fármacos que es mMMAE, vcMMAE, vcMMAF o mMMAF.

En un aspecto de la divulgación, el resto de anticuerpo del ADC de una cualquiera de las realizaciones anteriores comprende las CDR de VH y VL, opcionalmente las secuencias VH (SEQ ID NO:37) y VL (SEQ ID NO:77), del anticuerpo 111 humano anti-TF y un enlazador de fármacos que es mMMAE, vcMMAE, vcMMAF o mMMAF.

En otros aspectos, la divulgación proporciona una formulación liofilizada de uno cualquiera de los párrafos anteriores, que está esencialmente libre de cualquier polisorbato, opcionalmente de cualquier tensioactivo.

La divulgación también proporciona una formulación liofilizada que consiste esencialmente en un conjugado de anticuerpos y fármaco anti-TF; un agente tampón seleccionado de histidina, citrato y tris; un azúcar no reductor seleccionado de sacarosa, trehalosa y una combinación de los mismos y un agente de carga seleccionado de manitol y glicina.

En una realización de la invención, el anticuerpo anti-TF comprende las regiones de CDR VH y VL, opcionalmente las secuencias VH y VL, de la región VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y una región VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45.

También se divulgan en el presente documento: una región VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33 y una región VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 73; una región VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 y una región VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 77; o una región VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41. En una realización, el ADC anti-TF comprende las CDR VH y VL de SEQ ID NO:5 y 45, respectivamente. También se divulgan los ADC anti-TF que comprenden las CDR VH y VL de SEQ ID NO: 33 y 73, respectivamente y los ADC anti-TF que comprenden las CDR VH y VL de SEQ ID NO:37 y 77, respectivamente.

También se divulga en el presente documento una formulación liofilizada que comprende manitol y sacarosa, en donde la relación en peso de manitol a sacarosa es al menos aproximadamente 1, tal como entre aproximadamente 1 y aproximadamente 30, tal como entre 1 y aproximadamente 10, tal como entre aproximadamente 1 y aproximadamente 2, tal como aproximadamente 1.

También se divulga en el presente documento una formulación liofilizada que puede comprender manitol y trehalosa, en donde la relación en peso de manitol a trehalosa es al menos aproximadamente 1, tal como entre aproximadamente 1 y aproximadamente 30, tal como entre 1 y aproximadamente 10, tal como entre aproximadamente 1 y aproximadamente 2, tal como aproximadamente 1.

También se divulga en el presente documento una formulación liofilizada que comprende manitol y sacarosa, en donde la relación en peso de manitol a sacarosa está entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10 y la relación en peso de manitol a ADC es al menos aproximadamente 3, tal como entre 3 y 30.

La invención también proporciona una formulación liofilizada obtenible liofilizando una formulación acuosa que comprende, opcionalmente que consiste en, de aproximadamente 9 a aproximadamente 11 g/l de ADC anti-TF y aproximadamente 30 mM de histidina; aproximadamente 88 mM de sacarosa; y aproximadamente 165 mM de manitol.

La divulgación también proporciona una solución acuosa adecuada para preparar una formulación liofilizada de un ADC anti-TF, que comprende

a. de aproximadamente 7 a aproximadamente 20 g/l de ADC anti-TF, que comprende opcionalmente las CDR de VH y VL o las secuencias de VH y VL, del anticuerpo anti-TF 011,

b. de aproximadamente 28 a 34 mM de histidina;

c. de aproximadamente 84 a aproximadamente 146 mM de sacarosa;

d. de aproximadamente 158 a aproximadamente 274 mM de manitol; o

e. una combinación de a) y cualesquiera dos, tres o todos de (b) a (d).

La divulgación también proporciona una solución acuosa adecuada para preparar una formulación liofilizada de un ADC anti-TF en donde dicha solución acuosa no contiene un tensioactivo, comprendiendo dicha solución:

- 5 a. de aproximadamente 7 a aproximadamente 20 g/l de ADC anti-TF, que comprende opcionalmente las CDR de VH y VL o las secuencias de VH y VL, del anticuerpo anti-TF 011,
- b. de aproximadamente 28 a 34 mM de histidina;
- c. de aproximadamente 84 a aproximadamente 146 mM de sacarosa;
- d. de aproximadamente 158 a aproximadamente 274 mM de manitol; o
- 10 e. una combinación de (a) y cualesquiera dos, tres o todos de (b) a (d).

La divulgación también proporciona una solución acuosa adecuada para preparar una formulación liofilizada de un ADC anti-TF, que consiste en:

- 15 a. de aproximadamente 7 a aproximadamente 20 g/l de ADC anti-TF, que comprende opcionalmente las CDR de VH y VL o las secuencias de VH y VL, del anticuerpo anti-TF 011,
- b. de aproximadamente 28 a 34 mM de histidina;
- 20 c. de aproximadamente 84 a aproximadamente 146 mM de sacarosa;
- d. de aproximadamente 158 a aproximadamente 274 mM de manitol; o
- e. una combinación de (a) y cualesquiera dos, tres o todos de (b) a (d).

25 La invención también proporciona una formulación líquida farmacéuticamente aceptable obtenida reconstituyendo la formulación liofilizada de una cualquiera de las realizaciones anteriores en un diluyente acuoso estéril. Por ejemplo, se divulga que, dicha formulación líquida puede comprender o consistir esencialmente en aproximadamente 5 g/l a aproximadamente 30 g/l de ADC anti-TF, de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 mM de histidina que tiene un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 7; de aproximadamente 10 a aproximadamente 250 mM de sacarosa o trehalosa; y de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 300 mM de manitol o glicina. En una realización de la invención, la formulación líquida comprende o consiste esencialmente en aproximadamente 9 a aproximadamente 11 mg/ml de ADC anti-TF, de aproximadamente 28 a aproximadamente 34 mM de histidina, de aproximadamente 84 a aproximadamente 92 mM de sacarosa y de aproximadamente 158 a aproximadamente 274 mM de manitol.

Puede prepararse una formulación liofilizada de un ADC anti-TF liofilizando una formulación acuosa que comprende de aproximadamente 9 g/l a aproximadamente 11 g/l de ADC anti-TF y excipientes farmacéuticamente aceptables que comprenden: aproximadamente 30 mM de tampón histidina que tiene un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5; aproximadamente 88 mM de sacarosa; y aproximadamente 165 mM de manitol; en donde el anticuerpo comprende una región VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y una región VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45; una región VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33 y una región VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 73; una región VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 y una región VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 77; o una región VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41, y en donde el fármaco es MMAF o MMAE, por ejemplo, un fármaco enlazador que es vcMMAE.

En otra realización, la formulación liofilizada de la invención contiene menos del 3,0 % en peso de humedad. En otra realización, la formulación liofilizada de la invención contiene menos del 2,0 % en peso de humedad. En otra realización, la formulación liofilizada de la invención contiene menos del 1,0 % en peso de humedad. En otra realización, la formulación liofilizada de la invención contiene menos del 0,5 % en peso de humedad.

En otro aspecto preferido, una cualquiera de las formulaciones preferidas como anteriormente comprende una cantidad exacta o cantidades exactas de uno o más componentes tal como están comprendidos en las mismas y/o un valor de pH exacto. En otras palabras, uno o más de los términos "aproximadamente" están eliminados en este otro aspecto preferido de la invención.

#### *Conjugado de anticuerpos y fármaco*

60 Como se describe en el presente documento, las formulaciones de la invención son adecuadas para, por ejemplo, los ADC anti-TF.

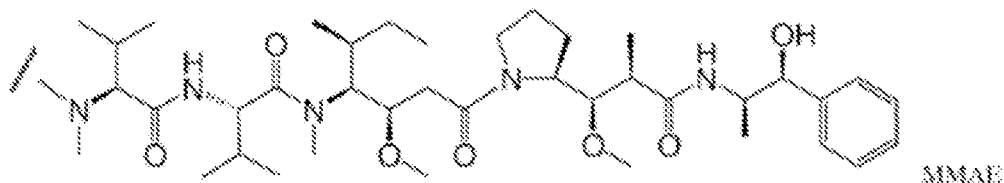
65 En un aspecto, las formulaciones liofilizadas de la divulgación comprenden un ADC anti-TF conjugado con un resto terapéutico seleccionado del grupo que consiste en taxol; citocalasina B; gramicidina D; bromuro de etidio; emetina; mitomicina; etopósido; tenopósido; vincristina; vinblastina; colchicina; doxorubicina; daunorubicina;

- dihidroxiantracindiona; un inhibidor de tubulina tal como maitansina o un análogo o derivado de la misma; mitoxantrona; mitramicina; actinomicina D; 1-deshidrotestosterona; un glucocorticoide; procaína; tetracaína; lidocaína; propranolol; puromicina; calicheamicina o un análogo o derivado de la misma, un antimetabolito tal como metotrexato, 6 mercaptopurina, 6 tioguanina, citarabina, fludarabina, 5 fluorouracilo, decarbazina, hidroxurea, asparaginasa, gemcitabina o cladribina; un agente alquilante tal como mecloretamina, tiotepa, clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU), lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, dacarbacina (DTIC), procarbazina, mitomicina C, cisplatino, carboplatino, duocarmicina A, duocarmicina SA, raquelmicina (CC-1065) o un análogo o derivado de la misma; pirrolo[2,1-c][1,4] benzodiazepinas (PDB) o análogos de las mismas; un antibiótico tal como dactinomicina, bleomicina, daunorrubicina, doxorrubicina, idarrubicina, mitramicina, mitomicina, mitoxantrona, plicamicina, antramicina (AMC)); toxina diftérica y moléculas relacionadas tales como la cadena A diftérica y fragmentos activos de la misma y moléculas híbridas, toxina de ricina tal como ricina A o una toxina de cadena de ricina A desglucosilada, toxina colérica, una toxina tipo Shiga tal como SLT I, SLT II, SLT IIV, toxina LT, toxina C3, toxina Shiga, toxina de la tos ferina, toxina tetánica, inhibidor de la proteasa Bowman-Birk de la soja, exotoxina de *Pseudomonas*, alorina, saporina, modeccina, gelanina, cadena de abrina A, cadena de modeccina A, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, Proteínas de *Phytolacca americana* tales como PAPI, PAPII y PAP S, inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina y toxinas de enomicina; ribonucleasa (RNasa); DNasa I, enterotoxina A estafilocócica; proteína antivírica de fitolaca americana; toxina differina; y endotoxina de *Pseudomonas*.
- En un aspecto de la divulgación, el anticuerpo está conjugado con una fracción citotóxica o citostática que es un fármaco seleccionado del grupo que consiste en dolastatina, maitansina, calicheamicina, duocarmicina, raquelmicina (CC-1065) o un análogo, un derivado o un profármaco de cualquiera de los mismos.
- En un aspecto de la divulgación, el anticuerpo se conjuga con un resto terapéutico, citostático y/o citotóxico que es un inhibidor de tubulina, un compuesto interactivo con el ADN y/o un inhibidor de quinasa. En un aspecto de la divulgación, el anticuerpo está conjugado con un compuesto hidrófobo, tal como un inhibidor de tubulina hidrófobo, preferentemente una auristatina, más preferentemente MMAE o MMAF. De acuerdo con la invención el anticuerpo está conjugado con MMAE.
- La carga de fármaco (o número promedio de fármacos citostáticos o citotóxicos por molécula de anticuerpo), es normalmente de 1 a aproximadamente 8, por ejemplo, p puede ser de 3-6, tal como de 4-6 o de 3-5, o p puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, tal como 3, 4 o 5, tal como 4.
- Los ADC para su uso en las formulaciones de la invención normalmente comprenden una unidad enlazadora entre la unidad de fármaco citostático o citotóxico y la unidad de anticuerpo.
- En algunos aspectos de la divulgación, el enlazador es escindible en condiciones intracelulares, de tal manera que la escisión del enlazador libera la unidad del fármaco del anticuerpo en el entorno intracelular. En otro aspecto más, la unidad enlazadora no puede escindirse y el fármaco se libera, por ejemplo, mediante degradación de anticuerpos. En algunos aspectos, el enlazador es escindible por un agente escindible que está presente en el entorno intracelular (por ejemplo, dentro de un lisosoma o endosoma o caveola). El enlazador puede ser, por ejemplo, un enlazador de peptidilo que puede escindirse con una enzima peptidasa o proteasa intracelular, incluyendo pero no limitado a, una proteasa lisosómica o endosómica. En algunos aspectos, el enlazador peptídico tiene una longitud de al menos dos aminoácidos o de al menos tres aminoácidos. Los agentes de escisión pueden incluir catepsinas B y D y plasmina, todas las cuales son conocidas por hidrolizar derivados de fármacos de tipo dipéptido dando como resultado la liberación del fármaco activo dentro de las células diana (véase, por ejemplo, Dubowchik y Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123). En una realización específica, el enlazador de peptidilo escindible por una proteasa intracelular es un enlazador Val-Cit (valina-citrulina) o un enlazador Phe-Lys (fenilalanina-lisina) (véase, por ejemplo, el documento US6214345, que describe la síntesis de doxorrubicina con el enlazador Val-Cit y diferentes ejemplos de enlazadores Phe-Lys). Los ejemplos de las estructuras de un enlazador Val-Cit y un enlazador Phe-Lys incluyen pero no se limitan a MC-vc-PAB descrito a continuación, MC-vc-GABA, MC-Phe-Lys-PAB o MC-Phe-Lys-GABA, en donde MC es la abreviatura de maleimido caproílo, vc es la abreviatura de Val-Cit, PAB es la abreviatura de p-aminobencilcarbamat y GABA es la abreviatura de ácido  $\gamma$ -aminobutírico. Una ventaja de usar la liberación proteolítica intracelular del agente terapéutico es que el agente se atenúa normalmente cuando se conjuga y las estabildades séricas de los conjugados son normalmente altas.
- En algunos aspectos de la divulgación, la unidad enlazadora no es escindible y el fármaco se libera por degradación del anticuerpo (véase el documento US 2005/0238649). Normalmente, dicho enlazador no es sustancialmente sensible al entorno extracelular.
- En un aspecto preferido, el anticuerpo se conjuga con un derivado de dolastatina tal como una auristatina. Se ha demostrado que las auristatinas o los análogos y derivados del péptido de auristatina interfieren con la dinámica de los microtúbulos, la hidrólisis de GTP y la división nuclear y celular y tienen actividad anticancerígena y antifúngica se describen en, por ejemplo, el documento US5635483; el documento US5780588; el documento US5663149. La fracción de fármaco auristatina normalmente está unida al anticuerpo a través de un enlazador, a través del extremo N (amino) o (extremo) C del resto del fármaco peptídico. Los ejemplos ilustrativos de auristatina incluyen los restos



farmacológicos DE y DF de monometil auristatina enlazados por el extremo N, divulgados en Senter *et al.*, Proceedings of the American Association for Cancer Research. Volumen 45, resumen número 623, presentados el 28 de marzo de 2004 y descritos en el documento US 2005/0238649).

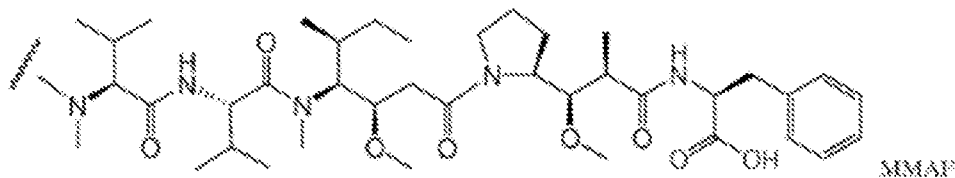
- 5 La auristatina de la invención es monometil auristatina E (MMAE):



en donde la línea ondulada indica el sitio de unión para el enlazador.

10

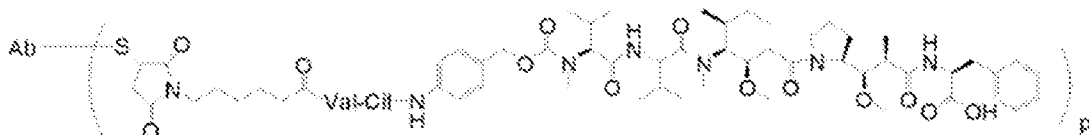
En otro aspecto de la divulgación, la auristatina es monometil auristatina F (MMAF):



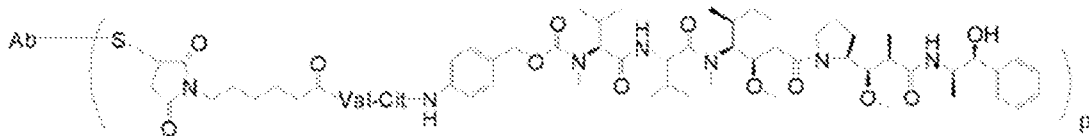
- 15 en donde la línea ondulada indica el sitio de unión para el enlazador.

En una realización el enlazador está unido a restos sulfhidrido del anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo anti-TF, obtenido por reducción (parcial) del anticuerpo.

- 20 En un aspecto de la divulgación el enlazador-auristatina es MC-vc-PAB-MMAF (también designado vcMMAF). En una realización de la invención el enlazador-auristatina es MC-vc-PAB-MMAE (también designado vcMMAE).



- 25 Ab-MC-vc-PAB-MMAF (Ab-vcMMAF)

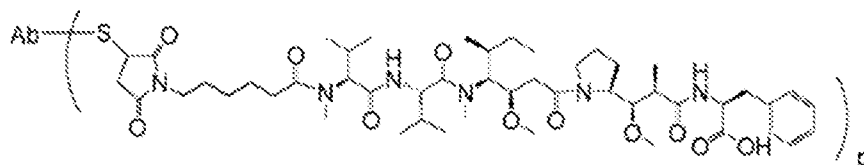


Ab-MC-vc-PAB-MMAE (Ab-vcMMAE)

- 30 en donde p indica un número de 1 a 8, por ejemplo, p puede ser de 3-5, S representa un resto sulfhidrido del anticuerpo y Ab designa el anticuerpo. En una realización el enlazador-auristatina es vcMMAE.

En otro aspecto de la divulgación, el conjugado enlazador es mcMMAF (donde mc/MC es una abreviatura de maleimido caproilo):

35



Ab-MC-MMAF (Ab-mcMMAF)

en donde p indica un número de 1 a 8, por ejemplo, p puede ser de 3-5, S representa un resto sulfhidrido del anticuerpo anti-TF y Ab designa el anticuerpo.

5 Aunque generalmente es aplicable a cualquier anticuerpo anti-TF, los anticuerpos particularmente adecuados para las formulaciones de ADC de la invención son aquellos que comparten una o más propiedades de unión fisicoquímicas y/o de unión a antígeno con uno cualquiera o más de los anticuerpos anti-TF para los cuales se proporcionan secuencias VH y VL en el presente documento (véase la Tabla 1 y la Figura 11), tales como, por ejemplo, anticuerpo 011, 098, 114, 017-D12, 042, 092-A09, 101, 025, 109 o 111, tales como, por ejemplo, anticuerpo 011, 098 o 111, tal como 011. En consecuencia, en una realización, cuando se conjuga con el fármaco en cuestión, el ADC resultante  
10 puede tener un pI en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 12, tal como de aproximadamente 7 a aproximadamente 10, tal como de aproximadamente 8,5 a aproximadamente 9,5, tal como de aproximadamente 8,5 a aproximadamente 9,0.

15 En un aspecto de la divulgación, el ADC puede unirse al mismo epítipo y/o comprender una o más secuencias CDR de, anticuerpo humano 011, opcionalmente en formato IgG1,k.

En un aspecto de la divulgación, el ADC puede unirse al mismo epítipo y/o comprender una o más secuencias CDR de, anticuerpo humano 098, opcionalmente en formato IgG1,k.

20 En un aspecto de la divulgación, el ADC puede unirse al mismo epítipo y/o comprender una o más secuencias CDR de, anticuerpo humano 114, opcionalmente en formato IgG1,k.

En un aspecto de la divulgación, el ADC puede unirse al mismo epítipo y/o comprender una o más secuencias CDR de, anticuerpo humano 017-D12 opcionalmente en formato IgG1,k.

25 En un aspecto de la divulgación, el ADC puede unirse al mismo epítipo y/o comprender una o más secuencias CDR de, anticuerpo humano 042, opcionalmente en formato IgG1,k.

30 En un aspecto de la divulgación, el ADC puede unirse al mismo epítipo y/o comprender una o más secuencias CDR de, anticuerpo humano 092-A09, opcionalmente en formato IgG1,k.

En un aspecto de la divulgación, el ADC puede unirse al mismo epítipo y/o comprender una o más secuencias CDR de, anticuerpo humano 101, opcionalmente en formato IgG1,k.

35 En un aspecto de la divulgación, el ADC puede unirse al mismo epítipo y/o comprender una o más secuencias CDR de, anticuerpo humano 025, opcionalmente en formato IgG1,k.

En un aspecto de la divulgación, el ADC puede unirse al mismo epítipo y/o comprender una o más secuencias CDR de, anticuerpo humano 109 opcionalmente en formato IgG1,k.

40 En un aspecto de la divulgación, el ADC puede unirse al mismo epítipo y/o comprender una o más secuencias CDR de, anticuerpo humano 111, opcionalmente en formato IgG1,k.

45 En un aspecto de la divulgación el anticuerpo es un anticuerpo anti-TF que compite por la unión al factor tisular con un anticuerpo de referencia que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO:33 y una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO:73, o con un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 y una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO:41, o con un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO:5 y una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO:45, o con un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO:9 y una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO:49, o con un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO:13 y una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO:53, o con un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO:17 y una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO:57, o con un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO:21 y una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO:61, o con un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO:25 y una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO:65, o con un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO:29 y una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO:69, o con un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO:37 y una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO:77. En un aspecto el anticuerpo es un anticuerpo anti-TF que compite por la  
50 unión del factor tisular con un anticuerpo de referencia que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO:5 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO:45.

60 En un aspecto de la divulgación, el anticuerpo anti-TF comprende: una región VH que comprende las secuencias CDR1, 2 y 3 de SEQ ID NO:34, 35 y 36 y una región VL que comprende las secuencias CDR1, 2 y 3 de SEQ ID NO:74, 75 y 76; o una región VH que comprende las secuencias CDR1, 2 y 3 de SEQ ID NO:2, 3 y 4 y una región VL que comprende las secuencias CDR1, 2 y 3 de SEQ ID NO:42, 43 y 44; o una región VH que comprende las secuencias

CDR1, 2 y 3 de SEQ ID NO:6, 7 y 8 y una región VL que comprende las secuencias CDR1, 2 y 3 de SEQ ID NO:46, 47 y 48; o una región VH que comprende las secuencias CDR1, 2 y 3 de SEQ ID NO:10, 11 y 12 y una región VL que comprende las secuencias CDR1, 2 y 3 de SEQ ID NO:50, 51 y 52, o una región VH que comprende las secuencias CDR1, 2 y 3 de SEQ ID NO:14, 15 y 16 y una región VL que comprende las secuencias CDR1, 2 y 3 de SEQ ID NO:54, 55 y 56; o una región VH que comprende las secuencias CDR1, 2 y 3 de SEQ ID NO:18, 19 y 20 y una región VL que comprende las secuencias CDR1, 2 y 3 de SEQ ID NO:58, 59 y 60; o una región VH que comprende las secuencias CDR1, 2 y 3 de SEQ ID NO:22, 23 y 24 y una región VL que comprende las secuencias CDR1, 2 y 3 de SEQ ID NO:62, 63 y 64, o una región VH que comprende las secuencias CDR1, 2 y 3 de SEQ ID NO:26, 27 y 28 y una región VL que comprende las secuencias CDR1, 2 y 3 de SEQ ID NO:66, 67 y 68; o una región VH que comprende las secuencias CDR1, 2 y 3 de SEQ ID NO:30, 31 y 32 y una región VL que comprende las secuencias CDR1, 2 y 3 de SEQ ID NO:70, 71 y 72; o una región VH que comprende las secuencias CDR1, 2 y 3 de SEQ ID NO:38, 39 y 40 y una región VL que comprende las secuencias CDR1, 2 y 3 de SEQ ID NO:78, 79 y 80; o una variante de cualquiera de dichos anticuerpos, en donde dicha variante tiene preferentemente como máximo 1, 2 o 3 modificaciones de aminoácidos, más preferentemente sustituciones de aminoácidos, tales como sustituciones conservativas de aminoácidos en dichas secuencias.

En una realización de la invención, el anticuerpo anti-TF comprende: una región VH que comprende las secuencias CDR1, 2 y 3 de SEQ ID NO:6, 7 y 8 y una región VL que comprende las secuencias CDR1, 2 y 3 de SEQ ID NO:46, 47 y 48, o una variante que tiene al menos la mayoría de las modificaciones de 1, 2 o 3 aminoácidos, más preferentemente sustituciones de aminoácidos, tales como sustituciones conservativas de aminoácidos en dichas secuencias.

En un aspecto de la divulgación el anticuerpo anti-TF comprende una VH que tiene al menos el 80 % de identidad, tal como al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 98 % o el 100 % de identidad con una secuencia de la región VH seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO:33, 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 37 y 29; o como máximo 20, tales como modificaciones de 15, o 10, o 5, 4, 3, 2 o 1 aminoácidos, más preferentemente sustituciones de aminoácidos, tales como sustituciones conservativas de aminoácidos en comparación con una secuencia de la región VH seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 33, 37 y 29.

En un aspecto de la divulgación, el anticuerpo anti-TF comprende una VL que tiene al menos el 80 % de identidad, tal como al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 98 % o el 100 % de identidad con una secuencia de la región VL seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO:41, 45, 49, 53, 57, 61, 65, 73, 77 y 69; o como máximo 20, tales como modificaciones de 15, o 10, o 5, 4, 3, 2 o 1 aminoácidos, más preferentemente sustituciones de aminoácidos, tales como sustituciones conservativas de aminoácidos en comparación con una secuencia de la región VH seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO:41, 45, 49, 53, 57, 61, 65, 73, 77 y 69.

