



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial



(11) BR 112016006397-0 B1

(22) Data do Depósito: 26/09/2014

(45) Data de Concessão: 16/01/2024

(54) Título: FORMULAÇÕES DE ANTICORPO DE ANTI-PDL1, SEU USO, ARTIGO DE FABRICAÇÃO E COMPOSIÇÃO

(51) Int.Cl.: C07K 16/28; A61K 39/395.

(30) Prioridade Unionista: 27/09/2013 US 61/883,953.

(73) Titular(es): GENENTECH, INC..

(72) Inventor(es): YING YANG; SREEDHARA ALAVATTAM.

(86) Pedido PCT: PCT US2014057821 de 26/09/2014

(87) Publicação PCT: WO 2015/048520 de 02/04/2015

(85) Data do Início da Fase Nacional: 23/03/2016

(57) Resumo: FORMULAÇÕES DE ANTICORPO DE ANTI-PDL1, SEU USO, ARTIGO DE FABRICAÇÃO E COMPOSIÇÃO. A invenção provê formulações farmacêuticas aquosas estáveis compreendendo um anticorpo de anti-PDL1. A invenção também provê métodos para formação de tais formulações e métodos de uso de tais formulações.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**FORMULAÇÕES DE ANTICORPO DE ANTI-PDL1, SEU USO, ARTIGO DE FABRICAÇÃO E COMPOSIÇÃO**".

Referência Cruzada a Pedidos Relacionados

[0001] Este pedido reivindica o benefício de prioridade do pedido provisório no. de série 61/883.953, depositado em 27 de setembro de 2013, que é incorporado aqui por referência em sua totalidade.

Apresentação da Listagem de Sequências em Arquivo de Texto ASCII.

[0002] O conteúdo da apresentação seguinte em Arquivo de Texto ASCII é incorporado aqui por referência em sua totalidade: uma forma de leitura por computador (CRF) da Listagem de Sequências (nome do arquivo: 146392022040SEQLIST.TXT, dados registrados: 26 de setembro de 2014, tamanho: 24 KB).

Campo da Invenção

[0003] Esta invenção refere-se a formulações farmacêuticas aquosas estáveis compreendendo anticorpos de anti-PDL1.

Antecedentes da Invenção

[0004] A provisão de dois sinais distintos a células T é um modelo amplamente aceito para a ativação de linfócito de linfócitos T restantes por células de apresentação de antígeno (APCs), Lafferty e outros, Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 53: 27-42 (1975). Este modelo posteriormente provê a discriminação entre tolerância auto e tolerância não-auto e tolerância imune, Bretscher e outros, Science 169: 1042-1049 (1970); Bretscher, P. A. P.N.A.S, USA 96: 185-190 (1999); Jenkins e outros, J. Exp. Med. 165: 302-319 (1987). O sinal primário, ou sinal específico de antígeno, é transduzido através do receptor de célula T (TCR) após reconhecimento de peptídeo de antígeno alheio apresentado no contexto do complexo maior de histocompatibilidade (MHC). O segundo sinal ou sinal co-estimulador é fornecido a células T por moléculas co-estimuladoras expressas nas células de apresentação de

antígeno (APCs), e induzem células T a promover expansão clonal, secreção de citocina e função efetora, Lenschow e outros, Ann. Ver. Immunol, 14:233 (1996), Na ausência de co-estimulação, células T podem tornar-se refratárias a estimulação de antígeno, não montam uma resposta imune eficaz, e ulteriormente podem resultar na exaustão ou na tolerância a antígenos estranhos.

[0005] No modelo de dois sinais as células T recebem sinais co-estimuladores secundários tanto positivos quanto negativos. A regulação de tais sinais positivos e negativos é crítica para maximizar as respostas imunes protetoras do hospedeiro, enquanto mantendo-se a tolerância imune e prevenção autoimune. Sinais secundários negativos parecem necessários para a indução de tolerância de célula T, enquanto sinais positivos promovem ativação da célula T. Enquanto o modelo de dois sinais simples ainda provê uma explicação válida para linfócitos nativos, uma resposta imune do hospedeiro é um processo dinâmico, e sinais co-estimuladores podem também ser providos a células T expostas a antígenos, O mecanismo de co-estimulação é de interesse terapêutico porque a manipulação dos sinais co-estimuladores tem mostrado prover um meio para ulteriormente melhorar ou terminar resposta imune com base em célula. Recentemente, foi revelado que disfunção de célula T ou anergia ocorre concorrentemente com uma expressão induzida sustentada do receptor inibitório, polipeptídeo de morte programada 1 (PD-1). Como um resultado disso, o direcionamento terapêutico de PD-1 e de outras moléculas que sinalizam através das interações com PD-1, tais como ligante de morte programada 1 (PD-L1) e ligante de morte programada 2 (PD-L2) são uma área de interesse intenso.

[0006] PD-L1 é ultra-expresso em muitos cânceres e está frequentemente associado a prognóstico pobre (Okazaki T e outros, Intern. Immun. 2007 19(7): 813) (Thompson RH e outros, Cancer Res 2006,

66(7):3381). De modo interessante, a maioria de linfócitos T de infiltração de tumor predominantemente expressam PD-1, em contraste com linfócitos T em tecidos normais e linfócitos T de sangue periférico que indicam que regulação para cima de PD-1 nas células T reativas a tumor pode contribuir para respostas de antitumor diminuídas (Blood 2009 114(8):1537). Isto pode ser devido a exploração de sinalização de PD-L1 mediada por expressão de PD-L1 de células de tumor que interagem com células T de expressão de PD-1 para resultar na atenuação de ativação de célula T e na evasão de vigilância imune (Sharpe e outros, Nat Rev 2002) (Keir ME e outros, 2008 Annu. Rev. Immunol, 26:677). Portanto, a inibição da interação de PD-L1/PD-1 pode melhorar a morte de tumores mediada por célula de CD8+ T.

[0007] PD-1 de direcionamento terapêutico e outras moléculas que sinalizam através de interações com PD-1, tais como ligante de morte programada 1 (PD-L1) e ligante de morte programada 2 (PD-L2) são uma área de interesse intenso. A inibição de sinalização de PD-L1 foi proposta como meio para melhorar imunidade de célula T para o tratamento de câncer (por exemplo, imunidade de tumor) e infecção, incluindo tanto infecção aguda quanto infecção crônica (por exemplo, persistente). No entanto, como uma ótima terapêutica dirigida nesta trajetória ainda não foi comercializada, uma necessidade médica não satisfeita significativa existe.

[0008] Todas as referências citadas aqui, incluindo pedidos de patentes, publicações de patentes, e números de acesso UniProtKB/Swiss-Prot são aqui incorporados por referência em sua totalidade, como se cada referência individual fosse especificamente e individualmente indicada como sendo incorporada por referência.

Sumário da Invenção

[0009] São aqui providas formulações farmacêuticas aquosas estáveis compreendendo um anticorpo. A formulação compreende um

anticorpo (por exemplo, um anticorpo de anti-PDL1), um tampão, sacarose, e um tensoativo, em que a formulação tem um pH de cerca de 5,0 a cerca de 7,0.

[0010] Em um aspecto, é provida aqui uma formulação farmacêutica aquosa estável, a formulação compreendendo um anticorpo monoclonal de anti-PDL1 em uma concentração de cerca de 40 mg/ml a cerca de 125 mg/ml, acetato de histidina ou acetato de sódio em uma concentração de cerca de 15 mM a cerca de 25 mM, sacarose em uma concentração de cerca de 60 mM a cerca de 240 mM, polissorbito em uma concentração de cerca de 0,005% (p/v) a cerca de 0,06% (p/v), e pH cerca de 5,0 a cerca de 6,3.

[0011] Em algumas concretizações, o anticorpo monoclonal na formulação é cerca de 40 mg/ml a cerca de 80 mg/ml. Em algumas concretizações, o anticorpo monoclonal na formulação é cerca de 54 mg/ml a cerca de 66 mg/ml. Em algumas concretizações, o anticorpo monoclonal na formulação é cerca de 60 mg/ml. Em algumas concretizações, o anticorpo monoclonal na formulação é cerca de 60 mg/ml a cerca de 125 mg/ml. Em algumas concretizações, o anticorpo monoclonal na formulação é cerca de 125 mg/ml.

[0012] Em algumas concretizações, o dito acetato de histidina ou acetato de sódio na formulação está em uma concentração de cerca de 17 mM a cerca de 22 mM. Em algumas concretizações, o dito acetato de histidina ou acetato de sódio na formulação está em uma concentração de cerca de 20 mM.

[0013] Em algumas concretizações, a dita sacarose na formulação é cerca de 60 mM a cerca de 180 mM. Em algumas concretizações, a dita sacarose na formulação é cerca de 120 mM. Em algumas concretizações, a dita sacarose na formulação é cerca de 240 mM.

[0014] Em algumas concretizações, a formulação tem um pH de cerca de 5,5 a cerca de 6,1. Em algumas concretizações, a formula-

ção tem um pH de cerca de 5,5 ou cerca de 5,8.

[0015] Em algumas concretizações, o dito polissorbato na formulação é polissorbato 20. Em algumas concretizações, o dito polissorbato (por exemplo, polissorbato 20) na formulação é cerca de 0,02% a cerca de 0,04%.

[0016] Em algumas concretizações, o dito anticorpo monoclonal na formulação é cerca de 60 mg/ml de sacarose na formulação é cerca de 120 mM, e pH é cerca de 5,8. Em algumas concretizações, o dito anticorpo monoclonal na formulação é cerca de 125 mg/ml de sacarose na formulação é cerca de 240 mM, e pH é cerca de 5,5.

[0017] Em algumas concretizações, a formulação compreende um anticorpo monoclonal (por exemplo, um anticorpo de anti-PDL1 descrito aqui) em uma quantidade de cerca de 60 mg/mL de acetato de histidina em uma concentração de cerca de 20 mM, sacarose em uma concentração de cerca de 120 mM, e polissorbato que é polissorbato 20 em uma concentração de 0,04% (p/v), e a formulação tem um pH de cerca de 5,8.

[0018] Em algumas concretizações, a formulação compreende um anticorpo monoclonal em uma quantidade de cerca de 125 mg/mL de acetato de histidina em uma concentração de cerca de 20 mM, sacarose em uma concentração de cerca de 240 mM, e polissorbato que é polissorbato 20 em uma concentração de 0,02%, and a formulação tem um pH de cerca de 5,5.

[0019] Em algumas concretizações, o dito anticorpo monoclonal na formulação não está sujeito a liofilização anterior. Em algumas concretizações, o dito anticorpo monoclonal na formulação é um anticorpo de comprimento total. Em algumas concretizações, o dito anticorpo monoclonal na formulação é um anticorpo de IgG1. Em algumas concretizações, o dito anticorpo monoclonal na formulação é um anticorpo humanizado. Em algumas concretizações, o dito anticorpo monoclonal

na formulação é um fragmento de anticorpo compreendendo uma região de ligação de antígeno. Em algumas concretizações, o fragmento de anticorpo é um fragmento de Fab ou de F(ab')₂.

[0020] Em algumas concretizações, o dito anticorpo monoclonal na formulação compreende

(a) uma região variável de cadeia leve compreendendo:

(1) HVR-L1 compreendendo a sequência de aminoácidos RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 1);

(2) HVR-L2 compreendendo a sequência de aminoácidos SASFLYS (SEQ ID NO: 2);

(3) HVR-L3 compreendendo a sequência de aminoácidos QQYLYHPAT (SEQ ID NO: 3); e

(b) uma região variável de cadeia pesada compreendendo:

(1) HVR-H1 compreendendo a sequência de aminoácidos GFTFSDSWIH (SEQ ID NO: 4);

(2) HVR-H2 compreendendo a sequência de aminoácidos AWISPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 5);

(3) HVR-H3 compreendendo a sequência de aminoácidos RHWPGGFDY (SEQ ID NO: 6),

[0021] Em algumas concretizações, o dito anticorpo monoclonal na formulação compreende uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 8. Em algumas concretizações, o dito anticorpo monoclonal na formulação compreende uma região variável de cadeia leve tendo pelo menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade de sequência com a região variável de cadeia leve tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, and uma região variável de cadeia pesada tendo pelo menos 85% , 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%,

94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade com a região variável de cadeia pesada tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 8. Em algumas concretizações, o dito anticorpo monoclonal na formulação compreende uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 32. Em algumas concretizações, o dito anticorpo monoclonal na formulação compreende uma região variável de cadeia leve tendo pelo menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade de sequência com a região variável de cadeia leve tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, and uma região variável de cadeia pesada tendo pelo menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade com a região variável de cadeia pesada tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 32, Em algumas concretizações, o dito anticorpo monoclonal na formulação compreende uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, e uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. Em algumas concretizações, o dito anticorpo monoclonal na formulação compreende uma cadeia leve tendo pelo menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade de sequência com a cadeia leve tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, e uma cadeia pesada tendo pelo menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade com a cadeia pesada tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

[0022] Em algumas concretizações, a formulação compreendendo o anticorpo é armazenado em um frasco de vidro ou um recipiente de liga de metal. Em algumas concretizações, a liga de metal é aço inoxi-

dável 316L ou hastelloy. Em algumas concretizações, a formulação é estável a 2-8°C por pelo menos 6 meses, pelo menos 12 meses, pelo menos 18 meses ou pelo menos 24 meses. Em algumas concretizações, o anticorpo na formulação retém, depois da armazenagem, pelo menos cerca de 75%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90% da atividade biológica antes da armazenagem. Em algumas concretizações, a atividade biológica é medida por ligação de anticorpo a PD-L1.

[0023] Em algumas concretizações, a formulação descrita aqui é estéril. Em algumas concretizações, a formulação descrita aqui é adequada como sendo administrada a um indivíduo. Em algumas concretizações, a formulação descrita aqui é para administração intravenosa (IV).

[0024] Em um outro aspecto, provido aqui é um artigo de fabricação ou kit compreendendo um recipiente que retém qualquer uma da formulação farmacêutica aquosa estável descrita acima e aqui. Em algumas concretizações, o recipiente é um frasco de vidro ou um recipiente de liga de metal. Em algumas concretizações, a liga de metal is aço inoxidável 316L ou hastelloy.

[0025] Em um outro aspecto, provido aqui é um método de tratamento de uma doença ou um distúrbio em um indivíduo compreendendo administração de uma quantidade eficaz de a formulação descrita aqui ao indivíduo, em que a doença ou a distúrbio é selecionada do grupo que consiste em infecção, câncer, e doença inflamatória.

[0026] Deve ser entendido que uma, alguma, ou a totalidade das propriedades das várias concretizações descritas aqui podem ser combinadas para formar outras concretizações da presente invenção, Esses e outros aspectos da invenção se tornarão evidentes por aquele de habilidade na técnica. Essas e outras concretizações da invenção são ulteriormente descritas pela descrição detalhada que se segue.

Breve Descrição dos Desenhos

[0027] A **Fig. 1** é uma série de gráficos que mostram análise estatística de dados de estabilidade de formulações de α -PDL1 a 40°C por ICIEF por uso de software JMP. **A)** Perda de taxa de pico principal média a partir de desenho de experiências (DOE) fracional fatorial. **B)** Análise de pico principal a partir de DOE fracional fatorial. Pico principal contém espécie carregada de α -PDL1 com o mesmo pH que o pI (ponto isoelétrico) da molécula.

[0028] A **Fig. 2** é uma série de gráficos que mostram análise estatística de dados de estabilidade de formulações de α -PDL1 a 25°C por CIEF por uso de software JMP. **A)** Perda de taxa de pico principal média a partir de desenho de experiências (DOE) fracional fatorial. **B)** Análise de pico principal a partir de DOE fracional fatorial. Pico principal contém espécie carregada de α -PDL1 com o mesmo pH que o pI (ponto isoelétrico) da molécula.

[0029] A **Fig. 3** é uma série de gráficos que mostram análise estatística de dados de estabilidade de formulações de α -PDL1 a 40°C por SE-HPLC por uso de software JMP. **A)** Perda de taxa de pico principal média a partir do desenho de experiências (DOE) fatorial fracional. **B)** Análise de pico principal a partir de DOE fracional fatorial. Pico principal contém monômero de α -PDL1.

[0030] A **Fig. 4** é uma série de gráficos que mostram análise estatística de dados de estabilidade de formulações de α -PDL1 a 25°C por SE-HPLC por uso de software JMP. **A)** Perda de taxa de pico principal média a partir do desenho de experiências (DOE) fatorial fracional. **B)** Análise de pico principal a partir do DOE fatorial fracional. Pico principal contém monômero de α -PDL1.

[0031] A **Fig. 5** é um gráfico que mostra falta de degradação de PS20 significativa de várias formulações de α -PDL1 armazenadas em várias temperaturas e tempo. Gráfico de percentagem (%) PS20 que

permanece na formulação como detectado por detector de dispersão de luz evaporativa (ELSD) em F1 através das formulações de F10, a é tempo zero (T0); b é 40°C, 1M; c é 25°C, 2M; d é 5° C, 2M; e é 5°C, 6M; f é 5°C, 6M, frasco de vidro de 20cc (GV), carga alta; e g é 5°C, 6M, frasco de vidro de 20cc (GV), carga baixa.

[0032] A **Fig. 6** é uma série de gráficos que mostram estabilidade de formulações de α -PDL1 armazenadas a -20°C ou 5°C por até 6 meses em um frasco de vidro (GV), **A)** Gráfico de percentagem (%) de monômero nas formulações depois dos cinco ciclos congelamento e descongelamento durante a armazenagem a -20°C pelo tempo indicado. **B)** Gráfico de percentagem (%) de monômero nas formulações armazenadas a 5°C pelo tempo indicado. **C)** Gráfico de percentagem (%) de pico principal obtido a partir da formulação depois de cinco ciclos de congelamento e descongelamento durante a armazenagem a -20°C pelo tempo indicado. **D)** Gráfico de percentagem (%) de pico principal obtido a partir da formulação armazenada a 5°C pelo tempo indicado.

[0033] A **Fig. 7** é uma série de gráficos que mostram estabilidade de uma formulação de α -PDL1 depois de três ciclos de congelamento e descongelamento e armazenagem em uma minilata de aço inoxidável ou hastelloy. **A)** Gráfico de percentagem (%) de monômero na formulação depois da armazenagem na temperatura indicada por 3 meses. **B)** Gráfico de percentagem (%) de pico principal na formulação depois da armazenagem na temperatura indicada por 3 meses.

[0034] A **Fig. 8** é uma série de gráficos que mostram estabilidade de uma armazenagem de formulação de α -PDL1 em um frasco de 20cc, **A)** Gráfico de percentagem (%) de monômero na formulação depois da armazenagem na temperatura indicada por 3 meses. **B)** Gráfico de percentagem (%) de pico principal na formulação depois da armazenagem na temperatura indicada por 3 meses.

[0035] A **Fig. 9** é uma série de gráficos que mostram estabilidade de formulações de α -PDL1 contendo várias concentrações de PS20 quando agitadas em frasco de vidros. **A)** Gráfico de percentagem (%) de monômero em formulações depois da agitação pelo tempo indicado a temperatura ambiente. **B)** Gráfico de turvação como medido por absorvância a 350 nm depois da agitação pelo tempo indicado a temperatura ambiente.

[0036] A **Fig. 10** é um gráfico que mostra estabilidade de formulações de α -PDL1 armazenadas no frasco de vidros por um período de tempo nas temperaturas indicadas e então submetidos a agitação, Percentagem de mudança de monômero nas formulações foi medida por SEC.

[0037] A **Fig. 11** é uma série de gráficos que mostram compatibilidade da taxa de perda de α -PDL1 por semana com diminuição de pH. **A)** Gráfico de percentagem (%) de perda de monômero por semana na formulação depois da armazenagem a 40°C. **B)** Gráfico de percentagem (%) de perda de pico principal por semana na formulação depois da armazenagem a 40°C.

Descrição Detalhada

I. Definições.

[0038] Antes de descrever a invenção em detalhes, deve ser entendido que esta invenção não é limitada a composições particulares ou sistemas biológicos, que podem, naturalmente, variar. Deve ser entendido que a terminologia usada aqui é para apenas a finalidade de descrição das concretizações particulares, e pretende-se que não seja limitante, Como usado neste relatório e as reivindicações anexas, as formas singular "um", "uma", "o" e "a" incluem referentes plurais a não ser que o conteúdo claramente dite de outro modo. Assim, por exemplo, referência a "uma molécula" opcionalmente inclui uma combinação de duas ou mais de tais moléculas, e semelhantes.

[0039] O termo "cerca de" como usado aqui refere-se à faixa de erro usual para o valor respectivo prontamente conhecida pela pessoa versada no campo técnico, Referência a "cerca de" um valor ou parâmetro aqui inclui (e descreve) concretizações que são dirigidas àquele valor ou parâmetro per se.

[0040] É entendido que aspectos e concretizações da invenção descritos aqui incluem "compreendendo," "que consiste," e "que consiste essencialmente de" aspectos e concretizações.

[0041] O termo "formulação farmacêutica" refere-se a uma preparação que é de tal forma que seja permitida a atividade biológica do ingrediente ativo a ser eficaz, e que contém nenhum componente adicional que são inaceitavelmente tóxicos a um indivíduo ao qual a formulação seria administrada. Tais formulações são estéreis, Excipientes "farmaceuticamente aceitáveis" (veículos, aditivos) são aqueles que podem razoavelmente ser administrados a um mamífero objeto para prover uma dose eficaz do ingrediente ativo empregado.

[0042] Uma formulação "estéril" é acético ou livre ou essencialmente livre de todos os microorganismos vivos e seus esporos.

[0043] Uma formulação "congelada" é uma em uma temperatura abaixo de 0°C. Em geral, a formulação congelada não é seca por congelamento, nem é submetida a liofilização anterior ou subsequente. Em certas concretizações, a formulação congelada compreende substância de fármaco congelada para armazenagem (no tanque de aço inoxidável) ou produto de fármaco congelado (na configuração de frasco final).

[0044] Uma formulação "estável" é uma em que a proteína ali essencialmente retém sua estabilidade física e/ou estabilidade química e/ou atividade biológica na armazenagem. De preferência, a formulação essencialmente retém sua estabilidade física e estabilidade química, bem como sua atividade biológica na armazenagem. O período de

armazenagem é em geral selecionado com base na vida de prateleira pretendida da formulação. Várias técnicas analíticas para a medição da estabilidade de proteína estão disponíveis na técnica e são revistas em *Peptide and Proteína Drug Delivery*, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs, (1991) and Jones, A. *Adv. Drug Delivery Rev*, 10: 29-90 (1993), por exemplo. Estabilidade pode ser medida em uma temperatura selecionada por um período de tempo selecionado. Estabilidade pode ser qualitativamente e/ou quantitativamente avaliada em uma variedade de diferentes modos, incluindo avaliação de formação de agregado (por exemplo, uso de cromatografia de exclusão por tamanho, por medição de turvação, e/ou por inspeção visual); por avaliação de heterogeneidade de carga usando-se cromatografia de troca de cátions, focalização isoelétrica capilar de imagem (icIEF) ou eletroforese de zona capilar; análise de sequência amino-terminal ou carbóxi-terminal; análise de espectrométrica de massa; análise de SDS-PAGE para comparar anticorpo reduzido ou intacto; análise de mapa de peptídeos (por exemplo, triptíco ou LYS-C); avaliação de atividade biológica ou função de ligação de antígeno do anticorpo; etc. Instabilidade pode envolver qualquer uma ou mais de: agregação, desamidação (*por exemplo*, desamidação de Asn), oxidação (*por exemplo*, oxidação de Met), isomerização (*por exemplo*, isomerização de Asp), grampeamento/hidrólise/fragmentação (*por exemplo*, fragmentação de região de articulação), formação de succinimida, cisteína(s) desemparelhada(s), extensão N-terminal, processamento C-terminal, diferenças de glicosilação, etc.

[0045] Uma proteína "retém sua estabilidade física" em uma formulação farmacêutica se ela mostrar nenhum sinal ou muito pouca de agregação, precipitação e/ou desnaturação no exame visual de cor e/ou claridade, ou como medida por dispersão de luz UV ou por cromatografia de exclusão por tamanho.

[0046] Uma proteína "retém sua estabilidade química" em uma formulação farmacêutica, se a estabilidade química em um dado tempo for tal que a proteína for considerada para ainda reter sua atividade biológica como definida abaixo. Estabilidade química pode ser avaliada por detecção e quantificação de formas quimicamente alteradas da proteína, Alteração química pode envolver modificação de tamanho (por exemplo, corte) que pode ser avaliada usando-se cromatografia de exclusão por tamanho, SDS-PAGE e/ou ionização de dessorção auxiliada por matriz/espectrometria de massa de tempo de voo (MALDI/TOF MS), por exemplo. Outros tipos de alteração química incluem alteração de carga (por exemplo, que ocorre como um resultado de desamidação) que podem ser avaliadas por cromatografia de troca de íons ou icIEF, por exemplo,

[0047] Um anticorpo "retém sua atividade biológica" em uma formulação farmacêutica, se a atividade biológica do anticorpo em um dado tempo for pelo menos cerca de 60% (dentro dos erros do ensaio) da atividade biológica exibida ao mesmo tempo da formulação farmacêutica foi preparada como determinado em um ensaio (por exemplo, um ensaio de ligação de antígeno). Outros ensaios de "atividade biológica" para anticorpos são elaborados aqui mais abaixo.

[0048] Como usado aqui, "atividade biológica" de um anticorpo monoclonal inclui a capacidade do anticorpo para se ligar a antígeno e que resulta em uma resposta biológica mensurável que pode ser medida in vitro ou in vivo.

[0049] Um anticorpo monoclonal "desamidado" aqui é um em que um ou mais seus resíduos de asparagina foram derivatizados, por exemplo, a um ácido aspártico ou um ácido isso-aspártico,

[0050] Um anticorpo monoclonal "oxidado" aqui é um em que um ou mais resíduos de triptofano e/ou um ou mais sua metionina foi(foram) oxidado(s).

[0051] Um anticorpo monoclonal "glicado" aqui é um em que um ou mais seu resíduo de lisina foi(foram) glicado(s).

[0052] Um anticorpo que é "suscetível a desamidação" é um compreendendo um ou mais resíduo, que demonstrou ser propenso a desamidar,

[0053] Um anticorpo que é "suscetível a oxidação" é um compreendendo um ou mais resíduo, que demonstrou ser propenso a oxidar.

[0054] Um anticorpo que é "suscetível a agregação" é um que demonstrou agregar entre si molécula(s) de anticorpo, especialmente no congelamento e/ou agitação.

[0055] Um anticorpo que é "suscetível a fragmentação" é um que demonstrou ser clivado em dois ou mais fragmentos, por exemplo, em uma sua região de articulação.

[0056] Por "redução de desamidação, oxidação, agregação, ou fragmentação" é destinado a prevenção ou diminuição da quantidade de desamidação, oxidação, agregação, ou fragmentação em relação ao anticorpo monoclonal formulado em uma formulação diferente.

[0057] O anticorpo que é formulado é de preferência essencialmente puro e desejavelmente essencialmente homogêneo (por exemplo, livre de proteínas contaminantes etc.). Anticorpo "essencialmente puro" significa uma composição compreendendo pelo menos cerca de 90% em peso do anticorpo, com base no peso total de proteínas na composição, de preferência pelo menos cerca de 95% em peso, Anticorpo "essencialmente homogêneo" significa uma composição compreendendo pelo menos cerca de 99% em peso de anticorpo, com base no peso total de proteínas na composição.

[0058] Por "isotônico" quer se dizer que a formulação de interesse tem essencialmente a mesma pressão osmótica que sangue humano, Formulações isotônicas em geral têm uma pressão osmótica de cerca de 250 a 350 mOsm, Isotonicidade pode ser medida usando-se uma

pressão de vapor ou osmômetro de tipo congelamento com gelo, por exemplo.

[0059] Como usado aqui, "tampão" refere-se a uma solução tamponada que resiste mudanças em pH pela ação de seus componentes de conjugado de ácido-base. O tampão desta invenção de preferência tem um pH na faixa de cerca de 4,5 a cerca de 7,0, de preferência de cerca de 5,6 a cerca de 7,0, por exemplo, de 5,6 a 6,9, 5,7 a 6,8, 5,8 a 6,7, 5,9 a 6,6, 5,9 a 6,5, 6,0, 6,0 a 6,4, ou 6,1 a 6,3. Em uma concretização o tampão tem um pH 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, ou 7,0. Por exemplo, fosfato de sódio é um exemplo de tampões que controlarão o pH nesta faixa.