En otro aspecto de la divulgación, el anticuerpo anti-TF es el anticuerpo monoclonal de longitud completa completamente humano IgG1,κ Anti-TF HuMab 092-A09, Anti-TF HuMab 101, Anti-TF HuMab 025, Anti-TF HuMab 109, Anti-TF HuMab 017-D12, Anti-TF HuMab 114, Anti-TF HuMab 042, Anti-TF HuMab 011, Anti-TF HuMab 098 o Anti-TF HuMab 111 o un anticuerpo que comprende las CDR de VH y VL de cualquiera de los mismos, o un anticuerpo que comprende la secuencia de VH y VL de los mismos. En una realización particular, el anticuerpo anti-TF es HuMab 011 anti-TF, o un anticuerpo que comprende las secuencias CDR1, 2, 3 VH y CDR 1, 2, 3 VL del mismo, o un anticuerpo que comprende las secuencias VH y VL del mismo. En otro aspecto, el anticuerpo anti-TF es HuMab 098 anti-TF, o un anticuerpo que comprende las secuencias CDR1, 2, 3 VH y CDR 1, 2, 3 VL del mismo, o un anticuerpo que comprende las secuencias VH y VL del mismo. En otro aspecto, el anticuerpo anti-TF es HuMab 111 anti-TF, o un anticuerpo que comprende las secuencias CDR1, 2, 3 VH y CDR 1, 2, 3 VL del mismo, o un anticuerpo que comprende las secuencias VH y VL del mismo.

La Tabla 1 establece los identificadores de secuencia específicos (SEQ ID NO) relacionados con las secuencias VH (1A) y VL (1B) de estos anticuerpos.

Tabla 1A

región VH	
SEQ ID NO: 1	VH 114
SEQ ID NO: 2	el documento VH 114, CDR1
SEQ ID NO: 3	el documento VH 114, CDR2
SEQ ID NO: 4	el documento VH 114, CDR3
SEQ ID NO: 5	VH 011
SEQ ID NO: 6	el documento VH 011, CDR1
SEQ ID NO: 7	el documento VH 011, CDR2
SEQ ID NO: 8	el documento VH 011, CDR3

(continuación)

<b>región VH</b>	
SEQ ID NO: 9	VH 017-D12
SEQ ID NO: 10	VH 017-D12, CDR1
SEQ ID NO: 11	VH 017-D12, CDR2
SEQ ID NO: 12	VH 017-D12, CDR3
SEQ ID NO: 13	VH 042
SEQ ID NO: 14	el documento VH 042, CDR1
SEQ ID NO: 15	el documento VH 042, CDR2
SEQ ID NO: 16	el documento VH 042, CDR3
SEQ ID NO: 17	VH 092-A09
SEQ ID NO: 18	VH 092-A09, CDR1
SEQ ID NO: 19	VH 092-A09, CDR2
SEQ ID NO: 20	VH 092-A09, CDR3
SEQ ID NO: 21	VH 101
SEQ ID NO: 22	el documento VH 101, CDR1
SEQ ID NO: 23	el documento VH 101, CDR2
SEQ ID NO: 24	el documento VH 101, CDR3
SEQ ID NO: 25	VH 025
SEQ ID NO: 26	el documento VH 025, CDR1
SEQ ID NO: 27	el documento VH 025, CDR2
SEQ ID NO: 28	el documento VH 025, CDR3
SEQ ID NO: 29	VH 109
SEQ ID NO: 30	el documento VH 109, CDR1
SEQ ID NO: 31	el documento VH 109, CDR2
SEQ ID NO: 32	el documento VH 109, CDR3
SEQ ID NO: 33	VH 098
SEQ ID NO: 34	el documento VH 098, CDR1
SEQ ID NO: 35	el documento VH 098, CDR2
SEQ ID NO: 36	el documento VH 098, CDR3
SEQ ID NO: 37	VH 111
SEQ ID NO: 38	el documento VH 111, CDR1
SEQ ID NO: 39	el documento VH 111, CDR2
SEQ ID NO: 40	el documento VH 111, CDR3

Tabla 1B

<b>región VL</b>	
SEQ ID NO: 41	VL 114
SEQ ID NO: 42	el documento VL 114, CDR1
SEQ ID NO: 43	el documento VL 114, CDR2
SEQ ID NO: 44	el documento VL 114, CDR3
SEQ ID NO: 45	VL 011
SEQ ID NO: 46	el documento VL 011, CDR1
SEQ ID NO: 47	el documento VL 011, CDR2
SEQ ID NO: 48	el documento VL 011, CDR3
SEQ ID NO: 49	VL 017-D12

(continuación)

región VL	
SEQ ID NO: 50	VL 017-D12, CDR1
SEQ ID NO: 51	VL 017-D12, CDR2
SEQ ID NO: 52	VL 017-D12, CDR3
SEQ ID NO: 53	VL 042
SEQ ID NO: 54	el documento VL 042, CDR1
SEQ ID NO: 55	el documento VL 042, CDR2
SEQ ID NO: 56	el documento VL 042, CDR3
SEQ ID NO: 57	VL 092-A09
SEQ ID NO: 58	VL 092-A09, CDR1
SEQ ID NO: 59	VL 092-A09, CDR2
SEQ ID NO: 60	VL 092-A09, CDR3
SEQ ID NO: 61	VL 101
SEQ ID NO: 62	el documento VL 101, CDR1
SEQ ID NO: 63	el documento VL 101, CDR2
SEQ ID NO: 64	el documento VL 101, CDR3
SEQ ID NO: 65	VL 025
SEQ ID NO: 66	el documento VL 025, CDR1
SEQ ID NO: 67	el documento VL 025, CDR2
SEQ ID NO: 68	el documento VL 025, CDR3
SEQ ID NO: 69	VL 109
SEQ ID NO: 70	el documento VL 109, CDR1
SEQ ID NO: 71	el documento VL 109, CDR2
SEQ ID NO: 72	el documento VL 109, CDR3
SEQ ID NO: 73	VL 098
SEQ ID NO: 74	el documento VL 098, CDR1
SEQ ID NO: 75	el documento VL 098, CDR2
SEQ ID NO: 76	el documento VL 098, CDR3
SEQ ID NO: 77	VL 111
SEQ ID NO: 78	el documento VL 111, CDR1
SEQ ID NO: 79	el documento VL 111, CDR2
SEQ ID NO: 80	el documento VL 111, CDR3

En una realización particularmente preferida, el ADC es HuMax TF ADC (IgG1, vcMMAE), que es un ADC compuesto por un anticuerpo monoclonal humano IgG1,κ 011 contra TF conjugado mediante un enlazador de valina citrulina escindible mediante proteasa al fármaco monometil auristatina E (vcMMAE). La identificación y la producción de este anticuerpo se describe en el documento WO 2011157741. Cada molécula de anticuerpo monoclonal (mAb) transporta un promedio de 4 moléculas de fármaco. La porción de anticuerpo tiene un peso molecular aproximado de 147 kDa. En promedio, se fijan cuatro moléculas de vcMMAE (peso molecular de 1,3 kDa) a cada molécula de mAb produciendo un peso molecular promedio total de HuMax TF ADC de 152 kDa. El punto isoelectrico de HuMax-TF-ADC es aproximadamente 8,7.

#### Formulación

Las formulaciones terapéuticas de los anticuerpos usados de acuerdo con la presente invención se preparan para su almacenamiento mezclando un ADC que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizantes opcionales farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, los excipientes o los estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas.

Generalmente, las formulaciones liofilizadas y reconstituidas de acuerdo con la divulgación comprenden un ADC anti-

TF, un agente tampón, un agente estabilizante (normalmente un azúcar no reductor o un alcohol de azúcar o un aminoácido) y un agente de carga. Los agentes estabilizantes preferidos son sacarosa, trehalosa y combinaciones de los mismos. Los agentes de carga preferidos son manitol, glicina y combinaciones de los mismos.

- 5 El término "tampón" como se usa en el presente documento denota un tampón farmacéuticamente aceptable. Generalmente, el tampón tiene un pKa y una capacidad tampón adecuada para el intervalo de pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 7, preferentemente de aproximadamente 5,5 a 6,5, tal como aproximadamente pH 6 o aproximadamente pH 6,0. Para formulaciones liofilizadas, los componentes del tampón no deben cristalizar a temperaturas inferiores a la ambiental en la concentración usada. Se prefieren los tampones que tienen una
- 10 temperatura de colapso más alta, ya que permitirá un ciclo de liofilización más rápido y robusto. Los tampones farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a, tampones histidina, tampones citrato, tampones succinato, tampones ácido carbónico, tampones fosfato, tampones glicolato, tampones TRIS® (tris(hidroximetil)aminometano) y mezclas de los mismos. Los tampones preferidos se basan en L-histidina, citrato, fosfato, ácido carbónico, succinato y/o glicolato, tales como histidina y/o citrato, e incluyen también mezclas, por
- 15 ejemplo, de L-histidina con clorhidrato de L-histidina o con TRIS® (tris(hidroximetil)aminometano). Potencialmente, puede ser necesario un ajuste del pH con un ácido o una base conocida en la técnica. Los tampones mencionados anteriormente L-histidina, citrato, fosfato, ácido carbónico, succinato y/o glicolato se usan generalmente en una cantidad de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 100 mM, tal como de aproximadamente 5 a aproximadamente 80 mM, preferentemente de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 50 mM, más
- 20 preferentemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 mM y aún más preferentemente de aproximadamente 30 mM. La concentración de un tampón fosfato está preferentemente en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 30 mM. Independientemente del tampón usado, el pH puede ajustarse a un valor en el intervalo que comprende de aproximadamente 5 a aproximadamente 7 y preferentemente de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5 y lo más preferentemente de aproximadamente 6,0 mediante ajuste
- 25 con un ácido o base conocido en la técnica o usando mezclas adecuadas de componentes tampón o ambos. Preferentemente, el tampón comprende un tampón histidina y/o citrato a una concentración de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 mM, tal como un tampón histidina a una concentración de aproximadamente 30 mM.

- La formulación de la invención puede comprender además uno o más estabilizantes farmacéuticamente aceptables como se definen anteriormente en el presente documento e ingredientes también conocidos en la técnica como
- 30 "lioprotectores" tales como azúcares, alcoholes de azúcar, aminoazúcares, aminoácidos y dextranos como se conocen en la técnica. Normalmente, puede usarse un estabilizante farmacéuticamente aceptable en una cantidad de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 500 mM. Los azúcares adecuados comprenden pero no se limitan a monosacáridos y disacáridos. Los ejemplos no limitantes de azúcares y alcoholes de azúcar para su uso de acuerdo
- 35 con la invención incluyen trehalosa, sacarosa, manitol, sorbitol, manosa, maltosa, galactosa, fructosa, sorbosa, rafinosa, glucosamina, N-metilglucosamina (también denominada "meglumina"), galactosamina y ácido neuramínico y combinaciones de los mismos. Se prefieren los azúcares no reductores y los alcoholes de azúcar, tales como sacarosa o trehalosa, a concentraciones de aproximadamente 10 a aproximadamente 250 mM, tal como de aproximadamente 50 a 225 mM, tal como de aproximadamente 84 a 146, tal como de aproximadamente 84 a 92 mM. La más preferida
- 40 es la sacarosa.

En una realización la formulación comprende sacarosa de 84 a 92 mM, tales como sacarosa 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91 o 92 mM. Lo más preferido es que la formulación comprenda sacarosa 88 mM.

- 45 Particularmente, también pueden usarse alcoholes de azúcar tales como manitol como agente de carga para producir una torta de liofilización homogénea y estable, que pueda reconstituirse en un tiempo aceptable, más específicamente en 0 - 600 segundos. En general, se usa un "agente de carga" cuando la cantidad total de API es demasiado pequeña para proporcionar una estructura adecuada a la torta. Los agentes de carga deben proporcionar una matriz inerte que proporcione una torta farmacéuticamente elegante. El agente de carga también modifica las características térmicas
- 50 de una formulación. La concentración del fármaco activo es a menudo tan baja que las características de liofilización del sistema se deben únicamente al agente de carga. Los agentes de carga comunes incluyen manitol, glicina como agentes de carga cristalinos; sacarosa, trehalosa, gelatina, dextrano como agentes de carga amorfos. Los agentes de carga preferidos son manitol y glicina.

- 55 En una realización, la formulación comprende de aproximadamente 158 a aproximadamente 274 mM de manitol, tal como 160 mM, 162 mM, 165 mM, 170 mM, 180 mM o 200 mM de manitol. Lo más preferido es que comprenda aproximadamente 165 mM de manitol o 165 mM de manitol.

- Las formulaciones liofilizadas de acuerdo con la invención están diseñadas de tal manera que sea posible excluir los
- 60 tensioactivos. Sin embargo, como puede apreciar una persona experta en la materia, para algunos fines puede ser sin embargo deseable incluir un tensioactivo. Los tensioactivos farmacéuticamente aceptables adecuados comprenden pero no se limitan a ésteres de ácidos grasos de polietilensorbitán, polietilen-polipropilenglicoles, estearatos de polioxietileno y dodecilsulfatos sódicos. Los ésteres de ácidos grasos de polietilen-sorbitán incluyen ésteres de polietilen(20)-sorbitán (sinónimo de polisorbato 20, vendido bajo la marca comercial (TM) Tween 20(TM) y monooleato
- 65 de polioxietileno(20)sorbitán (sinónimo de polisorbato 80 vendido bajo la marca comercial Tween 80(TM)). Los polietilén-polipropilenglicoles son los que se venden con los nombres Pluronic(R) F68 o Poloxamer 188(TM). Los

estearatos de polioxietileno se venden bajo la marca registrada Myrj(TM). Los polioxietileno monolauril éter son los que se venden bajo la marca comercial Brij(TM). Cuando sea deseable, pueden usarse ésteres de polietilen-sorbitán-polietilen(20)-sorbitán (Tween 20(TM)) y monooleato de polioxietileno(20)sorbitán (Tween 80(TM)), por ejemplo, en una cantidad de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 0,06 %, tal como de aproximadamente el 0,02 % a aproximadamente el 0,04 %.

Determinadas formulaciones liofilizadas de acuerdo con la invención están diseñadas de tal manera que sea posible excluir sales inorgánicas tales como cloruro sódico (NaCl), a menudo usado como agente de isotonicidad, del líquido previo a la liofilización y de la formulación liofilizada. Otros ejemplos de sales incluyen sales de cualquier combinación de los cationes sodio potasio, calcio o magnesio con aniones cloruro, fosfato, citrato, succinato, sulfato o mezclas de los mismos. Sin embargo, como puede apreciar una persona experta en la materia, para algunos fines puede ser deseable incluir sales inorgánicas, por ejemplo, para la reconstitución de la formulación liofilizada, es decir, como un diluyente como se describe a continuación.

La formulación de la invención puede comprender además uno o más de los siguientes ingredientes: antioxidantes, ácido ascórbico, glutatión, conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilo amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; parabenos de alquilo tales como parabeno de metilo o propilo; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); ciclodextrina, por ejemplo, hidroxipropil-ciclodextrina, sulfobutiletil-ciclodextrina, [beta]-ciclodextrina, polietilenglicol, por ejemplo, PEG 3000, 3350, 4000 o 6000; polipéptidos de bajo peso molecular (de menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; agentes quelantes tales como EDTA; contraiones formadores de sales tales como sodio; y complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína).

#### Proceso

La liofilización generalmente contiene tres etapas principales: congelación, secado primario y secado secundario. La primera fase consiste en congelar el producto a una temperatura inferior a la temperatura eutéctica o de transición vítrea del producto. La velocidad de congelación afecta al tamaño de los cristales de agua y a la velocidad de secado posterior. La segunda fase es el secado primario, que elimina el agua disolvente (hielo). Es importante que la temperatura del producto permanezca por debajo de la temperatura de colapso y que todo el hielo/agua se sublime. La tercera fase es el secado secundario que elimina el agua "unida" o el agua del soluto, durante el cual la temperatura del estante a menudo se eleva a más de 40 °C para acelerar el proceso de desorción. Los métodos de liofilización adecuados para formulaciones de anticuerpos y otras proteínas o conjugados de proteínas son bien conocidos por una persona experta en la materia y se describen en, por ejemplo, "Lyophilization of Biopharmaceuticals" por Henry R. Costantino y Michael J. Pikal; "Freeze Drying / Lyophilization of Pharmaceuticals and Biological Products" por Louis Rey y Joan C. May.

En un aspecto de la divulgación, la liofilización de la solución acuosa comprende las etapas de:

- a. enfriar la solución acuosa de 0,3 °C/min a 3 °C/min a entre -40 °C y -60;
- b. mantener isotérmicamente durante al menos 120 min;
- c. calentar a entre -20 °C y -15 °C a una velocidad de 0,3 °C/min a 6 °C/min;
- d. mantener isotérmicamente durante al menos 180 min;
- e. aplicar vacío usando una presión de entre 3,99 Pa y 39,99 Pa (30 mTorr y 300 mTorr) a una temperatura de entre -40 °C y -10 °C;
- f. aumentar la temperatura a entre 35 °C y 50 °C a entre 0,3 °C/min y 3 °C/min y
- g. mantener isotérmicamente durante al menos 10 horas o hasta que la humedad residual no supere el 2 %.

En una realización de la invención la liofilización de la solución acuosa comprende las etapas de:

- a. enfriar la solución acuosa a una velocidad de 0,5 °C/min a 1 °C/min a -40 °C o menos;
- b. mantener isotérmicamente durante al menos 120 min;
- c. calentar a entre -20 °C y -15 °C a una velocidad de 0,5 °C/min a 3 °C/min;
- d. mantener isotérmicamente durante al menos 180 min;
- e. aplicar vacío usando una presión de entre 6,66 Pa y 26,66 Pa (50 mTorr y 200 mTorr) a una temperatura de entre -30 °C y -10 °C;
- f. aumentar la temperatura a entre 35 °C y 50 °C a una velocidad de 0,5 °C/min y 1 °C/min y
- g. mantener isotérmicamente durante al menos 10 horas.

En una realización, la etapa de enfriamiento a) se realiza enfriando la solución acuosa a al menos 0,3 °C/min tal como 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9 o 3,0 °C/min hasta una temperatura de -40 °C.

En otra realización, la etapa de enfriamiento a) se realiza enfriando la solución acuosa a al menos 0,3 °C/min tal como 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9 o 3,0 °C/min hasta una temperatura de -50 °C.

En otra realización, la etapa de enfriamiento a) se realiza enfriando la solución acuosa a al menos 0,3 °C/min tal como 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9 o 3,0 °C/min hasta una temperatura de -60 °C.

5 En otra realización la etapa de calentamiento c) se realiza calentando el material con al menos 0,3 °C/min tal como 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,5, 3,8, 3,9, 4,0, 4,5, 5,0 o 6,0 °C/min a una temperatura de -15 °C.

10 En otra realización la etapa de calentamiento c) se realiza calentando el material con al menos 0,3 °C/min tal como 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,5, 3,8, 3,9, 4,0, 4,5, 5,0 o 6,0 °C/min a una temperatura de -20 °C.

15 En otra realización, el aumento de temperatura de la etapa f) se realiza con al menos 0,3 °C/min, tal como 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9 o 3,0 °C/min hasta una temperatura de 35 °C.

20 En otra realización, el aumento de temperatura de la etapa f) se realiza con al menos 0,3 °C/min, tal como 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9 o 3,0 °C/min hasta una temperatura de 40 °C.

25 En otra realización, el aumento de temperatura de la etapa f) se realiza con al menos 0,3 °C/min, tal como 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9 o 3,0 °C/min hasta una temperatura de 50 °C.

#### Uso

30 En otro aspecto la invención proporciona una formulación de ADC como se define en cualquiera de los aspectos o realizaciones del presente documento para su uso en el tratamiento del cáncer. Los cánceres ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, aquellos provocados por tumores del sistema nervioso central, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, tales como NSCLC, cáncer de mama, específicamente cáncer de mama triple negativo, cáncer esofágico, cáncer gástrico o de estómago, cáncer de hígado y biliar, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de endometrio, cáncer de ovario, melanoma maligno, sarcoma, tumores de origen primario desconocido, cáncer de médula ósea, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfoblástica crónica y linfoma no Hodgkin, cáncer de piel, glioma, cáncer del cerebro, útero, leucemia mieloide aguda y recto. En una  
35 realización, la parte de anticuerpo del ADC es un anticuerpo anti-TF y la formulación de la invención se administra a un sujeto que padece cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de próstata o cáncer de ovario.

40 Antes de la administración a un sujeto, se disuelve una formulación liofilizada de la invención que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de ADC, es decir, se reconstituye, en un diluyente farmacéuticamente aceptable. Los diluyentes ilustrativos no limitantes incluyen agua estéril de calidad farmacéutica (agua para inyección, WFI) o solución salina, agua bacteriostática para inyección (BWFI), una solución tamponada con pH (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato), solución de Ringer y solución de dextrosa. Por ejemplo, una formulación liofilizada de la invención puede reconstituirse en agua, solución tamponada con pH (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato), solución de Ringer y solución de dextrosa. Por ejemplo, una formulación liofilizada de la invención puede reconstituirse en agua estéril para inyección (WFI) hasta una concentración de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 mg/ml de ADC, tal como de aproximadamente 7 a aproximadamente 20 mg/ml de ADC, tal como de aproximadamente 8 a 15 mg/ml de ADC, tal como de aproximadamente 9 a aproximadamente 11 mg/ml de ADC, tal como de aproximadamente 10 mg/ml de ADC. Opcionalmente el concentrado puede diluirse aún más para, por ejemplo, infusión en una solución tamponada con pH (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y/o solución de dextrosa) hasta una concentración de aproximadamente 0,05 mg/ml a 30 mg/ml de ADC, tales como, por ejemplo, de 0,12 mg/ml a 2,40 mg/ml ADC.

55 Normalmente, la formulación reconstituida de la presente invención es adecuada para administración parenteral. Las expresiones "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral" como se usan en el presente documento significan modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, generalmente mediante inyección o infusión, e incluyen inyección e infusión epidérmica, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, intratendinosa, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, intracraneal, intratorácica, epidural e intraesternal. En una  
60 realización, la composición farmacéutica se administra mediante inyección o infusión intravenosa o subcutánea, por ejemplo, reconstituyendo la formulación liofilizada en agua estéril o solución salina y manteniéndola en bolsas o jeringas IV antes de la administración a un sujeto.

65 La invención también proporciona un kit que comprende la formulación liofilizada de un ADC anti-TF de acuerdo con la invención, normalmente en un recipiente herméticamente cerrado tal como un vial, una ampolla o bolsita, indicando



la cantidad del principio activo. Cuando el medicamento se administra mediante inyección, una ampolla de agua esterilizada para inyección o solución salina puede, por ejemplo, proporcionarse, opcionalmente como parte del kit, de tal manera que los ingredientes puedan mezclarse antes de la administración. Dichos kits pueden incluir además, si se desea, uno o más de diversos componentes de kits farmacéuticos convencionales, tales como, por ejemplo, recipientes con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, recipientes adicionales, etc., como resultará fácilmente evidente para un experto en la materia. Las instrucciones impresas, ya sea como inserciones o como etiquetas, que indiquen las cantidades de los componentes a administrar, las pautas de administración y/o las pautas de mezcla de los componentes, también pueden incluirse en el kit.

#### EJEMPLO 1

Este ejemplo muestra el efecto de determinados tampones y valores de pH sobre la estabilidad térmica de Anti-TF HuMab 098 (véase el documento WO2011157741 A2), denominado en el presente documento HuMax-TF. Un estudio de estabilidad acelerada para excipientes seleccionados, tampones y las condiciones de pH se diseñaron usando los sistemas de tampón histidina y acetato a un pH de 4,5-6,5.

El DOE (Diseño de Experimentos) usado fue un diseño lineal de superficie de respuesta con un factor numérico (pH) y dos categóricos (tipos de tampón y excipiente). El DOE incluyó muestras duplicadas para cada composición de formulación para evaluar la variabilidad experimental asociada a los diversos métodos biofísicos y analíticos. En el estudio se incluyeron muestras adicionales fuera del DOE a 50 mg/ml en las formulaciones de punto central y a 20 mg/ml con excipientes combinados de sorbitol y cloruro sódico. La Tabla 2 muestra el diseño de preformulación de muestras experimentales (DOE) para HuMax-TF.

Tabla 2

	pH	Tampón	Excipiente	Conc. de proteína (mg/ml)
A	4,5	Acetato 30 mM	NaCl 140 mM	20
B	4,5	Acetato 30 mM	NaCl 140 mM	20
C	5,0	Acetato 30 mM	NaCl 140 mM	20
D	6,0	Histidina 30 mM	NaCl 140 mM	20
E	6,5	Histidina 30 mM	NaCl 140 mM	20
F	5,5	Histidina 30 mM	NaCl 140 mM	20
G	5,5	Acetato 30 mM	NaCl 140 mM	20
H	4,5	Acetato 30 mM	sorbitol 225 mM	20
I	5,5	Histidina 30 mM	sorbitol 225 mM	20
J	5,5	Acetato 30 mM	NaCl 140 mM	20
K	6,0	Histidina 30 mM	sorbitol 225 mM	20
L	6,5	Histidina 30 mM	NaCl 140 mM	20
M	6,0	Histidina 30 mM	NaCl 140 mM	20
N	6,5	Histidina 30 mM	sorbitol 225 mM	20
O	5,0	Acetato 30 mM	sorbitol 225 mM	20
P	5,5	Acetato 30 mM	sorbitol 225 mM	20
Q	5,5	Histidina 30 mM	sorbitol 225 mM	20
R	5,0	Acetato 30 mM	NaCl 140 mM	20
S	5,5	Acetato 30 mM	sorbitol 225 mM	20
T	6,5	Histidina 30 mM	sorbitol 225 mM	20
U	5,0	Acetato 30 mM	sorbitol 225 mM	20
V	4,5	Acetato 30 mM	sorbitol 225 mM	20
W	5,5	Histidina 30 mM	NaCl 140 mM	20
X	6,0	Histidina 30 mM	sorbitol 225 mM	20
Composiciones fuera del DOE para una mayor concentración de proteínas				
Y	5,0	Acetato 30 mM	sorbitol 225 mM	50
Z	5,0	Acetato 30 mM	NaCl 140 mM	50

(continuación)

	pH	Tampón	Excipiente	Conc. de proteína (mg/ml)
AA	6,0	Histidina 30 mM	sorbitol 225 mM	50
BB	6,0	Histidina 30 mM	NaCl 140 mM	50
Composiciones fuera del DOE para mezclas de excipientes				
CC	5,0	Acetato 30 mM	sorbitol 110 mM + NaCl 70 mM	20
DD	6,0	Histidina 30 mM	sorbitol 110 mM + NaCl 70 mM	20

Las muestras de estabilidad acelerada se probaron mediante una diversidad de métodos analíticos. Los resultados seleccionados se analizan en los Ejemplos 2, 3 y 4.

5

## EJEMPLO 2

Las muestras de HuMax-TF incubadas a 5 y 45 °C (sin estrés y estresadas, respectivamente) durante cuatro semanas se analizaron mediante SEC (cromatografía de exclusión por tamaño) para determinar el efecto de diversas formulaciones sobre el grado de agregación y degradación. Los cromatogramas SEC de muestras HuMax-TF no estresadas mostraron un pico principal que correspondía al anticuerpo monomérico y representaba más del 98 % del área total del pico. Este pico principal de SEC reflejó la homogeneidad del tamaño del anticuerpo en cada formulación. Para la comparación de datos SEC entre diversas formulaciones, los valores del área del pico para las especies que eluyeron antes del pico principal se combinaron y se informaron como porcentaje de HMW. De forma similar, los valores del área del pico para las especies que eluyeron después del pico principal se combinaron y se informaron como porcentaje degradado. Los gráficos de barras presentados en la Figura 1 no mostraron tendencias significativas para ninguna de las especies para ninguna de las formulaciones en condiciones sin estrés. Para las condiciones estresadas, sin embargo, se observó un aumento de % de HMW y % de LMW y una disminución de los valores % principal debido a la agregación y la degradación. Se observaron valores de % de HMW y % de LMW más altos para las formulaciones de acetato en relación con las formulaciones de histidina. Para ambos tipos de tampón, y más notablemente en formulaciones de acetato, las especies % de HMW y % de LMW disminuyeron al aumentar el pH y con el sorbitol en relación con el cloruro sódico.

## EJEMPLO 3

25

El análisis SDS-PAGE se realizó en condiciones reductoras y no reductoras para muestras DOE seleccionadas de cuatro semanas. En condiciones reductoras, la banda de cadena pesada apareció en aproximadamente 54 kDa y la banda de cadena ligera apareció en aproximadamente 26 kDa. En condiciones no reductoras, la banda principal de HuMax-TF migró a aproximadamente 145 kDa. Las muestras se analizaron usando SDS-PAGE reductor y no reductor. En comparación con las muestras no estresadas, las formulaciones bajo estrés térmico mostraron un aumento en la intensidad de las bandas de BPM por debajo de la IgG intacta en el gel no reducido. De forma similar, se observaron mayores intensidades de nuevas bandas entre las bandas de cadena pesada y ligera para las muestras estresadas en relación con las muestras no estresadas. Tanto para las muestras reducidas como para las no reducidas, las formulaciones de acetato mostraron un mayor aumento en la intensidad de estas especies degradadas en relación con las formulaciones de histidina.

## EJEMPLO 4

Las muestras de HuMax-TF DOE estresadas y no estresadas de una semana se analizaron usando cIEF (isoelectroenfoque capilar con imágenes) para evaluar los efectos de varios componentes de la formulación en las áreas de los picos observados. Los resultados se muestran en la Figura 2. Los valores porcentuales del área del pico para las especies con valores de pI inferiores a los del pico principal se combinaron y se informaron como porcentaje de ácido, y los valores porcentuales del área del pico para las especies con valores de pI superiores a los del pico principal se combinaron y se informaron como por ciento básico.

45

El análisis cIEF de muestras HuMax-TF DOE no estresadas presentadas en la Figura 2 no mostró ninguna tendencia obvia en cuanto a la dependencia de los resultados cIEF del pH, el tipo de tampón o el tipo de excipiente para las muestras no estresadas. El análisis del cIEF de muestras del DOE estresadas mostró una disminución del 5-13 % en el área porcentual del pico principal. La disminución en el área del pico principal se produjo concomitantemente con un aumento en el área del pico para las especies ácidas y, para la mayoría de las formulaciones, un aumento en el porcentaje del área de pico básico también. Los cambios en el porcentaje de especies ácidas representados en los gráficos de barras no mostraron una dependencia obvia del pH, pero las formulaciones de acetato generalmente mostraron áreas de picos porcentuales de acidez ligeramente menores que las formulaciones de histidina. Sin embargo, el porcentaje de especies básicas mostró una fuerte dependencia del pH y el porcentaje de áreas de picos básicos disminuyó al aumentar el pH. Adicionalmente, las formulaciones de histidina mostraron un porcentaje de especies básicas más bajo que las formulaciones de acetato.

55

## EJEMPLO 5

Se diseñó un estudio de detección para probar el efecto del pH, la presencia de polisorbato y la presencia de sorbitol sobre la estabilidad de HuMax-TF-ADC en solución. HuMax-TF-ADC es un conjugado de anticuerpo y fármaco compuesto por el anticuerpo monoclonal humano IgG1 HuMax-TF 011 conjugado químicamente mediante un enlazador de valina citrulina (vc) escindible mediante proteasa al agente disruptor de microtúbulos monometil auristatina E (MMAE).

Se prepararon doce formulaciones diferentes usando 3 valores de pH diferentes. El diseño del estudio de formulación de la solución se muestra en la Tabla 3. Todas las formulaciones contenían HuMax-TF-ADC a 10 mg/ml con Histidina 30 mM. Tween = polisorbato 80 (PS80).

Tabla 3

Formulación	pH	Concentración de Tween (%)	Sorbitol (mM)
1	5,5	0	0
2	5,5	0	225
3	5,5	0,02	0
4	5,5	0,02	225
5	6,0	0	0
6	6,0	0	225
7	6,0	0,02	0
8	6,0	0,02	225
9	6,5	0	0
10	6,5	0	225
11	6,5	0,02	0
12	6,5	0,02	225

Las 12 formulaciones preparadas para el estudio de detección se analizaron mediante UV/Vis (espectroscopia ultravioleta-visible), icIEF, SEC y DAR-HIC (relación molar fármaco-anticuerpo mediante cromatografía de interacción hidrófoba). Los estudios de selección de formulaciones habían demostrado que los principales parámetros indicadores de estabilidad para HuMax-TF-ADC eran los agregados medidos por SEC y las isoformas ácidas (presumiblemente debido a la desamidación) medidas por icIEF.

El efecto del pH sobre el porcentaje de formación de HMW en muestras de solución almacenadas a 40 °C durante 2 semanas se midió mediante SEC (la Figura 3 muestra el % de HMW de SEC para las formulaciones 1, 5 y 9 en la tabla 3). Se demostró que un pH de 6,0 era el más eficaz para limitar la agregación de HuMax-TF-ADC en el tampón de histidina.

El efecto del pH sobre la desamidación de HuMax-TF-ADC en muestras de solución almacenadas a 40 °C durante 2 semanas se midió mediante el aumento de especies ácidas en icIEF (la Figura 4 muestra los resultados de las formulaciones 1, 5 y 9 en la tabla 3). Se encontró que un pH de 5,5 era más eficaz para limitar la desamidación, seguido de pH 6,0 y pH 6,5.

El uso de sorbitol o PS80 no tuvo ningún efecto marcado en el porcentaje de pico de carga principal según icIEF, así como el pico principal por SEC, en las formulaciones de HuMax-TF-ADC almacenadas a 40 °C durante 2 semanas (Figura 5A y 5B). Esto muestra que la formulación puede estar libre de tensioactivos.

## EJEMPLO 6

La selección de la formulación había demostrado que los principales parámetros indicadores de estabilidad eran los agregados medidos por SEC y las isoformas ácidas (presumiblemente desamidación) medidas por icIEF. La tasa de desamidación en todas las formulaciones líquidas probadas, medida en condiciones aceleradas, fue rápida, por lo tanto, las formulaciones líquidas probadas de HuMax-TF-ADC eran claramente inestables. En la Figura 6 se muestra una comparación entre algunas formulaciones líquidas y formulaciones liofilizadas preliminares.

## EJEMPLO 7

Se llevó a cabo un estudio piloto de liofilización con dos formulaciones que contenían diferentes concentraciones de sacarosa (150 mM y 250 mM), 10 mg/ml de HuMax-TF-ADC en un tampón de histidina 30 mM a pH 6,0 para investigar la posible influencia del volumen de llenado y el volumen/la forma del vial en la torta liofilizada. Para la histidina, la

formulación de sacarosa de HuMax-TF-ADC, las apariencias de la torta liofilizada fueron diferentes según los diferentes volúmenes de llenado y tamaños de vial:

A: El primer grupo de muestras de una formulación se vertió en viales de vidrio de 0,25 ml por 2 ml y se liofilizó. Las muestras parecían farmacéuticamente elegantes sin signos evidentes de colapso.

B: El segundo grupo de muestras con la misma formulación se estaba liofilizando simultáneamente usando un volumen de llenado de 4 ml en un vial de 10 ml, usando el mismo ciclo de liofilización. Las muestras aparecieron con una contracción severa.

En consecuencia, la formulación podría soportar una torta farmacéuticamente elegante para un volumen de llenado bajo de 0,25 ml en un vial de vidrio de 2 ml, pero es menos adecuada para un volumen de llenado mayor de 4 ml en un vial de 10 ml.

#### EJEMPLO 8

El objetivo de este ejemplo fue probar los efectos de las concentraciones de sacarosa y manitol sobre la estabilidad de formulaciones liofilizadas para HuMax-TF-ADC.

Las pruebas iniciales demostraron que la sacarosa puede sustituirse fácilmente por trehalosa, manteniendo las propiedades primarias de la formulación. Las pruebas continuaron usando sacarosa únicamente.

Tres formulaciones liofilizadas diferentes que contienen 10 mg/ml de HuMax-TF-ADC, histidina 30 mM, a pH 6,0 se prepararon con diferentes concentraciones de sacarosa y manitol. Los detalles se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4

Formulación	HuMax-TF-ADC	Histidina	Sacarosa	Manitol
A	10 mg/ml	30 mM	225 mM (7,7 % p/v)	274 mM (5 % p/v)
B	10 mg/ml	30 mM	88 mM (3 % p/v)	165 mM (3 % p/v)
C	10 mg/ml	30 mM	160 mM (5,5 % p/v)	274 mM (5 % p/v)

Las formulaciones liofilizadas con diferentes concentraciones de sacarosa y manitol se sometieron a pruebas de estabilidad acelerada a 25 °C, 40 °C y 50 °C. Las muestras estresadas se analizaron mediante métodos tales como SEC (cromatografía de exclusión por tamaño), icIEF (isoelectroenfoque capilar con imágenes), FTIR (espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier), DLS (dispersión dinámica de luz). Los datos de estabilidad acelerada para las 3 formulaciones mostraron que la formulación B tenía una ventaja sobre las otras formulaciones en cuanto a los agregados y la isoforma de carga principal, especialmente al comparar los datos de estabilidad a 50 °C y 40 °C. En la Figura 7 se muestran resultados ilustrativos.

Adicionalmente, la formulación B mostró el menor crecimiento en más partículas después del almacenamiento a 40 °C durante 2 meses, en comparación con las formulaciones A y C (Figura 8).

No se observaron cambios aparentes en la región de amida I de los espectros FTIR de la segunda derivada para las formulaciones A, B y C después del almacenamiento a 50 °C durante 2 semanas (Figura 9). Los datos sugirieron que la estructura secundaria de la molécula permaneció igual en cada formulación cuando se almacenó en condiciones de temperatura estresadas.

#### EJEMPLO 11

Este ejemplo verificó la idoneidad del manitol como un agente de carga cristalino en la formulación HuMax-TF-ADC, especialmente, la temperatura de recocido y el tiempo para la cristalización del manitol en la formulación liofilizada para HuMax-TF-ADC. La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es una técnica termoanalítica que mide la energía directamente y permite mediciones precisas de la capacidad calorífica de las muestras. Cuando la muestra sufre una transformación física como transiciones de fase, la diferencia en el flujo de calor entre la muestra y la referencia puede detectarse mediante DSC.

En el ejemplo actual, se usó DSC para determinar el tiempo requerido para el inicio de la cristalización del manitol en la formulación. Se probaron dos temperaturas de recocido diferentes (-15 °C y -20 °C). Después de que las soluciones se enfriaron a -40 °C a 1 °C/min, la temperatura se aumentó a -15 °C o -20 °C a 1 °C/min y se mantuvo isotérmicamente durante 120 minutos. El tiempo de inicio para la cristalización del manitol para la Formulación B fue de aproximadamente 10 minutos cuando se recoció a -15 °C o -20 °C, como se muestra en la Figura 10. Los datos demostraron que el manitol cristalizó fácilmente durante el recocido, por lo tanto funciona bien como agente de carga cristalino en la formulación.

## EJEMPLO 10

Se evaluaron muestras de formulación liofilizada de HuMax TF-ADC en programas de estabilidad acelerada y a largo plazo. La composición de la formulación de HuMax-TF-ADC después de la reconstitución es de 10 mg/ml formulada en histidina 30 mM (correspondiente a 4,65 mg/ml), sacarosa 88 mM (correspondiente a alrededor de 30 mg/ml), manitol 165 mM (correspondiente a alrededor de 30 mg/ml), pH 6,0. Las muestras de estabilidad a largo plazo se analizaron a tiempo cero, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 9 meses, 12 meses y a 18 meses, etc. La formulación liofilizada se reconstituyó, en los diferentes puntos temporales, con agua para inyección (WFI, por sus siglas en inglés) y se probó mediante métodos analíticos que incluyen SEC, HIC, CE-SDS e icIEF.

Después de al menos 6 meses de almacenamiento a  $5 \pm 3^\circ\text{C}$  y  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , todas las muestras permanecieron estables mediante todos los métodos de prueba. Las muestras almacenadas a  $5 \pm 3^\circ\text{C}$  y  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  no mostraron cambios significativos mediante ningún método de prueba al menos durante 6 meses en comparación con el inicio del estudio. Se observaron cambios menores esperados en el perfil de pureza durante las pruebas de estabilidad acelerada a  $25^\circ\text{C}$  mediante icIEF, CE-SDS reducido y SEC de prueba.

En particular, con respecto a la agregación, el análisis SEC mostró que el porcentaje de agregados se mantuvo alrededor del 2,2 % para las muestras tanto a  $5 \pm 3^\circ\text{C}$  como a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  durante al menos 6 meses. Se usó icIEF para determinar cambios en el perfil de carga de HuMax-TF-ADC. Para muestras almacenadas a  $5 \pm 3^\circ\text{C}$ , los cambios de la isoforma de carga principal están dentro del 0,4 % y para las muestras almacenadas a  $25^\circ\text{C}$ , el cambio es solo del 1,7 %, durante al menos 6 meses en comparación con el tiempo cero.

Adicionalmente, el DAR promedio (moles de auristatinas/moles de mAb), la carga de fármaco y el fármaco libre permanecen casi constantes durante al menos 6 meses tanto a  $5^\circ\text{C}$  como a  $25^\circ\text{C}$ . No hay signos de degradación durante al menos 6 meses tanto a  $5^\circ\text{C}$  como a  $25^\circ\text{C}$ , como lo muestran CE-SDS (no reducido) y CE-SDS (reducido), así como LMW por SEC. Por último, pero no menos importante, el bioensayo de Citotoxicidad demostró que la función biológica de HuMaxTF-ADC podría conservarse durante al menos 6 meses tanto a  $5^\circ\text{C}$  como a  $25^\circ\text{C}$ . Por lo tanto, HuMax-TF-ADC en dicha formulación es aceptablemente estable para uso farmacéutico.

Tabla 5A Datos de ejemplo del programa de estabilidad del producto farmacéutico HuMax-TF-ADC a  $5 \pm 3^\circ\text{C}$

Ensayo	Punto temporal (meses)				
	0	1	2	3	6
% principal de SEC	97,6	97,7	97,8	97,7	97,6
% de HMW SEC	2,3	2,2	2,1	2,2	2,2
% de LMW SEC	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2
DAR promedio por HIC (moles de auristatinas/moles de mAb)	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1
Carga de fármaco o anticuerpo no conjugado por HIC (% de área)	1,9	1,8	1,9	1,8	1,8
CE-SDS (no reducido)	CP	CR	CP	CR	CR
CE-SDS (reducido)	CP	CR	CP	CR	CR
CE-SDS (reducido) % LC0 + LC1	31,8	31,9	32,8	32,0	30,5
CE-SDS (reducido) % de HC	66,2	65,9	65,3	65,9	67,2
CE-SDS (reducido) LC0 + LC1 + HC	98,0	97,8	98,1	97,9	97,7
Fármaco libre (p/p % de fármaco libre/mAb)	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
% Principal icIEF	70,3	70,7	NA	69,6	69,9
% Ácido icIEF	25,2	24,2	NA	24,7	25,2
% Básico icIEF	4,5	5,2	NA	5,7	4,9
Citotoxicidad (basada en el patrón de referencia)	106	102	111	122	100

(continuación)

Ensayo	Punto temporal (meses)				
Particulados visibles	Prácticamente libre de partículas visibles	Prácticamente libre de partículas visibles	Prácticamente libre de partículas visibles	Prácticamente libre de partículas visibles	Prácticamente libre de partículas visibles
<b>CR= Comparable al patrón de referencia; HC= Cadena pesada; LC= Cadena ligera; TQI= Total de impurezas cuantificables; NT= No probado; NA= No analizado</b>					

Tabla 5B. Datos de ejemplo del programa de estabilidad del producto farmacéutico HuMax-TF-ADC a 25 ± 3 °C

Ensayo	Punto temporal (meses)				
	0	1	2	3	6
% principal de SEC	97,6	97,6	97,7	97,7	97,6
% de HMW SEC	2,3	2,3	2,2	2,2	2,2
% de LMW SEC	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2
DAR promedio por HIC (moles de auristatinas/moles de mAb)	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1
Carga de fármaco por HIC (% de área)	1,9	1,8	1,9	1,8	1,8
CE-SDS (no reducido)	CR	CP	CP	CR	CR
CE-SDS (reducido)	CP	CR	CP	CR	CR
CE-SDS (reducido) % LC0 + LC1	31,8	32,0	32,8	32,0	30,8
CE-SDS (reducido) % de HC	66,2	66,1	65,3	65,8	66,8
CE-SDS (reducido) LC0 + LC1 + HC	98,0	98,1	98,1	97,8	97,6
Fármaco libre (p/p % de fármaco libre/mAb)	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
% Principal icIEF	70,3	69,8	NA	68,6	68,6
% Ácido icIEF	25,2	24,7	NA	25,1	25,6
% Básico icIEF	4,5	5,4	NA	6,3	5,9
Citotoxicidad (basada en el patrón de referencia)	106	109	104	111	98
Particulados visibles	Prácticamente libre de partículas visibles	Prácticamente libre de partículas visibles	Prácticamente libre de partículas visibles	Prácticamente libre de partículas visibles	Prácticamente libre de partículas visibles
<b>CR= Comparable al patrón de referencia; HC= Cadena pesada; LC= Cadena ligera; TQI= Total de impurezas cuantificables; NT= No probado; NA= No analizado</b>					

## 5 EJEMPLO 11

Este estudio era para examinar el efecto de concentraciones de excipientes más altas o más bajas sobre la estabilidad de HuMax-TF-ADC, para verificar el intervalo aceptable de concentraciones de excipientes. Se prepararon tres formulaciones de HuMax-TF-ADC de acuerdo con la Tabla 6. Las soluciones se llenaron en viales de vidrio de 10 ml a razón de 4 ml por vial y se liofilizaron. Se colocaron muestras de cada formulación en estabilidad acelerada a 50 °C durante 4 semanas y se tomaron muestras después de 2, 3 y 4 semanas. Las muestras se analizaron para concentración, pH, tiempo de reconstitución, aspecto, icIE, CE-SDS, SEC, DAR-HIC, DLS de fármaco libre y MFI, con el fin de obtener datos para evaluar el impacto de una mayor o menor concentración de excipientes en la estabilidad de HuMax-TF-ADC. Los datos mostraron que las formulaciones se comportaron de manera similar en las pruebas de estabilidad en tensión.

Tabla 6

Descripción	Concentración de excipientes		
	Histidina	Sacarosa	Manitol
<b>Menor concentración de excipientes</b>	29,5 mM / 4,58 g/l	84 mM / 28,75 g/l	158 mM / 28,78 g/l
<b>Formulación diana</b>	30 mM / 4,65 g/l	88 mM / 30,12 g/l	165 mM / 30,06 g/l
<b>Mayor concentración de excipientes</b>	30,5 mM / 4,73 g/l	92 mM / 31,49 g/l	172 mM / 31,33 g/l

## EJEMPLO 12

- 5 Se examinó el efecto de las concentraciones de HuMax-TF-ADC sobre la estabilidad de las formulaciones liofilizadas de HuMax-TF-ADC, para verificar el intervalo aceptable para las concentraciones de HuMax-TF-ADC en la formulación.

10 Las formulaciones preparadas con histidina 30 mM, sacarosa 88 mM, manitol 165 mM y HuMax-TF-ADC 5 mg/ml o 30 mg/ml se liofilizaron y se almacenaron a 40 °C durante 2 meses o a 50 °C durante 2 semanas. El pico principal por SEC después de 2 meses de almacenamiento a 40 °C se mantuvo por encima del 97 % (Figura 12), solo se observaron ligeros aumentos en el porcentaje promedio de especies de alto peso molecular para ambas concentraciones después del almacenamiento a 40 °C (Figura 13). Las tendencias del perfil de carga cambian en condiciones de estrés, como lo muestran los datos de ICE, son similares para ambas concentraciones (Figura 14, 15 y 16).

15 Esto muestra que HuMax-TF-ADC puede formularse al menos en concentraciones en el intervalo de 5 mg/ml y 30 mg/ml.

## Ejemplo 13

20 La estabilidad en uso de HuMax-TF-ADC se estudió en diferentes concentraciones (hasta 48 mg/ml) y diferentes diluyentes, es decir, agua para inyección (WFI), NaCl (solución salina) al 0,9 % y solución de dextrosa al 5 % (D5W), durante al menos 48 horas a temperatura ambiente.

25 Los datos de la SEC mostraron que el porcentaje promedio del pico principal se mantuvo superior al 97 % para las muestras almacenadas a 25 °C durante 48 horas (Figura 17). Las muestras de 48 mg/ml contenían aproximadamente un 0,5 % más de especies de alto peso molecular que las otras muestras (Figura 18). Los diferentes diluyentes no influyeron en la propensión a la agregación.

30 Las muestras de solución en uso almacenadas a 25 °C también se examinaron usando iCE. La muestra reconstituida con dextrosa al 5 % tuvo el porcentaje de pico principal más bajo (Figura 19) después de 48 horas y el porcentaje más alto de especies ácidas (Figura 20) en comparación con las otras muestras. Esto indica que WFI y solución salina se diluyen potencialmente mejor para preservar el perfil de carga del HuMax-TF-ADC.

## Ejemplo 14

En este ejemplo se demuestra el efecto del tipo de tampón y el tipo de excipiente cristalizante sobre la estabilidad de las formulaciones de HuMax-TF-ADC.

40 Cuando se reemplaza histidina por citrato como tampón en la formulación liofilizada, o cuando se reemplaza manitol por glicina como excipiente cristalizante, su estabilidad se analizó por SEC e iCE, después del almacenamiento a 40 °C durante 2 meses.

45 En la figura 22 a la figura 26, la leyenda "Glicina" se refiere a la formulación que contiene 10 mg/ml de HuMax-TF-ADC, histidina 30 mM, sacarosa 88 mM, glicina 165 mM, pH 6,0; mientras que la leyenda "Citrato" se refiere a la formulación que contiene 10 mg/ml de HuMax-TF-ADC, citrato 30 mM, sacarosa 88 mM, manitol 165 mM, pH 6,0.

No se observaron cambios marcados en el porcentaje del pico principal promedio de SEC (Figura 22) o el pico de alto peso molecular (Figura 23) en las formulaciones de citrato o glicina después del almacenamiento a 40 °C durante 2 meses. No se observaron picos de bajo peso molecular en ninguna de las muestras.

55 La tasa de disminución del porcentaje del pico principal de iCE a 40 °C durante 2 meses en las formulaciones que contienen glicina y citrato fue (Figura 24) comparable a la formulación que contenía histidina 30 mM, Sacarosa 88 mM (3 %) y Manitol 165 mM (3 %) (Figura 7). Se observa que en condiciones de estrés por calor, la formulación de citrato se asoció a especies más ácidas en comparación con la formulación con histidina (Figura 25) y la formulación de glicina se asoció a especies más básicas en comparación con la formulación con manitol (Figura 26).

## Ejemplo 15

En este ejemplo se demostraron los efectos del pH y las concentraciones de tampón sobre la estabilidad de HuMax-TF-ADC. HuMax-TF-ADC se preparó a una concentración de 10 mg/ml con manitol al 3 % y sacarosa al 3 %, pero con histidina 20 mM o 50 mM con el pH de las muestras ajustado a 5, 6 o 7. Las muestras liofilizadas se almacenaron a 40 °C hasta durante 2 meses. Las formulaciones preparadas con histidina 20 mM o histidina 50 mM a pH 5, 6 o 7 mostraron resultados de SEC similares a 40 °C independientemente de la concentración del tampón y el pH, excepto que la formulación con histidina 50 mM a pH 5 mostró un ligero aumento en la agregación (Figuras 30 y 31).