[0060] Como usado aqui, um "tensoativo" refere-se a um agente tensoativo, de preferência um tensoativo não iônico. Exemplos dos tensoativos aqui incluem polissorbato (por exemplo, polissorbato 20 e, polissorbato 80); poloxâmero (por exemplo, poloxâmero 188); Triton; sulfato de dodecila de sódio (SDS); sulfato de laurila de sódio; glicosídeo octila de sódio; lauril-, miristil-, linoleil-, ou estearil-sulfobetaína; lauril-, miristil-, linoleil- ou estearil-sarcosina; linoleil-, miristil-, ou cetil-betaína; lauroamidopropil-, cocamidopropil-, linoleamidopropil-, miristamidopropil-, palmidopropil-, ou isostearamidopropil-betaína (por exemplo, lauroamidopropila); miristamidopropil-, palmidopropil-, ou isoestearamidopropil-dimetilamina; metil cocoil- taurato de sódio, ou metil oleil-aurato de dissódio; e a série MONAQUAT^R (Mona Industries, Inc., Paterson, N.J.); polietil glicol, polipropil glicol, e copolímeros de etileno e propileno glicol (por exemplo, Pluronic, PF68 etc); etc. Em uma concretização, o tensoativo aqui é polissorbato 20.

[0061] Em um sentido farmacológico, no contexto da invenção, uma "quantidade terapeuticamente eficaz" de um anticorpo refere-se a uma quantidade eficaz na prevenção ou no tratamento de um distúrbio para o tratamento do qual o anticorpo é eficaz. Um "distúrbio" é qual-

quer condição que se beneficiaria a partir do tratamento com o anti-corpo. Isso inclui desordens ou doenças crônicas e agudas incluindo aquelas condições patológicas que predisõem o mamífero à distúrbio em questão.

[0062] Um "conservante" é um composto que pode ser opcionalmente incluído na formulação para essencialmente reduzir ação bacteriana ali, assim facilitando a produção de uma formulação de múltiplos usos, por exemplo. Exemplos de conservantes potenciais incluem cloreto de octadecildimetilbenzil amônio, cloreto de hexametônio, cloreto de benzalcônio (uma mistura de cloretos de alquilbenzildimetilamônio em que os grupos alquila são compostos de cadeia longa), e cloreto de benzetônio. Outros tipos de conservantes incluem álcoois aromáticos tais como álcool fenólico, butílico e benzílico, alquil parabenos tais como metil ou propil parabeno, catocol, resorcinol, cicloexanol, 3-pentanol, e m-cresol. Em uma concretização, o conservante aqui é álcool benzílico.

[0063] Como usado aqui, o termo "tratamento" refere-se a intervenção clínica projetada para alterar o curso natural do indivíduo ou célula a ser tratado durante o curso da patologia clínica. Efeitos desejáveis de tratamento incluem diminuição da taxa de progressão de doença, melhoramento ou alívio do estado da doença, e remissão ou prognóstico aperfeiçoado. Por exemplo, um indivíduo é "tratado" com sucesso se um ou mais sintomas associados a câncer forem mitigados ou eliminados, incluindo, mas não são limitados a, redução da proliferação de (ou destruição) células cancerosas, diminuição de sintomas que resultam da doença, aumento da qualidade de vida daqueles que sofrem da doença, diminuição da dose de outras medicações exigidas para tratar a doença, atraso da progressão da doença, e/ou prolongamento da sobrevivência de indivíduos.

[0064] Como usado aqui, "progressão do atraso de uma doença"

significa defender, articular, diminuir, retardar, estabilizar, e/ou adiar o desenvolvimento doença (tal como câncer). Este atraso pode ser de comprimentos variáveis de tempo, dependendo da história da doença e/ou indivíduo a ser tratado. Como é evidente por aquele de habilidade na técnica, um atraso suficiente ou significativo pode, com efeito, incluir prevenção, pelo fato de que o indivíduo não desenvolve a doença. Por exemplo, um câncer de estágio tardio, tal como desenvolvimento de metástase, pode ser retardado.

[0065] Uma "quantidade eficaz" é pelo menos a quantidade mínima exigida para efetuar um aperfeiçoamento ou prevenção mensurável de um distúrbio particular. Uma quantidade eficaz aqui pode variar de acordo com fatores tais como estado da doença, idade, sexo e peso do paciente, e a capacidade do anticorpo de eliciar uma resposta desejada no indivíduo. Uma quantidade eficaz é também uma em que quaisquer efeitos tóxicos ou nocivos do tratamento excediam o valor pelos efeitos terapeuticamente benéficos. Para o uso profilático, resultados benéficos ou desejados incluem resultados tal como eliminação ou redução do risco, diminuição da severidade, ou atraso do início da doença, incluindo sintomas bioquímicos, histológicos e/ou comportamentais da doença, suas complicações e fenótipos patológicos intermediários durante o desenvolvimento da doença. Para o uso terapêutico, resultados benéficos ou desejados incluem resultados clínicos tal como diminuição um ou mais sintomas que resultam da doença, aumento da qualidade de vida daqueles que sofrem da doença, diminuição da dose de outras medicações exigidas para tratar a doença, efeito de melhoramento de uma outra medicação tal como via direcionamento, atraso da progressão da doença, e/ou prolongamento da sobrevivência. No caso de câncer ou tumor, uma quantidade eficaz do fármaco pode ter o efeito na redução do número de células de câncer; redução do tamanho de tumor; inibição de (isto é, diminuir em alguma

extensão ou desejavelmente parar) infiltração de célula de câncer para dentro de órgãos periféricos; inibir (*isto é*, diminuir em alguma extensão e desejavelmente parar) metástase de tumor; inibição em alguma extensão de crescimento de tumor; e/ou alívio em alguma extensão de um ou mais dos sintomas associados à distúrbio. Uma quantidade eficaz pode ser administrada em uma ou mais administrações. Para as finalidades desta invenção, uma quantidade eficaz de fármaco, composto, ou composição farmacêutica é uma quantidade suficiente para realizar tratamento profilático ou terapêutico ou diretamente ou indiretamente. Como é entendido no contexto clínico, uma quantidade eficaz de um fármaco, composto ou composição farmacêutica pode ou não pode ser conseguido em combinação com um outro fármaco, composto, ou composição farmacêutica. Assim, uma "quantidade eficaz" pode ser considerada no contexto de administração de um ou mais agentes terapêuticos, e um único agente pode ser considerado como sendo dado em uma quantidade eficaz se, em combinação com um ou mais outros agentes, um resultado desejável pode ser ou é conseguido.

[0066] Como usado aqui, "em combinação com" refere-se a administração de uma modalidade de tratamento além de uma outra modalidade de tratamento. Como tal, "em combinação com" refere-se a administração de uma modalidade de tratamento antes, durante, ou depois da administração da outra modalidade de tratamento ao indivíduo.

[0067] Um "distúrbio" é qualquer condição que se beneficiaria do tratamento incluindo, mas não limitada a, desordens ou doenças crônicas e agudas incluindo aquelas condições patológicas que predisõem o mamífero à distúrbio em questão.

[0068] Os termos "distúrbio proliferativa de célula" e "distúrbio proliferativa" referem-se a desordens que estão associadas a algum grau de proliferação de célula anormal. Em uma concretização, a distúrbio proliferativa de célula é câncer. Em uma concretização, a distúrbio pro-

liferativa de célula é um tumor.

[0069] "Tumor", como usado aqui, refere-se à totalidade de proliferação e crescimento de célula neoplásica, se maligno ou benigno, e todas as células e tecidos pré-cancerosas e cancerosas. Os termos "câncer", "canceroso", "distúrbio proliferativa de célula", "distúrbio proliferativa" e "tumor" não são mutualmente exclusivos como relacionados aqui.

[0070] Os termos "câncer" e "canceroso" referem-se a ou descrevem a condição fisiológica em mamíferos que é tipicamente caracterizado pelo crescimento de célula desregulado. Exemplos de câncer incluem mas não são limitados a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, e leucemia ou malignidades linfóides, Mais particular exemplos de tais câncer incluem, mas não limitados a, câncer de célula escamosa (*por exemplo*, câncer de célula escamosa epitelial), câncer de pulmão incluindo câncer de pulmão de célula pequena, câncer de pulmão de célula não pequena, adenocarcinoma do pulmão e carcinoma escamoso do pulmão, câncer do peritônio, câncer hepatocelular, câncer gástrico ou câncer de estômago incluindo câncer gastrointestinal e câncer estromal gastrointestinal, câncer pancreático, glioblastoma, câncer cervical, câncer ovariano, câncer de fígado, câncer de bexiga, câncer do trato urinário, hepatoma, câncer de mama, câncer de cólon, câncer retal, câncer de colorretal, carcinoma endometrial ou uterino, carcinoma de glândula salivar, câncer de rim ou renal, câncer de próstata, câncer da vulva, câncer de tireóide, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma peniana, melanoma, melanoma de espalhamento superficial, melanoma de lentigo maligno, melanomas lentiginosos acrais, melanomas nodulares, mieloma múltiplo e linfoma de célula B (incluindo linfoma de não Hodgkin (NHL) de baixo grau/folicular; NHL linfocítico pequeno (SL); NHL de grau intermediário/folicular; NHL de grau intermediário difuso; NHL imunoblástico de alto grau; NHL linfoblástico

de alto grau; NHL de célula não clivada pequena de grau alto; NHL de doença volumosa; linfoma de célula de manto; linfoma relacionado com AIDS; e Macroglobulinemia de Waldenstrom); leucemia linfocítica crônica (CLL); leucemia linfoblástica aguda (ALL); leucemia de célula pilosa; leucemia mieloblástica crônica; e distúrbio linfoproliferativa pós-transplante (PTLD), bem como proliferação vascular anormal associada a facomatoses, edema (tal como aquele associado a tumores cerebrais, síndrome de Meigs, cérebro, bem como câncer de cabeça e pescoço, metástases associadas. Em certas concretizações, cânceres que são acessíveis a tratamento pelos anticorpos da invenção incluem câncer de mama, câncer colorretal, câncer retal, câncer de pulmão de célula não pequena, glioblastoma, linfoma de não Hodgkins (NHL), câncer de célula renal, câncer de próstata, câncer de fígado, câncer pancreático, sarcoma de tecido mole, sarcoma de kaposi, carcinoma carcinóide, câncer de cabeça e de pescoço, câncer ovariano, mesotelioma, e múltiplo mieloma. Em algumas concretizações, o câncer é selecionado de: câncer de pulmão de célula pequena, glioblastoma, neuroblastomas, melanoma, carcinoma de mama, câncer gástrico, câncer de colorretal (CRC), e carcinoma hepatocelular. Ainda, em algumas concretizações, o câncer é selecionado de: câncer de pulmão de célula não pequena, câncer de colorretal, glioblastoma e carcinoma de mama, incluindo formas metastáticas daqueles cânceres.

[0071] Um "agente quimioterapêutico" é um composto químico útil no tratamento de câncer. Exemplos de agentes quimioterapêuticos incluem agentes de alquilação tais como tiotepa e cicloesfosfamida (CYTOXAN®); alquil sulfonatos tais como busulfan, improsulfan e piposulfan; aziridinas tais como benzodopa, carboquona, meturedopa, e uredopa; etileniminas e metilamelaminas incluindo altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosforamida e trimetilmelamina; acetogeninas (especialmente bullatacin e bullatacinona);

delta-9-tetraidrocanabinol (dronabinol, MARINOL[®]); beta-lapacona; lapachol; colcicinas; ácido betulínico; um camptotecina (incluindo o topotecan de análogo sintético (HYCAMTIN[®]), CPT-11 (irinotecan, CAMP-TOSAR[®]), acetilcamptotecina, escopolectina, e 9-aminocamptotecin); briostatin; calistatin; CC-1065 (incluindo seus análogos sintéticos de adozelesina, carzelesin e bizelesin); podofilotoxina; ácido podofilínico, teniposídeo; criptoficins (particularmente criptoficin 1 e criptoficin 8); dolastatin; duocarmicin (incluindo os análogos sintéticos, KW-2189 e CB1-TM1); eleutherobin; pancratistatin; um sarcodictin; espongistatin; mostardas de nitrogênio tais como clorambucila, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, cloridrato de óxido de mecloretamina, melfalan, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostarda de uracila; nitrosoúreias tais como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, e ranimnustina; antibióticos tais como antibióticos (por exemplo, caliceamicina, especialmente caliceamicina gama1I e caliceamicina omegall (vide, por exemplo, Nicolaou e outros, *Angew, Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994))); CDP323, um inibidor de alfa-4 integrina oral; dinemicina, incluindo dinemicina A; uma esperamicina; bem como cromóforo de neocarzinoestatina e cromóforos de antibiótico de enediina de cromoproteína relacionados), aclacinomisin, actinomicina, authramicina, aza-serina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, caminomicina, carzinophilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluindo ADRIAMYCIN[®], morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina, injeção de lipossoma de HCl de doxorubicina (DOXIL[®]), doxorubicina lipossomal TLC D-99 (MYOCET[®]), doxorubicina lipossomal pegilada (CAELYX[®]), e desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tais como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina,

porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; anti-metabólitos tais como metotrexato, gemcitabina (GEMZAR®), tegafur (UFTORAL®), capecitabina (XELODA®), uma epotilona, e 5-fluorouracila (5-FU); combretaestatina; análogos de ácido fólico tais como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tais como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tais como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tais como calusterona, dromostanolona propionato, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; anti-adrenais tais como aminoglutetimida, mitotano, triloestano; provedor de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; aldofosfamida glicosídeo; ácido aminolevulínico; eniluracila; amsacrina; bestrabucila; bisantreno; edatraxato; desfofamina; desmecolcina; diaziquona; elformitina; acetato de eliptínio; uma epotilona; etoglucid; nitrato de gálio; hidroxirúria; lentinan; lonidainina; maitansinoides tais como maitansina e ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentoestatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; 2-etilidrazida; procarbazona; PSK® complexo de polissacarídeo (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); razoxano; rizoxin; sizofuran; espirogermânio; ácido tenuazônico; triazi-quona; 2,2',2'-triclortrietilamina; tricotecenos (especialmente T-2 toxina, verracurrina A, roridina A e anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinosídeo ("Ara-C"); tiotepa; taxóide, por exemplo, paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), formulação de nanopartícula engenheirada por albumina de paclitaxel (ABRAXANE™), e docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, França); cloranbucila; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; agentes de platina tais como cisplatina, oxa-

liplatina (por exemplo, ELOXATIN®), e carboplatina; vincas, que previnem polimerização de tubulina a partir de formação de microtúbulos, incluindo vinblastina (VELBAN®), vincristina (ONCOVIN®), vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®), e vinorelbina (NAVELBINE®); etoposídeo (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; leucovorina; novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inibidor de topoisomerase RFS 2000; difluorometilornithina (DMFO); retinóides tal como ácido retinóico, incluindo bexaroteno (TARGRETIN®); bisfosfonatos tais como clodronato (por exemplo, BONEFOS® ou OSTAC®), etidronato (DIDROCAL®), NE-58095, ácido zoledrônico/zoledronato (ZOMETA®), alendronato (FOSAMAX®), pamidronato (AREDIA®), tiludronato (SKELID®), ou risedronato (ACTONEL®); troxacitabina (um análogos de 1,3-dioxolano nucleosídeo citosina); oligonucleotídeos sem sentidos, particularmente aqueles que inibem expressão de genes nas trajetórias de sinalização implicadas na proliferação celular anômala, tais como, por exemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras, e receptor de fator de crescimento epidérmico (EGF-R) (por exemplo, erlotinib (TarcevaTM)); e VEGF-A que reduzem proliferação de célula; vacinas tais como THE-RATOPE® e vacinas de terapia genética, por exemplo, vacina ALLOVECTIN®, vacina LEUVECTIN®, e vacina VAXID®; inibidor 1 de topoisomerase 1 (por exemplo, LURTOTECAN®); rmRH (por exemplo, ABARELIX®); BAY439006 (sorafenib; Bayer); SU-11248 (sunitinib, SUTENT®, Pfizer); perifosina, inibidor de COX-2 (por exemplo, celecoxib ou etoricoxib), inibidor de proteossoma (por exemplo PS341); bortezomib (VELCADE®); CCI-779; tipifarnib (R11577); orafenib, ABT510; inibidor de Bcl-2 tal como oblimersen sódico (GENASENSE®); pixantrona; inibidores de iEGFR; inibidores de cinase de tirosina; inibidores de cinase de serina-treonina tal como rapamicina (sirolimus, RAPAMUNE®); inibidores de farnesiltransferase tal como lonafarnib (SCH 6636, SARASARTM); e sais, ácidos ou derivados farma-

ceuticamente aceitáveis de qualquer um dos expostos acima; bem como combinações de dois ou mais dos acima tais como CHOP, uma abreviação para uma terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, a prednisolona; e FOLFOX, uma abreviação para um regime de tratamento com oxaliplatina (ELOXATIN[®]) combinada com 5-FU e leucovorina, e sais, ácidos ou derivados farmacologicamente aceitáveis de qualquer um dos expostos acima; bem como combinações de dois ou mais dos acima.

[0072] Agentes quimioterapêuticos como definidos aqui incluem "agentes anti-hormonais" ou "terapias endócrinas" que agem para regular, reduzir, bloquear ou inibir os efeitos de hormônios que podem promover o crescimento de câncer. Eles podem ser os próprios hormônios, incluindo, mas não limitados a: anti-estrogênios e moduladores de receptor de estrogênio seletivos (SERMs), incluindo, por exemplo, tamoxifeno (incluindo NOLVADEX[®] tamoxifen), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, queoxifeno, LY117018, onapristona, e FARESTON, toremifeno; inibidores de aromatase que inibem a enzima aromatase, que regula produção de estrogênio in the adrenal glands, such as, por exemplo, 4(5)-imidazóis, aminoglutetimida, MEGASE[®] megestrol acetato, AROMASIN[®] exemestano, formestanie, fadrozol, RIVISOR[®] vorozol, FEMARA[®] letrozol, e ARIMIDEX[®] anastrozol; and anti-androgens such as flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida, and goserelin; bem como troxacitabina (um análogo de citosina de 1,3-dioxolano nucleosídeo); oligonucleotídeos sem sentidos, particularmente aqueles que inibem a expressão de genes nas trajetórias de sinalização implicadas na proliferação de células anômalas, tais como, por exemplo, PKC-alfa, Raf e H-Ras; ribozimas tais como expressão de inibidor de VEGF (por exemplo, ribozima ANGIOZYME[®]) e uma expressão de inibidor de HER2; vacinas tais como vacinas de terapia genética, por exemplo, vacina ALLOVECTIN[®], va-

cina LEUVECTIN®, a vacina VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; inibidor 1 de topoisomerase de LURTOTECAN®; ABARELIX® rmRH; Vinorelbina e Esperamicinas (vide a pat. U.S. no. 4,675,187), e sais, ácidos ou derivados farmacêuticamente aceitáveis de qualquer um dos acima; bem como combinações de dois ou mais dos acima.

[0073] Um "agente inibidor de crescimento" quando usado aqui refere-se a um composto ou uma composição que inibe o crescimento de uma célula ou in vitro ou in vivo. Em uma concretização, agente inibidor de crescimento é anticorpo inibidor de crescimento que previne ou reduz proliferação de uma célula que expressa um antígeno ao qual o anticorpo se liga. Em uma outra concretização, o agente inibidor de crescimento pode ser um que significativamente reduz a percentagem de células na fase S. Exemplos de agentes inibidores de crescimento incluem agentes que bloqueiam a progressão de ciclo celular (em um local outro que não a fase S), tais como agentes que induzem aprisionamento de G1 e aprisionamento da fase M. Bloqueadores de fase M clássica incluem as vincas (vincristina e vinblastina), taxanos, inibidores II de topoisomerase tais como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etoposídeo, e bleomicina. Aqueles agentes que aprisionam G1 também transbordam para o aprisionamento de fase S, por exemplo, agentes de alquilação de DNA tais como tamoxifen, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatina, metotrexato, 5-fluorouracila, e ara-C. Outra informação pode ser encontrada em Mendelsohn e Israel, eds. The Molecular Basis of Cancer, capítulo 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami e outros, (W.B. Saunders, Philadelphia, 1995), por exemplo, p. 13. Os taxanos (paclitaxel e docetaxel) são fármacos anticâncer ambos derivados da árvore de teixo, Docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado do teixo Europeu, é um análogo semi-sintético de paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb), Paclitaxel e docetaxel promovem a

montagem de microtúbulos de dímeros de tubulina e estabilizam microtúbulos por prevenção de despolimerização, que resulta na inibição de mitose em células.

[0074] Por "terapia por radiação" quer se dizer o uso de raios gama e raios beta direcionados para induzir dano suficiente a uma célula de modo a limitar sua capacidade de funcionar normalmente ou de destruir a célula completamente, Será apreciado que haveria muitos modos conhecidos na técnica para determinar a dosagem e a duração de tratamento. Tratamentos típicos são dados como uma única administração de dosagens típicas variam de 10 a 200 unidades (Grays) por dia.

[0075] Um "sujeito" ou um "indivíduo" para as finalidades de tratamento refere-se a qualquer animal classificado como um mamífero, incluindo humanos, animais domésticos e de fazenda, e animais de zoo, de esportes ou animais de estimação, tais como cachorros, cavalos, gatos, vacas, etc. De preferência, o mamífero é o ser humano.

[0076] O termo "anticorpo" aqui é usado no sentido mais amplo e especificamente cobre os anticorpos monoclonais (incluindo todos os anticorpos monoclonais de comprimento total), anticorpos policlonais, anticorpos multiespecíficos (*por exemplo*, anticorpos biespecíficos), e fragmentos de anticorpos contanto que eles exibam a atividade biológica desejada.

[0077] Um anticorpo "isolado" é um que foi identificado e separado e/ou recuperado de um componente de seu ambiente natural, Componentes contaminantes de seu ambiente natural são materiais que interfeririam com pesquisa, usos de diagnóstico ou terapêuticos para o anticorpo, e podem incluir enzimas, hormônios, e outros solutos de proteínas ou não protéicos. Em algumas concretizações, um anticorpo é purificado (1) para mais do que 95% em peso do anticorpo como determinado por, por exemplo, o método de Lowry, e em algu-

mas concretizações, para mais do que 99% em peso; (2) para um grau suficiente para se obter pelo menos 15 resíduos de sequência de aminoácidos interna ou N-terminal por uso de, por exemplo, um sequenciador de copo giratório, ou (3) para homogeneidade por SDS-PAGE sob condições de redução ou não redução usando-se, por exemplo, azul de Coomassie ou coloração de prata. Anticorpo isolado inclui o anticorpo *in situ* dentro das células recombinantes uma vez que pelo menos um componente do ambiente natural do anticorpo não estará presente. Geralmente, no entanto, anticorpo isolado será preparado por pelo menos uma etapa de purificação.

[0078] "Anticorpos nativos" são usualmente glicoproteínas heterotetraméricas de cerca de 150,000 dáltons, constituídos de duas cadeias leve idênticas (L) e duas cadeias pesadas idênticas (H). Cada cadeia leve é ligada a uma cadeia pesada por uma ligação de dissulfeto covalente, enquanto o número de ligação de dissulfeto varia entre as cadeias pesadas de diferentes isótipos de imunoglobulina. Cada cadeia pesada e cada cadeia leve também regularmente espaçou pontos de dissulfeto de intracadeias. Cada cadeia pesada tem uma extremidade um domínio variável (V_H) seguido por numerosos domínios constantes. Cada cadeia leve tem um domínio variável em uma extremidade (V_L) e um domínio constante em sua outra extremidade; o domínio constante da cadeia leve é alinhado com o primeiro domínio constante da cadeia pesada, e do domínio variável de cadeia leve é alinhado com o domínio variável da cadeia pesada. Acredita-se que resíduos de aminoácidos particulares formem uma interface entre domínios variáveis de cadeia pesada e de cadeia leve.

[0079] O termo "domínio constante" refere-se à porção de uma molécula de imunoglobulina tendo uma sequência de aminoácidos mais conservadora em relação à outra porção da imunoglobulina, o domínio variável, que contém o sítio de ligação de antígeno. O domínio

constante contém os domínios de C_H1 , C_H2 e C_H3 (coletivamente, CH) da cadeia pesada e o domínio de CHL (ou CL) da cadeia leve.

[0080] A "região variável" ou "domínio variável" de um anticorpo refere-se aos domínios amino-terminais da cadeia pesada ou da cadeia leve do anticorpo. O domínio variável da cadeia pesada pode ser chamado de " V_H ," O domínio variável da cadeia leve pode ser chamado de " V_L ," Esses domínios são em geral as partes mais variáveis de um anticorpo e contêm os sítios de ligação de antígeno.

[0081] O termo "variável" refere-se ao fato de que certas porções dos domínios variáveis diferem extensivamente na sequência entre anticorpos e são usados na ligação e na especificidade de cada anticorpo particular para seu antígeno particular. No entanto, a variabilidade não é uniformemente distribuída através de todos os domínios variáveis de anticorpos, É concentrado em três segmentos chamados regiões hipervariáveis (HVRs) ambos os domínios variáveis de cadeia leve e de cadeia pesada. As porções mais altamente conservadas de domínios variáveis são chamadas as regiões de estrutura (FR). Os domínios variáveis de cadeias leves e pesadas nativas compreendem, cada um, quatro regiões de FR, grandemente adotando uma configuração de folha beta, ligadas por três HVRs, que formam laços que se ligam, e em alguns casos fazendo parte da estrutura de folha beta. As HVRs em cada cadeia são mantidas juntas na proximidade próxima pelas regiões de FR e, com as HVRs oriundas da outra cadeia, contribuem para a formação do sítio de anticorpos de ligação de antígeno (vide Kabat e outros, *Sequences of Proteínas of Immunological Interest*, 5ª edição, National Institute of Health, Bethesda, Md, (1991)). Os domínios constantes não estão envolvidos diretamente na ligação de um anticorpo a um antígeno, mas exibem várias funções efectoras, tal como participação do anticorpo na toxicidade celular dependente de anticorpo.

[0082] As "cadeias leves" de anticorpos (imunoglobulinas) oriundas de qualquer espécie de mamífero podem ser distribuídas em um de dois tipos claramente distintos, chamados kappa ("κ") e lambda ("λ"), com base nas sequências de aminoácidos de seus domínios constantes.

[0083] O termo "isótipo" ou "subclasse" de IgG como usado aqui quer se dizer qualquer uma das subclasses of imunoglobulinas definidas pelas características antigênicas e químicas de outras regiões constantes.

[0084] Dependendo de as sequências de aminoácidos do domínio constantes de suas cadeias pesadas, anticorpos (imunoglobulinas) podem ser distribuídos em diferentes classes. Há cinco classes principais de imunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, e várias dessas podem ser ulteriormente divididas em subclasses (isótipos), por exemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, e IgA₂. Os domínios constantes da cadeia pesada que correspondam à diferentes classes de imunoglobulinas são chamadas α, γ, ε, γ, and μ, respectivamente. As estruturas de subunidade e as configurações tridimensionais de diferentes classes de imunoglobulinas são bem conhecidas e são descritas em geral na, por exemplo, Abbas e outros, *Cellular and Mol, Immunology*, 4a ed. (W,B, Saunders, Co. 2000). Um anticorpo pode fazer parte de uma molécula de fusão maior, formado por associação covalente e não covalente do anticorpo com uma ou mais outras proteínas ou peptídeos.

[0085] Os termos "anticorpo de comprimento total," "anticorpo intacto" e "anticorpo inteiro" são usados aqui intercambiavelmente para referir-se a um anticorpo em sua forma substancialmente intacta, nenhum fragmento de anticorpo como definido abaixo. Os termos particularmente referem-se a um anticorpo com cadeias pesadas que contêm uma região de Fc.

[0086] Um "anticorpo nu" para as finalidades aqui é um anticorpo

que não é conjugado com uma porção citotóxica ou radiorótulo.

[0087] "Fragmentos de anticorpos" compreendem uma porção de um anticorpo intacto, de preferência compreendendo a sua região de ligação de antígeno. Em algumas concretizações, o fragmento de anticorpo descrito aqui é um fragmento de ligação de antígeno. Exemplos de fragmentos de anticorpos incluem fragmentos de Fab, Fab', F(ab')₂, e Fv; diacorpos; anticorpos lineares; moléculas de anticorpo de cadeia simples; e anticorpos multiespecíficos formados a partir dos fragmentos de anticorpos.