Como se muestra en la figura 27-29 por iCE, se observa que el pH juega un papel más importante que la concentración del tampón con respecto al cambio del perfil de carga bajo pruebas de estrés. Las formulaciones preparadas a pH 6 mostraron la menor disminución en el pico principal durante 2 meses de almacenamiento a 40 °C. Se observa una aparente disminución en el pico principal, que es potencialmente mayor que la variación del método analítico. La formulación preparada a pH 5 exhibió la mayor disminución en el porcentaje de pico principal (Figura 27). La formulación preparada a pH 7 tuvo el porcentaje más alto de especies ácidas (Figura 28) y la formulación preparada a pH 5 tuvo el porcentaje más alto de especies básicas (Figura 29).

## Ejemplo 16

El ciclo de liofilización para la formulación liofilizada de HuMax-TF-ADC de la invención puede realizarse como se describe a continuación.

En primer lugar, los viales pueden enfriarse a una velocidad de 0,5 °C/min a 1 °C/min a -40 °C o menos y mantenerse isotérmicamente durante al menos 120 min (etapa de enfriamiento). Posteriormente los viales se calientan entre -20 °C y -15 °C a una velocidad de 0,5 °C/min a 3 °C/min y se mantienen isotérmicamente durante al menos 180 min (etapa de recocido). En lo sucesivo se inicia el vacío usando una presión entre 50 mTorr y 200 mTorr con una temperatura entre -30 °C y -10 °C (secado primario). Por último, la temperatura se aumenta a entre 35 °C y 50 °C a entre 0,5 °C/min y 1 °C/min y se mantiene isotérmicamente durante al menos 10 horas (secado secundario). La humedad residual no debe ser superior al 2 % por peso.

## LISTA DE REFERENCIAS

El documento WO2011157741, el documento WO9704801, el documento WO9856418, el documento WO02011753, el documento WO02096457, el documento WO03009817, el documento WO03039485, el documento US8372396, el documento WO2004004639, el documento WO2004016286, el documento WO2004055164, el documento WO 2004071439, el documento WO2006014965, el documento WO2006044908 y el documento WO2007019232.

Physicochemical Stability of the Antibody-Drug Conjugate Trastuzumab-DM1: Changes due to Modification and Conjugation Processes. Aditya A. Wakankar, *et al.*, Bioconjugate Chemistry 2010: 21 (9), 1588-1595

Challenges in developing bioanalytical assays for characterization of antibody-drug conjugates. Stephan JP, *etc*, Bioanalysis. mar de 2011;3(6):677-700

Analytical methods for physicochemical characterization of antibody drug conjugates. Wakankar A, *et al.*, MAbs. mar-abr de 2011;3(2):161-72.

Analytical and bioanalytical technologies for characterizing antibody-drug conjugates, Stephen C Alley, Kevin E Anderson, Current Opinion in Chemical Biology, junio de 2013, 17 (3), 406-411

Effect of Polysorbate 80 Quality on Photostability of a Monoclonal Antibody, Singh *et al.*, AAPS PharmSciTech, Vol. 13, N.º 2, 2012.

Polysorbates 20 and 80 Used in the Formulation of Protein Biotherapeutics: Structure and Degradation Pathways. BRUCE A. KERWIN, JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, VOL. 97, N.º 8, AGOSTO DE 2008, 2924-2935.

Aggregates in monoclonal antibody manufacturing processes, Vázquez-Rey y Lang, 2011, Biotech, Bioeng. 108(7) p. 1494-1508.



## REIVINDICACIONES

1. Una formulación liofilizada de un conjugado de anticuerpos y fármaco (ADC) anti-factor tisular (TF), la formulación liofilizada obtenible u obtenida liofilizando una formulación acuosa que comprende de aproximadamente 9 a aproximadamente 11 g/l de dicho ADC anti-TF y excipientes farmacéuticamente aceptables que comprenden de aproximadamente 29 a aproximadamente 31 mM de tampón histidina que tiene un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5; de aproximadamente 84 a aproximadamente 92 mM de sacarosa y de aproximadamente 158 a aproximadamente 172 mM de manitol y en donde:
  - a. la formulación está libre de tensioactivo,
  - b. la porción de anticuerpo anti-TF del ADC comprende una región pesada variable (VH) que comprende una región CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 6, una región CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 7 y una región CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 8 y una región ligera variable (VL) que comprende una región CDR1 que tiene la secuencia aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 46, una región CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 47 y una región CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 48 o una variante que tiene como máximo 1, 2 o 3 modificaciones de aminoácidos, más preferentemente sustituciones de aminoácidos tales como sustituciones de aminoácidos conservativas en dichas secuencias,
  - c. la porción farmacológica del ADC es vcMMAE.
2. La formulación liofilizada de cualquiera de la reivindicación 1, en donde la formulación acuosa comprende el tampón de histidina en una concentración de aproximadamente 30 mM de tampón.
3. La formulación liofilizada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la formulación acuosa comprende sacarosa en una concentración de aproximadamente 88 mM.
4. La formulación liofilizada de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la formulación acuosa comprende el manitol en una concentración de aproximadamente 165 mM.
5. La formulación liofilizada de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la formulación acuosa comprende aproximadamente 10 g/l de ADC anti-TF.
6. La formulación liofilizada de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la formulación acuosa comprende de aproximadamente 9 a aproximadamente 11 g/l de ADC anti-TF, tal como aproximadamente 10 mg/ml de ADC anti-TF, aproximadamente 30 mM de histidina, aproximadamente 88 mM de sacarosa y aproximadamente 165 mM de manitol.
7. La formulación liofilizada de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo comprende una región VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y una región VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45.
8. La formulación liofilizada de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el número absoluto medio de restos de fármaco por molécula de anticuerpo es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, tal como 3, 4 o 5, preferentemente 4.
9. La formulación liofilizada de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo anti-TF es un anticuerpo de longitud completa.
10. La formulación liofilizada de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el ADC anti-TF es estable a 2-8 °C, tal como a 5 °C para uso farmacéutico durante al menos 6 meses, tal como durante al menos 9 meses, tal como durante al menos 15 meses o preferentemente durante al menos 18 meses o incluso más preferentemente durante al menos 24 meses, o lo más preferido durante al menos 36 meses.
11. La formulación liofilizada de la reivindicación 10, en donde la formulación liofilizada es estable cuando tiene menos del 3,0 % de agregados, tal como menos del 2,0 % de agregados cuando se almacena a 5 °C durante al menos 6 meses, tal como durante al menos 9 meses, tal como durante al menos 15 meses o preferentemente durante al menos 18 meses o incluso más preferentemente durante al menos 24 meses, o lo más preferido durante al menos 36 meses.
12. La formulación liofilizada de la reivindicación 10 u 11 en donde la estabilidad se determina mediante análisis SEC de acuerdo con el Ejemplo 10.
13. La formulación liofilizada de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la formulación está libre de sales inorgánicas.
14. Una formulación líquida farmacéuticamente aceptable obtenida reconstituyendo la formulación liofilizada de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 en un diluyente acuoso estéril.

15. La formulación líquida de la reivindicación 14, que comprende de aproximadamente 9 a aproximadamente 11 mg/ml de ADC anti-TF, de aproximadamente 28 a aproximadamente 34 mM de histidina, de aproximadamente 84 a aproximadamente 92 mM de sacarosa y de aproximadamente 158 a aproximadamente 172 mM de manitol.

5 16. Un método para preparar la formulación liofilizada de cualquiera de las reivindicaciones 1-13 que comprende las etapas de:

- 10 a. enfriar la solución acuosa a una velocidad de 0,5 °C/min a 1 °C/min a una temperatura de -40 °C o menos;
- b. mantener isotérmicamente durante al menos 120 min;
- c. calentar a entre -20 °C y -15 °C a una velocidad de 0,5 °C/min a 3 °C/min;
- d. mantener isotérmicamente durante al menos 180 min;
- e. aplicar vacío usando una presión de entre 6,66 Pa y 26,66 Pa (50 mTorr y 200 mTorr) a una temperatura de entre -30 °C y -10 °C;
- 15 f. aumentar la temperatura a entre 35 °C y 50 °C a una velocidad de 0,5 °C/min y 1 °C/min y
- g. mantener isotérmicamente durante al menos 10 horas.

17. Un método para preparar una solución inyectable de un ADC anti-TF, que comprende la etapa de reconstituir la formulación liofilizada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 en un diluyente acuoso estéril.

Fig. 1A

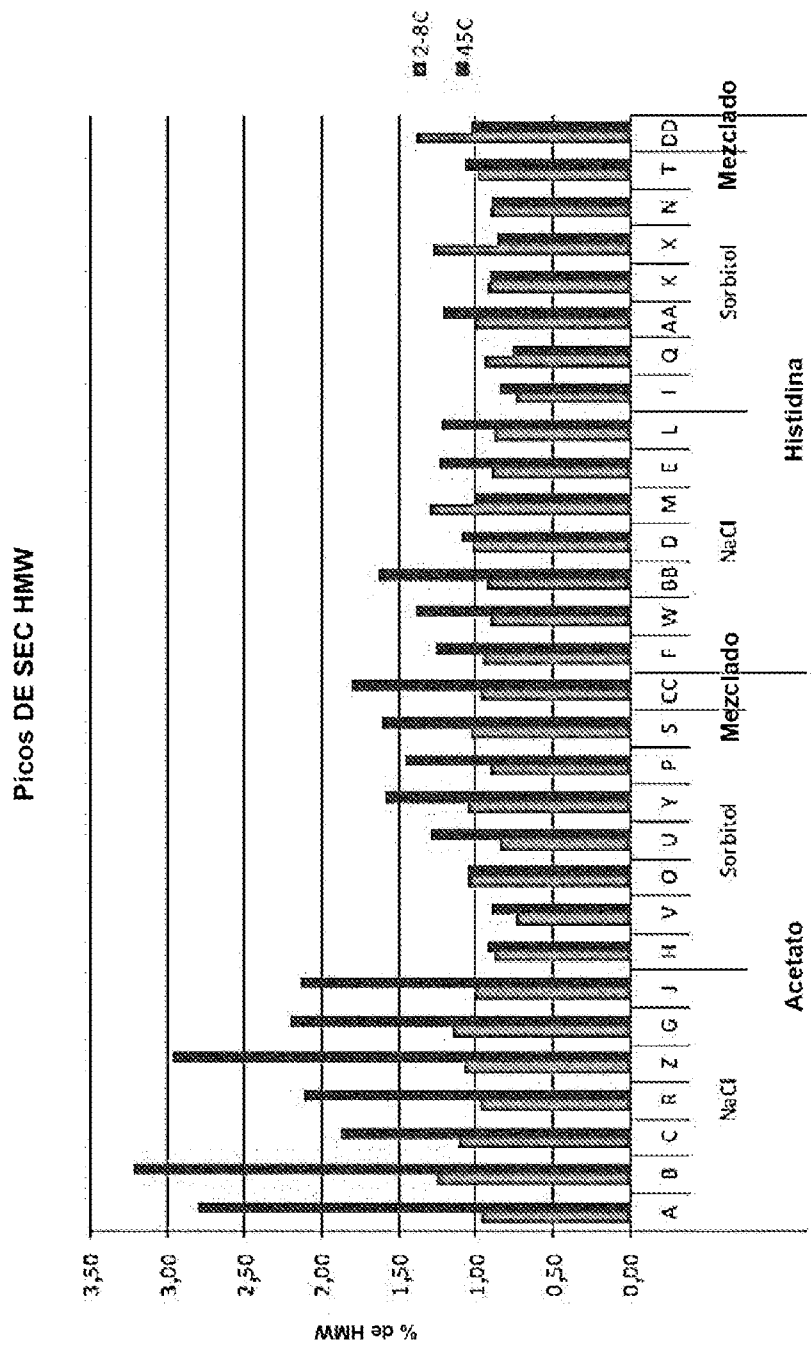


Fig. 1B

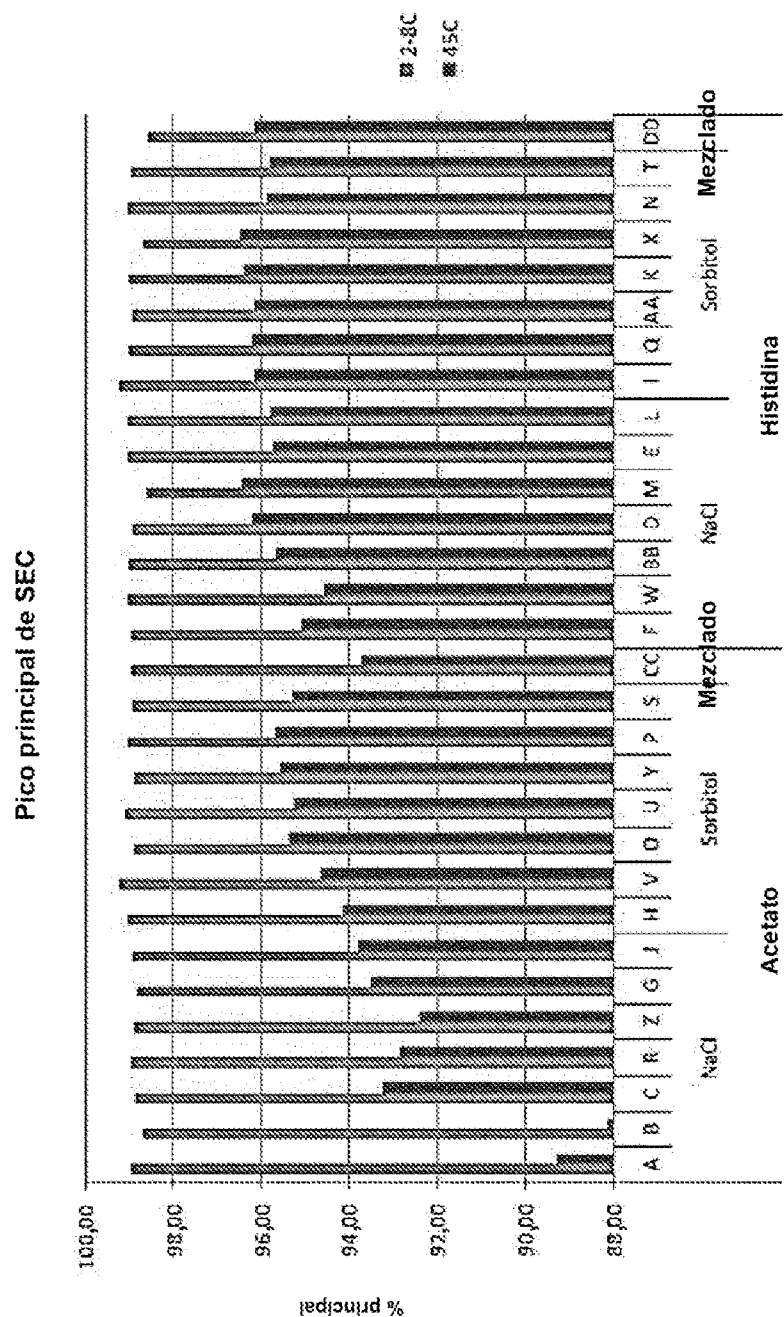


Fig. 1C

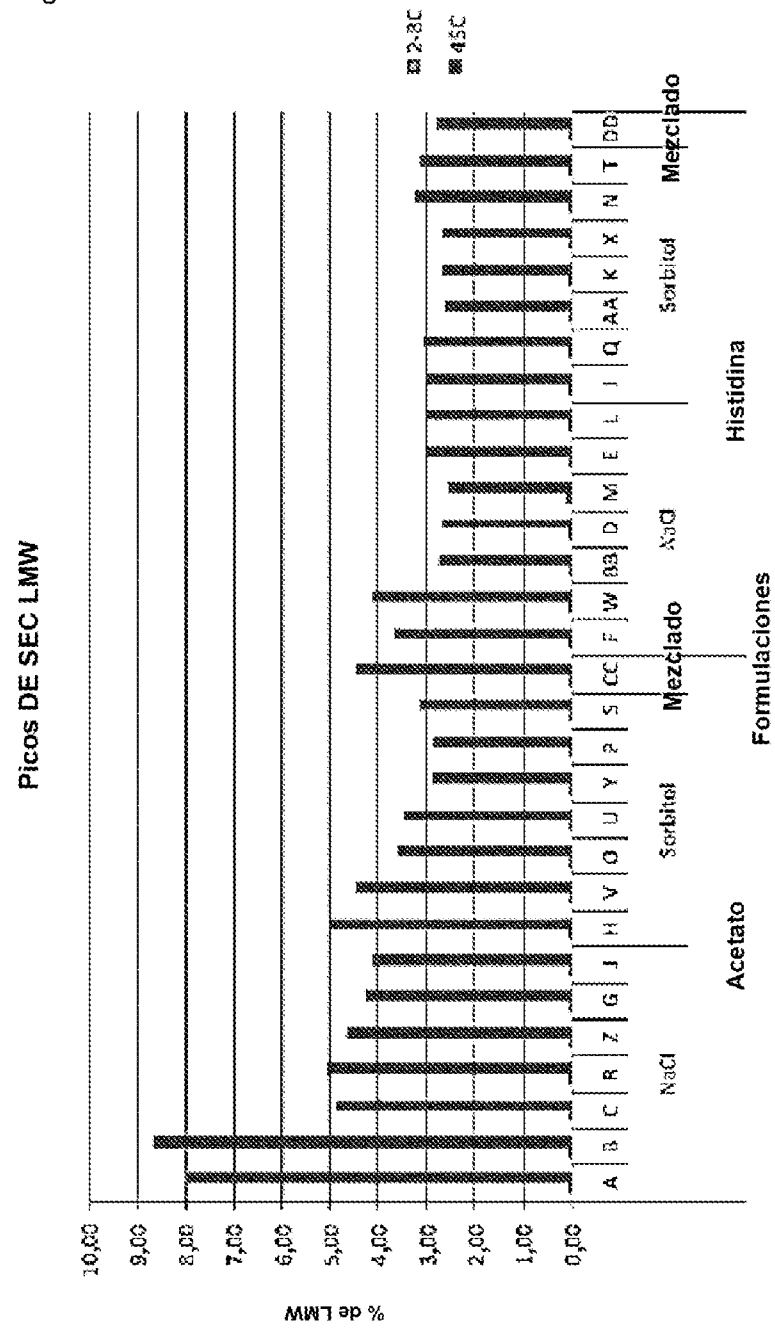


Fig. 2A

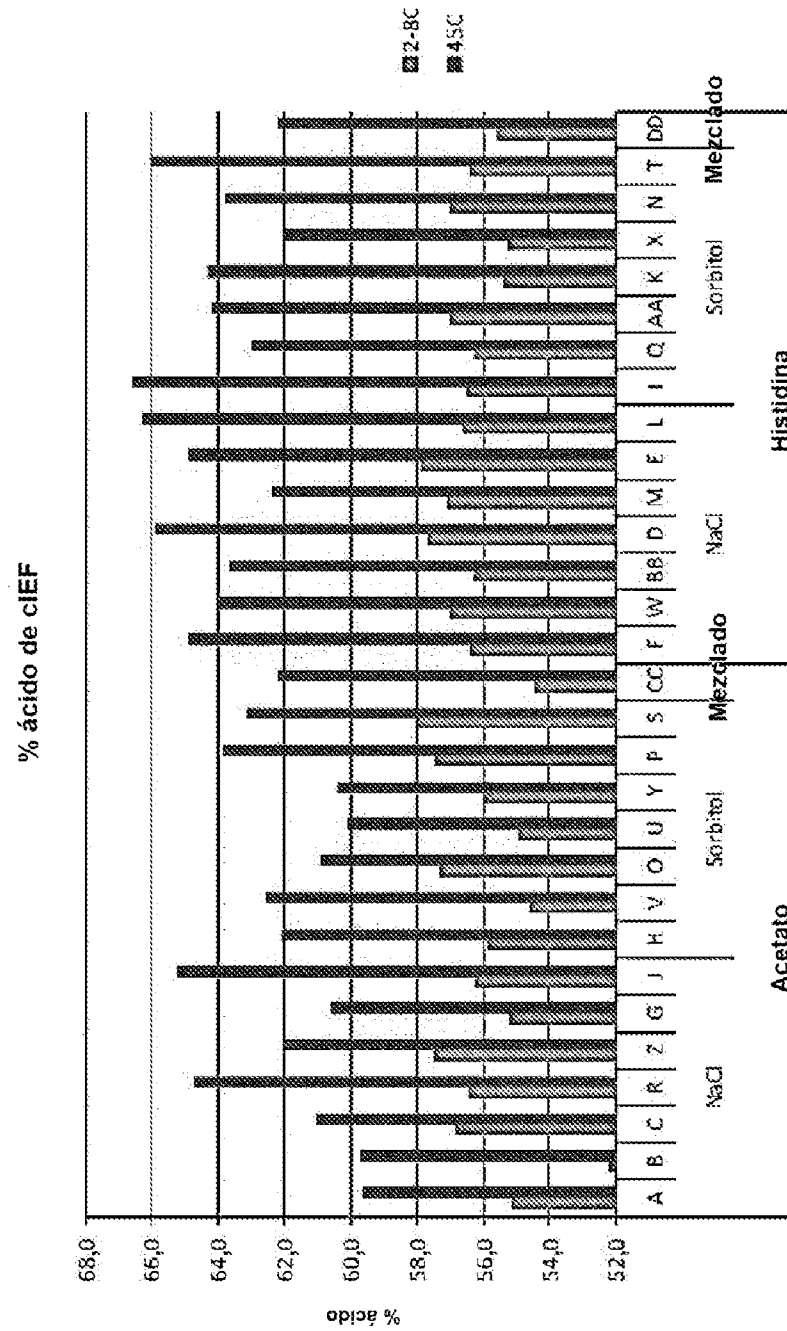


Fig. 2B

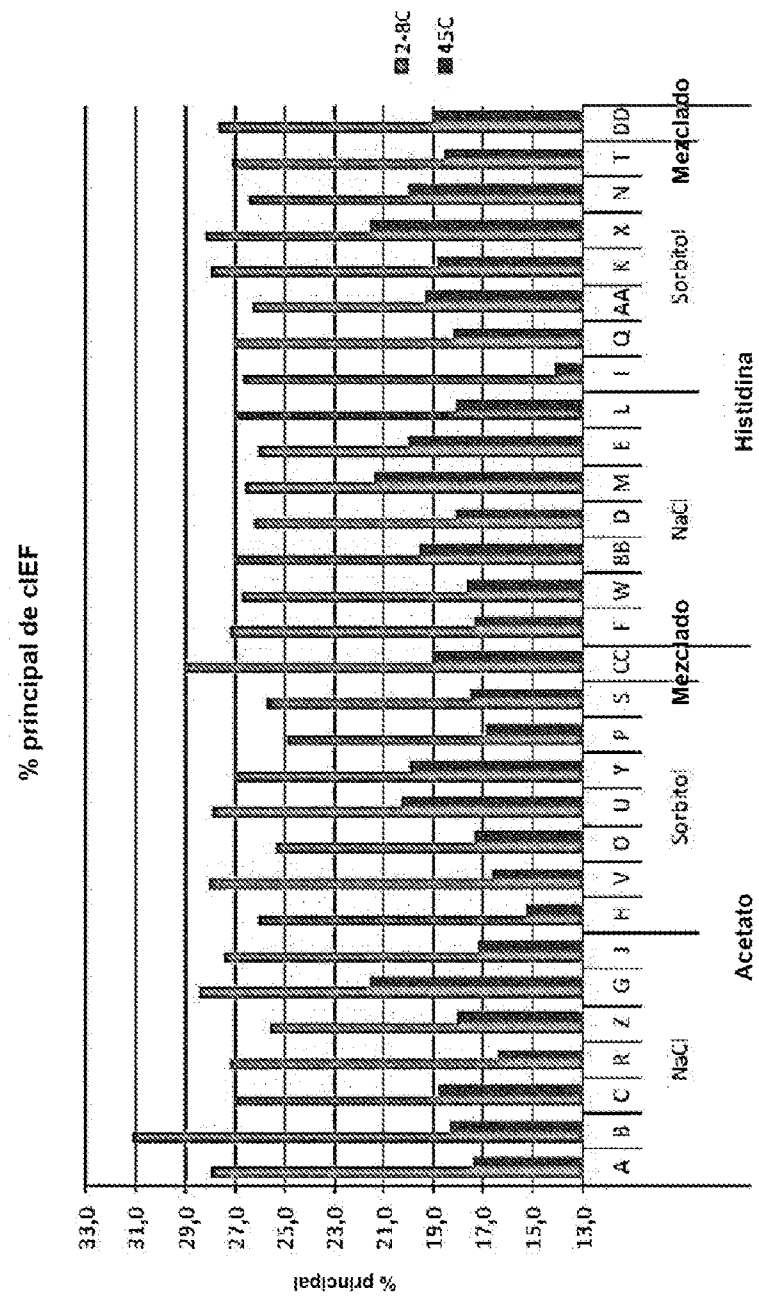


Fig. 2C

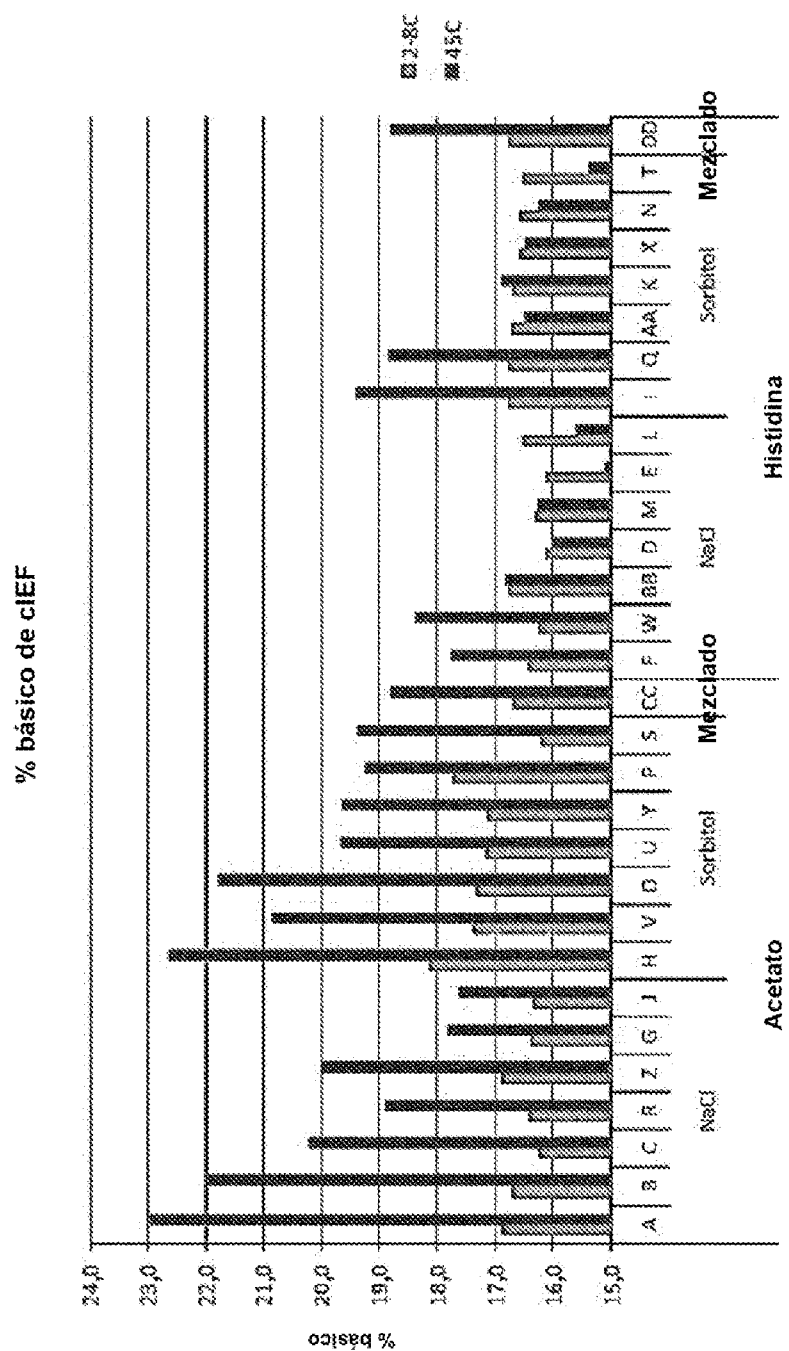




Fig. 3

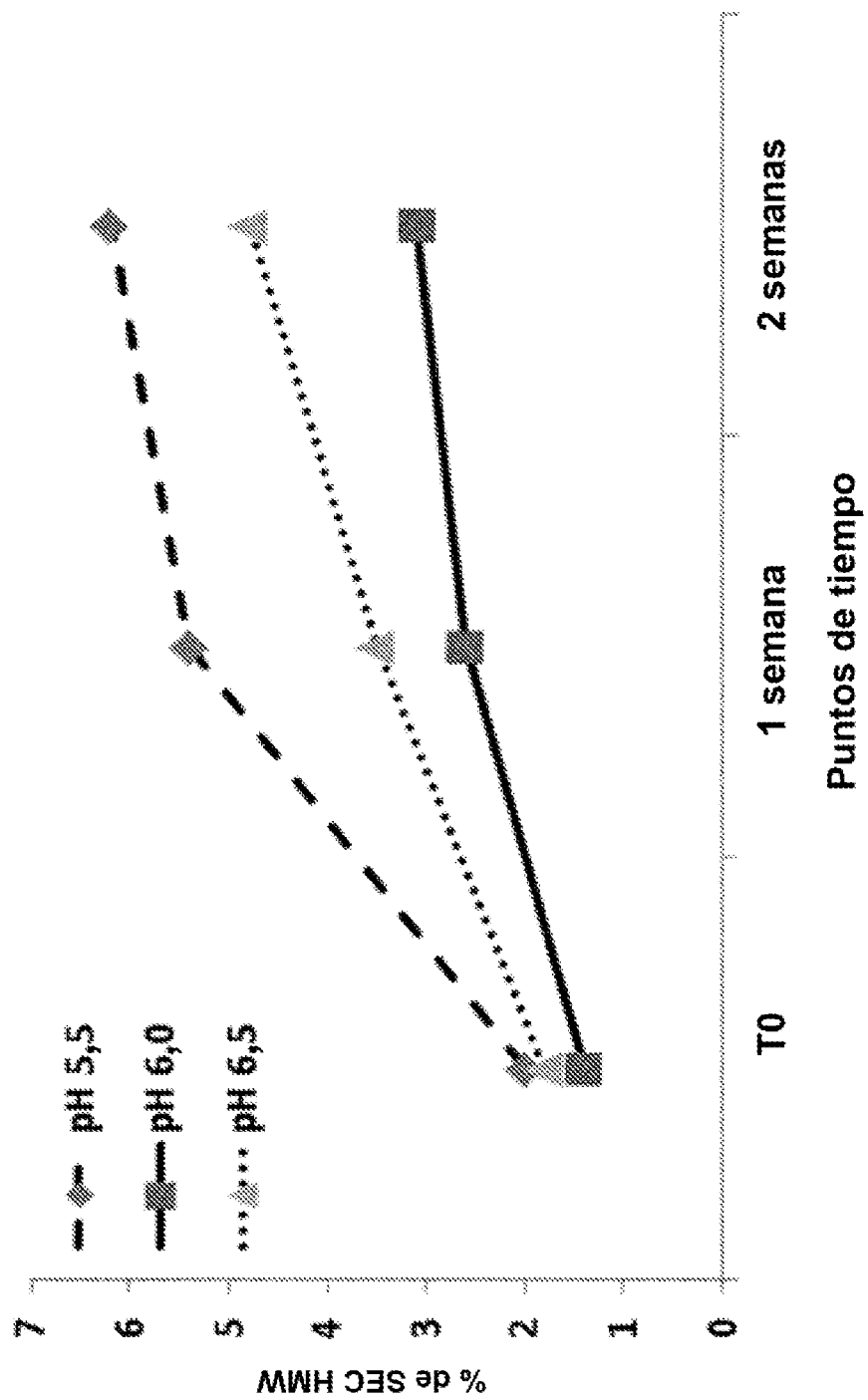


Fig. 4

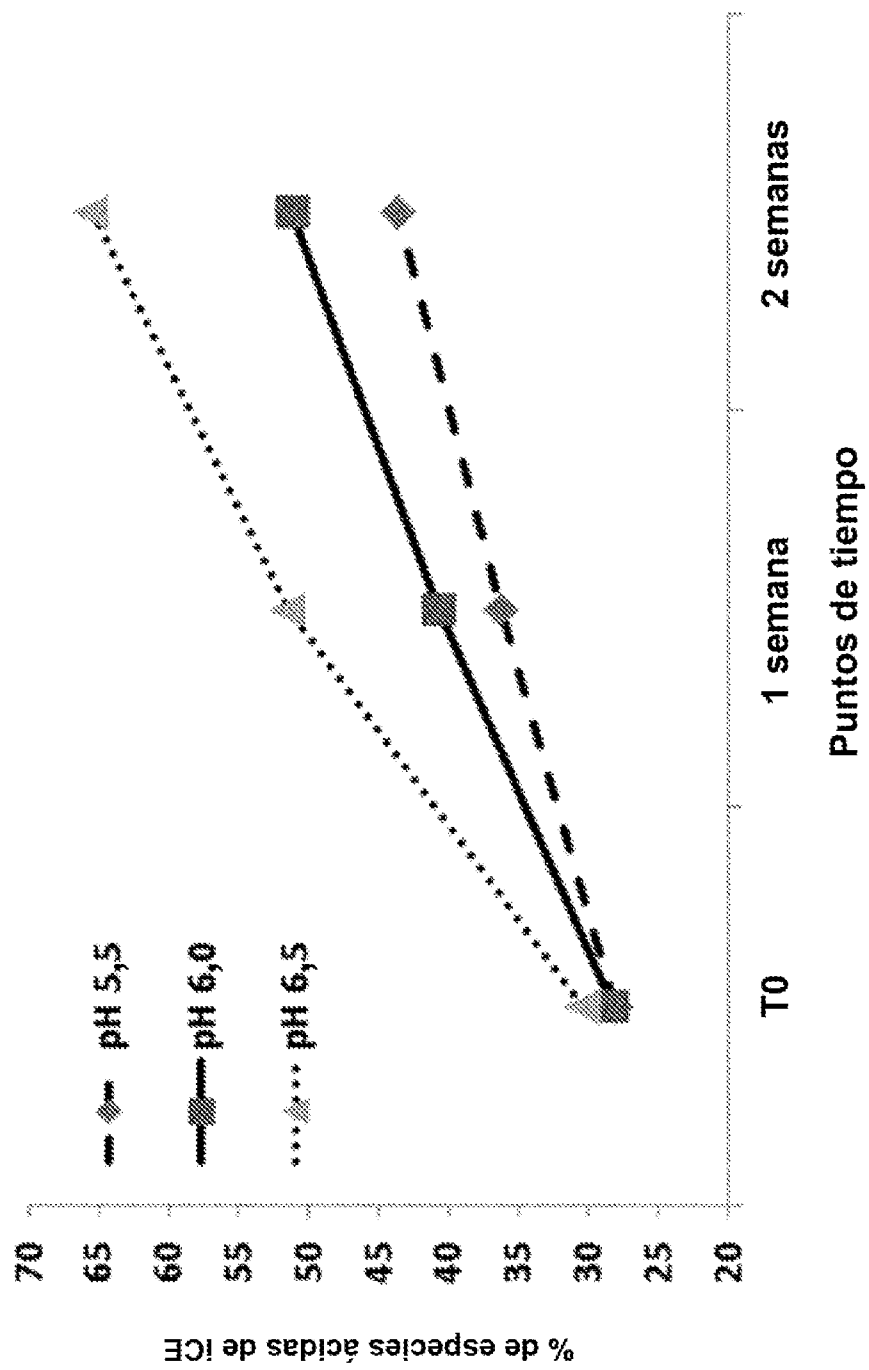


Fig. 5A

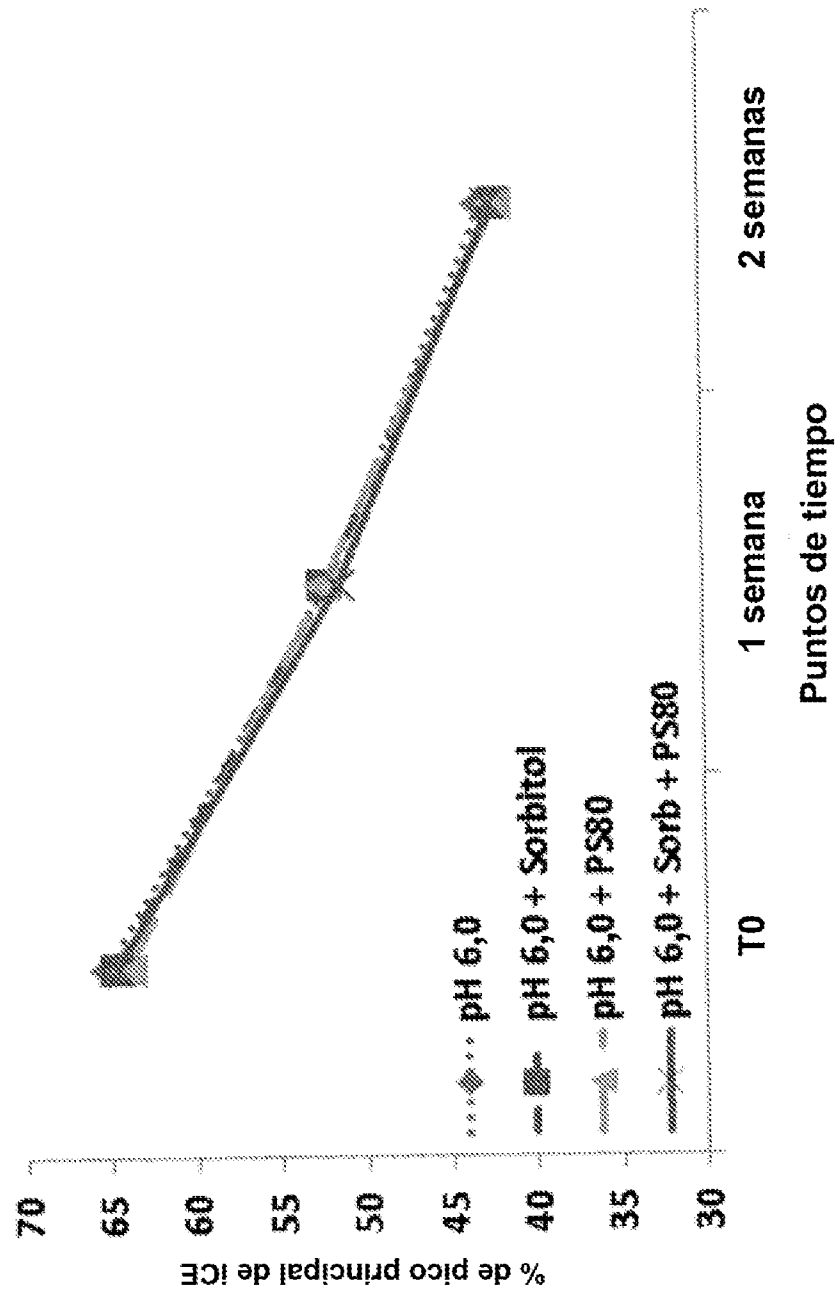