[0088] Digestão de papaína de anticorpos produz dois fragmentos de ligação de antígeno idênticos, chamados fragmentos de "Fab", com um sítio de ligação de antígeno simples, e um fragmento de "Fc" residual, cujo nome reflete sua capacidade de se cristalizar prontamente. Tratamento de pepsina fornece um fragmento de F(ab')₂ que tem dois sítios de combinação de antígeno e é ainda capaz de reticular antígeno.

[0089] "Fv" é o fragmento de anticorpo mínimo que contém um sítio de ligação de antígeno completo. Em uma concretização, uma espécie de Fv de duas cadeias consiste em um dímero de um domínio variável de cadeia leve e de cadeia pesada em apertada associação não covalente. Em uma espécie de Fv (scFv) de cadeia simples, um domínio variável de cadeia leve e de cadeia pesada pode ser covalentemente ligado por um ligador de peptídeo flexível tal que as cadeias leve e pesada podem se associar em um análogo de estrutura "dimérico" àquela espécie de Fv de duas cadeias. É nessa configuração que as três HVRs de cada domínio variável interagem para definir um sítio de ligação de antígeno na superfície do dímero de VH-VL. Coletivamente, as seis HVRs conferem especificidade de ligação de antígeno para o anticorpo. No entanto, mesmo um domínio variável simples (ou metade de um Fv compreendendo apenas três HVRs específicas para

um antígeno) tem a capacidade de reconhecer e de se ligar antígeno, embora em uma afinidade mais baixo do que o sítio de ligação total.

[0090] O fragmento de Fab contém os domínios variáveis de cadeia leve e de cadeia pesada e também contém o domínio constante da cadeia leve e o primeiro domínio constante (CH1) da cadeia pesada. Fragmentos de Fab' diferem dos fragmentos de Fab pela adição dos poucos resíduos no terminal carbóxi do domínio de CH1 de cadeia pesada incluindo uma ou mais cisteínas oriundas da região de articulação de anticorpo, Fab'-SH é a designação aqui para Fab' em que o(s) resíduo(s) de cisteína dos domínios constantes porta(m) um grupo tiol livre. Fragmentos de anticorpos de $F(ab')_2$ originalmente foram produzidos como pares de fragmentos de Fab' que têm cisteínas de articulação entre eles. Outros acoplamentos químicos de fragmentos de anticorpos são também conhecidos.

[0091] Fragmentos de anticorpos de "Fv" ou "scFv de cadeia simples" compreendem os domínios de VH e de VL de anticorpo, em que esses domínios estão presentes em uma cadeia de polipeptídeo simples. Em geral, o polipeptídeo de scFv ulteriormente compreende um ligador de polipeptídeo entre os domínios de VH e de VL que permitem o scFv para formar a estrutura desejada para a ligação de antígeno. Para uma revisão de scFv, vide, *por exemplo*, Pluckthün, in *The Pharmacology of Anticorpos monoclonais*, vol, 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York, 1994), págs. 269-315.

[0092] O termo "diacorpos" refere-se a fragmentos de anticorpos com dois sítios de ligação de antígeno, fragmentos esses que compreendem um domínio variável de cadeia pesada (VH) ligado a um domínio variável de cadeia leve (VL) na mesma cadeia de polipeptídeo (VH-VL). Por uso de um ligador que é demasiadamente curto para permitir emparelhamento entre os dois domínios na mesma cadeia, os domínios são forçados a emparelhar com os domínios complementares de

uma outra cadeia e criam dois sítios de ligação de antígeno, Diacorpos podem ser bivalentes ou biespecíficos. Diacorpos são descritos mais totalmente em, por exemplo, EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson e outros, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); and Hollinger e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993), Triacorpos e tetracorpos são também descritos em Hudson e outros, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003).

[0093] O termo "anticorpo monoclonal" como usado aqui refere-se a um anticorpo obtido a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, por exemplo, os anticorpos individuais compreendendo a população são idênticos exceto quanto a possíveis mutações, por exemplo, mutações de ocorrência natural, que podem estar presentes em quantidade menores. Assim, o modificador "monoclonal" indica o caráter do anticorpo como não sendo uma mistura de anticorpos discretos. Em certas concretizações, tal anticorpo monoclonal tipicamente inclui um anticorpo compreendendo uma sequência de polipeptídeos que liga um alvo, em que a sequência de polipeptídeos de ligação alvo foi obtida por um processo que inclui a seleção de uma sequência de polipeptídeos de ligação alvo simples de uma pluralidade das sequências de polipeptídeos. Por exemplo, o processo de seleção pode ser a seleção de um único clone de uma pluralidade de clones, tal como combinação de clones de hibridoma, clones de fago, ou clones de DNA recombinantes. Seria entendido que uma sequência de ligação de alvo selecionada pode ser ulteriormente alterada, por exemplo, para aperfeiçoar afinidade para o alvo, para humanizar a sequência de ligação alvo, para aperfeiçoar sua produção em cultura de células, para reduzir sua imunogenicidade *in vivo*, para cariar um anticorpo multiespecífico, etc. e que um anticorpo compreendendo a sequência de ligação alvo alterada é também um anticorpo monoclonal desta invenção. Em contraste com preparações de anticorpo policlonais, que tipicamente incluem diferentes anticorpos dirigidos contra

diferentes determinantes (epítomos), cada anticorpo monoclonal de uma preparação de anticorpo monoclonal é dirigido contra um determinante simples em um antígeno. Além de sua especificidade, preparações de anticorpo monoclonal são vantajosas pelo fato de que elas são tipicamente não contaminadas por outras imunoglobulinas.

[0094] O modificador "monoclonal" indica o caráter do anticorpo como sendo obtido a partir de uma população substancialmente homogênea de anticorpos, e não deve ser interpretada como uma produção necessária do anticorpo por qualquer método particular. Por exemplo, os anticorpos monoclonais como sendo usados de acordo com a invenção podem ser feitos por uma variedade de técnicas, incluindo, por exemplo, o método de hibridoma (por exemplo, Kohler and Milsteina, *Nature*, 256:495-97 (1975); Hongo e outros, *Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow e outros, *Anticorpos: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed, 1988); Hammerling e outros, in: *Anticorpos monoclonais and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N,Y,, 1981)), métodos de DNA recombinantes (vide, por exemplo, a pat. U.S. no. 4,816,567), tencologias de exibição de fago (vide, por exemplo, Clackson e outros, *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks e outros, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Sidhu e outros, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee e outros, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); and Lee e outros, *J. Immunol. Methods* 284 (1-2): 119-132 (2004), e tecnologias para a produção de anticorpos humanos ou de tipo humano em animais que têm partes ou a totalidade dos locais de imunoglobulina de ser humano ou genes que codificam sequências de imunoglobulinas humanas (vide, por exemplo, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993); Jakobovits e outros, *Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggemann e outros, *Year*

in Immunol, 7:33 (1993); as pats. U.S. nos. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; e 5,661,016; Marks e outros, *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg e outros, *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-813 (1994); Fishwild e outros, *Nature Biotechnol.* 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996); e Lonberg and Huszar, *Intern. Ver. Immunol.* 13: 65-93 (1995).

[0095] Os anticorpos monoclonais aqui incluem especificamente anticorpos "quiméricos" em que uma porção da cadeia pesada e/ou da cadeia leve é idêntica com ou homóloga a sequências correspondentes nos anticorpos derivados de uma espécie particular ou que pertencem a uma classe ou subclasse de anticorpo particular, enquanto o restante da(s) cadeia(s) é(são) idêntica(s) ou homóloga(s) a sequências correspondentes nos anticorpos derivados de uma outra espécie ou pertencendo a uma outra classe ou subclasse de anticorpo, bem como fragmentos de tais anticorpos, contanto que eles exibam a atividade biológica desejada (vide, *por exemplo*, a pat. U.S. no. 4.816,567; e Morrison e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)). Anticorpos quiméricos incluem anticorpos PRIMATTZED® em que a região de ligação de antígeno do anticorpo é derivada de um anticorpo produzido por, por exemplo, imunização de macaco macaque com o antígeno de interesse.

[0096] Formas "humanizadas" de anticorpos não humanos (por exemplo, camundongo) são anticorpos quiméricos que contêm sequência mínima derivada de imunoglobulina de não humano. Em uma concretização, um anticorpo humanizado é uma imunoglobulina humana (anticorpo de receptor) em que resíduos oriundos de uma HVR do receptor são substituídos por resíduos de uma HVR de uma espécie não humana (anticorpo doador) tais como camundongo, rato, coelho, ou primata não humano tendo a especificidade, afinidade, e/ou

capacidade desejada. Em alguns casos, resíduos de FR da imunoglobulina humana são substituídos por resíduos não humanos correspondentes. Além do mais, anticorpos humanizados podem compreender resíduos que não são encontrados no anticorpo de receptor ou no anticorpo doador. Estas modificações podem ser feitas para ulteriormente aperfeiçoar desempenho de anticorpo. Em geral, um anticorpo humanizado compreenderá substancialmente a totalidade de pelo menos um, e tipicamente dois, domínios variáveis, em que a totalidade ou substancialmente a totalidade dos laços hipervariáveis correspondem àqueles de uma imunoglobulina não humana, e a totalidade ou substancialmente a totalidade das FRs são aquelas de uma sequência de imunoglobulinas humana. O anticorpo humanizado opcionalmente também compreenderá pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente que de uma imunoglobulina humana. Para outros detalhes, vide, *por exemplo*, Jones e outros, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann e outros, *Nature* 332:323-329 (1988); and Presta, *Curr, Op, Struct, Biol*, 2:593-596 (1992). Vide também, *por exemplo*, Vaswani and Hamilton, *Ann, Allergy, Asthma & Immunol*, 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem, Soc, Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurle and Gross, *Curr, Op, Biotech*, 5:428-433 (1994); e as pats. U.S. Nos. 6.982.321 e 7.087.409.

[0097] Um "anticorpo humano" é um que possui uma sequência de aminoácidos que corresponde àquela de um anticorpo produzido por um ser humano e/ou foi feito usando-se qualquer uma das técnicas para a formação de anticorpos humanos como revelados aqui, Esta definição de um anticorpo humano especificamente exclui um anticorpo humanizado compreendendo resíduos de ligação de antígeno não humanos. Anticorpos humanos podem se produzidos usando-se várias técnicas conhecidas na técnica, incluindo bibliotecas de exibição de fagos, Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks e

outros, J. Mol. Biol., 222:581 (1991), Também disponível para a preparação de anticorpos monoclonais humanos são métodos descritos em Cole e *outros. Monoclonal Antibodies Anticorpos and Cancer Therapy*, Alan R, Liss, p, 77 (1985); Boerner e *outros, J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991). Vide também van Dijk and van de Winkel, *Curr, Opin. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001). Anticorpos humanos podem ser preparados por administração do antígeno a um animal transgênico que foi modificado para produzir tais anticorpos em resposta a desafio antigênico, mas cujos locais endógenos foram destivados, *por exemplo*, immunized xenomice (vide, *por exemplo*, as pats. U.S. nos. 6.075.181 e 6.150.584 com referência a tecnologia de XENOMICE^R). Vide também, *por exemplo*, Li e *outros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006) considerando anticorpos humanos gerados via uma tecnologia de hibridoma de célula B de ser humano.

[0098] Um "anticorpo dependente de espécie" é um que tem uma afinidade de ligação mais forte para um antígeno de uma primeira espécie de mamífero do que tem para um homólogo daquele antígeno de uma segunda espécie de mamífero, Normalmente, o anticorpo dependente da espécie da "ligação específica" a um antígeno humano (por exemplo, tem um valor de afinidade de ligação (Kd) de não mais do que cerca de 1×10^{-7} M, de preferência no mais do que cerca de 1×10^{-8} M e de preferência no mais do que cerca de 1×10^{-9} M) mas tem uma afinidade de ligação para um homólogo do antígeno de uma segunda espécie de não mamífero que é pelo menos cerca de 50 vezes, ou pelo menos cerca de 500 vezes, ou pelo menos cerca de 1000 vezes, mais fraca do que sua afinidade de ligação para o antígeno humano. O anticorpo dependente de espécie pode ser qualquer um dos vários tipos de anticorpos como definidos acima, mas de preferência é um anticorpo humano ou humanizado,

[0099] O termo "região hipervariável," "HVR," ou "HV," quando

usado aqui refere-se às regiões de um domínio variável de anticorpo que são hipervariáveis na sequência e/ou formam laços estruturalmente definidos. Em geral, anticorpos compreendem seis HVRs; três na VH (H1, H2, H3), e três na VL (L1, L2, L3). Acredita-se que nos anticorpos nativos, H3 e L3 exibam a maior diversidade das seis HVRs, e H3 em particular desempenhem um único papel na conferência de especificidade fina para anticorpos. Vide, *por exemplo*, Xu e outros, *Immunity* 13:37-45 (2000); Johnson and Wu, in *Methods in Molecular Biology* 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, N.J., 2003). De fato, anticorpos de camélídeo de ocorrência natural que consiste em uma cadeia pesada apenas são funcionais e estáveis na ausência de cadeia leve. Vide, *por exemplo*, Hamers-Casterman e outros, *Nature* 363:446-448 (1993); Sheriff e outros, *Nature Struct, Biol*, 3:733-736 (1996).

[00100] Numerosas delineações de HVR estão em uso e estão incluídas aqui. As Regiões de determinação de Complementaridade de Kabat (CDRs) são com base na variabilidade de sequência e são mais comumente usadas (Kabat e outros, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.(1991)), Chothia refers instead to the location of the structural loops (Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). As HVRs de AbM representam um compromisso entre as HVRs de Kabat e laços estruturais de Chothia, e são usadas por software de modelagem de anticorpo de Oxford Molecular's AbM. As HVRs de "contato" são com base em uma análise das estruturas de cristal complexas disponíveis. Os resíduos de cada um destas HVRs são observados abaixo.

Laço	Kabat	AbM	Chothia	Contato
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55

Laço	Kabat	AbM	Chothia	Contato
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B (numeração de Kabat)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (numeração de Chothia)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

[0100] HVRs podem compreender "HVRs prolongadas" como se segue: 24-36 ou 24-34 (L1), 46-56 ou 50-56 (L2) e 89-97 ou 89-96 (L3) in the VL e 26-35 (H1), 50-65 ou 49-65 (H2) e 93-102, 94-102, ou 95-102 (H3) na VH. Os resíduos de domínio variáveis são numerados de acordo com Kabat e outros, *supra*, para cada uma destas definições.

[0101] "Resíduos de estrutura" ou "de FR" são aqueles resíduos de domínio variáveis outros que não os resíduos de HVR como definidos aqui.

[0102] O termo "resíduo de domínio variável que numera como em Kabat" ou "posição de amino ácido que numera como em Kabat," e suas variações, refere-se ao sistema de numeração usado para domínios variáveis de cadeia pesada ou domínios variáveis de cadeia leve da compilação de anticorpos in Kabat e outros, *supra*. Usando-se este Sistema de numeração, a sequência de aminoácidos linear real pode conter menos ou adicionais aminoácidos que correspondem a um encurtamento de, ou inserção para dentro de, uma FR ou HVR do domínio variável. Por exemplo, um domínio variável de cadeia pesada pode incluir um inserto de amino ácido simples (resíduo 52a de acordo com Kabat) depois resíduo 52 de H2 e resíduo inseridos (por exemplo, resíduos 82a, 82b, e 82c, etc, de acordo com Kabat) depois de FR de cadeia pesada de resíduo 82. A numeração de Kabat de resíduos pode ser determinada para um dado anticorpo por alinhamento nas regi-

ões de homologia da sequência dos anticorpos com uma sequência de numeração de Kabat "padrão".

[0103] O sistema de numeração de Kabat é em geral usado quando se referindo a um resíduo no domínio variável (aproximadamente resíduos 1-107 da cadeia leve e resíduos 1-113 da cadeia pesada) (por exemplo, Kabat e outros, *Sequences of Immunological Interest*, 5th Ed, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md, (1991)). O "Sistema de numeração de EU" ou "índice de EU" é em geral usado quando se referindo a uma região constante de cadeia pesada de imunoglobulina (por exemplo, o índice de EU relatado em Kabat e outros, *supra*). O "índice de EU como em Kabat" refere-se à numeração de resíduo do anticorpo de EU de IgG1 de ser humano.

[0104] A expressão "anticorpos lineares" refere-se a os anticorpos descritos em Zapata e outros, (1995 *Proteína Eng*, 8(10):1057-1062), Resumidamente, esses anticorpos compreendem um par de segmentos de Fd tandem (VH-CH1-VH-CH1) que, juntamente com polipeptídeos de cadeia leve complementares, formam um par de regiões de ligação de antígeno. Anticorpos lineares podem ser biespecíficos ou monoespecíficos.

[0105] Uma vez que o uso aqui, o termo "especificamente se liga a" ou é "específico para" refere-se a interações mensuráveis e reproduzíveis tal como ligação entre um alvo e um anticorpo, que é determinante da presença do alvo na presença de uma população heterogênea de moléculas incluindo moléculas biológicas. Por exemplo, um anticorpo que especificamente se liga a um alvo (que pode ser um epítopo) é um anticorpo que liga seu alvo com maior afinidade, avidéz, mais prontamente, e/ou com maior duração do que ele se liga a outros alvos. Em uma concretização, a extensão de ligação de um anticorpo a um alvo não relacionado é menor do que cerca de 10% da ligação do anticorpo ao alvo como medido, *por exemplo*, por um radioimunoensaio

(RIA). Em certas concretizações, um anticorpo que especificamente se liga a um alvo tem uma dissociação constante (K_d) de $\leq 1\mu\text{M}$, $\leq 100\text{ nM}$, $\leq 10\text{ nM}$, $\leq 1\text{ nM}$, ou $\leq 0,1\text{ nM}$. Em certas concretizações, um anticorpo especificamente se liga a um epítopo em uma proteína que é conservada entre a proteína de diferentes espécies. Em uma outra concretização, ligação específica pode incluir, mas não exige ligação exclusiva.

II. Preparação e Formulações de Anticorpo

[0106] A invenção aqui refere-se a formulações aquosas estáveis compreendendo um anticorpo, tal como um anticorpo de anti-PDL1. Em algumas concretizações, a formulação compreende um anticorpo (por exemplo, um anticorpo monoclonal), sacarose, um tampão, e um tensoativo, em que a formulação tem um pH de cerca de 5,0 a cerca de 7,0. Em algumas concretizações, o anticorpo (por exemplo, um anticorpo de anti-PDL1 descrito aqui) na formulação está em uma quantidade de cerca de 40 mg/ml a cerca de 125 mg/ml. Em algumas concretizações, o tampão é histidina (por exemplo, acetato de histidina) ou acetato de sódio. Em algumas concretizações, o tampão na formulação está em uma concentração de cerca de 15 mM a cerca de 25 mM. Em algumas concretizações, sacarose na formulação é cerca de 60 mM a cerca de 240 mM. Em algumas concretizações, o tensoativo na formulação é polissorbato (por exemplo, polissorbato 20). Em algumas concretizações, polissorbato na formulação está em uma concentração de cerca de 0,005% (p/v) a cerca de 0,06% (p/v). Em algumas concretizações, a formulação tem um pH de cerca de 5,0 a cerca de 6,3. Em algumas concretizações, provida aqui é formulação farmacêutica aquosa estável, a formulação compreendendo um anticorpo monoclonal de anti-PDL1 em uma concentração de cerca de 40 mg/ml a cerca de 125 mg/ml, acetato de histidina ou acetato de sódio em uma concentração de cerca de 15 mM a cerca de 25 mM, sacarose em uma

concentração de cerca de 60 mM a cerca de 240 mM, polissorbato em uma concentração de cerca de 0,005% (p/v) a cerca de 0,06% (p/v), e pH cerca de 5,0 a cerca de 6,3. Em algumas concretizações, a formulação compreende um anticorpo monoclonal de anti-PDL1 em uma quantidade de cerca de 125 mg/ml, sacarose em uma concentração de cerca de 240 mM, e pH de cerca de 5,5. Em algumas concretizações, a formulação compreende um anticorpo monoclonal de anti-PDL1 em uma quantidade de cerca de 60 mg/ml, sacarose em uma concentração de cerca de 120 mM, e pH de cerca de 5,8.

[0107] Em algumas concretizações, o anticorpo na formulação é estável a -20°C por pelo menos cerca de 6 meses, pelo menos cerca de 12 meses, pelo menos cerca de 18 meses, pelo menos dois anos, pelo menos três anos, ou pelo menos quatro anos. Em algumas concretizações, o anticorpo na formulação é estável a 2-8°C por pelo menos cerca de 6 meses, pelo menos cerca de 12 meses, pelo menos cerca de 18 meses, pelo menos dois anos, ou pelo menos três anos. Em algumas concretizações, depois da armazenagem, o anticorpo retém pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 65%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 75%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%, ou pelo menos cerca de 95% de sua atividade biológica (por exemplo, ligação ao alvo, ou potência terapêutica) exibida antes da armazenagem, isto é, na hora a formulação farmacêutica foi preparada.

[0108] Em certas concretizações, a formulação é estável a cerca de 40°C por pelo menos cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21, 28, ou mais dias. Em certas concretizações, a formulação é estável a cerca de 40°C por pelo menos cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, ou menos semanas. Em certas concretizações, a formulação é estável a cerca de 25°C por pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, ou mais meses. Em certas concretiza-

ções, a formulação é estável a cerca de 5°C por pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, ou mais meses. Em certas concretizações, a formulação é estável a cerca de -20°C por pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, ou mais meses. Em certas concretizações, a formulação é estável a 5°C ou -20°C por pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, ou mais meses. Além do mais, a formulação é de preferência estável após o congelamento (para, por exemplo, -20°C, -40°C ou -70°C) e descongelamento da formulação, por exemplo, após 1, 2, 3, 4, ou 5 ciclos de congelamento e descongelamento,

A. Anticorpos (tais como anticorpos de anti-PDL1)

[0109] Em algumas concretizações, o anticorpo na formulação compreende pelo menos um triptofano (por exemplo, pelo menos dois, pelo menos três, ou pelo menos quatro) na sequência de cadeia pesada e/ou cadeia leve. Em algumas concretizações, triptofano de amino ácido está nas regiões de CDR, regiões de estrutura e/ou regiões constantes do anticorpo. Em algumas concretizações, o anticorpo compreende dois ou três resíduo de triptofanos nas regiões de CDR. Em algumas concretizações, o anticorpo na formulação é um anticorpo de anti-PDL1, PD-L1 (ligante 1 de morte de célula programada 1), também conhecido como PDL1, B7-H1, B7-4, CD274, e B7-H, é uma proteína de transmembrana, e sua interação com PD-1 inibe ativação da célula T e produção de citocina. Em algumas concretizações, o anticorpo de anti-PDL1 descrito aqui se liga a PD-L1 de ser humano, Exemplos de anticorpos de anti-PDL1 que podem ser formulados usando-se as formulações descritas aqui são descritas no pedido de patente PCT WO

2010/077634 A1 e na patente US 8.217.149, que são incorporados aqui por referência,

[0110] Em algumas concretizações, o anticorpo de anti-PDL1 é capaz de inibir ligação entre PD-L1 e PD-1 e/ou entre PD-L1 e B7-1. Em algumas concretizações, o anticorpo de anti-PDL1 é um anticorpo monoclonal. Em algumas concretizações, o anticorpo de anti-PDL1 é um fragmento de anticorpo selecionado do grupo que consiste em fragmentos de Fab, Fab'-SH, Fv, scFv, e (Fab')₂. Em algumas concretizações, o anticorpo de anti-PDL1 é um anticorpo humanizado. Em algumas concretizações, o anticorpo de anti-PDL1 é um anticorpo humano.

[0111] Anticorpos de anti-PDL1 descritos na WO 2010/077634 A1 e na patente US 8,217,149 podem ser formulados nas formulações descritas aqui. Em algumas concretizações, o anticorpo de anti-PDL1 compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 30 e uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 31,

[0112] Em uma concretização, o anticorpo de anti-PDL1 compreende uma região variável de cadeia pesada polipeptídico compreendendo uma sequência de HVR-H1, HVR-H2 e HVR-H3, em que:

- (a) a sequência de HVR-H1 é GFTFSX₁SWIH (SEQ ID NO: 11);
- (b) a sequência de HVR-H2 é AWIX₂PYGGXSX₃YYADSVKG (SEQ ID NO: 12);
- (c) a sequência de HVR-H3 é RHWPGGFDY (SEQ ID NO: 13);

ulteriormente em que: X₁ é D ou G; X₂ é S ou L; X₃ é T ou S,

[0113] Em um aspecto específico, X₁ é D; X₂ é S e X₃ é T. Em um outro aspecto, o polipeptídico ulteriormente compreende sequências de estrutura de cadeia pesada de região variável justapostas entre as HVRs de acordo com a fórmula: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4). Em ainda um outro aspecto, as sequências de estrutura são derivadas de sequências de estrutura de consenso de ser humano. Em um outro aspecto, as sequências de es-

estrutura são estrutura de consenso do subgrupo III de VH. Em ainda um outro aspecto, pelo menos uma das sequências de estrutura é a seguinte:

HC-FR1 é EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 14)

HC-FR2 é WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO: 15)

HC-FR3 é RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 16)

HC-FR4 é WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 17),

[0114] Em ainda um outro aspecto, o polipeptídeo de cadeia pesada é ulteriormente combinado com uma cadeia leve de região variável compreendendo uma HVR-L1, HVR-L2 e HVR-L3, em que:

(a) a sequência de HVR-L1 é RASQX₄X₅X₆TX₇X₈A (SEQ ID NO: 18);

(b) a sequência de HVR-L2 é SASX₉LX₁₀S, (SEQ ID NO: 19);

(c) a sequência de HVR-L3 é QQX₁₁X₁₂X₁₃X₁₄PX₁₅T (SEQ ID NO: 20);

ulteriormente em que: X₄ é D ou V; X₅ é V ou I; X₆ é S ou N; X₇ é A ou F; X₈ é V ou L; X₉ é F ou T; X₁₀ é Y ou A; X₁₁ é Y, G, F, ou S; X₁₂ é L, Y, F ou W; X₁₃ é Y, N, A, T, G, F ou I; X₁₄ é H, V, P, T ou I; X₁₅ é A, W, R, P ou T,

[0115] Em ainda um outro aspecto, X₄ é D; X₅ é V; X₆ é S; X₇ é A; X₈ é V; X₉ é F; X₁₀ é Y; X₁₁ é Y; X₁₂ é L; X₁₃ é Y; X₁₄ é H; X₁₅ é A. Em ainda um outro aspecto, a cadeia leve ulteriormente compreende sequências de estrutura de cadeia leve de região variável justa postas entre as HVRs de acordo com a fórmula: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). Em ainda um outro aspecto, as sequências de estrutura são derivadas de sequências de estrutura de consenso de ser humano. Em ainda um outro aspecto, as sequências de estrutura são estrutura de consenso de kappa I de VL. Em ainda um outro aspecto, pelo menos uma da sequência de estrutura é a seguinte:

LC-FR1 é DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 21)

LC-FR2 é WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 22)

LC-FR3 é GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 23)

LC-FR4 é FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 24),

[0116] Em uma outra concretização, provido é um fragmento de ligação de antígeno ou anticorpo de anti-PDL1 isoaldo compreendendo uma sequência de região variável de cadeia pesada e uma região variável de cadeia leve, em que:

(a) a cadeia pesada compreende e HVR-H1, HVR-H2 e HVR-H3, em que ulteriormente:

(i) a sequência de HVR-H1 é GFTFSX₁SWIH; (SEQ ID NO: 11)

(ii) a sequência de HVR-H2 é AWIX₂PYGGSX₃YYADSVKG (SEQ ID NO: 12)

(iii) a sequência de HVR-H3 sequence é RHWPGGFDY, e (SEQ ID NO: 13)

(b) a cadeia leve compreende e HVR-L1, HVR-L2 e HVR-L3, em que ulteriormente:

(i) a sequência de HVR-L1 é RASQX₄X₅X₆TX₇X₈A (SEQ ID NO: 18)

(ii) a sequência de HVR-L2 é SASX₉LX₁₀S; e (SEQ ID NO: 19)

(iii) a sequência de HVR-L3 é QQX₁₁X₁₂X₁₃X₁₄PX₁₅T; (SEQ ID NO: 20)

Ulteriormente em que: X₁ é D ou G; X₂ é S ou L; X₃ é T ou S; X₄ é D ou V; X₅ é V ou I; X₆ é S ou N; X₇ é A ou F; X₈ é V ou L; X₉ é F ou T; X₁₀ é Y ou A; X₁₁ é Y, G, F, ou S; X₁₂ é L, Y, F ou W; X₁₃ é Y, N, A, T, G, F ou I; X₁₄ é H, V, P, T ou I; X₁₅ é A, W, R, P ou T,

[0117] Em um aspecto específico, X₁ é D; X₂ é S e X₃ é T. Em um outro aspecto, X₄ é D; X₅ é V; X₆ é S; X₇ é A; X₈ é V; X₉ é F; X₁₀ é Y; X₁₁ é Y; X₁₂ é L; X₁₃ é Y; X₁₄ é H; X₁₅ é A. Em ainda um outro aspecto, X₁ é D; X₂ é S e X₃ é T, X₄ é D; X₅ é V; X₆ é S; X₇ é A; X₈ é V; X₉ é F; X₁₀ é Y; X₁₁ é Y; X₁₂ é L; X₁₃ é Y; X₁₄ é H e X₁₅ é A,

[0118] Em um outro aspecto, a região variável de cadeia pesada compreende uma ou mais sequências de estrutura justapostas entre as HVRs como: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), e as regiões variáveis de cadeia leve compreende uma ou mais sequências de estrutura justapostas entre como HVRs como: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). Em ainda um outro aspecto, as sequências de estrutura são derivadas de sequências de estrutura de consenso de ser humano. Em ainda um outro aspecto, as sequências de estrutura de cadeia pe-

sada são derivadas de uma sequência de subgrupo I, II, ou III de Kabat. Em ainda um outro aspecto, a sequência de estrutura de cadeia pesada é a estrutura de consenso do subgrupo III de VH. Em ainda um outro aspecto, uma ou mais das sequências de estrutura de cadeia pesada são as seguintes:

HC-FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	(SEQ ID NO: 14)
HC-FR2	WVRQAPGKGLEWV	(SEQ ID NO: 15)
HC-FR3	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	(SEQ ID NO: 16)
HC-FR4	WGQGTLVTVSA	(SEQ ID NO: 17),

[0119] Em ainda um outro aspecto, as sequências de estrutura de cadeia leve são derivadas de uma sequência de subgrupos de Kabat kappa I, II, III ou IV. Em ainda um outro aspecto, as sequências de estrutura de cadeia leve são estruturas de consenso de kappa I de VL. Em ainda um outro aspecto, uma ou mais das sequências de estrutura de cadeia leve são as seguintes:

LC-FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	(SEQ ID NO: 21)
LC-FR2	WYQQKPGKAPKLLIY	(SEQ ID NO: 22)
LC-FR3	GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC	(SEQ ID NO: 23)
LC-FR4	FGQGTKVEIKR	(SEQ ID NO: 24),

[0120] Em ainda um outro aspecto específico, o anticorpo ulteriormente compreende uma região constante de camundongo ou de ser humano. Em ainda um outro aspecto, a região constante de ser humano é selecionada do grupo que consiste em IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4. Em ainda um outro aspecto específico, a região constante de ser humano é IgG1. Em ainda um outro aspecto, a região constante de camundongo é selecionada do grupo que consiste em IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3. Em ainda um outro aspecto, a região constante de camundongo se IgG2A. Em ainda um outro aspecto específico, o anticorpo tem uma função efetora mínima ou reduzida. Em ainda um outro aspecto específico a função efetora mínima resulta de uma "mutação de Fc menos efector" ou aglicolização. Em ainda uma outra concretização, a mutação de Fc menos efector é uma substituição de N297A ou

D265A/N297A na região constante.

[0121] Em ainda uma outra concretização, provido é um anticorpo de anti-PDL1 compreendendo uma sequência de região variável de cadeia leve ou de cadeia pesada, em que:

(a) a cadeia pesada ulteriormente compreende e uma sequência de HVR-H1, HVR-H2 e HVR-H3 tendo pelo menos 85% de identidade de sequência com GFTFSDSWIH (SEQ ID NO: 25), AWIS-PYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 26) and RHWPGGFDY (SEQ ID NO: 13), respectivamente, ou

(b) a cadeia leve ulteriormente compreende uma sequência de HVR-L1, HVR-L2 e HVR-L3 tendo pelo menos 85% de identidade de sequência com RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 27), SASFLYS (SEQ ID NO: 28) e QQYLYHPAT (SEQ ID NO: 29), respectivamente.

[0122] Em um aspecto específico, a identidade de sequência é 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100%. Em um outro aspecto, a região variável de cadeia pesada compreende uma ou mais sequências de estrutura justapostas entre as HVRs como: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), e as regiões variáveis de cadeia leve compreende uma ou mais sequências de estrutura justapostas entre as HVRs como: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). Em ainda um outro aspecto, as sequências de estrutura são derivadas de sequências de estrutura de consenso de ser humano. Em ainda um outro aspecto, as sequências de estrutura de cadeia pesada são derivadas de uma sequência de subgrupo I, II ou III de Kabat. Em ainda um outro aspecto, a sequência de estrutura de cadeia pesada é a estrutura de consenso do subgrupo III de VH. Em ainda um outro aspecto, uma ou mais das sequências de estrutura de cadeia pesada são as seguintes:

HC-FR1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 14)

HC-FR2 WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO: 15)

HC-FR3 RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 16)

HC-FR4 WGQGTTLVTVSA (SEQ ID NO: 17),

[0123] Em ainda um outro aspecto, as sequências de estrutura de cadeia leve são derivadas de uma sequência de subgrupos de Kabat kappa I, II, III ou IV. Em ainda um outro aspecto, as sequências de estrutura de cadeia leve are estrutura de consenso de kappa I de VL. Em ainda um outro aspecto, uma ou mais das sequências de estrutura de cadeia leve são as seguintes:

LC-FR1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC (SEQ ID NO: 21)

LC-FR2 WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 22)

LC-FR3 GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 23)

LC-FR4 FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 24),

[0124] Em ainda um outro aspecto específico, o anticorpo ulteriormente compreende uma região constante de camundongo ou de ser humano. Em ainda um outro aspecto, a região constante de ser humano é selecionada do grupo que consiste em IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4. Em ainda um outro aspecto específico, a região constante de ser humano é IgG1. Em ainda um outro aspecto, a região constante de camundongo é selecionada do grupo que consiste em IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3. Em ainda um outro aspecto, a região constante de camundongo se IgG2A. Em ainda um outro aspecto específico, o anticorpo tem uma função efetora mínima ou reduzida. Em ainda um outro aspecto específico a função efetora mínima resulta de uma "mutação de Fc menos efetor" ou aglicolização. Em ainda uma outra concretização, a mutação de Fc menos efetor é uma substituição de N297A ou D265A/N297A na região constante.

[0125] Em ainda uma outra concretização, provido é um anticorpo de anti-PDL1 isolado compreendendo uma sequência de região variável de cadeia leve ou de cadeia pesada, em que:

(a) a sequência de cadeia pesada tem pelo menos 85% de identidade de sequência com a sequência de cadeia pesada:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVR-
QAPGKGLEWVAWIS PYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAY-
LQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVTVSA (SEQ ID
NO: 30), ou

(b) as sequências de cadeia leve tem pelo menos 85% de
identidade de sequência com a sequência de cadeia leve: DIQMT-
QSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIY
SASF LYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS-
LQPEDFATYYCQYLYHPATFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 31),

[0126] Em um aspecto específico, a identidade de sequência é
86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%,
98%, 99% ou 100%. Em um outro aspecto, a região variável de cadeia
pesada compreende uma ou mais sequências de estrutura justapostas
entre as HVRs como: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-
FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), e as regiões variáveis de cadeia leve com-
preende uma ou mais sequências de estrutura justapostas entre as
HVRs como: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-
L3)-(LC-FR4). Em ainda um outro aspecto, as sequências de estrutura
são derivadas de sequências de estrutura de consenso de ser huma-
no. Em um outro aspecto, as sequências de estrutura de cadeia pesa-
da são derivadas de uma sequência de subgrupo I, II ou III de Kabat.
Em ainda um outro aspecto, a sequência de estrutura de cadeia pesa-
da is a estrutura de consenso do subgrupo III de VH. Em ainda um ou-
tro aspecto, uma ou mais das sequências de estrutura de cadeia pe-
sada são as seguintes:

HC-FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	(SEQ ID NO: 14)
HC-FR2	WVRQAPGKGLEWV	(SEQ ID NO: 15)
HC-FR3	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	(SEQ ID NO: 16)
HC-FR4	WGQGTLVTVSA	(SEQ ID NO: 17),

[0127] Em ainda um outro aspecto, as sequências de estrutura de
cadeia leve são derivadas de uma sequência de subgrupos de Kabat

kappa I, II, III ou IV. Em ainda um outro aspecto, as sequências de estrutura de cadeia leve are estrutura de consenso de kappa I de VL. Em ainda um outro aspecto, uma ou mais das sequências de estrutura de cadeia leve são as seguintes:

LC-FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC	(SEQ ID NO: 21)
LC-FR2	WYQQKPGKAPKLLIY	(SEQ ID NO: 22)
LC-FR3	GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC	(SEQ ID NO: 23)
LC-FR4	FGQGTKVEIKR	(SEQ ID NO: 24),

[0128] Em ainda um outro aspecto específico, o anticorpo ulteriormente compreende uma região constante de camundongo ou de ser humano. Em ainda um outro aspecto, a região constante de ser humano é selecionada do grupo que consiste em IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4. Em ainda um outro aspecto específico, a região constante de ser humano é IgG1. Em ainda um outro aspecto, a região constante de camundongo é selecionada do grupo que consiste em IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3. Em ainda um outro aspecto, a região constante de camundongo se IgG2A. Em ainda um outro aspecto específico, o anticorpo tem uma função efetora mínima ou reduzida. Em ainda um outro aspecto específico, a função efetora mínima resulta da produção em células procarióticas. Em ainda um outro aspecto específico a função efetora mínima resulta de uma "mutação de Fc menos efetor" ou aglicolização. Em ainda uma outra concretização, a mutação de Fc menos efetor é uma substituição de N297A ou D265A/N297A na região constante.

[0129] Em uma outra concretização, provido é um anticorpo de anti-PDL1 isolado compreendendo uma sequência de região variável de cadeia leve ou de cadeia pesada, em que:

(a) a sequência de cadeia pesada tem pelo menos 85% de identidade de sequência com a sequência de cadeia pesada: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGK GLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAE-

DTAVYYCARRHWPGGFDYWQGGLTVTVSS (SEQ ID NO: 32), ou

(b) as sequências de cadeia leve tem pelo menos 85% de identidade de sequência com a sequência de cadeia leve: DIQMTQSPSSL-SASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIY SASF LYS-GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGT-KVEIKR (SEQ ID NO: 31).

[0130] Em um aspecto específico, a identidade de sequência é 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100%. Em um outro aspecto, a região variável de cadeia pesada compreende uma ou mais sequências de estrutura justapostas entre as HVRs como: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), e as regiões variáveis de cadeia leve compreende uma ou mais sequências de estrutura justapostas entre as HVRs como: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). Em ainda um outro aspecto, as sequências de estrutura são derivadas de sequências de estrutura de consenso de ser humano. Em um outro aspecto, as sequências de estrutura de cadeia pesada são derivadas de uma sequência de subgrupo I, II ou III de Kabat. Em ainda um outro aspecto, a sequência de estrutura de cadeia pesada é a estrutura de consenso do subgrupo III de VH. Em ainda um outro aspecto, uma ou mais das sequências de estrutura de cadeia pesada são as seguintes:

HC-FR1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 14)

HC-FR2 WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO: 15)

HC-FR3 RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 16)

HC-FR4 WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 33),

[0131] Em ainda um outro aspecto, as sequências de estrutura de cadeia leve são derivadas de uma sequência de subgrupos de Kabat kappa I, II, III ou IV. Em ainda um outro aspecto, as sequências de estrutura de cadeia leve são a estrutura de consenso de kappa I de VL. Em ainda um outro aspecto, uma ou mais das sequências de estrutura de

cadeia leve são as seguintes:

LC-FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC	(SEQ ID NO: 21)
LC-FR2	WYQQKPGKAPKLLIY	(SEQ ID NO: 22)
LC-FR3	GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC	(SEQ ID NO: 23)
LC-FR4	FGQGTKVEIKR	(SEQ ID NO: 24),

[0132] Em ainda um outro aspecto específico, o anticorpo ulteriormente compreende uma região constante de camundongo ou de ser humano. Em ainda um outro aspecto, a região constante de ser humano é selecionada do grupo que consiste em IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4. Em ainda um outro aspecto específico, a região constante de ser humano é IgG1. Em ainda um outro aspecto, a região constante de camundongo é selecionada do grupo que consiste em IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3. Em ainda um outro aspecto, a região constante de camundongo se IgG2A. Em ainda um outro aspecto específico, o anticorpo tem uma função efetora mínima ou reduzida. Em ainda um outro aspecto específico, a função efetora mínima resulta da produção em células procarióticas. Em ainda um outro aspecto específico a função efetora mínima resulta de uma "mutação de Fc menos efetor" ou aglicolização. Em ainda uma outra concretização, a mutação de Fc menos efetor é uma substituição de N297A ou D265A/N297A na região constante.

[0133] Em um outro aspecto, a região variável de cadeia pesada compreende uma ou mais sequências de estrutura justapostas entre as HVRs como: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), e as regiões variáveis de cadeia leve compreende uma ou mais sequências de estrutura justapostas entre as HVRs como: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). Em ainda um outro aspecto, as sequências de estrutura são derivadas de sequências de estrutura de consenso de ser humano. Em ainda um outro aspecto, as sequências de estrutura de cadeia pesada são derivadas de uma sequência de subgrupo I, II ou III de Ka-

bat. Em ainda um outro aspecto, a sequência de estrutura de cadeia pesada é a estrutura de consenso do subgrupo III de VH. Em ainda um outro aspecto, uma ou mais das sequências de estrutura de cadeia pesada são as seguintes:

HC-FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	(SEQ ID NO: 34)
HC-FR2	WVRQAPGKGLEWVA	(SEQ ID NO: 35)
HC-FR3	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	(SEQ ID NO: 16)
HC-FR4	WGQGTLLTVSS	(SEQ ID NO: 33),

[0134] Em ainda um outro aspecto, as sequências de estrutura de cadeia leve são derivadas de uma sequência de subgrupos de Kabat kappa I, II, II ou IV. Em ainda um outro aspecto, as sequências de estrutura de cadeia leve are estrutura de consenso de kappa I de VL. Em ainda um outro aspecto, uma ou mais das sequências de estrutura de cadeia leve são as seguintes:

LC-FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	(SEQ ID NO: 21)
LC-FR2	WYQQKPGKAPKLLIY	(SEQ ID NO: 22)
LC-FR3	GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC	(SEQ ID NO: 23)
LC-FR4	FGQGTKVEIK	(SEQ ID NO: 36),

[0135] Em ainda um outro aspecto específico, o anticorpo ulteriormente compreende uma região constante de camundongo ou de ser humano. Em ainda um outro aspecto, a região constante de ser humano é selecionada do grupo que consiste em IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4. Em ainda um outro aspecto específico, a região constante de ser humano é IgG1. Em ainda um outro aspecto, a região constante de camundongo é selecionada do grupo que consiste em IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3. Em ainda um outro aspecto, a região constante de camundongo se IgG2A. Em ainda um outro aspecto específico, o anticorpo tem uma função efetora mínima ou reduzida. Em ainda um outro aspecto específico a função efetora mínima resulta de uma "mutação de Fc menos efetor" ou aglicolização. Em ainda uma outra concretização, a mutação de Fc menos efetor é uma substituição de N297A ou D265A/N297A na região constante.

[0136] Em ainda uma outra concretização, provido é um anticorpo de anti-PDL1 compreendendo uma sequência de região variável de cadeia leve ou de cadeia pesada, em que:

(c) a cadeia pesada ulteriormente compreende e uma sequência de HVR-H1, HVR-H2 e HVR-H3 tendo pelo menos 85% de identidade de sequência com GFTFSDSWIH (SEQ ID NO: 4), AWIS-PYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 5) and RHWPGGFDY (SEQ ID NO: 6), respectivamente, ou

(d) a cadeia leve ulteriormente compreende uma sequência de HVR-L1, HVR-L2 e HVR-L3 tendo pelo menos 85% de identidade de sequência com RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 1), SASFLYS (SEQ ID NO: 2) e QQYLYHPAT (SEQ ID NO: 3), respectivamente.

[0137] Em um aspecto específico, a identidade de sequência é 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100%. Em um outro aspecto, a região variável de cadeia pesada compreende uma ou mais sequências de estrutura justapostas entre as HVRs como: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), e as regiões variáveis de cadeia leve compreende uma ou mais sequências de estrutura justapostas entre as HVRs como: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). Em ainda um outro aspecto, as sequências de estrutura são derivadas de sequências de estrutura de consenso de ser humano. Em ainda um outro aspecto, as sequências de estrutura de cadeia pesada são derivadas de uma sequência de subgrupo I, II ou III de Kabat. Em ainda um outro aspecto, a sequência de estrutura de cadeia pesada é a estrutura de consenso do subgrupo III de VH. Em ainda um outro aspecto, uma ou mais das sequências de estrutura de cadeia pesada são as seguintes:

HC-FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	(SEQ ID NO: 34)
HC-FR2	WVRQAPGKGLEWV	(SEQ ID NO: 35)
HC-FR3	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	(SEQ ID NO: 16)

HC-FR4 WGQGTLVTVSSASTK (SEQ ID NO: 33),

[0138] Em ainda um outro aspecto, as sequências de estrutura de cadeia leve são derivadas de uma sequência do subgrupo de Kabat kappa I, II, III ou IV. Em ainda um outro aspecto, as sequências de estrutura de cadeia leve são estrutura de consenso de kappa I de VL. Em ainda um outro aspecto, uma ou mais das sequências de estrutura de cadeia leve são as seguintes:

LC-FR1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 21)

LC-FR2 WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 22)

LC-FR3 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 23)

LC-FR4 FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 24)

[0139] Em ainda um outro aspecto específico, o anticorpo ulteriormente compreende uma região constante de camundongo ou de ser humano. Em ainda um outro aspecto, a região constante de ser humano é selecionada do grupo que consiste em IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4. Em ainda um outro aspecto específico, a região constante de ser humano é IgG1. Em ainda um outro aspecto, a região constante de camundongo é selecionada do grupo que consiste em IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3. Em ainda um outro aspecto, a região constante de camundongo se IgG2A. Em ainda um outro aspecto específico, o anticorpo tem uma função efetora mínima ou reduzida. Em ainda um outro aspecto específico a função efetora mínima resulta de uma "mutação de Fc menos efector" ou aglicolização. Em ainda uma outra concretização, a mutação de Fc menos efector é uma substituição de N297A ou D265A/N297A na região constante.

[0140] Em ainda uma outra concretização, provido é um anticorpo de anti-PDL1 isolado compreendendo uma sequência de região variável de cadeia leve ou de cadeia pesada, em que:

(a) a sequência de cadeia pesada tem pelo menos 85% de identidade de sequência com a sequência de cadeia pesada: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWI

SPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA-
VYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSSASTK (SEQ ID NO: 8), ou

(b) as sequências de cadeia leve tem pelo menos 85% de identidade de sequência com a sequência de cadeia leve: DIQMTQSPSSL-SASVGDRVITICRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASF LYS-GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGT-KVEIKR (SEQ ID NO: 7).

[0141] Em algumas concretizações, provido é um anticorpo de anti-PDL1 isolado compreendendo uma sequência de região variável de cadeia leve ou de cadeia pesada, em que a sequência região variável de cadeia leve tem pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 7. Em algumas concretizações, provido é um anticorpo de anti-PDL1 isolado compreendendo uma sequência de região variável de cadeia leve ou de cadeia pesada, em que a sequência região variável de cadeia pesada tem pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 8. Em algumas concretizações, provido é um anticorpo de anti-PDL1 isolado compreendendo uma sequência de região variável de cadeia leve ou de cadeia pesada, em que a sequência região variável de cadeia leve tem pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pe-

lo menos 97%, pelo menos 98%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 e a sequência região variável de cadeia pesada tem pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.

[0142] Em ainda uma outra concretização, provido é um anticorpo de anti-PDL1 isolado compreendendo uma sequência de cadeia pesada e de cadeia leve, em que:

(a) a sequência de cadeia pesada tem pelo menos 85% de identidade de sequência com a sequência de cadeia pesada: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVR-QAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAY-LQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGGGTLTVSSASTKG-PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL-TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT-KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS-RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE-QYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA-KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN-GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN-VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 10), ou

(b) as sequências de cadeia leve tem pelo menos 85% de identidade de sequência com a sequência de cadeia leve: DIQMTQSPSSL-SASVGDRVITICRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYS-GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGT-KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS-

LSSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 9).

[0143] Em algumas concretizações, provido é um anticorpo de anti-PDL1 isolado compreendendo uma sequência de cadeia pesada e de cadeia leve, em que a sequência de cadeia leve tem pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9. Em algumas concretizações, provido é um anticorpo de anti-PDL1 isolado compreendendo uma sequência de cadeia pesada e de cadeia leve, em que a sequência de cadeia pesada tem pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. Em algumas concretizações, provido é um anticorpo de anti-PDL1 isolado compreendendo uma sequência de cadeia pesada e de cadeia leve, em que a sequência de cadeia leve tem pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 and a sequência de cadeia pesada tem pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, ou pelo menos 99%

de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

[0144] Em algumas concretizações, o anticorpo de anti-PDL1 isolado é um anticorpo monoclonal oxidado. Em algumas concretizações, a formulação de anticorpo oxidado na formulação compreende uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, e uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. Em algumas concretizações, a formulação de anticorpo oxidado na formulação compreende uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, em que um ou mais de W33, W50, ou W101 é oxidado. Em algumas concretizações, a formulação de anticorpo oxidado na formulação compreende uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, em que um ou mais de M253 e M429 são oxidados. Em algumas concretizações, a formulação de anticorpo oxidado retém pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 65%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 75%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%, ou pelo menos cerca de 95% de sua atividade biológica (por exemplo, ligação ao alvo, ou a potência terapêutica) exibida antes da armazenagem, isto é, na hora a formulação farmacêutica foi preparada.

[0145] Em algumas concretizações, o anticorpo de anti-PDL1 isolado é um anticorpo monoclonal glicado. Em algumas concretizações, o anticorpo monoclonal glicado na formulação compreende uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, e uma pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. Em algumas concretizações, o anticorpo monoclonal glicado na formulação compreende uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, em que uma ou mais de lisina é glicada. Em algumas concretizações, o anticorpo monoclonal

glicado na formulação compreende uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, em que K65 é glicado.

[0146] Em algumas concretizações, o anticorpo de anti-PDL1 isolado é aglicosilado.

[0147] Em qualquer uma das concretizações aqui, o anticorpo de anti-PDL1 isolado pode ser ligar a um PD-L1 humano, por exemplo, um PD-L1 humano como mostrado em UniProtKB/Swiss-Prot número de acesso Q9NZQ7,1, ou uma sua variante.

[0148] Em ainda uma outra concretização, provido é um ácido nucléico isolado que codifica qualquer um dos anticorpos descritos aqui. Em algumas concretizações, o ácido nucléico ulteriormente compreende um vetor adequado para a expressão do ácido nucléico que codifica qualquer um dos anticorpos de anti-PDL1 anteriormente descritos. Em ainda um outro aspecto específico, o vetor está em uma célula hospedeira adequada para a expressão do ácido nucléico. Em ainda um outro aspecto específico, a célula hospedeira é uma célula eucariótica ou uma célula procariótica. Em ainda um outro aspecto específico, a célula eucariótica em uma célula de mamífero, tal como ovário de hamster chinês (CHO).

[0149] O seu fragmento de ligação de antígeno ou anticorpo, pode ser feito usando-se métodos conhecidos na técnica, por exemplo, por um processo compreendendo cultivo de uma célula hospedeira contendo ácido nucléico que codifica qualquer um dos anteriormente descritos anticorpos de anti-PDL1 ou fragmento de ligação de antígeno em uma forma adequada para expressão, sob condições adequadas para produzir tal anticorpo ou fragmento e recuperação do anticorpo ou do fragmento.

B. Preparação de anticorpo

[0150] O anticorpo na formulação é preparado usando-se técnicas

disponíveis na técnica para a geração de anticorpos, métodos exemplares dos quais são descritos em mais detalhes nas seguintes seções.

[0151] O anticorpo é direcionado contra um antígeno de interesse (*isto é*, PD-L1, tal como PD-L1 humano). De preferência, o antígeno é um polipeptídeo biologicamente importante e administração do anticorpo a um mamífero que sofre de um distúrbio pode resultar em um benefício terapêutico naquele mamífero.

(i) Preparação de antígeno

[0152] Antígenos solúveis ou seus fragmentos, opcionalmente conjugados com outras moléculas, podem ser feitos como imunógenos para a geração de anticorpos. Para as moléculas de transmembrana, tais como receptores, fragmentos destes (por exemplo, o domínio extracelular de um receptor) podem ser usadas como o imunógeno. Alternativamente, células que expressam a molécula de transmembrana podem ser usadas como o imunógeno. Tais células podem ser derivadas de uma fonte natural (por exemplo, linhas de células de câncer) ou podem ser células que foram transformadas por técnicas recombinantes para expressar a molécula de transmembrana. Outros antígenos e suas formas úteis para a preparação de anticorpos estarão evidentes por aqueles na técnica.

(ii) Certos Métodos à Base de Anticorpo

[0153] Anticorpos policlonais são de preferência aumentados em animais por múltiplas injeções subcutânea (sc) ou intraperitoneal (ip) do antígeno relevante e um auxiliar, Pode ser útil conjugar o antígeno relevante com uma proteína que é imunogênica na espécie a ser imunizada, por exemplo, hemocianina de lapa "keyhole", albumina no sorro, tiroglobulina bovina, ou inibidor de tripsina de soja usando-se a agente bifuncional ou de derivatização, por exemplo, éster de maleimidobenzil sulfosuccinimida (conjugação através de resíduos de cisteí-

na), N-hidroxisuccinimida (através de resíduos de lisina), glutaraldeído, anidrido succínico, SOCl_2 , ou $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, onde R e R^1 são grupos alquila diferentes.

[0154] Animais são imunizados contra o antígeno, conjugados imunogênicos, ou derivados por combinação, por exemplo, 100 μg ou 5 μg da proteína ou conjugado (para coelhos ou camundongos, respectivamente) com 3 volumes de auxiliar completo de Freund e injeção da solução intradermicamente em múltiplos sítios. Um mês mais tarde os animais são reforçados com 1/5 a 1/10 a quantidade original de peptídeo ou conjugado em auxiliar completo de Freund por injeção subcutânea em múltiplos sítios, Sete a 14 dias mais tarde os animais são sangrados e o soro é analisado quanto ao título de anticorpo. Animais são reforçados até o platô de título. De preferência, o animal é reforçado com o conjugado do mesmo antígeno, mas conjugado com uma proteína diferente e/ou através de um reagente de reticulação diferente, Conjugados também podem ser feitos em cultura de células recombinantes como fusões de proteína, Também, agentes de agregação tal como alúmen são adequadamente usados para melhorar a resposta imune.

[0155] Anticorpos monoclonais da invenção podem ser feitos usando-se o método de hibridoma primeiramente descrito por Kohler e outros, *Nature*, 256:495 (1975), e ulteriormente descrito, por exemplo, in Hongo e outros, *Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow e outros, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed, 1988); Hammerling e outros, in: *Anticorpos monoclonais and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N,Y,, 1981), and Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006) com referência a human-human hybridomas, Métodos adicionais incluem aqueles descritos, por exemplo, na pat. U.S. no. 7.189.826 com referência a produção de anticorpos de IgM naturais de ser humano monoclonais a partir de li-

nhas de células de hibridoma, Tecnologia de hibridoma de ser humano (Trioma technology) é descrita em Vollmers and Brandleina, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) and Vollmers and Brandleina, *Métodos and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005).

[0156] Para as várias outras técnicas de hibridoma, vide, *por exemplo*, US 2006/258841; US 2006/183887 (anticorpos totalmente humanos), US 2006/059575; US 2005/287149; US 2005/100546; US 2005/026229; e as pats. U.S. nos. 7.078.492 e 7.153.507. Um protocolo exemplar para a produção de anticorpos monoclonais usando-se o método de hibridoma é descrito como se segue. Em uma concretização, um camundongo ou outro animal hospedeiro apropriado, tal como hamster, é imunizado para eliciar linfócitos T que produzem ou são capazes de produzir anticorpos que especificamente se ligarão à proteína para imunização. Anticorpos são aumentados em animais por múltiplas injeções subcutânea (sc) ou intraperitoneal (ip) de um polipeptídeo da invenção ou um seu fragmento, e um auxiliar, tal como lipídio de monofosforila A (MPL)/trealose dicrinomicolato (TDM) (Ribi Immunochem, Pesquisa, Inc., Hamilton, Mont.). Um polipeptídeo da invenção (por exemplo, antígeno) ou um seu fragmento pode ser preparado usando-se métodos bem conhecidos na técnica, tais como métodos recombinantes, alguns dos quais são ulteriormente descritos aqui. Soro oriundo de animais imunizados é analisado quanto a anticorpos de anti-antígeno, e imunizações de reforço são opcionalmente administrados, Linfócitos oriundos de animais que produzem anticorpos de anti-antígeno são isolados. Alternativamente, linfócitos podem ser imunizados *in vitro*.