Fig. 5B

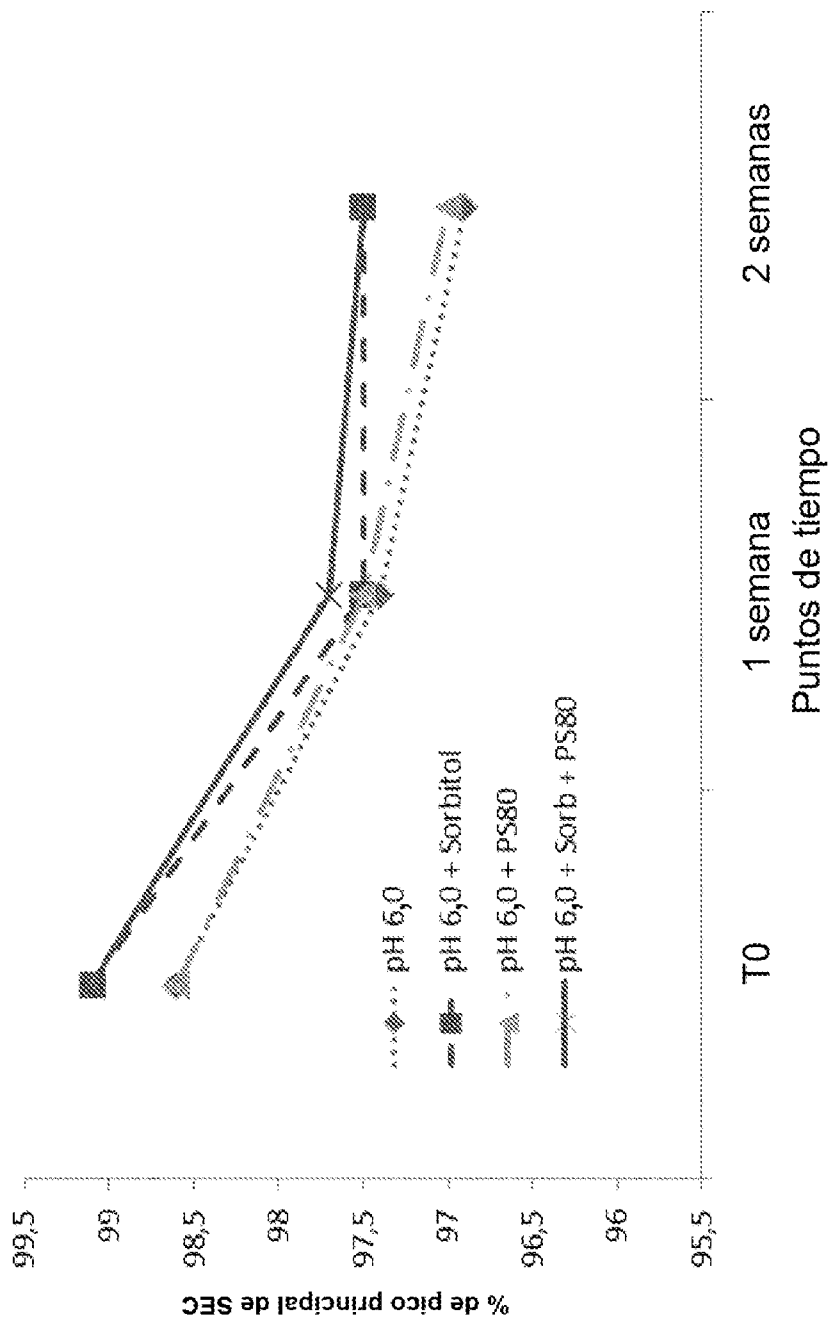


Fig. 6

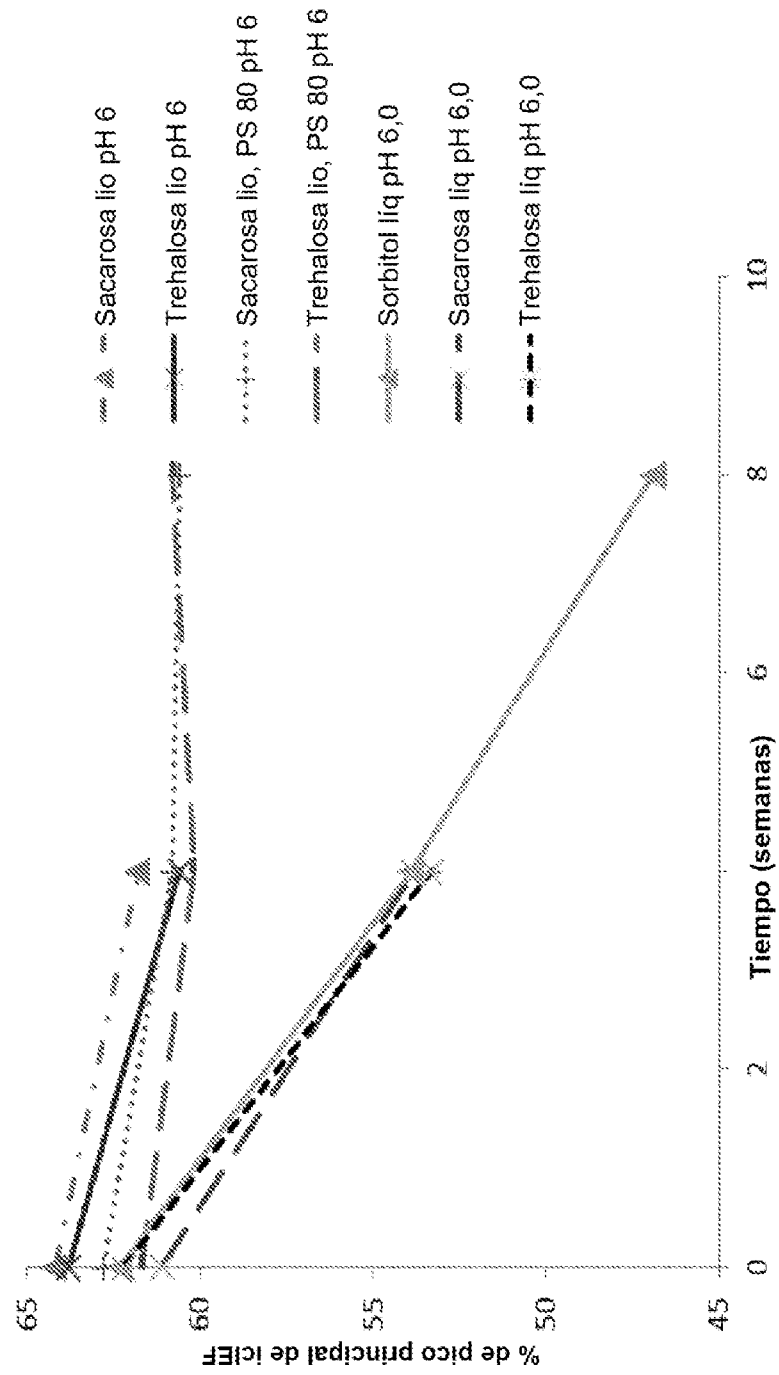


Fig. 7

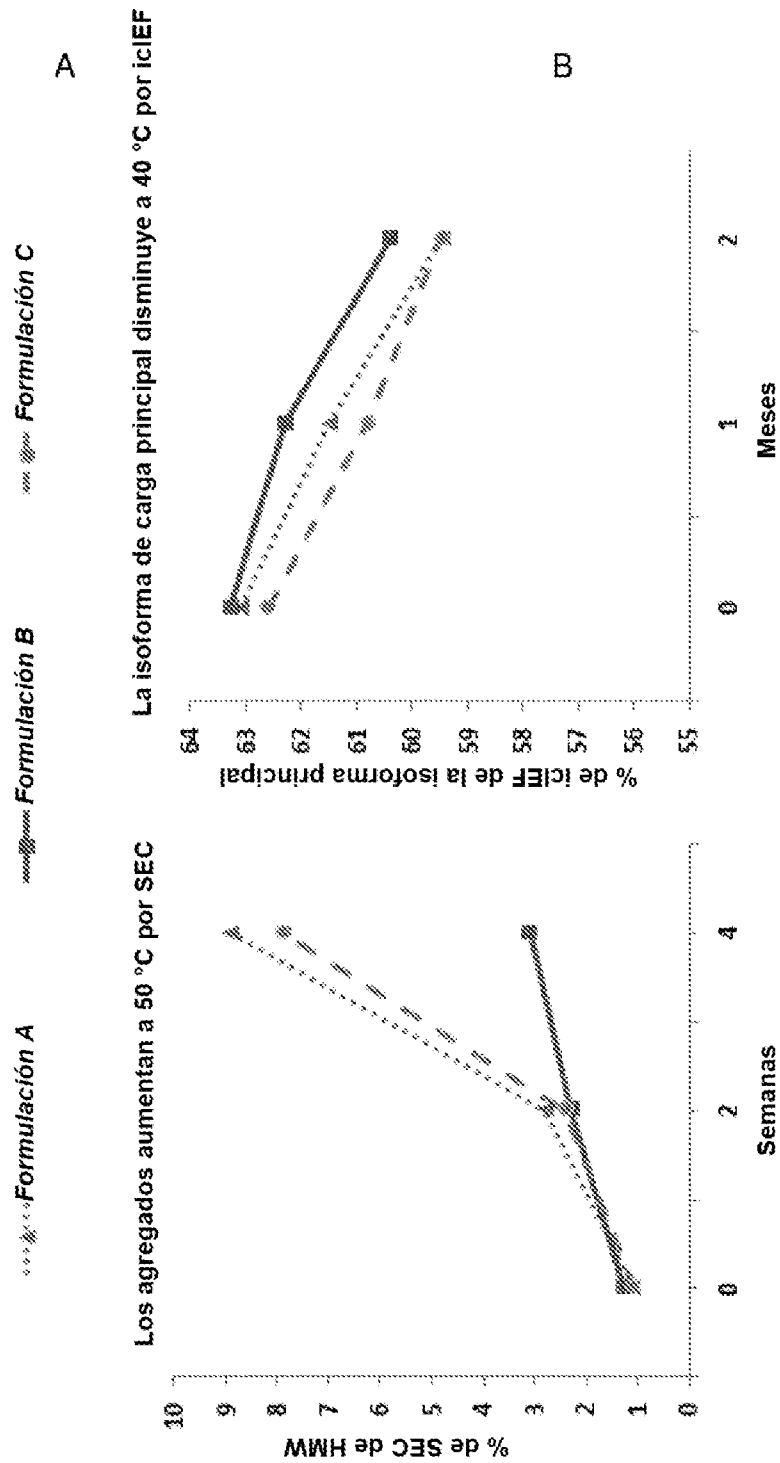


Fig. 8

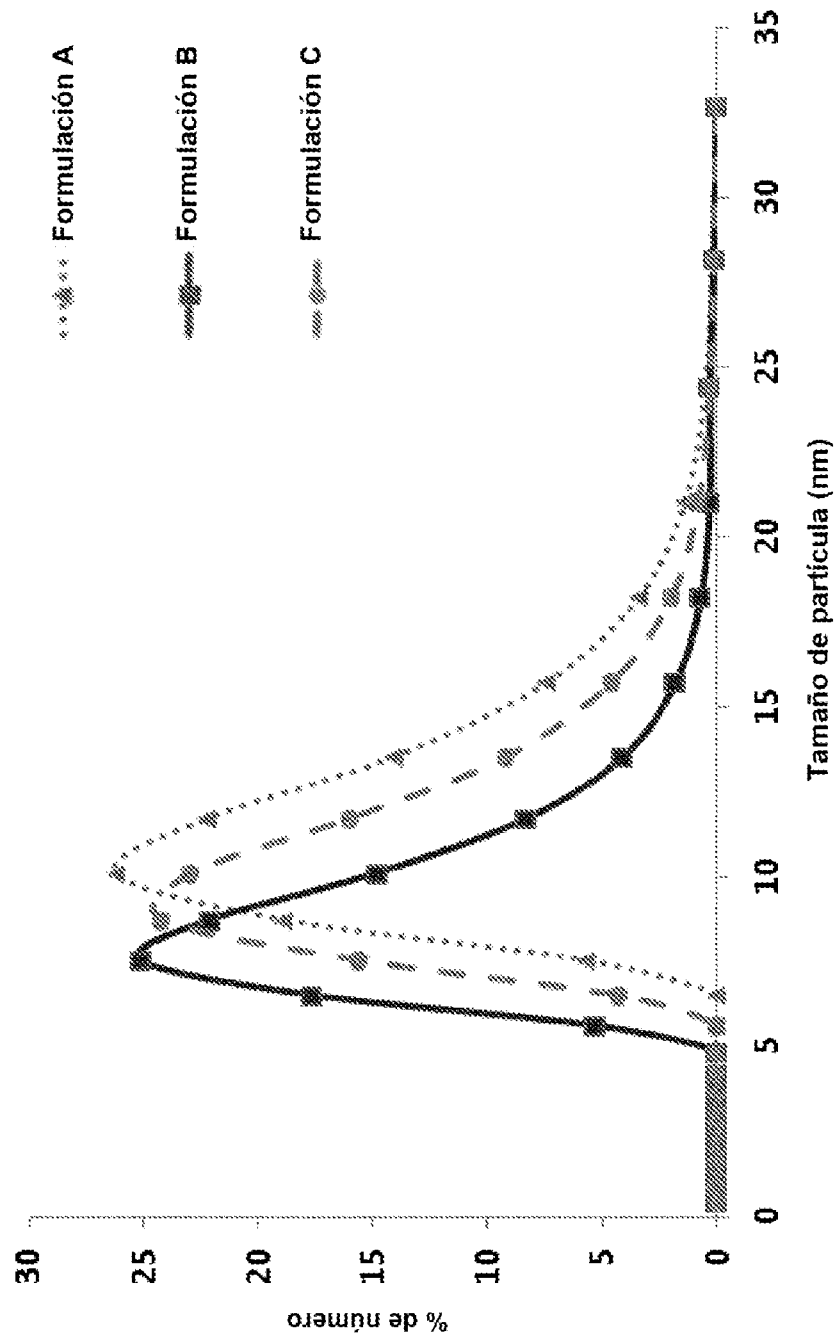


Fig. 9

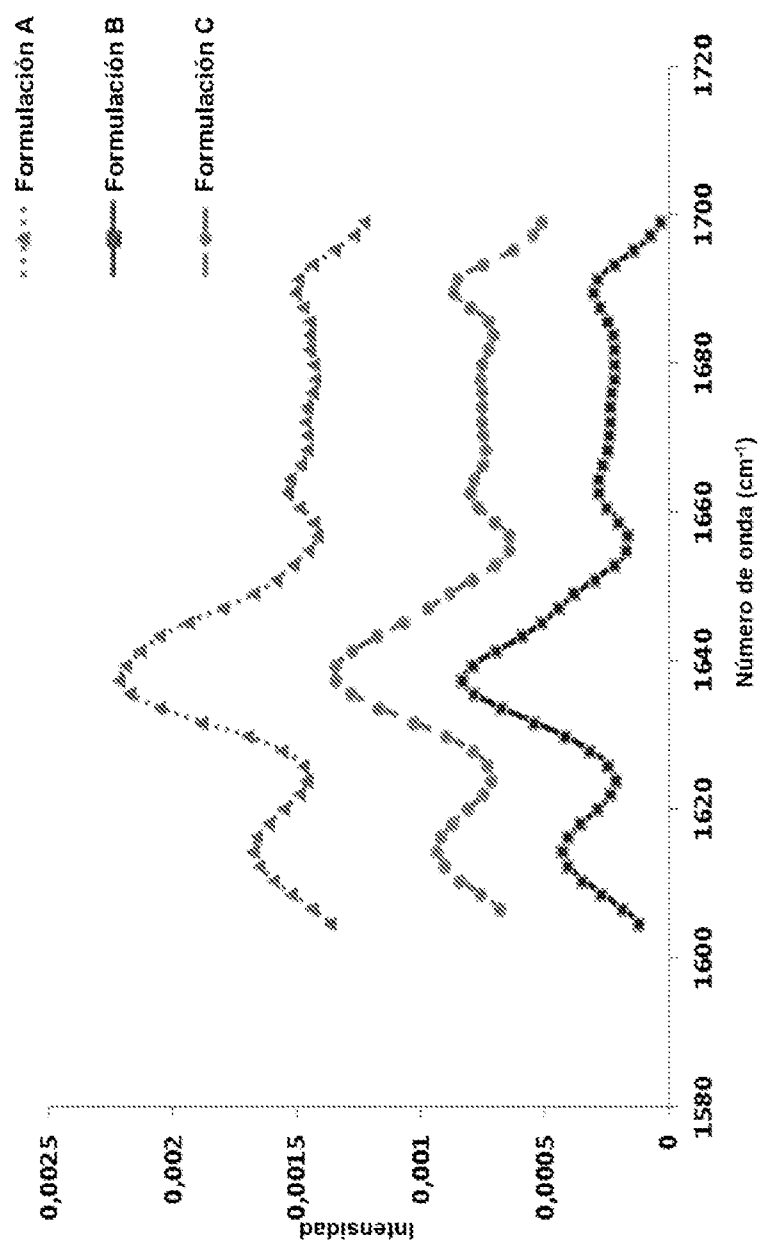




Fig. 10

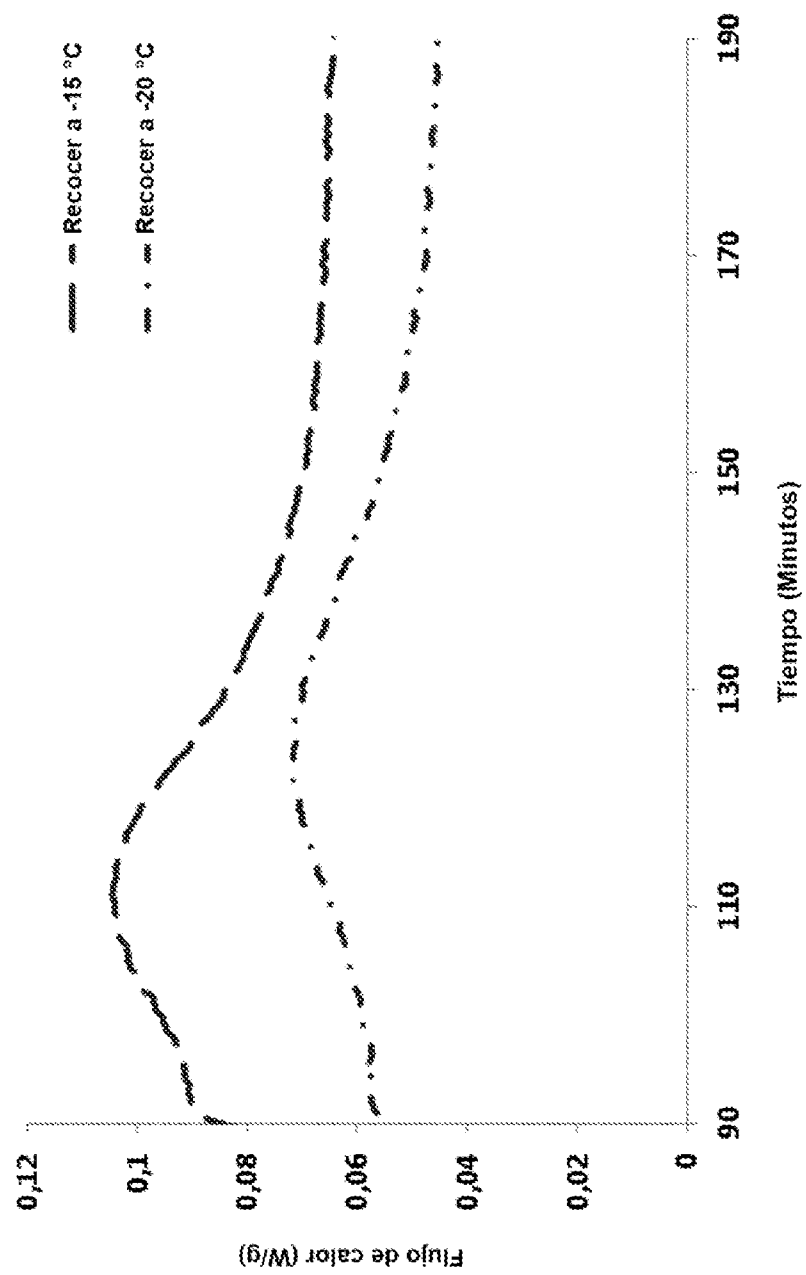


Fig. 11

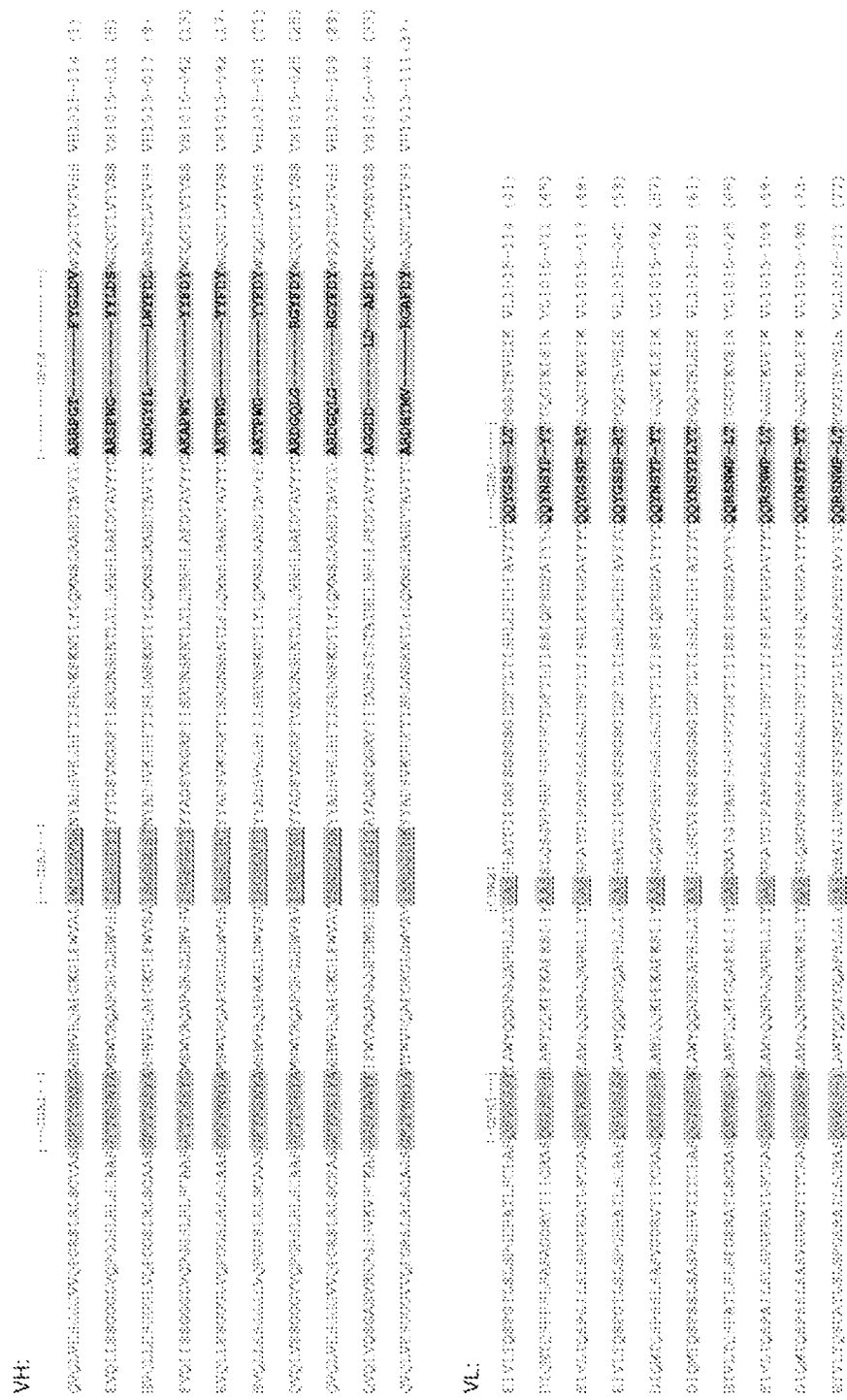


Fig. 12

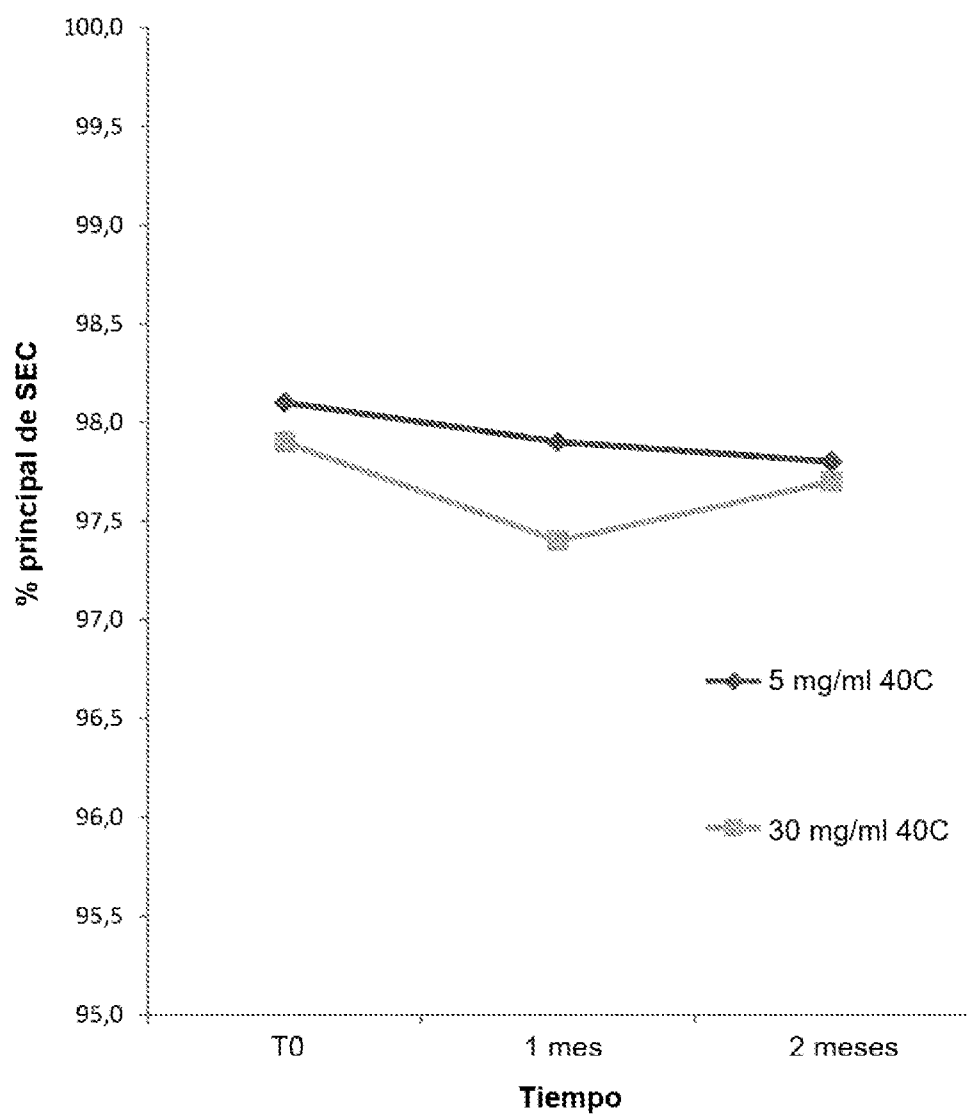


Fig. 13

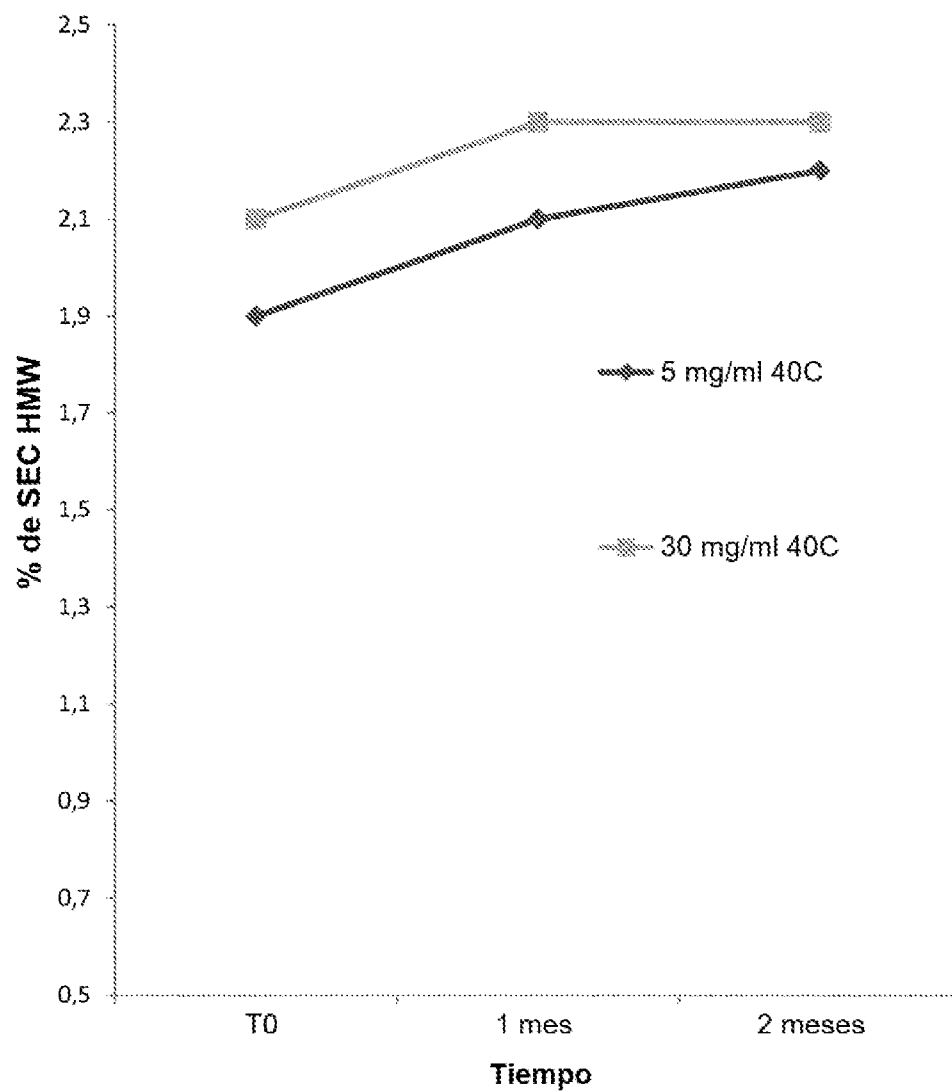