[0157] Linfócitos são então fundidos com células de mieloma usando-se um agente de fusão adequado, tal como polietileno glicol, para formar uma célula de hibridoma. Vide, *por exemplo*, Goding, *Monoclo-*

nal Antibodies: Principles and Practice, pp, 59-103 (Academic Press, 1986). Células de mieloma podem ser usadas que fundem eficazmente, suportam produção de alto nível estável de anticorpo pelas células de produção de anticorpo selecionadas, e são sensíveis a um meio tal como meio de HAT. Células de mieloma exemplar incluem, mas não são limitadas a, linhas de mielomas de camundongo, tais como aquelas derivada de tumores de camundongo de MOPC-21 e MPC-11 disponíveis do Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif, USA, e células de SP-2 ou X63-Ag8-653 disponíveis da American Type Culture Collection, Rockville, Md, USA, Linhas de células de hetermieloma de camundongo-ser humano de mielomas de ser humano também foram descritas para a produção de anticorpos monoclonais humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur e outros, *Anticorpo monoclonal Production Técnicas and Applications*, pp, 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

[0158] As células de hibridomas assim preparadas são semeadas e são desenvolvidas em um meio de cultura adequado, por exemplo, um meio que contém uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou a sobrevivência das células de mieloma parentais, não fundidas. Por exemplo, se as células de mieloma parentais carecerem da transferase de fosforribosila de guanina de hipoxantina de enzima (HGPRT ou HPRT), o meio de cultura para os hibridomas tipicamente incluirão hipoxantina, aminopterina, e timidina (meio de HAT), substâncias essas que previnem crescimento de células deficientes de HGPRT. De preferência, métodos de cultura de células de hibridoma livre de soro são usados para reduzir uso de soro derivado de animal tal como soro bovino fetal, como descrito, por exemplo, em Even e outros, *Trends in Biotechnology*, 24 (3), 105-108 (2006).

[0159] Oligopeptídeos como ferramentas para o aperfeiçoamento de produtividade de culturas de células de hibridoma são descritas em

Franok, *Trends in Anticorpo monoclonal Pesquisa*, 111-122 (2005), Especificamente, meios de culturas médios são enriquecidos com certos aminoácidos (alanina, serina, asparagina, prolina), ou com frações de hidrolisado de proteína, e apoptose pode significativamente ser suprimida por oligopeptídeos sintéticos, constituídos de três a seis resíduos de aminoácidos. Os peptídeos estão presentes em concentrações mais altas milimolares.

[0160] Meio de cultura em que células de hibridoma estão se desenvolvendo pode ser avaliado para a produção de anticorpos monoclonais que se ligam a um anticorpo da invenção. A especificidade de ligação de anticorpos monoclonais produzidos por células de hibridoma pode ser determinada por imunoprecipitação ou por um ensaio de ligação *in vitro*, tal como radioimunoensaio (RIA) ou ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA). A afinidade de ligação do anticorpo monoclonal pode ser determinado, por exemplo, por Scatchard analysis. Vide, *por exemplo*, Munson e outros, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

[0161] Depois que as células de hibridoma são identificadas que produzem anticorpos da especificidade, afinidade, e/ou atividade desejada, os clones podem ser subclonados por limitação de procedimentos de diluição e desenvolvidos por métodos padrão. Vide, *por exemplo*, Goding, *supra*, Meios de cultura adequados para esta finalidade incluem, por exemplo, meio de D-MEM ou de RPMI-1640, além disso, células de hibridoma podem ser desenvolvidas *in vivo* como tumores de ascite em um animal. Anticorpos monoclonais secretados pelos subclones são adequadamente separados do meio de cultura, fluido de ascite, ou soro por procedimentos de purificação de imunoglobulina convencionais tal como, por exemplo, Sepharose de proteína A, cromatografia de hidrolapatita, eletroforese de gel, dialise, ou cromatografia por afinidade. Um procedimento para o isolamento de proteínas de células de hibridoma é descrito na US 2005/176122 e na pat. U.S. no.

6.919.436. O método inclui usando-se sais mínimos, tais como sais liotrópicos, no processo de ligação e de preferência também usando-se pequenas quantidades de solventes orgânicos no processo de eluição.

(iii) Certos Métodos de Triagem de Biblioteca

[0162] Anticorpos da invenção podem ser feitos por uso de bibliotecas combinatórias para triar quanto a anticorpos com a(s) atividade(s) desejada(s). Por exemplo, uma variedade de métodos são conhecidos na técnica para a geração de bibliotecas de exibição de fagos e triagem de tais bibliotecas quanto a anticorpos que possuem as características de ligação desejadas. Tais métodos são descritos em geral em Hoogenboom e outros, in *Métodos in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien e outros, ed., Human Press, Totowa, N.J., 2001). Por exemplo, um método de geração de anticorpos de interesse é através do uso de uma biblioteca de anticorpos de fagos como descrita em Lee e outros, *J. Mol. Biol.* (2004), 340(5):1073-93,

[0163] Em princípio, clones de anticorpo sintéticos são selecionados por triagem de bibliotecas de fagos contendo fago que exibem vários fragmentos de região variável de anticorpo (Fv) fundidos a proteína de revestimento de fago. Tais bibliotecas de fagos são garimpadas por cromatografia por afinidade contra o antígeno desejado. Clones que expressam fragmentos de Fv capazes de se ligar ao antígeno desejado são adsorvidos ao antígeno e assim separados dos clones de não ligação na biblioteca. Os clones de não ligação são então eluídos do antígeno, e podem ser ulteriormente enriquecidos por ciclos adicionais de adsorção/eluição de antígeno. Qualquer um dos anticorpos da invenção pode ser obtido por projeção de um procedimento de triagem de antígeno adequado para selecionar o clone de fago de interesse seguido por construção de um clone de anticorpo de comprimento total clone usando-se as sequências de Fv a partir do clone de fago de inte-

resse e sequências de região constante (Fc) adequadas descritas em Kabat e outros, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda Md, (1991), vols, 1-3.

[0164] Em certas concretizações, o domínio de ligação de antígeno de um anticorpo é formado a partir de duas regiões variáveis (V) de cerca de 110 aminoácidos, um de cada uma das cadeias leve (VL) e pesada (VH), que ambos apresentam três laços hipervariáveis (HVRs) ou regiões de determinação de complementaridade (CDRs). Domínios variáveis podem ser exibidos funcionalmente no fago, ou como fragmentos de Fv de cadeia simples (scFv), em que VH e VL estão covalentemente ligadas através de um peptídeo flexível, curto, ou como fragmentos de Fab, em que eles são cada um fundidos a um domínio constante e interagem não covalentemente, como descrito em Winter e outros, *Ann. Rev. Immunol*, 12: 433-455 (1994). Como usado aqui, clones de codificação de scFv de fago e clones de codificação de Fab são coletivamente chamados de " clones de fago de Fv " ou " clones de Fv."

[0165] Repertórios de genes de VH e de VL podem ser separadamente clonados por reação de cadeia de polimerase (PCR) e combinados aleatoriamente nas bibliotecas de fagos, que podem ser então buscadas quanto a clones de ligação de antígeno como descritos em Winter e outros, *Ann. Ver. Immunol*, 12: 433-455 (1994). Bibliotecas oriundas de fontes imunizadas provêm anticorpos de alta afinidade para o imunógeno sem a exigência de construção de híbridomas. Alternativamente, os repertórios nativos podem ser clonados para prover uma fonte simples de anticorpos humanos em uma ampla gama de não-auto antígenos e também auto antígenos sem qualquer imunização como descrito por Griffiths e outros, *EMBO J*, 12: 725-734 (1993). Finalmente, bibliotecas nativas podem também ser feitas sinteticamente por clonagem dos segmentos de gene V não redispuestos das célu-

las tronco, e usando-se iniciadores de PCR contendo sequência aleatória para codificar as regiões de CDR3 altamente variáveis e para realizar redistribuição in vitro como descrito Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.* 227: 381-388 (1992),

[0166] Em certas concretizações, fago filamentososo é usado para exibir fragmentos de anticorpos por fusão à proteína de revestimento menor pIII. Os fragmentos de anticorpos podem ser exibidos como fragmentos de Fv de cadeia simples, em que domínios de VH e VL estão ligados na mesma cadeia de polipeptídeo por um espaçador de polipeptídeo flexível, por exemplo, como descrito por Marks e outros, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1991), ou como fragmentos de Fab, em que uma cadeia é fundida a pIII e a outra é secretada no periplasma da célula hospedeira bacteriana onde montagem de uma estrutura de proteína de revestimento de Fab que se torna exibida na superfície de fago por deslocamento de algumas das proteínas de revestimento de tipo selvagem, por exemplo, como descrito em Hoogenboom e outros, *Nucl. Acids Res.* 19: 4133-4137 (1991).

[0167] Em geral, ácidos nucléicos que codificam fragmentos de gene de anticorpo são obtidos a partir de células imunes coletadas a partir de seres humanos ou de animais. Se uma biblioteca orientada em favor de clones de anti-antígeno é desejada, o indivíduo é imunizado com antígeno para gerar uma resposta de anticorpo, e células de baço e/ou células B circulantes, outros linfócitos de sangue periféricos (PBLs) são recuperados para a construção de biblioteca. Em uma concretização, uma biblioteca de fragmentos de gene de anticorpo humano orientada em favor de clones de anti-antígeno é obtida por geração de uma resposta de anticorpo de anti-antígeno em camundongos transgênicos que portam um conjunto de genes de imunoglobulina de ser humano funcionais (e que carecem de um sistema de produção de anticorpo endógeno funcional) tal que imunização de an-

tígeno origina células B que produzem anticorpos humanos contra antígeno. A geração de camundongos transgênicos produtores de anticorpo humano é descrita abaixo.

[0168] Enriquecimento adicional para as populações de células reativas de anti-antígeno pode ser obtido por uso de um procedimento de triagem adequado para isolar células B que expressam anticorpo ligado, por exemplo, por separação de células usando-se cromatografia por afinidade de antígeno ou adsorção de células em antígeno marcado com fluorocromo seguida por classificação de célula ativada por fluxo (FACS).

[0169] Alternativamente, o uso de células de baço e/ou células B ou outros PBLs oriundos de um doador não imunizado provê uma melhor representação do repertório de anticorpo possível, e também permite a construção de uma biblioteca de anticorpos usando-se quaisquer espécies de animais (humano ou não humano) em que antígeno não é antigênico. Para bibliotecas que incorporam a construção de gene de anticorpo in vitro, células tronco são coletadas a partir do indivíduo para prover ácidos nucleicos que codificam segmentos de gene de anticorpo não redispuestos. As células imunes de interesse podem ser obtidas a partir de uma variedade de espécies de animais, tais como espécies de ser humano, de camundongo, de rato, de lagomorfos, de luprinos, de caninos, de felinos, de suínos, de bovinos, de equinos, e espécies de aves, etc.

[0170] Segmentos de gene de anticorpo variável de codificação de ácido nucleico (incluindo segmentos de VH e VL) são recuperados a partir das células de interesse e são ampliados. No caso de bibliotecas de genes de VH e de VL redispuestas, o DNA desejado pode ser obtido por isolamento de DNA ou mRNA genômico de linfócitos seguido por reação de cadeia de polimerase (PCR) como iniciadores que emparelhamento das extremidades de 5' e 3' de genes de VH e de VL redis-

postos descritos em Orlandi e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86: 3833-3837 (1989), desse modo fazendo vários repertórios de genes V para expressão. Os genes V podem ser amplificados a partir de cDNA e DNA genômico, com retro-iniciadores na extremidade 5' do éxon que codifica o domínio V maduro e iniciadores dianteiros com base dentro do segmento J como descrito em Orlandi e outros, (1989) e em Ward e outros, *Nature*, 341: 544-546 (1989). No entanto, para amplificar a partir de cDNA, retro-iniciadores podem ser também baseados no éxon líder como descrito em Jones e outros, *Biotechnol*, 9: 88-89 (1991), e iniciadores dianteiros dentro da região constante como descrito em Sastry e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86: 5728-5732 (1989). Para maximizar a complementaridade, degeneração pode ser incorporada nos iniciadores como descrito em Orlandi e outros, (1989) ou Sastry e outros, (1989). Em certas concretizações, a diversidade de biblioteca é maximizada por uso de iniciadores de PCR direcionados para cada família de gene V a fim de ampliar todas as disposições de VH e VL disponíveis presentes na amostra de ácido nucléico de célula madura, por exemplo, como descrito no método de Marks e outros, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1991) ou como descrito no método de Orum e outros, *Nucleic Acids Res.* 21: 4491-4498 (1993). Para a clonagem do DNA ampliado em vetores de expressão, sítios de restrição raros podem ser introduzidos para dentro do iniciador de PCR como uma etiqueta em uma extremidade como descrito em Orlandi e outros, (1989), ou por outra ampliação de PCR com um iniciador etiquetado como descrito em Clackson e outros, *Nature*, 352: 624-628 (1991).

[0171] Repertórios de genes V sinteticamente redispuestos podem ser derivados in vitro de segmentos de gene V. A maioria dos segmentos de gene de VH de ser humano foram clonados e foram sequenciados (reported in Tomlinson e outros, *J. Mol. Biol.* 227: 776-798 (1992)), e foram mapeados (relatados em Matsuda e outros, *Nature Genet*, 3:

88-94 (1993); estes segmentos clonados (incluindo todas as principais conformações do laço de H1 e H2) podem ser usados para gerar diversos repertórios de gene de VH com iniciadores de PCR que codificam laços de H3 de diversa sequência e comprimento como descritos em Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*227: 381-388 (1992), Repertórios de VH podem também ser feitos com a diversidade de sequência focalizada em um laço de H3 longo de um comprimento simples como descrito em Barbas e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4457-4461 (1992), segmentos de V_k e V_λ de ser humano foram clonados e foram sequenciados (relatados em Williams and Winter, *Eur. J. Immunol.*23: 1456-1461 (1993)) e podem ser usados para formar repertórios de cadeia leve sintéticos, repertórios de gene de V sintético, com base em uma faixa de vezes VH e VL, e comprimentos de L3 e H3, codificarão anticorpos de diversidade estrutural considerável, Após ampliação de DNAs de condificação de gene de V, germlina V-gene segmentos de gene de V de linha de germes de acordo com os métodos Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*227: 381-388 (1992).

[0172] Repertórios de fragmentos de anticorpos podem ser construídos por combinação de repertórios de gene de VH e VL juntos de vários modos. Cada repertório pode ser criado em diferentes vetores, e os vetores recombinados *in vitro*, por exemplo, como descrito em Hogrefe e outros, *Gene*, 128: 119-126 (1993), ou *in vivo* por infecção combinatória, por exemplo, o sistema de loxP descrito em Waterhouse e outros, *Nucl. Acids Res.*21: 2265-2266 (1993). Abordagem de recombinação *in vivo* explora a natureza de duas cadeias de fragmentos de Fab para superar o limite no tamanho da biblioteca imposta por eficiência de transformação de *E. coli*, Repertórios de VH e de VL nativos são clonados separadamente, um dentro de um fagemídeo e o outro dentro de um vetor de fago. As duas bibliotecas são então combinadas por infecção de fago de bactérias contendo fagemídeo de modo que

cada célula contém uma combinação diferente e o tamanho de biblioteca é limitado apenas pelo número de células presentes (cerca de 10^{12} clones). Ambos os vetores contêm sinais de recombinação *in vivo* de modo que os genes de VH e de VL são recombinantes sobre um réplicon simples e são co-embalados em vírions de fago. Estas vastas bibliotecas provêm números grandes de diversos anticorpos de boa afinidade (K_d^{-1} de cerca de 10^{-8} M).

[0173] Alternativamente, os repertórios podem ser clonados sequencialmente no mesmo vetor, por exemplo, como descrito em *Barbas e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 7978-7982 (1991), ou montados entre si por PCR e então clonados, por exemplo, como descrito em *Clackson e outros, Nature*, 352: 624-628 (1991). Montagem de PCR pode também ser usado para unir DNAs de VH e de VL com DNA que codifica um espaçador de peptídeo flexível para formar repertórios de Fv de cadeia simples (scFv). Em ainda uma outra técnica, "na montagem de PCR de célula" é usado para combinar genes de VH e de VL dentro dos linfócitos por PCR então clonar repertórios de genes ligados como descritos em *Embleton e outros, Nucl. Acids Res.* 20: 3831-3837 (1992).

[0174] Os anticorpos produzidos por bibliotecas nativas (ou natural ou sintética) podem ser de afinidade moderada (K_d^{-1} de cerca de 10^6 a 10^7 M⁻¹), mas maturação por afinidade podem também ser imitada *in vitro* por construção e resselação bibliotecas secundárias como descritas em *Winter e outros, (1994), supra*. Por exemplo, mutação pode ser introduzida aleatoriamente *in vitro* por uso de polimerase propensa a erro (relatada em *Leung e outros, Technique* 1: 11-15 (1989)) in o método de *Hawkins e outros, J. Mol. Biol.* 226: 889-896 (1992) ou no método de *Gram e outros, Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 89: 3576-3580 (1992). Adicionalmente, maturação por afinidade pode ser realizada por mutação aleatória de uma ou mais CDRs, por exemplo, usando-se PCR

com iniciadores que portam sequência aleatória que varia a CDR de interesse, em clones de Fv individuais selecionados e triagem para clones de afinidade mais altos, WO 9607754 (publicada em 14 de março de 1996) descrita um método para a introdução e mutagênese em uma complementaridade que determina região de uma cadeia leve de imunoglobulina para criar uma biblioteca de genes de cadeia leve. Uma outra abordagem eficaz é para recombinar os domínios de VH ou de VL selecionados por exibição de fago com repertórios de variantes de domínio V de ocorrência natural obtidos a partir de doadores não imunizados e triagem para afinidade mais alta em vários ciclos de re-manejamento de cadeia como descrito em Marks e outros, *Bio-technol*, 10: 779-783 (1992), Esta técnica permite a produção de anticorpos e fragmentos de anticorpos com afinidades de cerca de 10^{-9} M ou menos.

[0175] Triagem das bibliotecas pode ser realizada por várias técnicas conhecidas na técnica. Por exemplo, antígeno pode ser usado para revestir as cavidades de placas de adsorção, expresso em células hospedeiras afixadas a placas de adsorção ou usadas na classificação de célula, ou conjugadas com biotina para captura com contas revestidas com estreptavidina, ou usadas em qualquer outro método para garimpar bibliotecas de exibição de fagos.

[0176] As amostras de biblioteca de fagos são postas em contato com antígeno imobilizado sob condições adequadas para a ligação de pelo menos uma porção das partículas de fago com o adsorvente, Normalmente, as condições, incluindo pH, concentração iônica, temperatura e semelhantes são selecionados para imitar condições fisiológicas. Os fagos ligados à fase sólida são lavados e então são avaliados por ácido, por exemplo, como descrito em Barbas e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 88: 7978-7982 (1991), ou por álcali, por exemplo, como descrito em Marks e outros, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1991), ou por

competição de antígeno, por exemplo, em um procedimento similar ao método de competição de antígeno de Clackson e outros, *Nature*, 352: 624-628 (1991). Fagos podem ser enriquecidos 20-1,000 vezes em um ciclo simples de seleção. Além do mais, os fagos enriquecidos podem ser desenvolvidos em cultura bacteriana e selecionados a outros ciclos de seleção.

[0177] A eficácia de seleção dependente de muitos fatores, incluindo a cinética de dissociação durante a lavagem, e se múltiplos fragmentos de anticorpos em um fago simples podem simultaneamente engajar com antígeno. Anticorpos com cinética de dissociação rápida (e fracas afinidades de ligação) podem ser retidos por uso de lavagens curtas, exibição de fago multivalente e alta densidade de revestimento de antígeno na fase sólida. A alta densidade não apenas estabiliza o fago através de interações multivalentes, mas favorece religação do fago que se dissociou. A seleção de anticorpos com cinética de dissociação lenta (e boas afinidades de ligação) pode ser promovida por uso de lavagens longas e exibição de fago monovalente como descrito em Bass e outros, *Proteins*, 8: 309-314 (1990) e na WO 92/09690, e uma baixa densidade de revestimento de antígeno como descrito em Marks e outros, *Biotechnol*, 10: 779-783 (1992).

[0178] É possível selecionar entre anticorpos de fago de diferentes afinidades, mesmo com afinidades que diferem levemente, para antígeno. No entanto, mutação aleatória de um anticorpo selecionado (por exemplo, como realizada em algumas técnicas de maturação por afinidade) é provável originar muitos mutantes, a maior parte que se liga a antígeno, e uns poucos com afinidade mais alta. Com antígeno limitante, fagos por afinidade alta rara poderiam ser completados. Para reter todos os mutantes por afinidade mais alta, fagos podem ser incubados com excesso de antígeno biotinilado, mas com o antígeno biotinilado em uma concentração de molaridade mais baixa do que a afini-

dade molar alvo constante para antígeno. Os fagos de ligação por afinidade altos podem então ser capturados por contas paramagnéticas revestidas por estreptavidina. Tal "captura de equilíbrio" permite que os anticorpos sejam selecionados acordo com suas afinidades de ligação, com sensibilidade que permite isolamento de clones mutantes com tão pouco quanto duas vezes afinidades mais altas de um grande excesso de fagos com afinidade mais baixa. Condições usadas nos fagos de lavagem ligados a uma fase sólida podem ser manipuladas para discriminar na base de cinética de dissociação,

[0179] Clones de anti-antígeno podem ser selecionados com base na atividade. Em certas concretizações, a invenção provê anticorpos de anti-antígeno que se ligam a células vivas que naturalmente expressam antígeno ou se ligam a antígeno de flutuação livre ou antígeno ligado às outras estruturas celulares. Clones de Fv que correspondem a tais anticorpos de anti-antígeno podem ser selecionados por (1) isolamento de clones de anti-antígeno de uma biblioteca de fagos como descrito acima, e aplicação opcional da população isolada de clones de fago por desenvolvimento da população em um hospedeiro bacteriano; (2) seleção de antígeno e uma segunda proteína contra a qual atividade de bloqueamento e não bloqueamento, é desejada; (3) adsorção dos clones de anti-antígeno de fago em antígeno imobilizado; (4) usando-se em excesso da segunda proteína para eluir quaisquer clones indesejados que reconhecem determinantes de ligação de antígeno que se sobrepõem ou são partilhadas com os determinantes de ligação da segunda proteína; e (5) eluição dos clones que permanecem adsorvidas após a etapa (4). Opcionalmente, clones com as propriedades de bloqueamento/não bloqueamento desejadas podem ser ulteriormente enriquecidos por repetição dos procedimentos de seleção descritos aqui uma ou mais vezes,

[0180] DNA que codifica anticorpos monoclonais derivados de hibri-

doma ou clones de Fv de exibição de fago da invenção é prontamente isolado e sequenciado usando-se procedimentos convencionais (por exemplo, por uso de iniciadores de oligonucleotídeo projetados para especificamente ampliar as regiões de codificação de cadeia pesada e de cadeia leve de interesse a partir do modelo de DNA de fago ou de hibridoma). Uma vez isolado, o DNA pode ser colocado para dentro dos vetores de expressão, que são então transfectados para dentro de células hospedeiras tais como células de *E. coli*, células de COS de símio, células de ovário de hamster chinês (CHO), ou células de mieloma que de outra maneira não produzem proteína de imunoglobulina, para se obter a síntese dos anticorpos monoclonais desejados nas células hospedeiras recombinantes, Revisão de artigos na expressão recombinante em bactérias de DNA de codificação de anticorpo incluem Skerra e outros, *Curr, Opinion in Immunol*, 5: 256 (1993) and Pluckthun, *Immunol, Revs*, 130: 151 (1992).

[0181] DNA que codifica os clones de Fv da invenção pode ser combinado com sequências de DNA conhecidas que codificam regiões constantes de cadeia pesada e/ou de cadeia leve (por exemplo, as sequências de DNA apropriadas podem ser obtidas a partir de Kabat e outros, *supra*) para formar clones que codificam cadeias pesada e/ou de cadeia leve de comprimento parcial ou total. Serão apreciadas regiões constantes de qualquer isótipo podem ser usadas para esta finalidade, incluindo regiões constantes de IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE, e que tais regiões constantes podem ser obtidos a partir de qualquer espécie humana ou de animal. Um clone de Fv derivado do DNA de domínio variável de uma espécie de animal (tal como ser humano) e então fundido a DNA de região constante de uma outra espécie de animal para formar sequência (s) de codificação para "híbrido", cadeia pesada e/ou cadeia leve de comprimento total é incluída na definição de anticorpo "quimérico" e "híbrido" como usado aqui. Em certas concretizações,

um clone de Fv derivado de DNA variável de ser humano é fundido a DNA de região constante de ser humano para formar sequência(s) de codificação para cadeias pesada e/ou leve de comprimento parcial ou total.

[0182] DNA que codifica anticorpo de anti-antígeno derivado de um hibridoma da invenção pode também ser modificado, por exemplo, por substituição da sequência de codificação para domínios constantes de cadeia pesada e leve de ser humano no lugar de sequências de camundongos homólogas derivadas do clone de hibridoma (por exemplo, como no método de Morrison *e outros*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)), DNA que codifica um anticorpo ou fragmento derivado de clone de Fv ou de hibridoma pode ser ulteriormente modificado por união covalente à sequência de codificação imunoglobulina a totalidade ou parte da sequência de codificação para um polipeptídeo de não imunoglobulina. Deste modo, anticorpos "quiméricos" ou "híbridos" são preparados que têm a especificidade de ligação dos anticorpos derivados de clone de hibridoma ou de clone de Fv da invenção.

(iv) Anticorpos humanos e Humanizados

[0183] Vários métodos para humanização de anticorpos não humanos são conhecidos na técnica. Por exemplo, um anticorpo humanizado tem um ou mais resíduos de aminoácidos introduzidos para dentro dele a partir de uma fonte que é não humana. Esses resíduos de aminoácidos de não humanos são frequentemente chamados de resíduos de "importação", que são tipicamente tirados de um domínio variável de "importação", Humanização pode essencialmente ser realizado após o método de Winter e co-trabalhadores (Jones *e outros*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *e outros*, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen *e outros*, *Science*, 239:1534-1536 (1988)), por uso de sequências de CDRs ou de CDR de roedor como substituto as sequências correspondentes de um anticorpo humano. Correspondentemen-

te, tais anticorpos "humanizados" são anticorpos quiméricos (a pat. U.S. no. 4.816.567) em que substancialmente menos do que um domínio variável humano intacto foi substituído pela sequência correspondente oriunda de uma espécie não humana. Na prática, anticorpos humanizados são tipicamente anticorpos humanos em que alguns resíduos de CDR e possivelmente alguns resíduos de FR são substituídos por resíduos de sítios análogos nos anticorpos de roedor.

[0184] A escolha de domínios variáveis humanos, tanto leve quanto pesada, como sendo usada na formação dos anticorpos humanizados é muito importante para reduzir antigenicidade. De acordo com o método "melhor ajustado" assim chamado, a sequência do domínio variável de um anticorpo de roedor é triada contra a biblioteca total de sequências de domínio variável de ser humano conhecidas. A sequência humana que é mais próxima àquela do roedor é então aceita como a estrutura humana (FR) para o anticorpo humanizado (Sims e outros, *J. Immunol.*151:2296 (1993); Chothia e outros, *J. Mol. Biol.*196:901 (1987)). Um outro método usa uma estrutura derivada particular da sequência de consenso de todos os anticorpos humanos de um subgrupo particular de cadeia leve ou de cadeia pesada. A mesma estrutura pode ser usada para vários anticorpos humanizados diferentes (Carter e outros, *Proc, Natl, Acad Sci, USA*, 89:4285 (1992); Presta e outros, *J. Immunol.*151:2623 (1993)).

[0185] É mais importante que anticorpos sejam humanizados com retenção de alta afinidade para o antígeno e outras propriedades biológicas favoráveis. Para conseguir este objetivo, de acordo com uma concretização do método, anticorpos humanizados são preparados por um processo de análise das sequências parentais e vários produtos humanizados conceituais usando-se modelos tridimensionais das sequências parentais e humanizadas. Modelos de imunoglobulina tridimensionais são comumente disponíveis e são familiares àqueles ver-

sados na técnica. Programas de computador estão disponíveis que ilustram e exibem prováveis estruturas conformacionais tridimensionais de sequências de imunoglobulinas de candidato selecionado. Inspeção desta exibição permite análise do papel provável dos resíduos no funcionamento da sequência de imunoglobulinas de candidato, isto é, a análise de resíduos que influenciam a capacidade da imunoglobulina de candidato para ligar seu antígeno. Deste modo, resíduos de FR podem ser selecionados e combinados das sequências de importação e de receptor de modo que a característica de anticorpo desejada, tal como afinidade aumentada afinidade para o antígeno(s) alvo(s), é conseguida. Em geral, os resíduos de região hipervariável são diretamente e mais substancialmente envolvidos na influência da ligação de antígeno,

[0186] Anticorpos humanos da invenção podem ser construídos por combinação de sequência(s) de domínio variável de clone de Fv selecionadas de bibliotecas de exibição de fagos derivadas de ser humano com sequência(s) de domínio constante de ser humano conhecida(s) como descrito acima. Alternativamente, anticorpos monoclonais humanos da invenção podem ser feitos pelo método de hibridoma. Linhas de células de heteromieloma de camundongo-de ser humano e mieloma de ser humano para a produção de anticorpos monoclonais humanos foram descritos, por exemplo, por Kozbor *J. Immunol.* 133: 3001 (1984); Brodeur e outros, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp, 51-63 (Marcel Dekker, Inc, New York, 1987); and Boerner e outros, *J. Immunol.* 147: 86 (1991).

[0187] É possível produzir animais transgênicos (por exemplo, camundongos) que são capazes, de imunização, de produzir um repertório completo de repertório de anticorpos humanos na ausência de produção de imunoglobulina endógena. Por exemplo, foi descrito que deleção homozigota do gene de região de união de cadeia pesada do

anticorpo (J_H) em camundongos mutantes de linha de germes e quiméricos resulta na inibição completa da produção de anticorpo endógena. Transferência do ensaio de gene de imunoglobulina de linha de germes de ser humano em tais camundongos mutantes de linha de germes resultarão na produção de anticorpos humanos no desafio de antígeno. Vide, *por exemplo*, Jakobovits e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits e outros, *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggermann e outros, *Year in Immuno*, 7:33 (1993); and Duchosal e outros, *Nature* 355:258 (1992).

[0188] Embaralhamento de genes pode também ser usado para derivar anticorpos humanos de não humanos, por exemplo, roedor, anticorpos, onde o anticorpo humano tem afinidades e especificidades similares à anticorpo de partida não humano. De acordo com este método, que é também chamado "impressão de epítipo", ou a região variável de cadeia leve ou de cadeia pesada de um fragmento um fragmento de anticorpo não humano obtido por técnicas de exibição de fago as descrito aqui é trocado por um repertório de genes de domínio V de ser humano, criando uma população de quimeras de scFv ou Fab de cadeia de ser humano/de não ser humano. Seleção com antígeno resulta no isolamento de um scFv ou Fab quimérico de cadeia de ser humano/de não ser humano em que a cadeia de ser humano restaura o sítio de ligação de antígeno destruído na remoção da cadeia de não ser humano correspondente cone de exibição de fago primário, isto é o epítipo governa (imprime) a escolha do par de cadeia de ser humano. Quando o processo é repetido a fim de substituir a cadeia de não ser humano restante, um anticorpo humano é obtido (vide a PCT WO 93/06213 publicada em 1 de abril de 1993), Ao contrário de humanização tradicional de anticorpos de não ser humano por enxerto de CDR, esta técnica provê anticorpos totalmente humanos, que têm nenhum resíduo de FR ou de CDR de origem não humana.

(v) Fragmentos de anticorpos

[0189] Fragmentos de anticorpos podem ser gerados por meio tradicional, tais como digestão enzimática ou por técnicas de recombinantes. Em certas circunstâncias há vantagens de uso de fragmentos de anticorpos, ao invés de anticorpos inteiros. O tamanho menor dos fragmentos permite rápida depuração, e pode levar a acesso aperfeiçoado para tumores sólidos. Para uma revisão de certos fragmentos de anticorpos, vide Hudson e outros, (2003) *Nat, Med*, 9:129-134.

[0190] Várias técnicas foram desenvolvidas, para a produção de fragmentos de anticorpos, Tradicionalmente, estes fragmentos foram derivados via digestão proteolítica de anticorpos intactos (vide, por exemplo, Morimoto e outros, *Journal of Biochemical and Biophysical Métodos* 24:107-117 (1992); and Brennan e outros, *Science*, 229:81 (1985)). No entanto, estes fragmentos podem agora ser produzidos diretamente por células hospedeiras recombinantes. Fragmentos de anticorpos de Fab, Fv e ScFv podem todos ser expressos em e secretados a partir de E. coli, assim permitindo produção fácil de grandes quantidades destes fragmentos. Fragmentos de anticorpos podem ser isolados das bibliotecas de fagos de anticorpo discutidas acima. Alternativamente, fragmentos de Fab'-SH podem ser diretamente recuperados a partir de E. coli e quimicamente acoplados formar fragmentos de F(ab')₂ (Carter e outros, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). De acordo com uma outra abordagem, fragmentos de F(ab')₂ podem ser isolados diretamente da cultura de células hospedeiras recombinantes. Fragmento de Fab e de F(ab')₂ com semi-vida in vivo aumentada compreendendo recuperação de resíduos de epítomos de ligação de receptor são descritos na pat. U.S. no. 5.869.046. Outras técnicas para a produção de fragmentos de anticorpos estarão evidentes pelos praticantes versados. Em certas concretizações, um anticorpo é um fragmento de Fv de cadeia simples (scFv). Vide a WO 93/16185; as pats.

U.S. nos. 5.571.894; e 5.587.458, Fv e scFv são as únicas espécies com sítios de combinação intactos que são destituídos de regiões constantes; assim, eles podem ser adequados para a ligação não específica reduzida durante o uso in vivo. Proteínas de fusão de scFv podem ser construídos para fornecer fusão de uma proteína efetora ou no terminal amino ou carboxi de um scFv. Vide *Antibody Engineering*, ed, Borrebaeck, *supra*. O fragmento de anticorpo podem também ser um "anticorpo linear", por exemplo, como descrito na pat. U.S. no. 5.641.870, por exemplo. Tais anticorpos lineares podem ser monoespecíficos ou biespecíficos.

(vi) Anticorpos multiespecíficos

[0191] Anticorpos multiespecíficos têm especificidades de ligação por pelo menos dois epítomos diferentes, onde os epítomos são usualmente de diferentes antígenos. Embora tais moléculas normalmente apenas ligassem dois epítomos diferentes (isto é anticorpos biespecíficos, BsAbs), anticorpos com especificidades adicionais tais como anticorpos triespecíficos são incluídos pela expressão quando usada aqui. Anticorpos biespecíficos podem ser preparados como anticorpos de comprimento total ou fragmentos de anticorpos (por exemplo, anticorpos biespecíficos de $F(ab')_2$).

[0192] Métodos para formação de anticorpos biespecíficos são conhecidos na técnica. Produção tradicional de anticorpos de comprimento total biespecíficos é com base na co-expressão de dois pares de cadeia pesada-cadeia leve de imunoglobulina, onde as duas cadeias têm especificidades diferentes (Millstein e outros, *Nature*, 305:537-539 (1983)). Por causa do agrupamento aleatório de cadeias leve e pesada de imunoglobulina, esses hibridomas (quadromas) produzem uma mistura potencial de 10 moléculas de anticorpos diferentes, das quais apenas uma tem a estrutura biespecífica correta. Purificação da molécula correta, que é usualmente feita por etapas de cromatografia

por afinidade, é bastante complicado, e os rendimentos de produto são poucos, Procedimentos similares são revelados na WO 93/08829, e em Traunecker e outros, *EMBO J*,10:3655-3659 (1991).

[0193] De acordo com uma abordagem diferente, domínios variáveis de anticorpo com as especificidades de ligação desejadas (sítios de combinação de anticorpo-antígeno) são fundidos às sequências de domínio constante de imunoglobulina. A fusão de preferência é com um domínio constante de cadeia pesada de imunoglobulina, compreendendo pelo menos parte da articulação, regiões de CH2, e CH3. É típico ter a primeira região constante de cadeia pesada (CH1) contendo o sítio necessário para a ligação de cadeia leve, presente em pelo menos uma das fusões. DNAs que codificam as fusões de cadeia pesada de imunoglobulina e, se desejado, uma cadeia leve de imunoglobulina, são inseridos para dentro de vetores de expressão separados, e são co-transfectados em um organismo hospedeiro adequado. Isto provê flexibilidade maior no ajuste das proporções mútuas dos três fragmentos de polipeptídeos em concretizações quando razões desiguais das três cadeias de polipeptídeo usadas na construção provêm os ótimos rendimentos. É, no entanto, possível inserir as sequências de codificação para duas ou todas as três cadeias de polipeptídeo em um vetor de expressão quando a expressão de pelo menos duas cadeias de polipeptídeo em razões iguais resulta nos altos rendimentos ou quando as razões são de não significância particular.

[0194] Em uma concretização desta abordagem, os anticorpos biespecíficos são constituídos de uma cadeia pesada de imunoglobulina híbrida com uma primeira especificidade em um braço, e um par de cadeia pesada-cadeia leve de imunoglobulina híbrida (provendo uma segunda especificidade de ligação) no outro braço. Verificou-se que nesta estrutura assimétrica facilita do composto biespecífico desejado de combinações de cadeia de imunoglobulina não desejadas, como a

presença de uma cadeia leve de imunoglobulina em apenas uma metade da molécula biespecífica provê de um modo fácil de separação. Essa abordagem é revelada na WO 94/04690. Para outros detalhes de geração de anticorpos biespecíficos vide, por exemplo, Suresh e outros, *Métodos in Enzymology*, 121:210 (1986).

[0195] De acordo com uma outra abordagem descrita na WO 96/27011, a interface entre um par de moléculas de anticorpo pode ser engenheirado para maximizar a percentagem de heterodímeros que são recuperados a partir de cultura de células recombinantes. Uma interface compreende pelo menos uma parte do domínio de C_H 3 de um anticorpo domínio constante. Neste método, uma ou mais cadeias laterais de amino ácido pequenas da interface da primeira molécula de anticorpo são trocadas por cadeias laterais maiores (por exemplo, tirosina ou triptofano). "Cavidades" compensatórias de tamanho idêntico ou similar à(s) cadeia(s) lateral(ais) maior(es) são criadas na interface de uma segunda molécula de anticorpo por troca de cadeias de amino ácido maiores por aquelas menores (por exemplo, alanina ou treonina). Isso provê um mecanismo para o aumento do rendimento do heterodímero sobre outros produtos finais indesejados tais como homodímeros.

[0196] Anticorpos biespecíficos incluem anticorpos reticulados ou "heteroconjugados". Por exemplo, um dos anticorpos no heteroconjugado pode ser acoplado a avidina, o outro a biotina. Tais anticorpos, por exemplo, foram propostos para direcionar células do sistema imune alvo para células indesejadas (a pat. U.S. no. 4,676,980), e para o tratamento de infecção por HIV (WO 91/00360, WO 92/200373, e EP 03089). Anticorpos heteroconjugados podem ser feitos usando-se quaisquer métodos de reticulação convenientes, Agentes de reticulação adequados são bem conhecidos na técnica, e são revelados na pat. U.S. no. 4.676.980, juntamente com numerosas técnicas de reticu-

lação.

[0197] Técnicas para a geração de anticorpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticorpos foram também descritas na literatura. Por exemplo, anticorpos biespecíficos podem ser preparados usando-se ligação química. Brennan e outros, *Science*, 229: 81 (1985) descrevem um procedimento em que anticorpos intactos são proteoliticamente clivados para gerar fragmentos de $F(ab')_2$. Estes fragmentos são reduzidos na presença do agente, de complexação de ditiol, arsenito de sódio para estabilizar ditióis vicinais e prevenir a formação de dissulfeto intermolecular. Os fragmentos de Fab' gerados são então convertidos em derivados de tionitrobenzoato (TNB). Um dos derivados de Fab' -TNB é então reconvertido no Fab' -tiol por redução com mercaptoetilamina e é misturado com uma quantidade equimolar do outro derivado de Fab' -TNB para formar o anticorpo biespecífico. Os anticorpos biespecíficos produzidos podem ser usados como agentes para a imobilização seletiva de enzimas.

[0198] Progresso recente facilitou a recuperação direta de fragmentos de Fab' -SH a partir de *E. coli*, que podem ser quimicamente acoplados para formar anticorpos biespecíficos. Shalaby e outros, *J. Exp. Med.* 175: 217-225 (1992) descrevem a produção de uma molécula de anticorpo de $F(ab')_2$ biespecífico totalmente humanizada. Cada fragmento de Fab' foi separadamente secretado a partir de *E. coli* e foi submetido a acoplamento químico dirigido in vitro para formar o anticorpo biespecífico.

[0199] Várias técnicas para a formação e isolamento de fragmentos de anticorpos biespecíficos diretamente de cultura de células recombinantes foram também descritas. Por exemplo, anticorpos biespecíficos foram produzidos usando-se zippers de leucina, Kostelny e outros, *J. Immunol.* 148(5):1547-1553 (1992). Os peptídeos de zipper de leucina oriundos das proteínas de Fos e de Jun foram ligados às porções de

Fab' de dois diferentes anticorpos por fusão de gene. Os homodímeros de anticorpo foram reduzidos na região de articulação para formar monômeros e então foram re-oxidados para formar os heterodímeros de anticorpo. Este método pode também ser utilizado para a produção de homodímeros de anticorpo. A tecnologia de "diacorpo" descrita por Hollinger e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) proveu um mecanismo alternativo para a formação de fragmentos de anticorpos biespecíficos. Os fragmentos compreendem um domínio variável de cadeia pesada (V_H) ligado a um domínio variável de cadeia leve (V_L) por um ligador que é demasiadamente curto para permitir emparelhamento entre os dois domínios na mesma cadeia. Correspondentemente, os domínios de V_H e de V_L de um fragmento são forçados para emparelhar com os domínios de V_L e de V_H complementares de um outro fragmento, desse modo formando dois sítios de ligação de antígeno. Uma outra estratégia para a formação de fragmentos de anticorpos biespecíficos pelo uso de dímeros de Fv de cadeia simples (sFv) foi também relatados. Vide Gruber e outros, *J. Immunol.* 152:5368 (1994).

[0200] Anticorpos com mais do que duas valências são contemplados. Por exemplo, anticorpos triespecíficos podem ser preparados, *Tuft e outros, J. Immunol.* 147: 60 (1991).

(vii) Anticorpos de domínio simples

[0201] Em algumas concretizações, um anticorpo da invenção é um anticorpo de domínio simples. Um anticorpo de domínio simples é uma cadeia de polipeptídeo simples compreendendo a totalidade ou uma porção do domínio variável de cadeia pesada ou a totalidade ou uma porção do domínio variável de cadeia leve de um anticorpo. Em certas concretizações, um anticorpo de domínio simples é um anticorpo de domínio simples humano (Domantis, Inc. Waltham, Mass.; *vide, por exemplo*, a pat. U.S. no. 6.248.516 B1). Em uma concretização, um

anticorpo de domínio simples consiste da totalidade ou uma porção do domínio variável de cadeia pesada de um anticorpo.

(viii) Variantes de anticorpo

[0202] Em algumas concretizações, modificação(ões) de sequência de aminoácidos dos anticorpos descritos aqui são contempladas. Por exemplo, podem ser desejável para aperfeiçoar a afinidade de ligação e/ou outras propriedades biológicas do anticorpo, Variantes de sequência de aminoácidos do anticorpo podem ser preparados por introdução de mudanças apropriadas na sequência de nucleotídeos que codificam o anticorpo, ou por síntese de peptídeo. Tais modificações incluem, por exemplo, deleções de, e/ou inserções em e/ou substituição de, resíduos dentro das sequências de aminoácidos do anticorpo. Qualquer combinação de deleção, inserção e substituição pode ser feita para alcançar no construto final, com a condição de que o construto final possui as características desejadas. As alterações de aminoácidos podem ser introduzidas na sequência de aminoácidos do anticorpo objeto na hora que a sequência é feita.

(ix) Derivados de anticorpo

[0203] Os anticorpos da invenção podem ser ulteriormente modificados para conter porções não proteínicas adicionais que são conhecidas na técnica e prontamente disponíveis. Em certas concretizações, as porções adequadas para a derivatização do anticorpo são polímeros solúveis em água. Exemplos não limitantes de polímeros solúveis em água incluem, mas não são limitados a, polietileno glicol (PEG), copolímeros de etileno glicol/propileno glicol, carboximetilcelulose, dextrano, álcool polivinílico, polivinil pirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anidrido maléico, poliaminoácidos (ou homopolímeros ou copolímeros aleatórios), e dextrano ou poli(n-vinil pirrolidona)polietileno glicol, homopolímeros de propileno glicol, co-polímeros de óxido de prolipropileno /óxido de

etileno, polióis polietoxilados (por exemplo, glicerol), álcool polivinílico, e suas misturas. Propionaldeído de polietileno glicol pode ter vantagens na fabricação devido a sua estabilidade em água. O polímero pode ser de qualquer peso molecular, e pode ser ramificado ou não ramificado. O número de polímeros ligados ao anticorpo pode variar, e se mais do que um polímero estiver ligados, eles podem ser moléculas iguais ou diferentes. Em geral, o número e/ou o tipo de polímeros usados para derivatização podem ser determinados com base nas considerações incluindo, mas não limitadas a, como propriedades ou funções particulares do anticorpo como sendo aperfeiçoadas, se o derivado de anticorpo foi usado em uma terapia sob condições definidas, etc.

(x) Vetores, células hospedeiras, e métodos recombinantes

[0204] Anticorpos podem também ser produzidos usando-se métodos recombinantes. Para a produção recombinante de um anticorpo de anti-antígeno, ácido nucléico que codifica o anticorpo é isolado e é inserido em um vetor replicável para outra clonagem (ampliação do DNA) ou para expressão, DNA que codifica o anticorpo pode ser prontamente isolado e sequenciado usando-se procedimentos convencionais (*por exemplo*, por uso de sondas de oligonucleotídeos que são capazes de se ligar especificamente a genes que codificam as cadeias leve e pesada do anticorpo). Muitos vetores estão disponíveis. Os componentes de vetor em geral incluem, mas não são limitados a, um ou mais dos seguintes: uma sequência de sinal, uma origem de replicação, um ou mais genes marcadores, um elemento melhorador, um promotor, e uma sequência de terminação de transcrição.

(a) Componente de sequência de sinal

[0205] Um anticorpo da invenção pode ser recombinantemente produzido não apenas diretamente, mas também como um polipeptídeo de fusão com um polipeptídeo heterólogo, que é de preferência uma

sequência de sinal ou outro polipeptídeo tendo um sítio de clivagem específico no N-terminal do polipeptídeo ou proteína madura. A sequência de sinal heteróloga selecionada de preferência é uma que é reconhecida e é processada (*por exemplo*, é cor uma peptidase de sinal) pela célula hospedeira. Para células hospedeiras procarióticas que não reconhecem e processam uma sequência de sinal de anticorpo nativo, a sequência de sinal é substituído por uma sequência de sinal procariótica selecionada, por exemplo, do grupo da fosfatase alcalina, penicilinase, lpp, ou líderes de enterotoxina II estável a calor. Para a secreção de levedura da sequência de sinal nativa pode ser substituída por, *por exemplo*, o líder de invertase de levedura, um líder de fator (incluindo líderes de alfa-fator de *Saccharomyces* and *Kluyveromyces*), ou líder de fosfatase de ácido, o líder de glucoamilase de *C. albicans*, ou o sinal descrito na WO 90/13646. Em expressão de célula de mamífero, sequências de sinal de mamífero bem como líderes secretórios virais, por exemplo, o sinal de herpes simplex gD, estão disponíveis.

(b) Origem de replicação

[0206] Tanto vetores de expressão quanto vetores de clonagem contêm uma sequência de ácido nucléicos que permite que o vetor replique em uma ou mais células hospedeiras selecionadas. Em geral, em vetores de clonagem desta sequência é uma que permite que o vetor replique independentemente do DNA cromossomal de hospedeiro, e inclui origens de replicação ou sequências de replicação autônoma. Tais sequências são bem conhecidas para uma variedade de bactéria, levedura, e vírus. A origem de replicação a partir do plasmídeo pBR322 é adequado para a maioria de bactérias Gram-negativas, o 2 μ , origem de plasmídeo é adequado para levedura, e várias origens virais (SV40, polioma, adenovírus, VSV ou BPV) são úteis para vetores de clonagem em células de mamífero. Em geral, a origem de com-

ponente de replicação não é necessária para vetores de expressão de mamífero (a origem de SV40 pode tipicamente ser usada apenas porque ela contém o promotor precoce).

(c) Componente de gene de seleção

[0207] Vetores de expressão e vetores de clonagem podem conter um gene de seleção, também chamados um marcador selecionável, Genes de seleção típicos codificam proteínas que (a) conferem resistências a antibióticos ou outras toxinas, *por exemplo*, ampicilina, neomicina, metotrexato, ou tetraciclina, (b) deficiências auxotróficas de complemento, ou (c) fornecem nutrientes críticos não disponíveis do meio complexo, *por exemplo*, o gene que codifica racemase de D-alanina para *Bacilli*.

[0208] Um exemplo de um esquema de seleção utiliza um fármaco para aprisionar o crescimento de uma célula hospedeira, Aquelas células que são transformadas com sucesso com um gene heterólogo produzem a proteína que confere resistência a fármaco e assim sobrevivem o regime de seleção. Exemplos de tal seleção dominante usam os fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

[0209] Uma outra exemplo de marcadores selecionáveis adequados para células de mamífero são aqueles que permitem a identificação de células competentes para colocar ácido nucléico de codificação de anticorpo, tais como DHFR, sintetase de glutamina (GS), cinase de timidina, metalotioneína-I e -II, de preferência genes de metalotioneína de primata, adenosina desaminase, ornitina descarboxilase, *etc.*

[0210] Por exemplo, células transformadas com o gene de DHFR são identificadas por cultivo dos transformantes em um meio de cultura contendo metotrexato (Mtx), um antagonista competitiva de DHFR, Sob essas condições, o gene de DHFR é ampliado juntamente com qualquer outro ácido nucléico co-transformado. Uma linha de células de ovário de hamster chinês (CHO) deficiente na atividade de DHFR

endógena (por exemplo, ATCC CRL-9096) pode ser usada,

[0211] Alternativamente, células transformadas com p gene de GS são identificadas por cultivo dos transformantes em um meio de cultura contendo L-metionina sulfoximina (Msx), um inibidor de GS, Sob essas condições, o gene de GS é ampliado juntamente com qualquer outro ácido nucléico co-transformado. O Sistema de seleção/ampliação de GS pode ser usado em combinação com o sistema de seleção/ampliação de DHFR descrito acima.

[0212] Alternativamente, células hospedeiras (particularmente hospedeiros de tipo selvagem que contêm DHFR endógeno) transformadas ou co-transformadas com sequência de DNA que codificam um anticorpo de interesse, gene de DHFR de tipo selvagem, e um outro marcador selecionável tal como aminoglicosídeo 3'-fosfotransferase (APH) pode ser selecionado por crescimento celular em meio contendo um agente de seleção para o marcador selecionável tal como antibiótico de aminoglicosídico, *por exemplo*, canamicina, neomicina, ou G418, vide a pat. U.S. no. 4.965.199.

[0213] Um gene de seleção adequado para o uso na levedura é o *gene de trp1* presente no plasmídio de levedura YRp7 (Stinchcomb e outros, *Nature*, 282:39 (1979)). O *gene de trp1* provê um marcador de seleção para uma cepa mutante de levedura que carece da capacidade de se desenvolver em triptofano, por exemplo, ATCC No, 44076 ou PEP4-1, Jones, *Genetics*, 85:12 (1977). A presença da lesão de *trp1* no genoma de célula hospedeira de levedura então provê um ambiente eficaz para a detecção de transformação por crescimento na ausência de triptofano. Similarmente, cepas de levedura deficientes de *Leu2* (ATCC 20,622 ou 38,626) são contempladas por plasmídios conhecidos que portam o gene de *Leu2*.

[0214] Além disso, vetores derivados do plasmídio circular de 1,6 µm pKD1 podem ser usados para a transformação de leveduras de

Kluyveromyces. Alternativamente, um sistema de expressão para a produção em grande escala de quimosina de bezerro recombinante foi relatado para *K. lactis*, Van den Berg, *Bio/Technology*, 8:135 (1990). Vetores de expressão de múltiplas cópias estáveis para a secreção de albumina de soro de ser humano recombinante madura por cepas industriais de *Kluyveromyces* foram também reveladas, Fleer e outros, *Bio/Technology*, 9:968-975 (1991).

(d) Componente de promotor

[0215] Vetores de expressão e vetores de clonagem em geral contêm um promotor que é reconhecido pelo organismo hospedeiro e é operavelmente ligado ao ácido nucléico que codifica um anticorpo. Promotores adequados para o uso com hospedeiros procarióticos incluem o promotor de *phoA*, sistemas de promotor de β -lactamase e lactose, promotor de fosfatase alcalina, um sistema de promotor de triptofano (*trp*), e promotores híbridos tal como o promotor de *tac*. No entanto, outros promotores bacterianos conhecidos são adequados, Promotores para o uso nos sistemas bacterianos também conterão uma sequência de Shine-Dalgarno (S.D.) operavelmente ligada ao DNA que codifica um anticorpo.

[0216] Sequências de promotores são conhecidos para eucariotas, Virtualmente todos os gene eucarióticos têm uma região rica em AT localizada aproximadamente de 25 a 30 bases a montante do sítio onde transcrição é iniciada. Uma outra sequência encontrava de 70 a 80 bases a montante do início da transcrição de muitos genes é uma região de CNCAAT onde N pode ser qualquer nucleotídeo. Na extremidade 3' da maioria dos genes eucarióticos está uma sequência de AA-TAAA que pode ser o sinal para a adição da cauda de poli A à extremidade 3' da sequência de codificação, Todas essas sequências são adequadamente inseridas para dentro de vetores de expressão eucarióticos.

[0217] Exemplos de sequências de promotores adequadas para o uso com hospedeiros de levedura incluem os promotores para 3-fosfoglicerato cinase ou outras enzimas glicolítica, tais como enolase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, hexocinase, piruvato decarboxilase, fosfofructocinase, glicose-6-fosfato isomerase, 3-fosfoglicerato mutase, piruvato cinase, triosefosfato isomerase, fosfoglicose isomerase, e glucocinase.

[0218] Outros promotores de levedura, que são promotores induzíveis tendo a vantagem adicional de transcrição controlada por condições de crescimento, são as regiões de promotor para desidrogenase 2 de álcool, isocitocromo C, fosfatase ácida, enzimas degradativas associadas ao metabolismo de nitrogênio, metalotioneína, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, e enzimas responsáveis pela utilização de maltose e galactose. Vetores e promotores adequados para o uso na expressão de levedura são ulteriormente descritos na EP 73,657. Melhoradores de levedura também são vantajosamente usados com promotores de levedura.

[0219] Transcrição de anticorpo de vetores em células hospedeiras de mamífero pode ser controlada, por exemplo, por promotores obtidos a partir dos genomas de vírus tais como vírus polioma, vírus da varíola aviária, adenovírus (tal como Adenovírus 2), vírus de papiloma bovino, vírus de sarcina aviário, citomegalovírus, um retrovírus, vírus de hepatite B, Vírus 40 de símio (SV40), ou de promotores de mamíferos heterólogos, por exemplo, o promotor de actina ou um promotor de imunoglobulina, de promotores de choque térmico, com a condição de que tais promotores sejam compatíveis com os sistemas de célula hospedeira.

[0220] Os promotores tardios e precoces do vírus de SV40 são convenientemente obtidos como um fragmento de retrição de SV40 que também contém a origem viral de SV40 de replicação. O promotor

precoce imediato do citomegalovírus humano é convenientemente obtido como um fragmento de restrição de HindIII E. Um sistema para expressão de DNA em hospedeiros de mamífero usando o vírus de papiloma bovino como um vetor revelado na pat. U.S. no. 4.419.446. Uma modificação deste Sistema é descrita na pat. U.S. no. 4.601.978. Vide também Reyes e outros, *Nature* 297:598-601 (1982) na expressão de cDNA de beta-interferon de ser humano em células de camundongo sob o controle de um promotor de cinase de timidina oriundo de vírus de herpes simplex. Alternativamente, a repetição terminal longa de Vírus de Sarcoma de Rous pode ser usada como o promotor.