Fig. 14

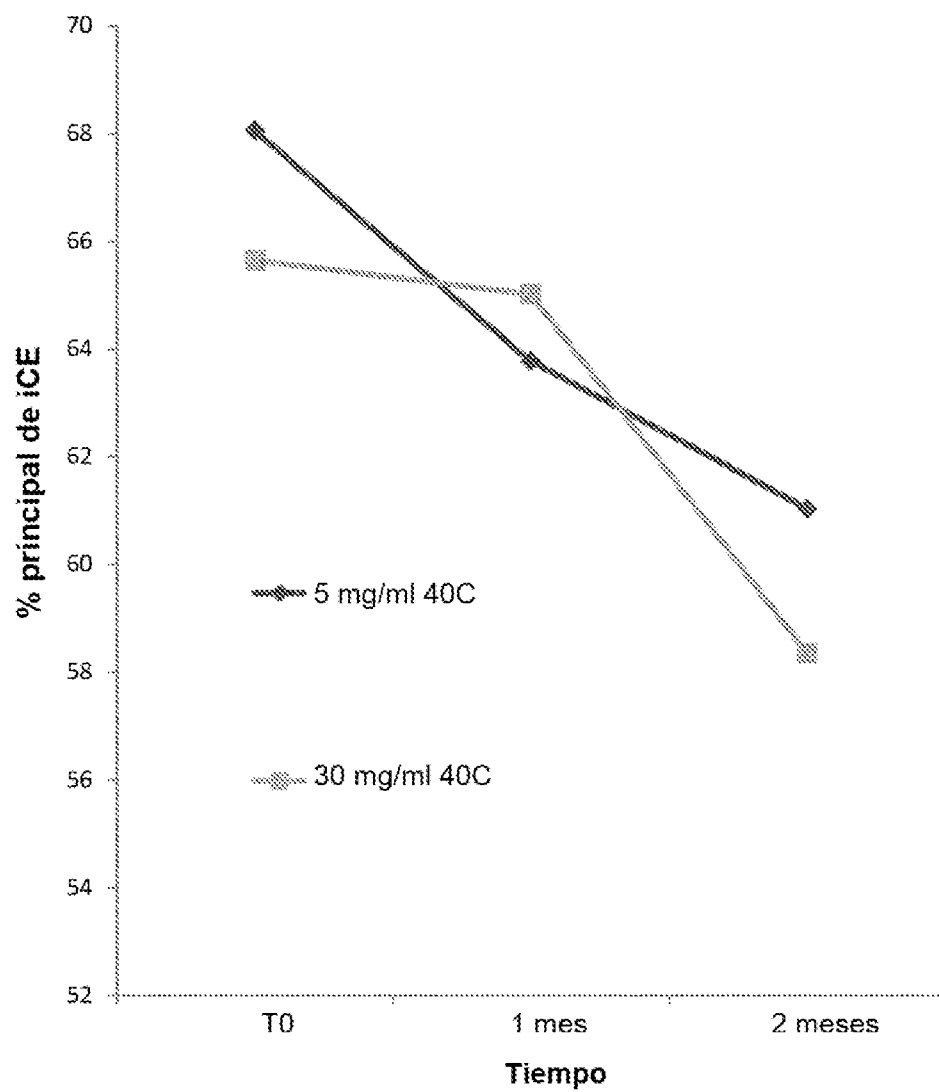


Fig. 15

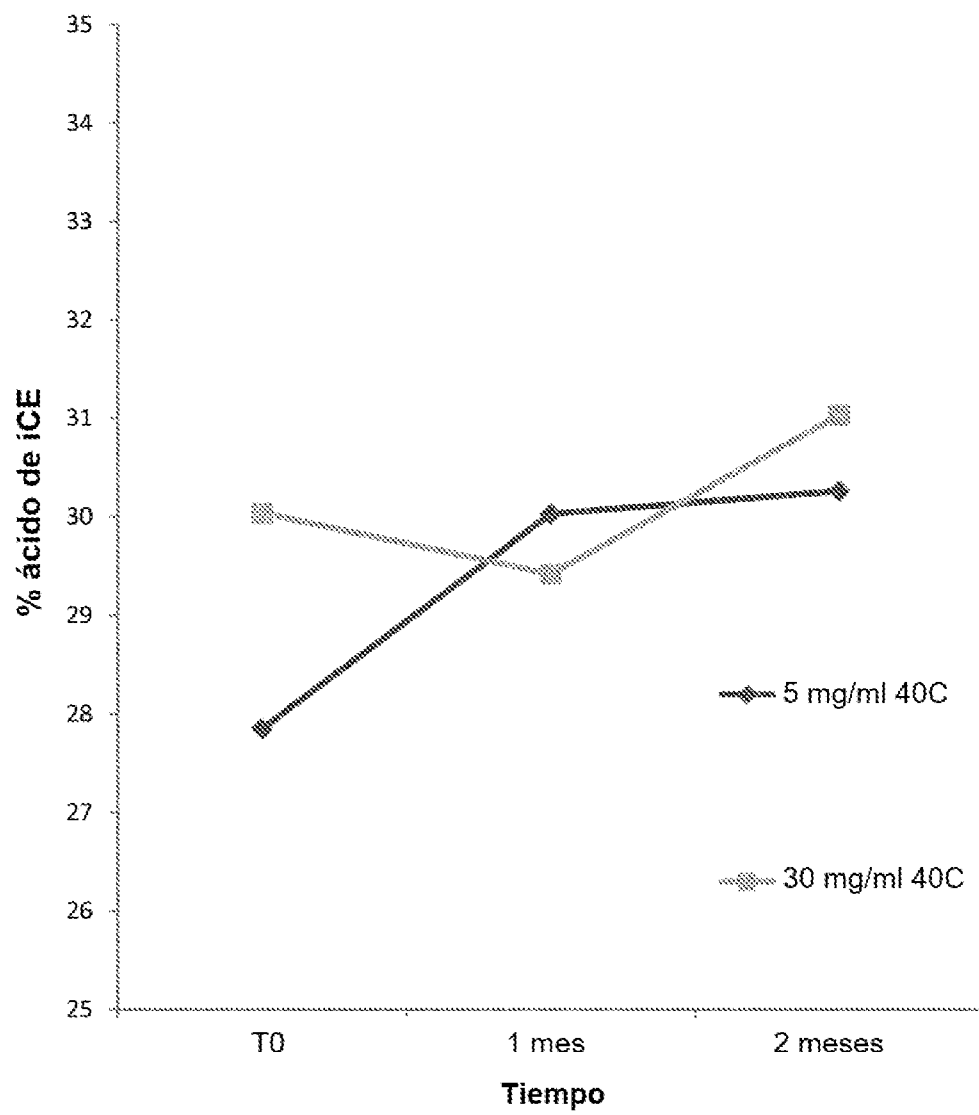


Fig. 16

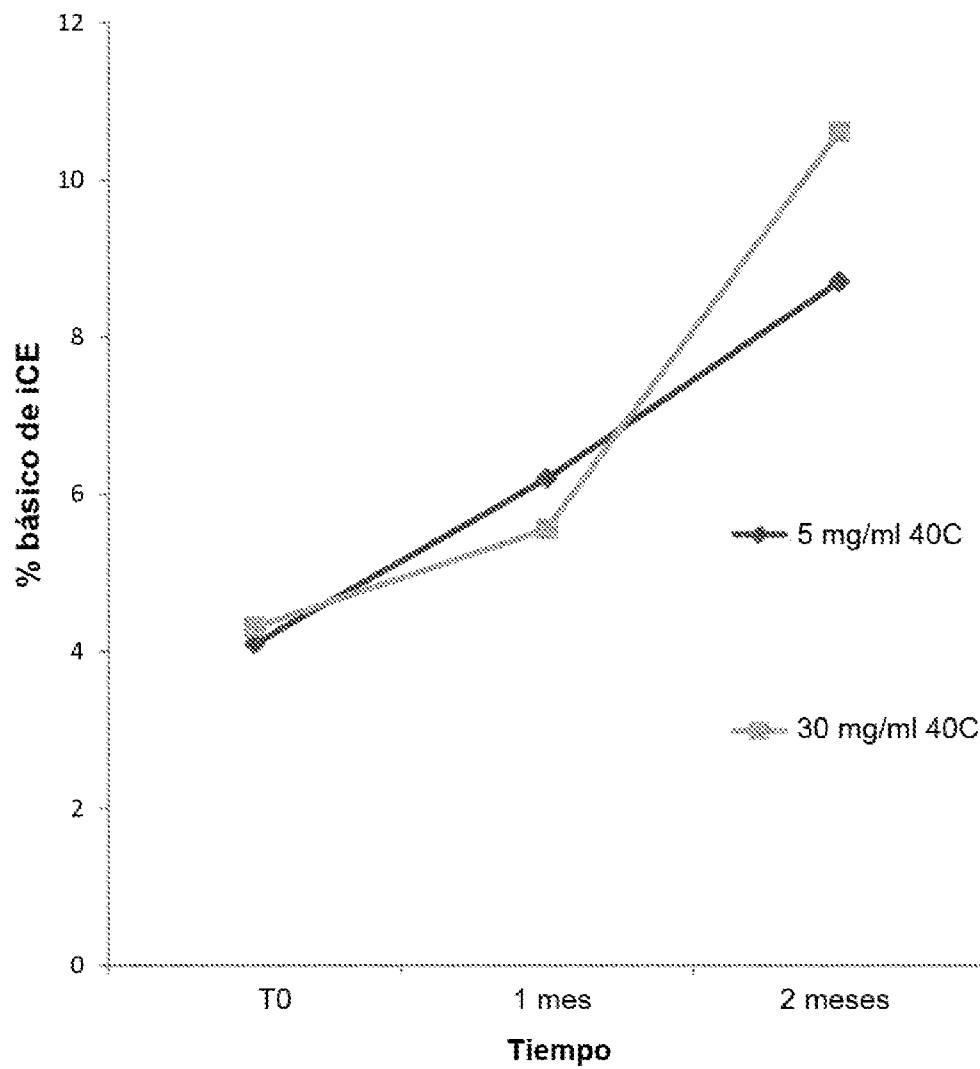


Fig. 17

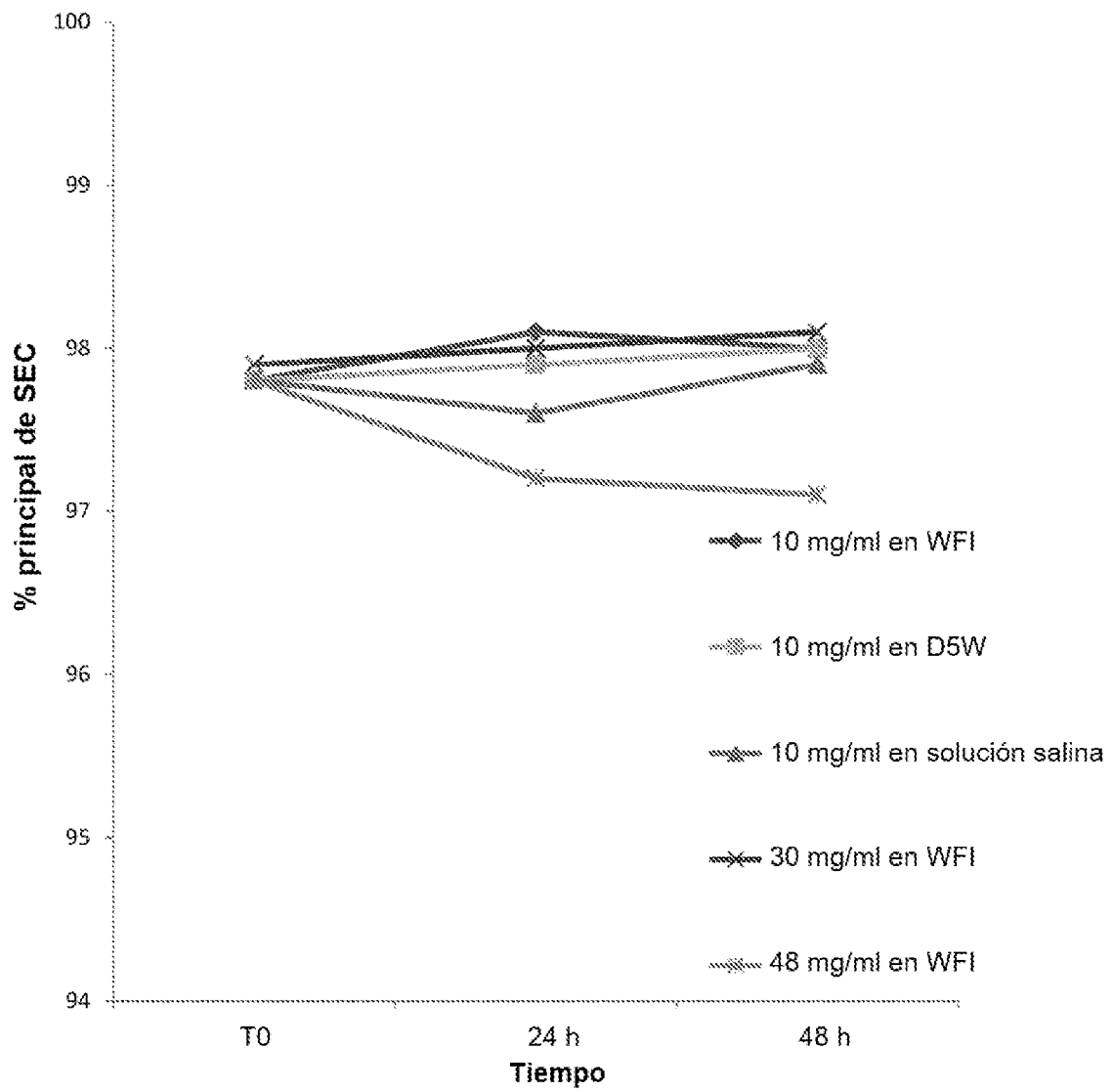




Fig. 18

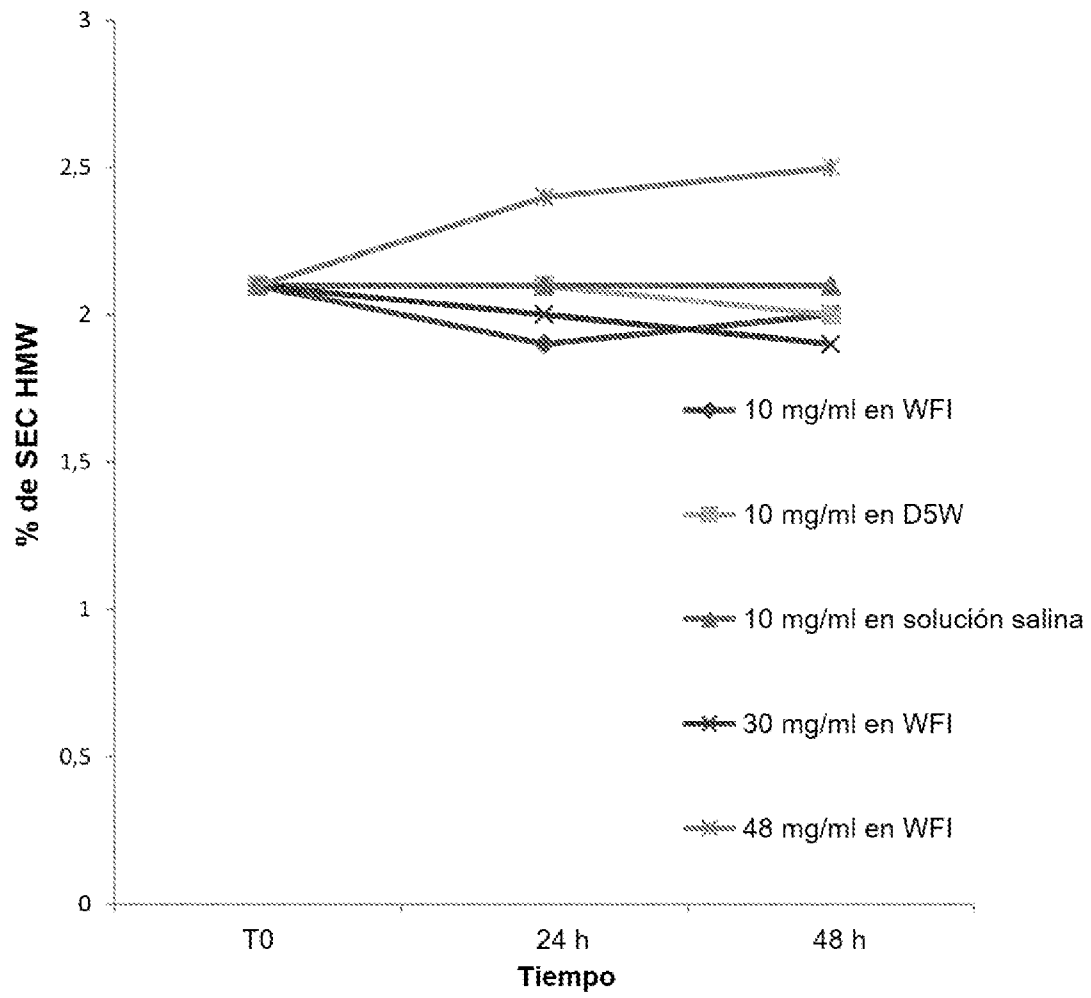


Fig. 19

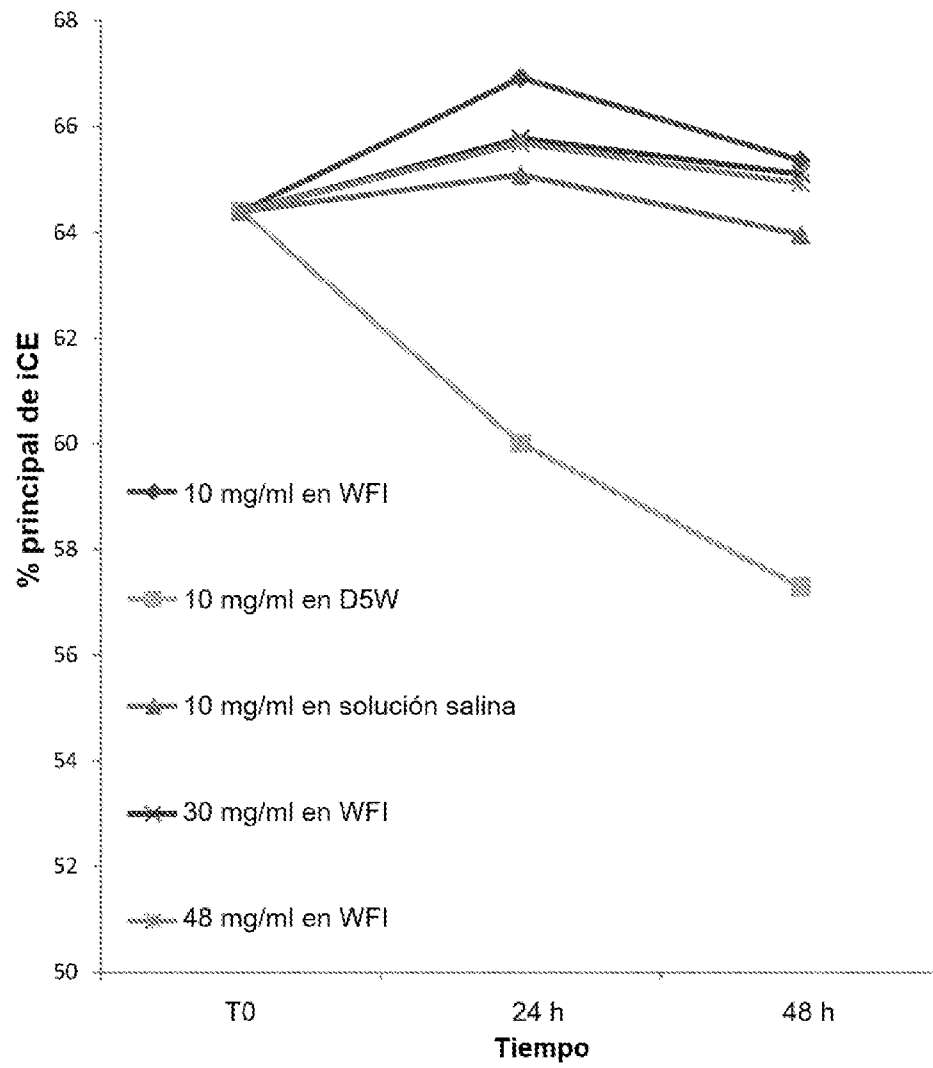


Fig. 20

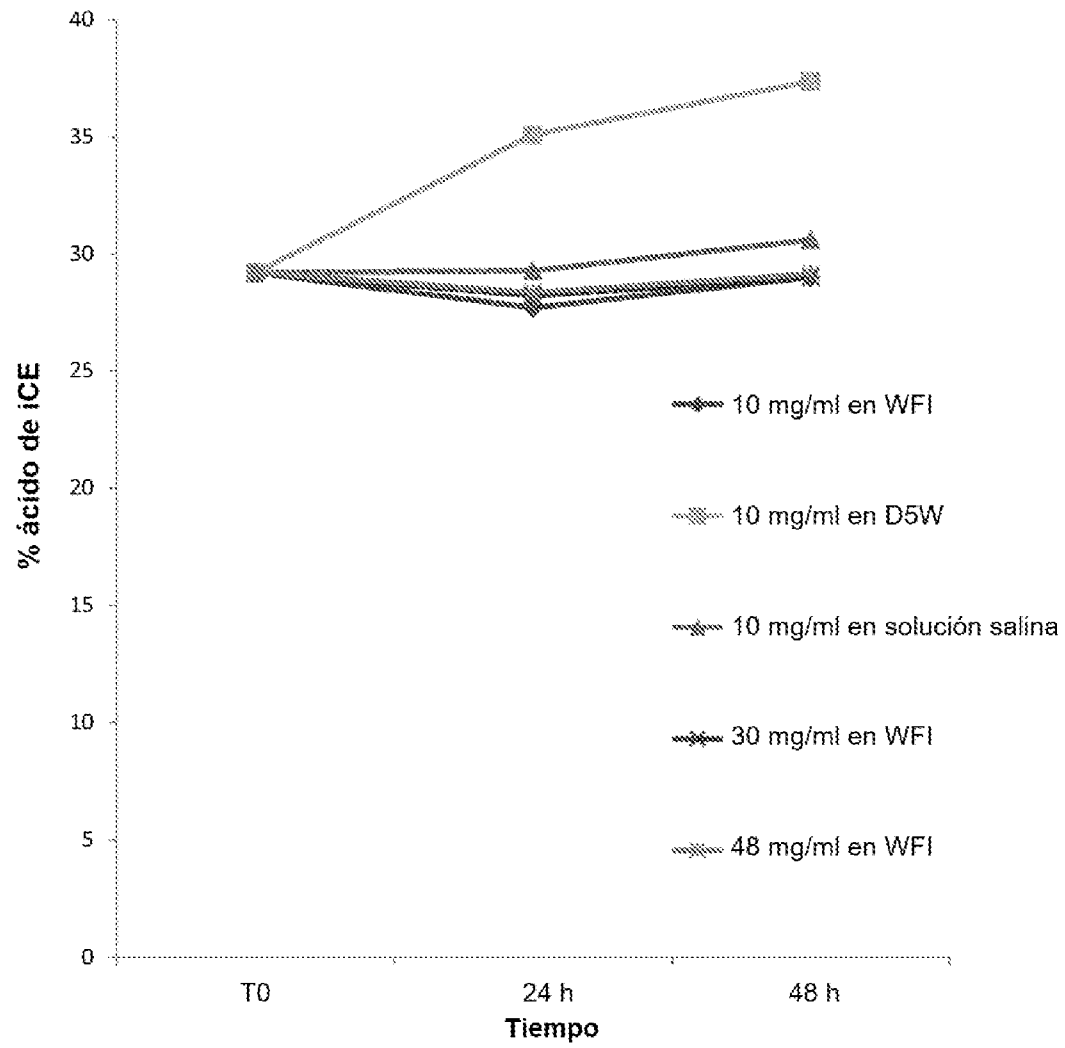


Fig. 21

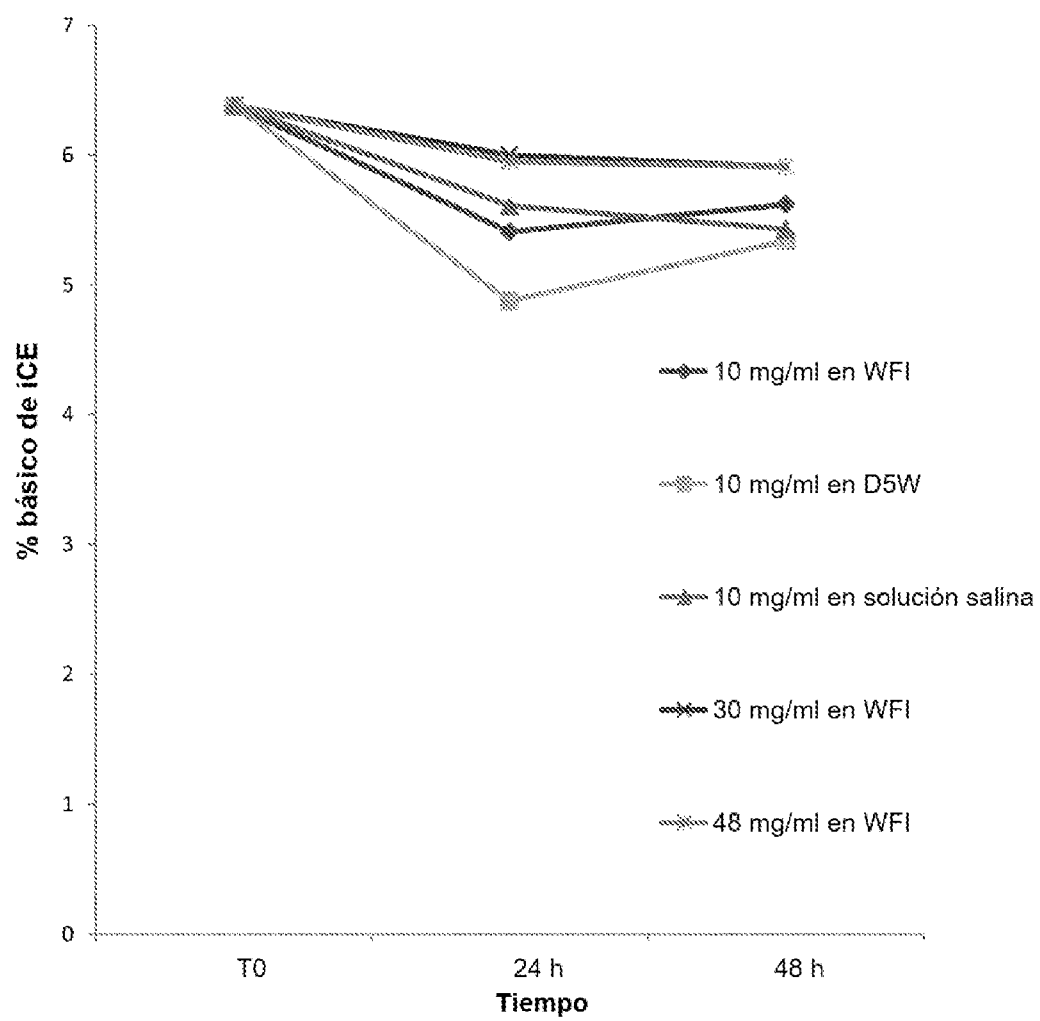


Fig. 22

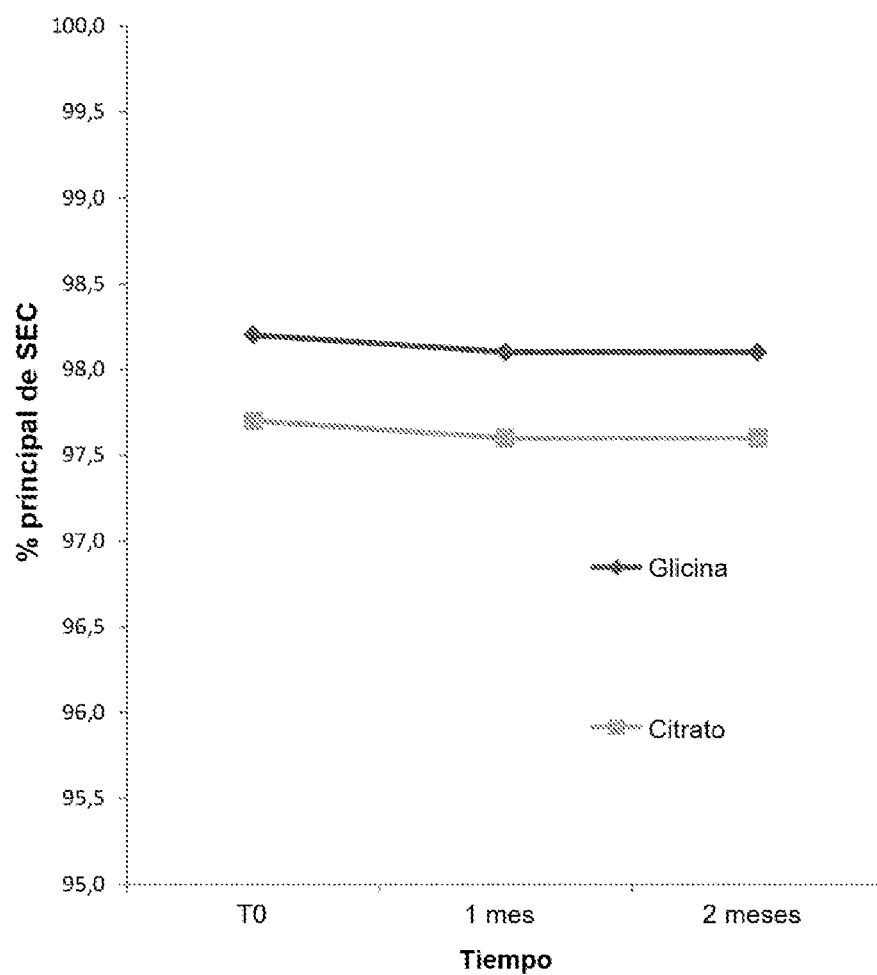


Fig. 23

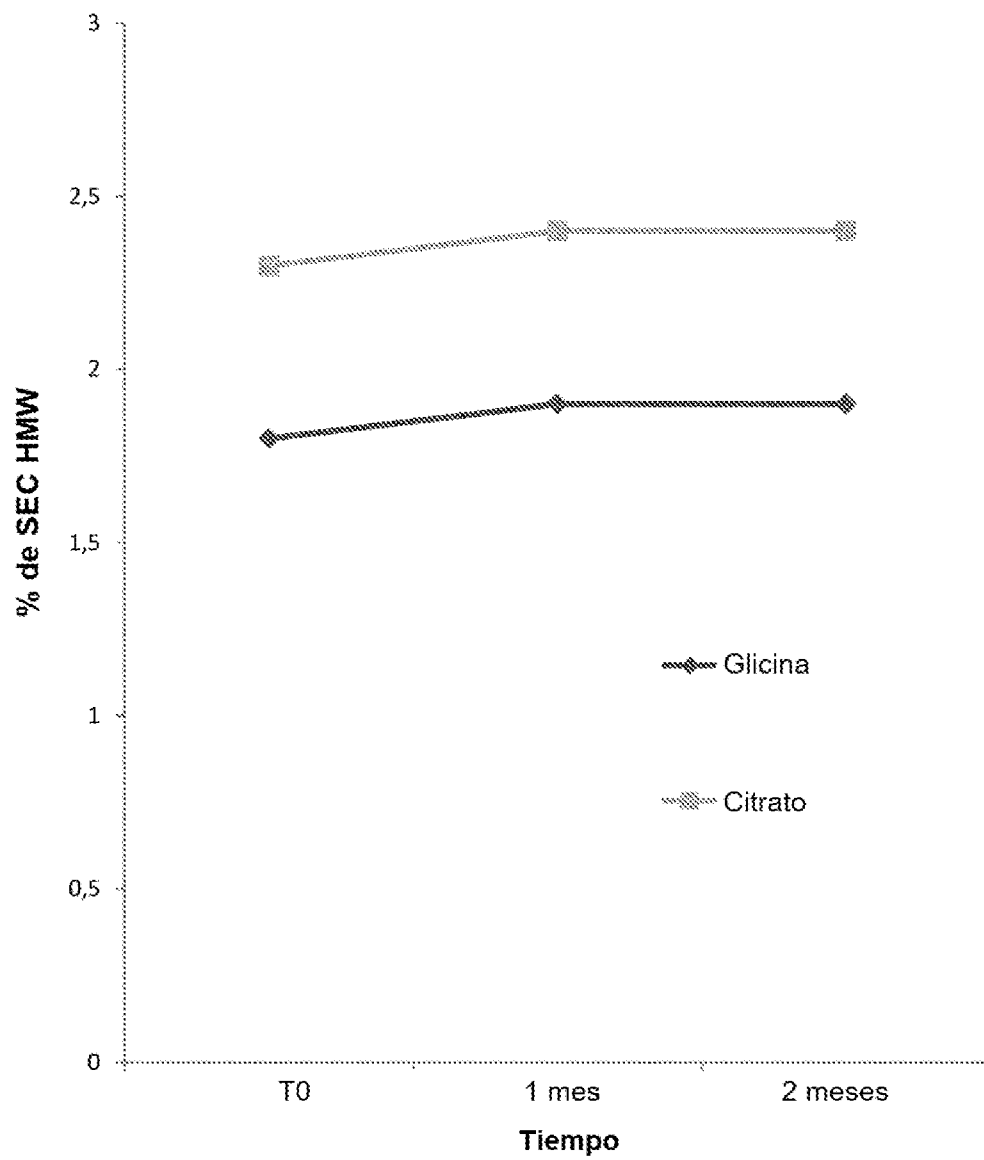


Fig. 24

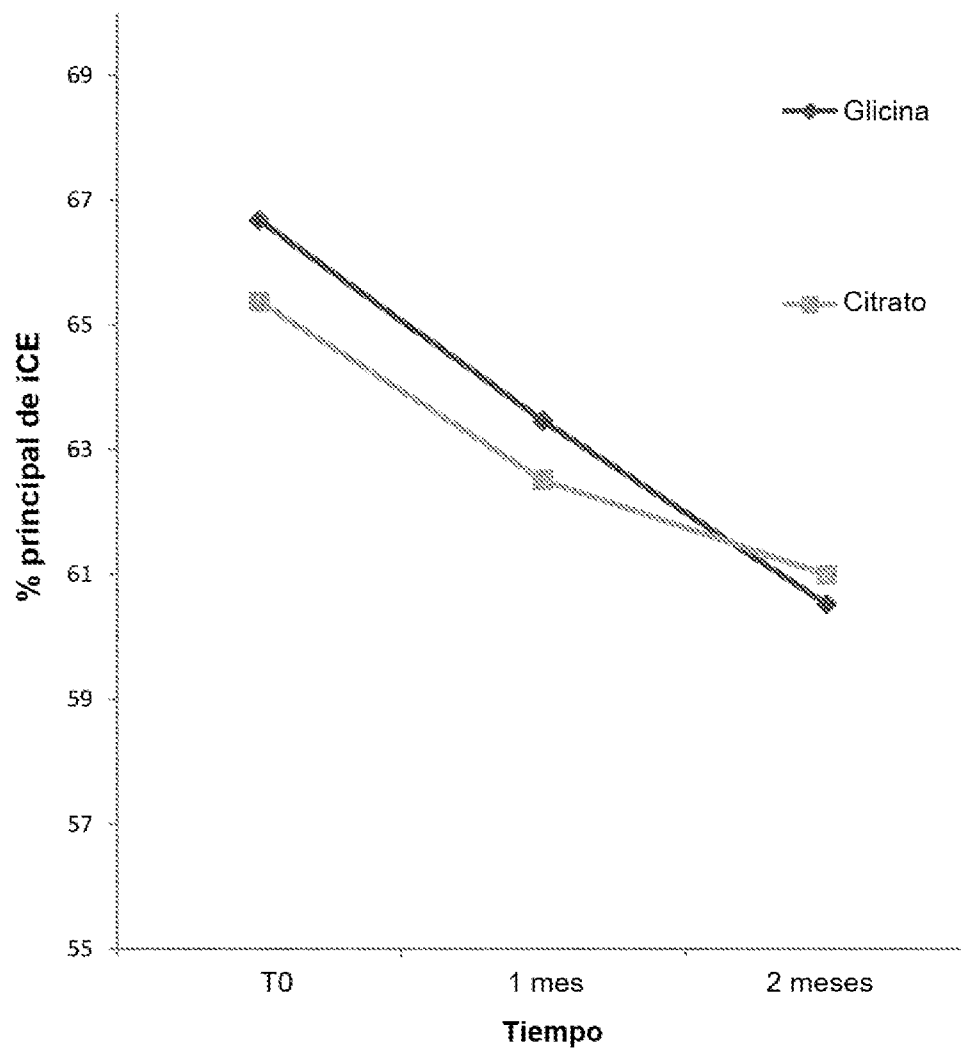


Fig. 25

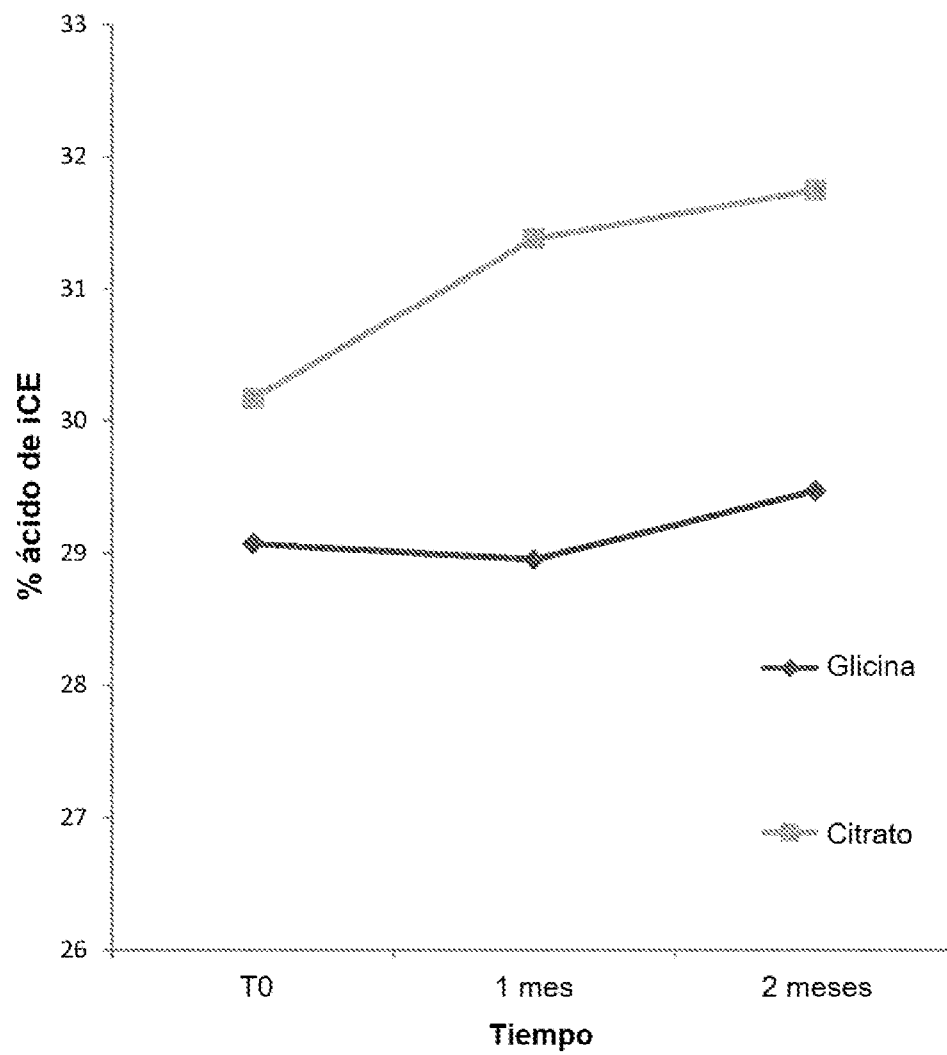




Fig. 26

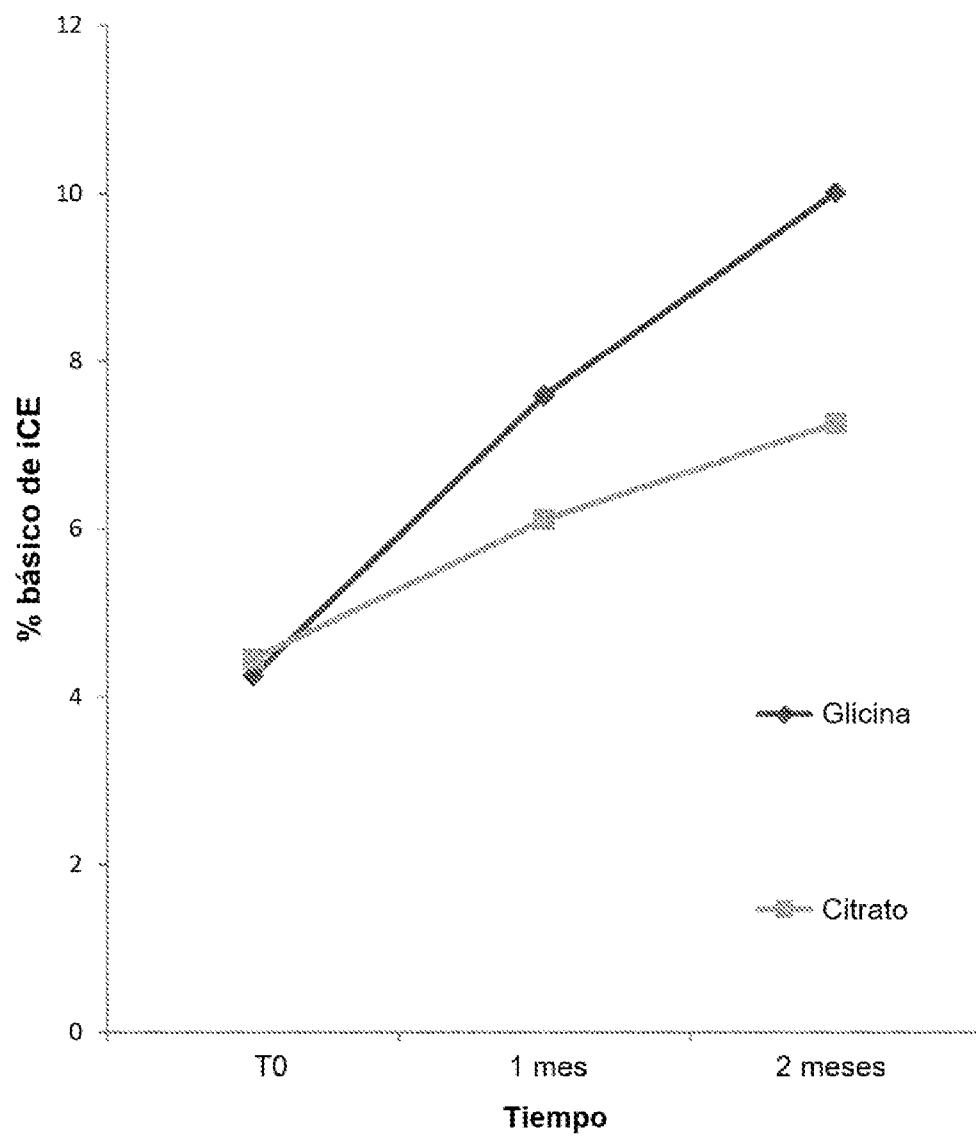


Fig. 27

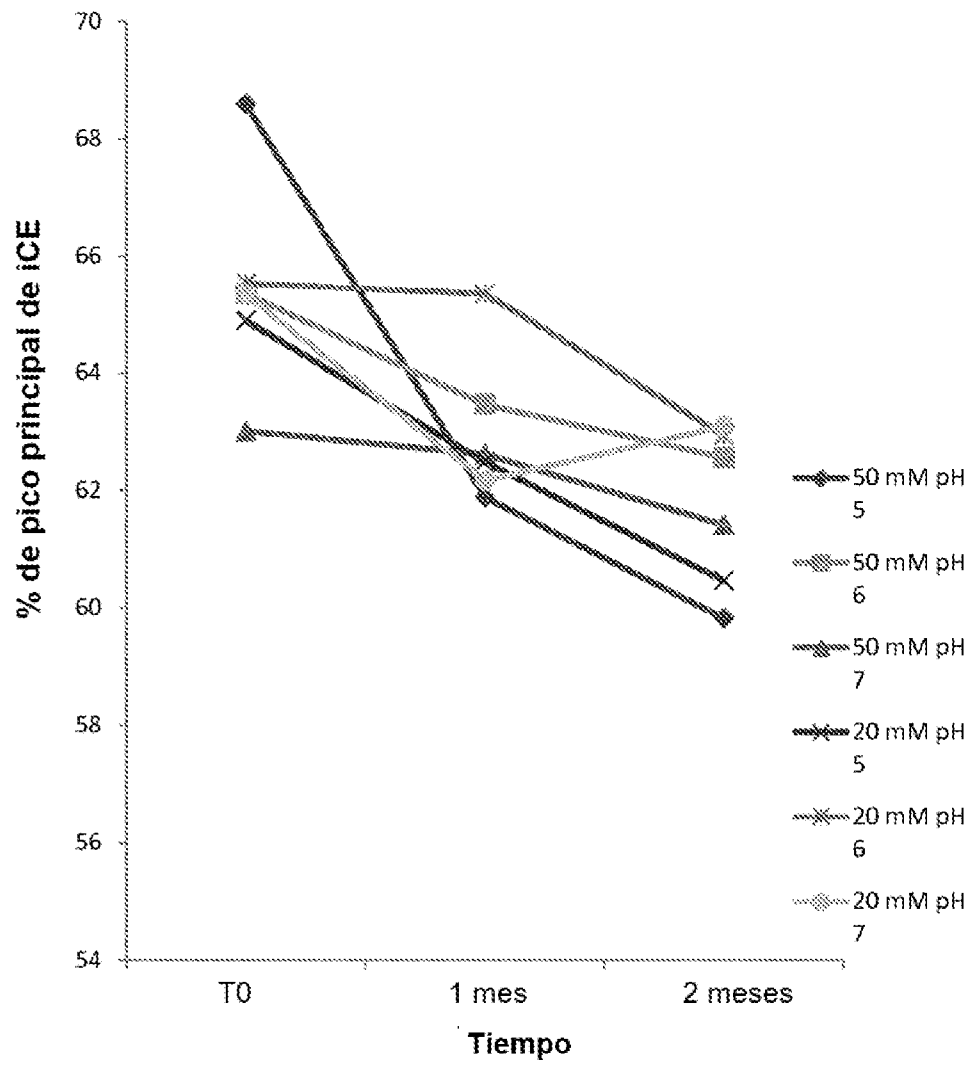


Fig. 28

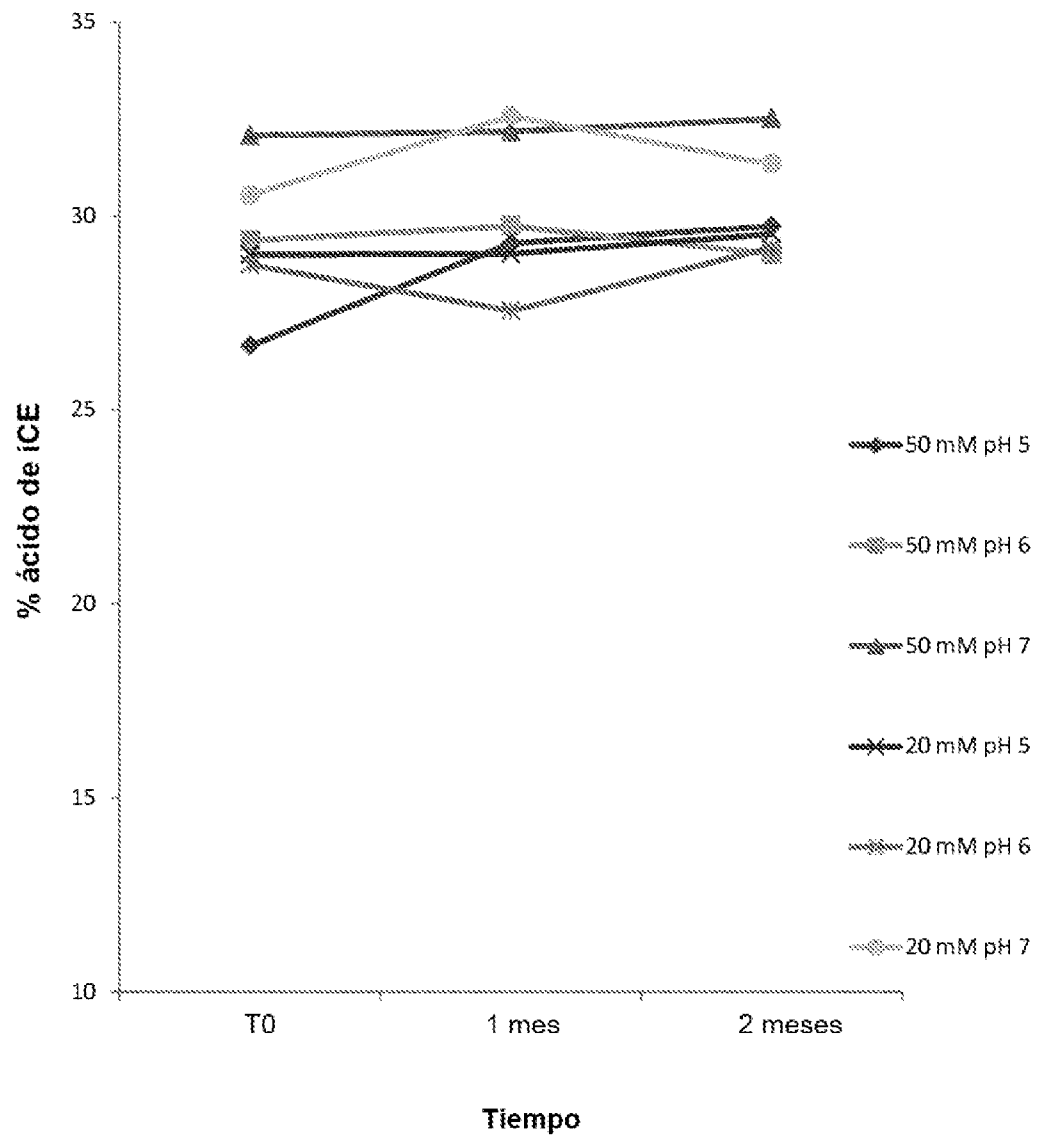


Fig. 29

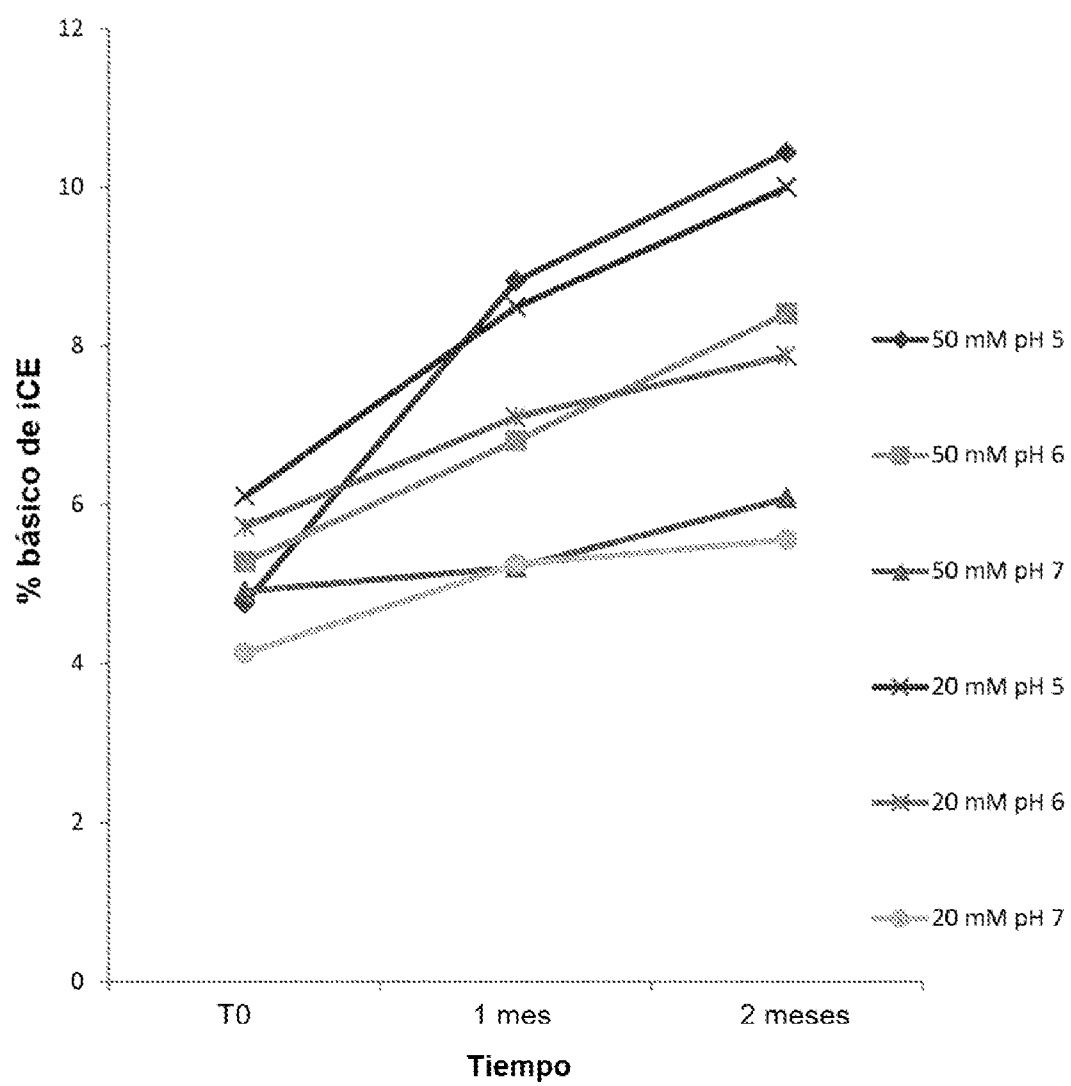


Fig. 30

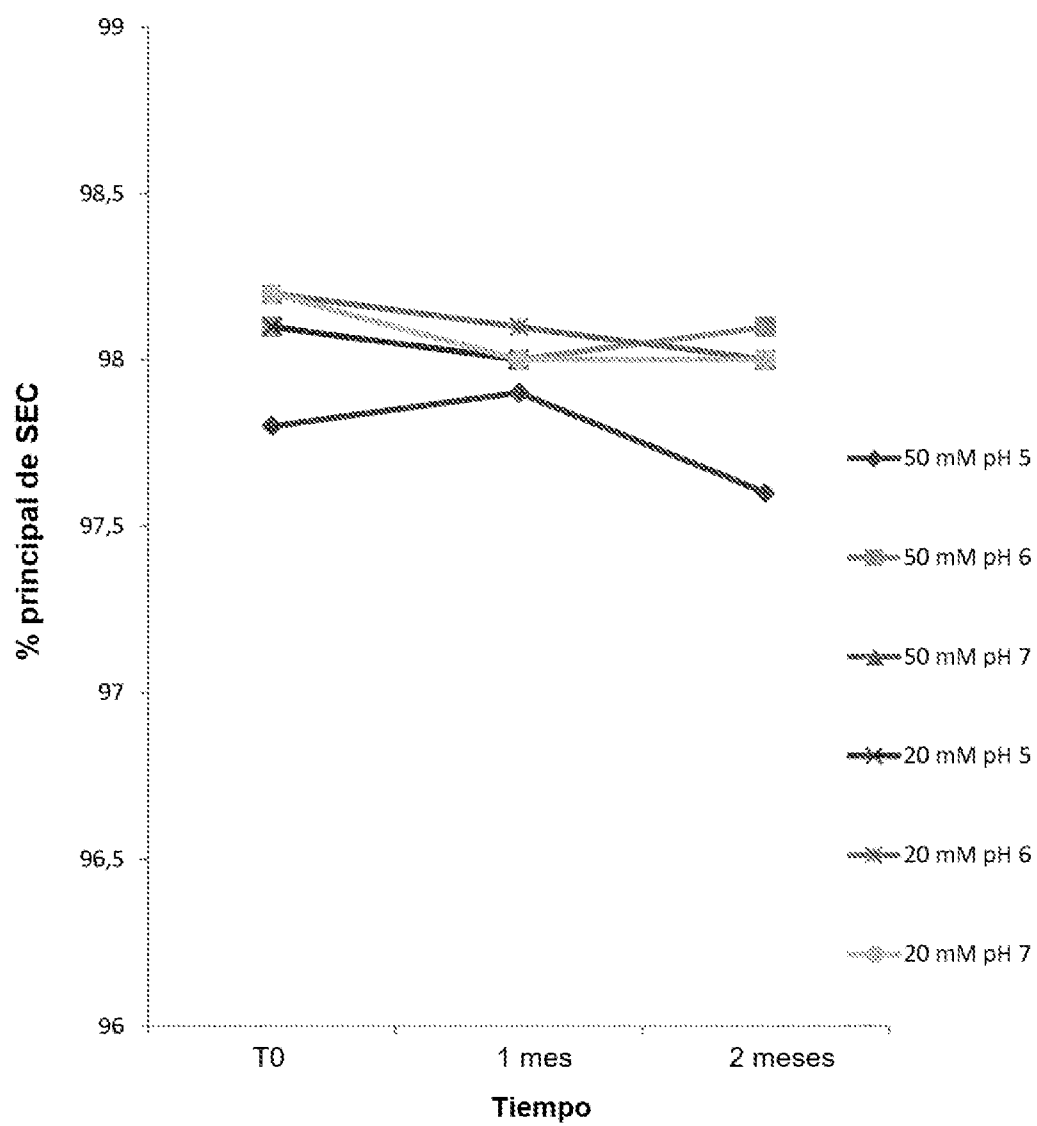


Fig. 31