(e) Componente de Elemento de Melhorador

[0221] Transcrição de um DNA que codifica um anticorpo desta invenção por eucariotas superiores é frequentemente aumentada por inserção de uma sequência melhoradora para dentro do vetor, Muitas sequências melhoradoras são conhecidas de genes de mamífero (globina, elastase, albumina, α -fetoproteína, e insulina). Tipicamente, no entanto, uma usará um melhorador de um vírus de célula eucariótica. Exemplos incluem o melhorador de SV40 no lado tardio da origem de replicação (pb 100-270), o melhorador de promotor de citomegalovírus precoce, o melhorador de polioma no lado tardio da origem de replicação, e melhoradores de adenovírus. Vide também Yaniv, *Nature* 297:17-18 (1982) nos elementos de melhoramento para a ativação de promotores eucarióticos. O melhorador pode ser unido no vetor a uma posição 5' ou 3' até sequência de codificação de anticorpo mas é de preferência localizado no sítio 5' a partir do promotor.

(f) Componente de terminação de transcrição

[0222] Vetores de expressão usados em células hospedeiras eucarióticas (levedura, fungos, inseto, planta, animal, ser humano, ou células nucleadas oriundas de outros organismos multicelulares) também conterão sequências necessárias para a terminação de transcrição e

para a estabilização do mRNA. Tais sequências estão comumente disponíveis da 5' e, ocasionalmente 3', regiões não traduzidas de DNAs ou cDNAs eucarióticos ou virais. Estas regiões contêm segmentos de nucleotídeo transcritos como fragmentos poliadenilados na porção não traduzida do anticorpo de codificação de mRNA. Um componente de terminação de transcrição útil é a região de poliadenilação de hormônio de crescimento bovino. Vide WO 94/11026 e um vetor de expressão revelado ali.

(g) Seleção e transformação de células hospedeiras

[0223] Células hospedeiras adequadas para a clonagem ou expressão do DNA nos vetores aqui são as células eucariotas superiores, levedura ou procariota descritas acima, Procariotas adequadas para esta finalidade incluem eubactéria, tais como organismos Gram-negativos ou Gram-positivos, por exemplo, Enterobacteriaceae tal como *Escherichia*, por exemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por exemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por exemplo, *Serratia marcescans*, e *Shigella*, bem como *Bacilli* tais como *B. subtilis* e *B. licheniformis* (por exemplo, *B. licheniformis* 41P revelado na DD 266,710 publicada em 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tais como *P. aeruginosa*, e *Streptomyces*. Um hospedeiro de clonagem de *E. coli* preferido é *E. coli* 294 (ATCC 31.446), embora outras cepas tais como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537), e *E. coli* W3110 (ATCC 27.325) sejam adequadas. Esses exemplos são ilustrativos ao invés de limitantes.

[0224] Anticorpo de comprimento total, proteínas de fusão de anticorpo, e fragmentos de anticorpos podem ser produzidos em bactérias, em particular quando glicosilação e função efetora de Fc não são necessários, tal como o anticorpo terapêutico é conjugado com um agente citotóxico (por exemplo, uma toxina) que por si só se mostra eficaz na destruição de célula de tumor. Anticorpos de comprimento

total têm semi-vida maior na circulação. Produção em *E. coli* é mais rápida e custo mais eficaz. Para expressão de fragmentos de anticorpos e polipeptídeos em bactérias, vide, por exemplo, a pat. U.S. no. 5,64,237 (Carter e outros), a pat. U.S. no. 5.789.199 (Joly e outros,), a pat. U.S. no. 5,840,523 (Simmons e outros,), que descreve região de iniciação de tradução (TIR) e sequências de sinal para secreção e expressão de otimização. Vide também Charlton, *Métodos in Molecular Biology*, Vol, 248 (B, K, C, Lo, ed, Humana Press, Totowa, N,J, 2003), pp, 245-254, descrevendo expressão de fragmentos de anticorpos em *E. coli*. Depois da expressão, o anticorpo pode ser isolado da pata de célula de *E. coli* em uma fração solúvel e pode ser purificada através de, por exemplo, uma coluna de proteína A ou G dependendo do isótipo. Purificação final pode ser realizada similar ao processo para a purificação de anticorpo expresso, por exemplo, em células de CHO.

[0225] Além de procariotas, micróbios eucarióticos tais como fungos filamentosos ou levedura são hospedeiros de expressão ou clonagem adequados para vetores de codificação de anticorpo, *Saccharomyces cerevisiae*, ou levedura de padeiro comum, é o mais comumente usado entre os microorganismos hospedeiros eucarióticos inferiores. No entanto, numerosos outros gêneros, espécies e cepas estão comumente disponíveis e são úteis aqui, tal como *Schizosaccharomyces pombe*; *Kluyveromyces* hosts tais como, por exemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilarum* (ATCC 36,906), *K. thermotolerans*, e *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402,226); *Pichia pastoris* (EP 183,070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244,234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tal como *Schwanniomyces occidentalis*; e fungos filamentosos tais como, por exemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, e hospedeiros de *Aspergillus* tais como *A. nidulans* e *A. niger*. Para uma revisão que discute o uso

de leveduras e fungos filamentosos para a produção de proteínas terapêuticas, vide, por exemplo, Gerngross, *Nat, Biotech*, 22:1409-1414 (2004).

[0226] Certos fungos e cepas de levedura podem ser selecionados em que trajetórias de glicosilação foram "humanizadas," resultando na produção de um anticorpo com um padrão de glicosilação parcialmente ou totalmente humano. Vide, *por exemplo*, Li e outros, *Nat, Biotech*, 24:210-215 (2006) (descrevendo humanização da trajetória de glicosilação em *Pichia pastoris*); e Gerngross e outros, *supra*.

[0227] Células hospedeiras adequadas para a expressão de anticorpo glicosilado são também derivadas de organismos multicelulares (invertebrados e vertebrados). Exemplos de células de invertebrais incluem cepas e variantes e células hospedeiras de inseto permissivas correspondentes oriundas de hospedeiros tais como *Spodoptera frugiperda* (catorpillar), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca da fruta), e *Bombyx mori* foram identificados. Uma variedade de cepas virais para transfecção estão publicamente disponíveis, *por exemplo*, a variante de L-1 de *Autographa californica* NPV e a cepa de Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, e tais vírus podem ser usados como o vírus aqui de acordo com a invenção, particularmente para a transfecção de células de *Spodoptera frugiperda*.

[0228] Culturas de células de planta de algodão, corn, batata, soja, petunia, tomate, lentilha d'água (*Leninaceae*), alfalfa (*M. truncatula*), e tabaco podem também ser utilizadas como hospedeiros. Vide, *por exemplo*, as pats. U.S. nos. 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978, e 6.417.429 (descrevendo tecnologia de PLANTIBODIES™ para a produção de anticorpos em plantas transgênicas).

[0229] Células de vertebrado podem ser usadas como hospedeiros, e propagação de células de vertebrado em cultura (cultura de tecidos)

se tornaram um procedimento rotineiro. Exemplos de linhas de células de hospedeiro de mamífero úteis são linhas de CV1 de rim de macaco transformadas por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); linha de rim embrionária de ser humano (293 ou 293 células subclonadas para crescimento na cultura de suspensão, Graham e outros, *J, Gen Virol*, 36:59 (1977)); células de rim de hamster bebê (BHK, ATCC CCL 10); células de sertoli de camundongo (TM4, Mather, *Biol, Reprod*, 23:243-251 (1980)); células de rim de macaco (CV1 ATCC CCL 70); células de rim de macaco verde Africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical de ser humano (HELA, ATCC CCL 2); canina kidney cells (MDCK, ATCC CCL 34); células de fígado de búfalo rato (BRL 3A, ATCC CRL 1442); human lung cells (W138, ATCC CCL 75); células de fígado de ser humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamário de camundongo (MMT 060562, ATCC CCL51); células de TRI (Mather e outros, *Annals N, Y, Acad, Sci*, 383:44-68 (1982)); células de MRC 5; células de FS4; e uma linha de hepatomas de ser humano (Hep G2). Outras linhas de células hospedeiras de mamífero úteis incluem células de ovário de hamster chinês (CHO), incluindo células de DHFR⁻ CHO (Urlaub e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); e linhas de células de mieloma tais como NS0 e Sp2/0. Para uma revisão de certas linhas de células hospedeiras de mamífero adequadas para a produção de anticorpo, vide, por exemplo, Yazaki and Wu, *Métodos in Molecular Biology*, Vol, 248 (B, K, C, Lo, ed, Humana Press, Totowa, N,J, 2003), pp, 255-268.

[0230] Células hospedeiras são transformadas com os vetores de expressão ou vetores de clonagem descritos acima para a produção de anticorpo e são cultivadas no meio de nutriente convencional modificado quando apropriado para a indução de promotores, seleção de transformantes, ou ampliação dos genes que codificam as sequências desejadas.

(h) Cultivo das células hospedeiras

[0231] As células hospedeiras usadas para produzir um anticorpo desta invenção podem ser cultivadas em uma variedade de media, Meios comercialmente disponíveis tais como Ham's F10 (Sigma), Meio Essencial Mínimo ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), e Meio de Eagle Modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) são adequados para o cultivo das células hospedeiras, além disso, qualquer um dos meios descritos em Ham e outros, *Meth, Enz*, 58:44 (1979), Barnes e outros, *Anal, Biochem*, 102:255 (1980), as pats. U.S. nos. 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; ou 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; ou a pat, U,S, Re, 30,985 podem ser usadas como meio de cultura para as células hospedeiras. Qualquer um destes meios pode ser suplementado quando necessário com hormônios e/ou outros fatores de crescimento (tal como insulina, transferrina, ou fator de crescimento epidérmico), sais (tais como cloreto de sódio, cálcio, magnésio e fosfato), tampões (tal como HEPES), nucleotídeos (tais como adenosina e timidina), antibióticos (tal como fármaco GENTAMYCINTM), elementos em traço (definidos como compostos inorgânicos usualmente presentes em concentrações finais na faixa micromolar), e glicose ou uma fonte de energia equivalente. Quaisquer outros suplementos necessários podem também ser incluídos em concentrações apropriadas que seriam conhecidos por aqueles versados na técnica. As condições de cultura, tais como temperatura, pH, e semelhantes, são aquelas anteriormente usadas com a célula hospedeira selecionada para expressão, e estará evidente pela especialista geralmente versado.

(xi) Purificação de anticorpo

[0232] Quando do uso técnicas recombinantes, o anticorpo pode ser produzido intracelularmente, no espaço periplásmico, ou diretamente secretado no meio. Se o anticorpo for produzido intracelularmente,

como uma primeira etapa. Os fragmentos em partículas, ou células hospedeiras ou fragmentos lisados, são removidos, por exemplo, por centrifugação ou ultrafiltração, Carter e outros, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992) descrevem um procedimento para o isolamento de anticorpos que são secretadas para o espaço periplásico de *E. coli*, Resumidamente, pasta de célula é descongelada na presença de acetato de sódio (pH 3,5), EDTA, e fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) no período de cerca de 30 min. Fragmentos de célula podem ser removidos por centrifugação. Onde o anticorpo é secretado no meio, sobrenadantes oriundos de tais sistemas de expressão são em geral primeiramente concentrados usando-se um filtro de concentração de proteína comercialmente disponível, por exemplo, uma unidade de ultrafiltração de Amicon ou Millipore Pellicon. Um inibidor de protease tal como PMSF pode ser incluído em qualquer etapa exposta acima para inibir proteólise e antibióticos podem ser incluídos para prevenir crescimento de contaminantes acidentais.

[0233] A composição de anticorpo preparada a partir das células pode ser purificada usando-se, por exemplo, cromatografia de hidrofobicidade, cromatografia de interação hidrofóbica, eletroforese de gel, diálise, e cromatografia por afinidade, com cromatografia por afinidade estando entre uma das etapas de purificação tipicamente preferidas. Adequabilidade da proteína A como um ligante de afinidade depende da espécie e do isótipo de qualquer domínio de Fc de imunoglobulina que está presente no anticorpo, Proteína A pode ser usada para purificar anticorpos que são com base nas cadeias pesadas de $\gamma 1$, $\gamma 2$, ou $\gamma 4$ humanas (Lindmark e outros, *J. Immunol. Meth*, 62:1-13 (1983)), Proteína G é recomendada para todos os isótipos de camundongo e para $\gamma 3$ de ser humano (Guss e outros, *EMBO J*, 5:1567-1575 (1986)). A matriz à qual o ligante de afinidade é ligado é mais frequentemente agarose, mas outras matrizes estão disponíveis. Matrizes mecânica-

mente estáveis tal como vidro de poro controlado ou poli(estireno-divinil)benzeno permitem taxas de fluxo mais rápidas e tempos de processamento mais curtos do que podem ser conseguidos com agarose. Onde o anticorpo compreende um domínio de C_H3, a resina de Bakerbond ABXTM (J, T, Baker, Phillipsburg, N.J.) é útil para a purificação. Outras técnicas para a purificação de proteína tais como fracionamento em uma coluna de troca de íons, precipitação de etanol, HPLC de fase reversa, cromatografia em sílica, cromatografia em cromatografia de SEPHAROSETM heparina em uma resina de troca de cátions ou íons (tal como coluna de ácido poliaspártico), cromatofocalização, SDS-PAGE, e precipitação de sulfato de amônio estão também disponíveis dependendo do anticorpo a ser recuperado.

[0234] Em geral, várias metodologias para a preparação de anticorpos para o uso na pesquisa, testagem, e clínica são bem estabelecidas na técnica, consistentes com as metodologias descritas cima e/ou como julgadas apropriadas por aquele versado na técnica para um anticorpo particular de interesse.

C. Seleção de anticorpos biologicamente ativos

[0235] Anticorpos produzidos como descritos acima podem ser submetidos a um ou mais ensaios de "atividade biológica" para selecionar um anticorpo com propriedades benéficas de uma perspectiva terapêutica ou seleção de formulações e condições que retêm atividade biológica do anticorpo. O anticorpo pode ser testado quanto a sua capacidade de se ligar o antígeno contra o qual foi aumentado. Por exemplo, para um anticorpo de anti-PDL1, as propriedades de ligação de antígeno do anticorpo podem ser avaliadas em um ensaio que deleta a capacidade de se ligar a PDL1. Em algumas concretizações, a ligação do anticorpo pode ser determinada por ligação de saturação; ELISA; e/ou ensaios de competição (por exemplo, RIA's), por exemplo. Também, o anticorpo pode ser submetido a outros ensaios de ativida-

de biológica, por exemplo, a fim de avaliar sua eficácia como uma terapêutica. Tais ensaios são conhecidos na técnica e dependem do antígeno alvo e do uso pretendido para o anticorpo. Por exemplo. Os efeitos biológicos de bloqueio de PD-L1 pelo anticorpo podem ser avaliados nas células de CD8+T, um modelo de camundongo de vírus de coriomeningite linfocítico (LCMV) e/ou um modelo de tumor de singênica, por exemplo, como descrito na patente US no, 8.217.149,

[0236] Para triar quanto a anticorpos que se ligam a um epítipo particular no antígeno de interesse (por exemplo, aqueles que bloqueiam ligação do anticorpo de anti-PDL1 do exemplo a PD-L1), um ensaio rotineiro de bloqueio cruzado tal como aquele descrito em *Antibodies. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988), podem ser realizados. Alternativamente, mapeamento de epítipo, por exemplo, como descrito em Champe e outros, *J. Biol. Chem.* 270:1388-1394 (1995), pode ser realizado para determinar se o anticorpo liga um epítipo de interesse.

D. Preparação das formulações

[0237] Depois de preparação do anticorpo de interesse (por exemplo, técnicas para a produção de anticorpos que podem ser formulados como revelados aqui serão elaborados abaixo e são conhecidos na técnica), a formulação farmacêutica compreendendo é preparada. Em certas concretizações, o anticorpo a ser formulado não foi submetido a liofilização anterior e a formulação de interesse aqui é uma formulação aquosa. Em certas concretizações, o anticorpo é um anticorpo de comprimento total. Em uma concretização, o anticorpo na formulação é um fragmento de anticorpo, tal como um $F(ab')_2$, caso esse em que problemas que não podem ocorrer para o anticorpo de comprimento total (tal como grampeamento do anticorpo para Fab) pode necessitar ser abordado. A quantidade terapeuticamente eficaz de anticorpo presente na formulação é determinada por levar em consideração os vo-

lumes de dose e modo(s) volumes de administração desejados, por exemplo. De cerca de 25 mg/mL a cerca de 150 mg/mL, ou de cerca de 30 mg/mL a cerca de 140 mg/mL, ou de cerca de 35 mg/mL a cerca de 130 mg/mL, ou de cerca de 40 mg/mL a cerca de 120 mg/mL, ou de cerca de 50 mg/mL a cerca de 130 mg/mL, ou de cerca de 50 mg/mL a cerca de 125 mg/mL, ou de cerca de 50 mg/mL a cerca de 120 mg/mL, ou de cerca de 50 mg/mL a cerca de 110 mg/mL, ou de cerca de 50 mg/mL a cerca de 100 mg/mL, ou de cerca de 50 mg/mL a cerca de 90 mg/mL, ou de cerca de 50 mg/mL a cerca de 80 mg/mL, ou de cerca de 54 mg/mL a cerca de 66 mg/mL é uma concentração de anticorpo exemplar na formulação.

[0238] Uma formulação aquosa é preparada compreendendo o anticorpo em uma solução tamponada por pH. O tampão desta invenção tem um pH na faixa de cerca de 5,0 a cerca de 7,0. Em certas concretizações o pH está na faixa de cerca de 5,0 a cerca de 6,5, o pH está na faixa de cerca de 5,0 a cerca de 6,4, na faixa de cerca de 5,0 a cerca de 6,3, o pH está na faixa de cerca de 5,0 a cerca de 6,2, o pH está na faixa de cerca de 5,0 a cerca de 6,1, o pH está na faixa de cerca de 5,5 a cerca de 6,1, o pH está na faixa de cerca de 5,0 a cerca de 6,0, o pH está na faixa de cerca de 5,0 a cerca de 5,9, o pH está na faixa de cerca de 5,0 a cerca de 5,8, o pH está na faixa de cerca de 5,1 a cerca de 6,0, o pH está na faixa de cerca de 5,2 a cerca de 6,0, o pH está na faixa de cerca de 5,3 a cerca de 6,0, o pH está na faixa de cerca de 5,4 a cerca de 6,0, o pH está na faixa de cerca de 5,5 a cerca de 6,0, o pH está na faixa de cerca de 5,6 a cerca de 6,0, o pH está na faixa de cerca de 5,7 a cerca de 6,0, ou o pH está na faixa de cerca de 5,8 a cerca de 6,0. Em certas concretizações da invenção, a formulação tem um pH de 6,0 ou cerca de 6,0. Em certas concretizações da invenção, a formulação tem um pH de 5,9 ou cerca de 5,9. Em certas concretizações da invenção, a formulação tem um

pH de 5,8 ou cerca de 5,8. Em certas concretizações da invenção, a formulação tem um pH de 5,7 ou cerca de 5,7. Em certas concretizações da invenção, a formulação tem um pH de 5,6 ou cerca de 5,6. Em certas concretizações da invenção, a formulação tem um pH de 5,5 ou cerca de 5,5. Em certas concretizações da invenção, a formulação tem um pH de 5,4 ou cerca de 5,4. Em certas concretizações da invenção, a formulação tem um pH de 5,3 ou cerca de 5,3. Em certas concretizações da invenção, a formulação tem um pH de 5,2 ou cerca de 5,2. Exemplos de tampões que controlarão o pH dentro desta faixa incluem histidina (tal como L-histidina) ou acetato de sódio. Em certas concretizações, o tampão contém acetato de histidina ou acetato de sódio na concentração de cerca de 15 mM a cerca de 25 mM. Em certas concretizações da invenção, o tampão contém acetato de histidina ou acetato de sódio na concentração de cerca de 15 mM a cerca de 25 mM, cerca de 16 mM a cerca de 25 mM, cerca de 17 mM a cerca de 25 mM, cerca de 18 mM a cerca de 25 mM, cerca de 19 mM a cerca de 25 mM, cerca de 20 mM a cerca de 25 mM, cerca de 21 mM a cerca de 25 mM, cerca de 22 mM a cerca de 25 mM, cerca de 15 mM, cerca de 16 mM, cerca de 17 mM, cerca de 18 mM, cerca de 19 mM, cerca de 20 mM, cerca de 21 mM, cerca de 22 mM, cerca de 23 mM, cerca de 24 mM, ou cerca de 25 mM. Em uma concretização, o tampão é acetato de histidina ou acetato de sódio em uma quantidade de cerca de 20 mM, pH 5,0. Em uma concretização, o tampão é acetato de histidina ou acetato de sódio em uma quantidade de cerca de 20 mM, pH 5,1. Em uma concretização, o tampão é acetato de histidina ou acetato de sódio em uma quantidade de cerca de 20 mM, pH 5,2. Em uma concretização, o tampão é acetato de histidina ou acetato de sódio em uma quantidade de cerca de 20 mM, pH 5,3. Em uma concretização, o tampão é acetato de histidina ou acetato de sódio em uma quantidade de cerca de 20 mM, pH 5,4. Em uma concretização, o tampão é aceta-

to de histidina ou acetato de sódio em uma quantidade de cerca de 20 mM, pH 5,5. Em uma concretização, o tampão é acetato de histidina ou acetato de sódio em uma quantidade de cerca de 20 mM, pH 5,6. Em uma concretização, o tampão é acetato de histidina ou acetato de sódio em uma quantidade de cerca de 20 mM, pH 5,7. Em uma concretização, o tampão é acetato de histidina ou acetato de sódio em uma quantidade de cerca de 20 mM, pH 5,8. Em uma concretização, o tampão é acetato de histidina ou acetato de sódio em uma quantidade de cerca de 20 mM, pH 5,9. Em uma concretização, o tampão é acetato de histidina ou acetato de sódio em uma quantidade de cerca de 20 mM, pH 6,0. Em uma concretização, o tampão é acetato de histidina ou acetato de sódio em uma quantidade de cerca de 20 mM, pH 6,1. Em uma concretização, o tampão é acetato de histidina ou acetato de sódio em uma quantidade de cerca de 20 mM, pH 6,2. Em uma concretização, o tampão é acetato de histidina ou acetato de sódio em uma quantidade de cerca de 20 mM, pH 6,3. Em uma concretização, o tampão é acetato de histidina ou acetato de sódio em uma quantidade de cerca de 25 mM, pH 5,2. Em uma concretização, o tampão é acetato de histidina ou acetato de sódio em uma quantidade de cerca de 25 mM, pH 5,3. Em uma concretização, o tampão é acetato de histidina ou acetato de sódio em uma quantidade de cerca de 25 mM, pH 5,4. Em uma concretização, o tampão é acetato de histidina ou acetato de sódio em uma quantidade de cerca de 25 mM, pH 5,5. Em uma concretização, o tampão é acetato de histidina ou acetato de sódio em uma quantidade de cerca de 25 mM, pH 5,6. Em uma concretização, o tampão é acetato de histidina ou acetato de sódio em uma quantidade de cerca de 25 mM, pH 5,7. Em uma concretização, o tampão é acetato de histidina ou acetato de sódio em uma quantidade de cerca de 25 mM, pH 5,8. Em uma concretização, o tampão é acetato de histidina ou acetato de sódio em uma quantidade de cerca de 25 mM, pH 5,9.

Em uma concretização, o tampão é acetato de histidina ou acetato de sódio em uma quantidade de cerca de 25 mM, pH 6,0. Em uma concretização, o tampão é acetato de histidina ou acetato de sódio em uma quantidade de cerca de 25 mM, pH 6,1. Em uma concretização, o tampão é acetato de histidina ou acetato de sódio em uma quantidade de cerca de 25 mM, pH 6,2. Em uma concretização, o tampão é acetato de histidina ou acetato de sódio em uma quantidade de cerca de 25 mM, pH 6,3.

[0239] Uma formulação ulteriormente compreende sacarose em uma quantidade de cerca de 60 mM a cerca de 240 mM. Em algumas concretizações, sacarose na formulação é cerca de 60 mM a cerca de 230 mM, cerca de 60 mM a cerca de 220 mM, cerca de 60 mM a cerca de 210 mM, cerca de 60 mM a cerca de 200 mM, cerca de 60 mM a cerca de 190 mM, cerca de 60 mM a cerca de 180 mM, cerca de 60 mM a cerca de 170 mM, cerca de 60 mM a cerca de 160 mM, cerca de 60 mM a cerca de 150 mM, cerca de 60 mM a cerca de 140 mM, cerca de 80 mM a cerca de 240 mM, cerca de 90 mM a cerca de 240 mM, cerca de 100 mM a cerca de 240 mM, cerca de 110 mM a cerca de 240 mM, cerca de 120 mM a cerca de 240 mM, cerca de 130 mM a cerca de 240 mM, cerca de 140 mM a cerca de 240 mM, cerca de 150 mM a cerca de 240 mM, cerca de 160 mM a cerca de 240 mM, cerca de 170 mM a cerca de 240 mM, cerca de 180 mM a cerca de 240 mM, cerca de 190 mM a cerca de 240 mM, cerca de 200 mM a cerca de 240 mM, cerca de 80 mM a cerca de 160 mM, cerca de 100 mM a cerca de 140 mM, ou cerca de 110 mM a cerca de 130 mM. Em algumas concretizações, sacarose na formulação é cerca de 60 mM, cerca de 70 mM, cerca de 80 mM, cerca de 90 mM, cerca de 100 mM, cerca de 110 mM, cerca de 120 mM, cerca de 130 mM, cerca de 140 mM, cerca de 150 mM, cerca de 160 mM, cerca de 170 mM, cerca de 180 mM, cerca de 190 mM, cerca de 200 mM, cerca de 210 mM, cerca de 220

mM, cerca de 230 mM, ou cerca de 240 mM.

[0240] Em algumas concretizações, a concentração de anticorpo na formulação é cerca de 40 mg/ml a cerca de 125 mg/ml. Em algumas concretizações, a concentração de anticorpo na formulação é cerca de 40 mg/ml a cerca de 120 mg/ml, cerca de 40 mg/ml a cerca de 110 mg/ml, cerca de 40 mg/ml a cerca de 100 mg/ml, cerca de 40 mg/ml a cerca de 90 mg/ml, cerca de 40 mg/ml a cerca de 80 mg/ml, cerca de 40 mg/ml a cerca de 70 mg/ml, cerca de 50 mg/ml a cerca de 120 mg/ml, cerca de 60 mg/ml a cerca de 120 mg/ml, cerca de 70 mg/ml a cerca de 120 mg/ml, cerca de 80 mg/ml a cerca de 120 mg/ml, cerca de 90 mg/ml a cerca de 120 mg/ml, ou cerca de 100 mg/ml a cerca de 120 mg/ml. Em algumas concretizações, a concentração de anticorpo na formulação é cerca de 60 mg/ml. Em algumas concretizações, a concentração de anticorpo na formulação é cerca de 65 mg/ml. Em algumas concretizações, a concentração de anticorpo na formulação é cerca de 70 mg/ml. Em algumas concretizações, a concentração de anticorpo na formulação é cerca de 75 mg/ml. Em algumas concretizações, a concentração de anticorpo na formulação é cerca de 80 mg/ml. Em algumas concretizações, a concentração de anticorpo na formulação é cerca de 85 mg/ml. Em algumas concretizações, a concentração de anticorpo na formulação é cerca de 90 mg/ml. Em algumas concretizações, a concentração de anticorpo na formulação é cerca de 95 mg/ml. Em algumas concretizações, a concentração de anticorpo na formulação é cerca de 100 mg/ml. Em algumas concretizações, a concentração de anticorpo na formulação é cerca de 110 mg/ml. Em algumas concretizações, a concentração de anticorpo na formulação é cerca de 125 mg/ml.

[0241] Em algumas concretizações, um tensoativo é adicionado à formulação de anticorpo. Tensoativos exemplares incluem tensoativos não iônicos tais como polissorbatos (por exemplo, polissorbatos 20, 80

etc) ou poloxâmeros (por exemplo, poloxâmero 188, etc.). A quantidade de tensoativo adicionada é tal que reduz agregação de um anticorpo formulado e/ou minimiza a formação de partículas na formulação e/ou reduz adsorção. Por exemplo, o tensoativo pode estar presente na formulação em uma quantidade de cerca de 0,001% a cerca de 0,5% (p/v). Em algumas concretizações, o tensoativo (por exemplo, polissorbato 20) é de cerca de 0,005% a cerca de 0,2%, de cerca de 0,005% a cerca de 0,1%, de cerca de 0,005% a cerca de 0,09%, de cerca de 0,005% a cerca de 0,08%, de cerca de 0,005% a cerca de 0,07%, de cerca de 0,005% a cerca de 0,06%, de cerca de 0,005% a cerca de 0,05%, de cerca de 0,005% a cerca de 0,04%, de cerca de 0,008% a cerca de 0,06%, de cerca de 0,01% a cerca de 0,06%, de cerca de 0,02% a cerca de 0,06%, de cerca de 0,01% a cerca de 0,05%, ou de cerca de 0,02% a cerca de 0,04%. Em certas concretizações, o tensoativo (por exemplo, polissorbato 20) está presente na formulação em uma quantidade de 0,005% ou cerca de 0,005%. Em certas concretizações, o tensoativo (por exemplo, polissorbato 20) está presente na formulação em uma quantidade de 0,006% ou cerca de 0,006%. Em certas concretizações, o tensoativo (por exemplo, polissorbato 20) está presente na formulação em uma quantidade de 0,007% ou cerca de 0,007%. Em certas concretizações, o tensoativo (por exemplo, polissorbato 20) está presente na formulação em uma quantidade de 0,008% ou cerca de 0,008%. Em certas concretizações, o tensoativo (por exemplo, polissorbato 20) está presente na formulação em uma quantidade de 0,009% ou cerca de 0,009%. Em certas concretizações, o tensoativo (por exemplo, polissorbato 20) está presente na formulação em uma quantidade de 0,01% ou cerca de 0,01%. Em certas concretizações, o tensoativo (por exemplo, polissorbato 20) está presente na formulação em uma quantidade de 0,02% ou cerca de 0,02%. Em certas concretizações, o tensoativo (por exemplo, polis-

sorbato 20) está presente na formulação em uma quantidade de 0,03% ou cerca de 0,03%. Em certas concretizações, o tensoativo (por exemplo, polissorbato 20) está presente na formulação em uma quantidade de 0,04% ou cerca de 0,04%. Em certas concretizações, o tensoativo (por exemplo, polissorbato 20) está presente na formulação em uma quantidade de 0,05% ou cerca de 0,05%. Em certas concretizações, o tensoativo (por exemplo, polissorbato 20) está presente na formulação em uma quantidade de 0,06% ou cerca de 0,06%. Em certas concretizações, o tensoativo (por exemplo, polissorbato 20) está presente na formulação em uma quantidade de 0,07% ou cerca de 0,07%. Em certas concretizações, o tensoativo (por exemplo, polissorbato 20) está presente na formulação em uma quantidade de 0,08% ou cerca de 0,08%. Em certas concretizações, o tensoativo (por exemplo, polissorbato 20) está presente na formulação em uma quantidade de 0,1% ou cerca de 0,1%. Em certas concretizações, o tensoativo (por exemplo, polissorbato 20) está presente na formulação em uma quantidade de 0,2% ou cerca de 0,2%. Em certas concretizações, o tensoativo (por exemplo, polissorbato 20) está presente na formulação em uma quantidade de 0,3% ou cerca de 0,3%. Em certas concretizações, o tensoativo (por exemplo, polissorbato 20) está presente na formulação em uma quantidade de 0,4% ou cerca de 0,4%. Em certas concretizações, o tensoativo (por exemplo, polissorbato 20) está presente na formulação em uma quantidade de 0,5% ou cerca de 0,5%.

[0242] Em uma concretização, uma formulação contém os agentes identificados acima (por exemplo, anticorpo, tampão, sacarose, e/ou tensoativo) e está essencialmente livre de um ou mais conservantes, tais como álcool benzílico, fenol, m-cresol, clorobutanol e benzetônio Cl. Em uma outra concretização, um conservante pode ser incluído na formulação, particularmente onde a formulação é uma formulação de multidoses. A concentração de conservante pode estar na faixa de

cerca de 0,1% a cerca de 2%, de preferência de cerca de 0,5% a cerca de 1%. Um ou mais outros veículos, excipientes ou estabilizadores farmacologicamente aceitáveis tais como aqueles descritos em Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edição, Osol, A, Ed, (1980) podem ser incluídos na formulação com a condição de que eles não adversamente afetem as características desejadas da formulação, Veículos, excipientes ou estabilizadores aceitáveis são não tóxicos a receptores nas dosagens e concentrações empregadas e incluem; agentes de tamponamento adicionais; co-solventes; anti-oxidantes incluindo ácido ascórbico e metionina; agentes de quelação tal como EDTA; complexos de metal (por exemplo, complexos de Zn-proteína); polímeros biodegradáveis tais como poliésteres; e/ou contra-íons de formação de sal, Veículos farmacologicamente aceitáveis exemplares aqui ulteriormente incluem agentes de dispersão de fármaco intersticiais tais como glicoproteínas de hialuronidase ativas neutras solúveis (sHASEGP), por exemplo, glicoproteínas de hialuronidase de PH-20 solúvel de ser humano, tal como rHuPH20 (HYLENEX[®], Baxter International, Inc.), Certos sHASEGPs e métodos exemplares de uso, incluindo rHuPH20, são descritos na publicações de patentes US Nos, 2005/0260186 e 2006/0104968. Em um aspecto, uma sHASEGP é combinada com uma ou mais glicosaminoglicanases adicionais tais como condroitinases.

[0243] Uma formulação aqui pode também conter mais do que uma proteína quando necessário para a indicação particular a ser tratada, de preferência aquelas com atividades complementares que não adversamente afetam a outra proteína. Por exemplo, onde o anticorpo é anti-PDL1, pode ser combinado com um outro agente (por exemplo, um agente quimioterapêutico, e agente anti-neoplásico).

[0244] Em algumas concretizações, a estabilidade física, estabilidade química, ou atividade biológica do anticorpo na formulação é

avaliada e é medida. Quaisquer métodos conhecidos na técnica e descritos nos Exemplos aqui podem ser usados para avaliar a estabilidade e atividade biológica do anticorpo na formulação. Por exemplo, estabilidade do anticorpo na formulação pode ser medida por, mas não limitada a, cromatografia de exclusão por tamanho (SEC ou SE-HPLC), focalização isoeletrica capilar fotografada (ICIEF), mapeamento de peptídeos, ensaio de obscuração de luz de volume baixo (HIAC), e técnicas de eletroforese capilar (CE) tais como CE-sulfato de dodecila de sódio (CE-SDS) e análise de CE-glicano. Em algumas concretizações, o anticorpo na formulação é estável a -20°C por pelo menos cerca de 6 meses, pelo menos cerca de 8 meses, pelo menos cerca de 10 meses, pelo menos cerca de 12 meses, pelo menos cerca de 14 meses, pelo menos cerca de 16 meses, pelo menos cerca de 18 meses, pelo menos cerca de 20 meses, pelo menos cerca de 21 meses, pelo menos cerca de 22 meses, pelo menos cerca de 23 meses, pelo menos cerca de 24 meses, pelo menos cerca de 3 anos, ou pelo menos cerca de 4 anos. Em algumas concretizações, o anticorpo na formulação é estável a 2°C até 8°C (*por exemplo*, 5°C) por pelo menos cerca de 6 meses, pelo menos cerca de 8 meses, pelo menos cerca de 10 meses, pelo menos cerca de 12 meses, pelo menos cerca de 14 meses, pelo menos cerca de 16 meses, pelo menos cerca de 18 meses, pelo menos cerca de 20 meses, pelo menos cerca de 21 meses, pelo menos cerca de 22 meses, pelo menos cerca de 23 meses, ou pelo menos cerca de 24 meses. Em algumas concretizações, a estabilidade do anticorpo (*isto é*, um anticorpo monômero) é medida por cromatografia de exclusão por tamanho na formulação depois da armazenagem. Em algumas concretizações, a estabilidade do anticorpo é (*isto é*, um anticorpo monômero) medida por focalização isoeletrica capilar fotografada na formulação depois da armazenagem. Em algumas concretizações, a percentagem de anticorpo monômero na formu-

lação quando comparada com proteína total (*por exemplo*, incluindo anticorpo e agregados) é maior do que cerca de 60%, cerca de 65%, cerca de 70%, cerca de 75%, cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 86%, cerca de 87%, cerca de 88%, cerca de 89%, cerca de 90%, cerca de 91%, cerca de 92%, cerca de 93%, cerca de 94% ou cerca de 95% depois da armazenagem a -20°C por pelo menos cerca de 6 meses, pelo menos cerca de 12 meses, pelo menos cerca de 18 meses, ou pelo menos cerca de 24 meses. Em algumas concretizações, a percentagem de anticorpo monômero na formulação quando comparada com (*por exemplo*, incluindo anticorpo e agregados) é maior do que cerca de 60%, cerca de 65%, cerca de 70%, cerca de 75%, cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 86%, cerca de 87%, cerca de 88%, cerca de 89%, cerca de 90%, cerca de 91%, cerca de 92%, cerca de 93%, cerca de 94% ou cerca de 95% depois da armazenagem a 2°C até 8°C (*por exemplo*, 5°C) por pelo menos cerca de 6 meses, pelo menos cerca de 12 meses, pelo menos cerca de 18 meses, ou pelo menos cerca de 24 meses. Em algumas concretizações, a percentagem de anticorpo monômero na formulação quando comparada com (*por exemplo*, incluindo anticorpo e agregados) é maior do que cerca de 60%, cerca de 65%, cerca de 70%, cerca de 75%, cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 86%, cerca de 87%, cerca de 88%, cerca de 89%, cerca de 90%, cerca de 91%, cerca de 92%, cerca de 93%, cerca de 94% ou cerca de 95% depois da agitação a temperatura ambiente (*por exemplo*, cerca de 15°C a 25°C) por pelo menos cerca de 2 horas, pelo menos cerca de 4 horas, pelo menos cerca de 6 horas, pelo menos cerca de 8 horas, pelo menos cerca de 10 horas, pelo menos cerca de 12 horas, pelo menos cerca de 14 horas, pelo menos cerca de 16 horas, pelo menos cerca de 18 horas, pelo menos cerca de 20 horas, ou pelo menos cerca de 24 horas. Em algumas concretizações, a percentagem de agregados totais (*por exemplo*, a espécie de alto

peso molecular e espécie de baixo peso molecular) na formulação é menos do que qualquer uma de cerca de 0,1%, cerca de 0,2%, cerca de 0,3%, cerca de 0,4%, cerca de 0,5%, cerca de 0,6%, cerca de 0,7%, cerca de 0,8%, cerca de 0,9%, cerca de 1%, cerca de 2%, cerca de 3%, cerca de 4%, cerca de 5%, cerca de 6%, cerca de 7%, cerca de 8%, cerca de 9%, ou cerca de 10% depois da armazenagem a -20°C por pelo menos cerca de 6 meses, pelo menos cerca de 12 meses, pelo menos cerca de 18 meses, ou pelo menos cerca de 24 meses. Em algumas concretizações, a percentagem de agregados totais (*por exemplo*, a espécie de alto peso molecular e espécie de baixo peso molecular) na formulação é menos do que qualquer um de cerca de 0,1%, cerca de 0,2%, cerca de 0,3%, cerca de 0,4%, cerca de 0,5%, cerca de 0,6%, cerca de 0,7%, cerca de 0,8%, cerca de 0,9%, cerca de 1%, cerca de 2%, cerca de 3%, cerca de 4%, cerca de 5%, cerca de 6%, cerca de 7%, cerca de 8%, cerca de 9%, ou cerca de 10% depois da armazenagem a 2°C até 8°C (*por exemplo*, 5°C) por pelo menos cerca de 6 meses, pelo menos cerca de 12 meses, pelo menos cerca de 18 meses, ou pelo menos cerca de 24 meses. Em algumas concretizações, a percentagem de agregados totais (*por exemplo*, a espécie de alto peso molecular e espécie de baixo peso molecular) na formulação é menos do que qualquer de cerca de 0,1%, cerca de 0,2%, cerca de 0,3%, cerca de 0,4%, cerca de 0,5%, cerca de 0,6%, cerca de 0,7%, cerca de 0,8%, cerca de 0,9%, cerca de 1%, cerca de 2%, cerca de 3%, cerca de 4%, cerca de 5%, cerca de 6%, cerca de 7%, cerca de 8%, cerca de 9%, ou cerca de 10% depois da agitação a temperatura ambiente (*por exemplo*, cerca de 15°C a 25°C) por pelo menos cerca de 2 horas, pelo menos cerca de 4 horas, pelo menos cerca de 6 horas, pelo menos cerca de 8 horas, pelo menos cerca de 10 horas, pelo menos cerca de 12 horas, pelo menos cerca de 14 horas, pelo menos cerca de 16 horas, pelo menos cerca de 18 horas, pe-

lo menos cerca de 20 horas, ou pelo menos cerca de 24 horas. Em qualquer uma das concretizações aqui, a formulação estável pode ser armazenada em um frasco de vidro, um recipiente de liga de metal, ou uma bolsa intravenosa (IV). Em algumas concretizações, a liga de metal é aço inoxidável 316L ou hastelloy.

[0245] As formulações a serem usadas para administração in vivo seriam estéreis. Isso é prontamente realizado por filtração através de membras de filtração estéril, antes de, ou após, preparação da formulação.

III. Métodos de tratamento e administração da formulação de anticorpos

[0246] A formulação é administrada a um mamífero que necessita de tratamento com o anticorpo, de preferência um ser humano, de acordo com métodos conhecidos, tal como administração intravenosa (por exemplo, como um bolus ou por infusão contínua durante um período de tempo), por rotas intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinhal, subcutânea, intra-articular, intrassinovial, intratecal, oral, tópica ou inalação. Em uma concretização, a formulação é administrada ao mamífero por administração intravenosa. Para tais finalidades, uma formulação pode ser injetada usando-se uma seringa ou via uma linha IV, por exemplo. Em uma concretização, a formulação é administrada ao mamífero por administração subcutânea.

[0247] A dosagem aproximada ("quantidade terapeuticamente eficaz") do anticorpo dependerá, por exemplo, da condição a ser tratada, da severidade e do curso da condição, se o anticorpo é administrado para as finalidades preventivas ou terapêuticas, da terapia anterior, da história clínica do paciente e da resposta ao anticorpo, do tipo de anticorpo usado, e da descrição do médico atendente. O anticorpo é adequadamente administrado ao paciente de uma vez ou durante uma série de tratamento e pode ser administrado ao paciente a qualquer

momento a partir do diagnóstico para frente. O anticorpo pode ser administrado como um único tratamento ou em combinação com outros fármacos ou terapias úteis no tratamento da condição em questão.

[0248] Como uma proposição geral, a quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo administrado a um ser humano estará na faixa de cerca de 0,01 a cerca de 50 mg/kg de peso de corpo do paciente se por uma ou mais administrações. Em algumas concretizações, o anticorpo usado é cerca de 0,01 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 0,01 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 0,01 a cerca de 35 mg/kg, cerca de 0,01 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 0,01 a cerca de 25 mg/kg, cerca de 0,01 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 0,01 a cerca de 15 mg/kg, cerca de 0,01 a cerca de 10 mg/kg, cerca de 0,01 a cerca de 5 mg/kg, ou cerca de 0,01 a cerca de 1 mg/kg administrado diariamente, por exemplo. Em algumas concretizações, o anticorpo é administrado a 15 mg/kg. No entanto, outros regimes de dosagem podem ser úteis. Em uma concretização, um anticorpo de anti-PDL1 descrito aqui é administrado a um ser humano em uma dose de cerca de 100 mg, cerca de 200 mg, cerca de 300 mg, cerca de 400 mg, cerca de 500 mg, cerca de 600 mg, cerca de 700 mg, cerca de 800 mg, cerca de 900 mg, cerca de 1000 mg, cerca de 1100 mg, cerca de 1200 mg, cerca de 1300 mg ou cerca de 1400 mg no dia 1 de ciclos de 21 dias. A dose pode ser administrada como uma dose única ou como múltiplas doses (por exemplo, 2 ou 3 doses), tais como infusões. A dose do anticorpo administrada em um tratamento de combinação pode ser reduzida quando comparada com um tratamento simples. O progresso dessa terapia é facilmente monitorado por técnicas convencionais.

[0249] As formulações contendo anticorpo de anti-PDL1 descritas aqui podem ser usadas em uma variedade de aplicações terapêuticas e diagnóstico *in vitro* e *in vivo*. Por exemplo, uma formulação contendo o anticorpo pode ser administrada a um indivíduo ou um indivíduo

para o tratamento de uma doença ou um distúrbio (por exemplo, doença ou distúrbio mediada pela interação de PD-1 e de PD-L1).

[0250] Em algumas concretizações, a doença ou a distúrbio é câncer. Em algumas concretizações, o câncer é localmente avançado ou metastático. Em algumas concretizações, o câncer é selecionado do grupo que consiste em um tumor sólido, um câncer hematológico, câncer de bexiga, câncer de cérebro, câncer de mama, câncer de cólon, câncer de colorretal, câncer gástrico, glioma, câncer de cabeça, leucemia, câncer de fígado, câncer de pulmão (por exemplo, câncer de pulmão de célula pequena), linfoma, mieloma, câncer de pescoço, câncer ovariano, melanoma, câncer pancreático, câncer renal, câncer salivar, câncer de estômago, câncer epitelial tímico, câncer de tireóide, e carcinoma de célula escamosa da cabeça e pescoço. Em algumas concretizações, a pessoa ou indivíduo tratado tem células de câncer positivas a PD-L1 (por exemplo, detectadas por IHC).

[0251] Em algumas concretizações, a doença ou a distúrbio é uma infecção. Em algumas concretizações, a infecção é uma infecção persistente. Em algumas concretizações, a infecção é uma infecção viral, uma infecção bacteriana, uma infecção fúngica, uma infecção de helminto, ou uma infecção de protozoário. Em algumas concretizações, a infecção viral é selecionada do grupo que consiste em citomegalovírus, vírus de Epstein-Barr, vírus de hepatite B, vírus de hepatite C, vírus de herpes, vírus de sarampo, influenza, vírus de imunodeficiência de ser humano, vírus linfotrópico T de ser humano, vírus de coriomeningite linfocítica, vírus sincicial respiratório, e/ou rinovírus. Em algumas concretizações, a infecção bacteriana é selecionada do grupo que consiste em *Helicobacter spp*, *Mycobacterium spp*, *Porphyromonas spp*, *Chlamydia spp*, *Salmonella spp*, *Listeria spp*, *Streptococcus spp*, *Haemophilus spp*, *Neisseria spp*, *Klebsiella spp*, *Borrelia spp*, *Bacterioides spp*, e *Treponema spp*. Em algumas concretizações, a

infecção por protozoário é selecionada do grupo que consiste em *Leishmania spp*, *Plasmodium falciparum*, *Schistosoma spp*, *Toxoplasma spp*, *Trypanosoma spp*, e *Taenia spp*. Em algumas concretizações, a infecção fúngica é selecionada do grupo que consiste em blastomicose, coccidioiodmycosis, histoplamsosis, candidiasis, croptococcose, aspergilosse, mucomicose e pneumocistose.

[0252] Em algumas concretizações, a doença ou a distúrbio é uma doença inflamatória. Em algumas concretizações, a doença inflamatória é selecionada do grupo que consiste em acute disseminatod encefalomielite, doença de Addison, doença de Alzheimer, espondilite nqui-losante, síndrome de anticorpo de antifosfolipídio, atherosclerose, anemia hemolítica autoimune, hepatite autoimune, artrite, doença de Behcet, doença de Berger, Bullous penfigóide, doença de Celíaca, doença de Chaga, colangite, doença de Crohn, Dermatomiosite, Diabetes melitus tipo 1, glomerulonefrite, síndrome de Goodpasture, doença de exerto versus hospedeiro, doença de Graves, síndrome de Guillain-Barré, doença de Hashimoto, urticária, síndrome de hiper IgE, púrpura trombocitopênico idiopático, lúpus eritematoso, lúpus nefrite, esclerose múltipla, miastenia gravis, rejeição de transplante de órgão, doença de Parkinson, pênfigo, anemia perniciosa, poliomiosite, cirrose biliar primária, psoríase, síndrome de Raynaud, artrite reumatóide, escleroderma, síndrome de Sjögren, arterite temporal, tiroidite, colite ulcerativa, uveite, vasculite, e granulomatose de Wegener.

[0253] Em algumas concretizações, uma formulação contendo o anticorpo pode ser administrada em combinação com um outro agente terapêutico a uma pessoa ou um indivíduo para o tratamento de uma doença ou um distúrbio. Por exemplo, para o tratamento de câncer, a formulação de anticorpo de anti-PDL1 descrita aqui pode ser administrada em combinação com um outro tratamento anti-câncer (por exemplo, uma quimioterapia ou um tratamento diferente de anticorpo).

IV. Artigos de Fabricação ou Kits

[0254] Em uma outra concretização da invenção, um artigo de fabricação ou um kit é provido compreendendo um recipiente que mantém a formulação farmacêutica aquosa da invenção e opcionalmente provê instruções para seu uso, Recipientes adequados incluem, por exemplo, garrafas, frascos, bolsas e seringas, O recipiente pode ser formado a partir de uma variedade de materiais tais como vidro, plástico (tal como cloreto de polivinila ou poliolefina), ou uma liga de metal (tal como aço inoxidável ou hastelloy). Um recipiente exemplar é um recipiente de liga de metal de 300 cc (por exemplo, para armazenagem a -20°C). Um outro recipiente exemplar pode ser um frasco de vidro de 10-50 cc (por exemplo, para armazenagem a 2-8°C). Por exemplo, o recipiente pode ser frascos de vidro de 10 cc, 15 cc, 20 cc, ou 50 cc. O recipiente retém uma formulação e o rótulo sobre o, ou associado ao, recipiente pode indicar instruções para o uso. O artigo de fabricação pode ulteriormente incluir outros materiais desejáveis de um ponto de vista comercial e do usuário, incluindo outros tampões, diluentes, filtros, agulhas, seringas, e insertos de embalagem com instruções para o uso. Em algumas concretizações. O artigo de fabricação ulteriormente inclui um ou mais de um outro agente (por exemplo, um agente quimioterapêutico, um agente anti-neoplásico), Recipientes adequados para o um ou mais agente incluem, por exemplo, garrafas, frascos, bolsas e seringas.

[0255] O relatório descritivo é considerado como sendo suficiente para permitir aquele versado na técnica praticar a invenção, Várias modificações da invenção além daquelas mostradas e descritas aqui se tornarão evidentes por aqueles versados na técnica a partir da descrição exposta acima e caem dentro do escopo das reivindicações anexas, Todas as publicações, patentes e pedidos de patentes relatados aqui são incorporados por referência em sua totalidade para todas

as finalidades.

Exemplos

[0256] A invenção será mais totalmente entendida por referência aos seguintes exemplos. Eles, no entanto, seriam interpretados como limitante do escopo da invenção. É entendido que os exemplos e as concretizações descritas aqui são para finalidades ilustrativas apenas e que várias modificações ou mudanças à sua luz serão sugeridas por pessoas versadas na técnica e devem ser incluídas dentro do espírito e campo de ação deste pedido e escopo das reivindicações anexas.

Exemplo 1: Desenvolvimento de formulação de um anticorpo de anti-PDL1

[0257] Anticorpo de anti-PDL1 (α -PDL1) é um anticorpo de IgG1 aglicosilado derivado de CHO destinado a restaurar função de célula T através de inibição de interações de PDL1/PD1, Desafios no início do desenvolvimento incluíam potencial de oxidação e glicação de Trp em ou próximas as regiões de CDR e algumas oxidação de metionina, Estudos de pré-robustez indicavam um pH mais alto do que anteriormente direcionado (pH 5,5) fosse ótimo. A administração dosada alvo era uma dose fixa mas uma dose com base em peso foi também contemplada, Estudos analíticos foram conduzidos para analisar estabilidade de várias formulações e uma formulação (60 mg/mL α -PDL1, His AcO a 20 mM pH 5,8, sacarose a 120 mM, 0,04% de PS20) foi selecionada, Estudos de formulação inicial suportam até três anos de estabilidade em substância de fármaco (DS) e produto de fármaco (DS).

Métodos e Materiais

Produção de formulações de α -PDL1

[0258] Material de α -PDL1 que tinha sofrido ultrafiltração/diafiltração foi submetido a estudos de desenvolvimento de formulação, O material foi dialisado em vários tampões de formulação usando-se pacotes de dialise de 10000 Dálton. Depois de dialise,

concentrações de proteínas foram alustadas para alcançar concentrações alvo e 10% de solução de estoque de PS20 foram adicionadas em para conseguir concentração de PS20 direcionadas. Um material de formulação foi introduzido asseticamente nos frascos de vidro de Forma Vitrum de 2-cc com 1 mL de volume de carga e foram selados com uma tampa de 13 mm de Daikyo 777-1. Amostras foram armazenadas na vertical ou a 5°C, 25°C ou 40°C.

Cor, aparência e claridade(CAC)

[0259] Cor de amostra, aparência, e claridade foram determinadas visual sob uma luz de fluorescência branca com fundo preto e branco a temperatura ambiente como descrito na European Pharmacopoeia (EP) métodos (Council of Europe, *European Pharmacopoeia*, 2008, 7th Ed. EP 2.2.2 e EP 2.2.1). Um frasco de vidro de 3cc foi enchido com 1 mL de cada amostra testada. Um controle negativo (água purificada) com o volume de amostra correspondente foi usado para comparação.

Medições de concentração de proteínas

[0260] A concentração de proteínas foi determinada por medição da absorbância em um espectrofotômetro Agilent 8453 (Santa Clara, CA,) via diluição de amostra volumétrica a cerca de 0,5 mg/mL com 0,9% de solução salina. As amostras foram comparadas com amostras em branco de 0,9% de solução salina e a absorbância foi medida na A_{max} de cerca de 280 nm e também a 320 nm. A diferença entre A_{max} e A_{320} foi calculada para se obter a A_{max} corrigida usada para determinar a concentração de proteína final com uma absortividade de $1,5 \text{ mL cm}^{-1} \text{ mg}^{-1}$.

Medições de turvação.

[0261] A densidade ótica média a 350 nm das amostras foi medida em uma cubeta de quartz com um comprimento de trajetória de 1cm em um espectrofotômetro de Agilent 8453. Água purificada foi usada como um branco. Méodo de obscurecimento de luz para partículas

subvisíveis (ensaio de HIAC)

[0262] Contagens de partículas de amostras foram realizadas usando-se obscurecimento de luz medida pelo HIAC-Royco modelo 9703 (HACH, Loveland, CO.). Número cumulativos médio de partículas por mililitro $\geq 2 \mu\text{m}$, $\geq 5 \mu\text{m}$, $\geq 10 \mu\text{m}$ e $\geq 25 \mu\text{m}$ foram tabulados para cada amostra usando-se Pharm Spec v2,0, Quatro leituras, consumindo um total de 1,6 mL de cada amostra, foram realizadas por teste, com a primeira leitura descartada, e as e leituras restantes calculadas a média.

Cromatografia de exclusão por tamanho (SEC ou SE-HPLC)

[0263] Distribuição de variante de tamanho foi determinada por cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) usando-se uma Toso-Haas Bioscience coluna G3000 SWXL (South San Francisco, CA,) a 30°C em uma HPLC Agilent 1200 (Santa Clara, CA,USA), Todas as amostras foram injetadas não diluídas a 50 μg sobre a coluna e foram eluídas no período de 60 minutos com absorção de UV a 280 nm, Dois métodos de SEC diferentes foram usados para testagem de amostra, Método 1 usava fosfato de potássio a 0,20 M, cloreto de potássio a 0,25 M, pH 6,2, enquanto método 2 usava fosfato de potássio a 0,20 M, cloreto de potássio a 0,25 M, pH 6,2 com 10% (v/v) de isopropanol como a fase móvel, Resultados são relatados como percentagem de pico relativo da área da área total sob a curva.

Focalização isoeletrica capilar fotografada (ICIEF)

[0264] A distribuição de variantes de carga foi avaliada por iCIEF usando-se um analisador iCE280 (Proteína simples) com um cartucho capilar revestido por fluorocarbono (100 μm x 5 cm). A solução anfólita consistia de uma mistura de 0,35% de metil celulose (MC), 0,75% de anfólitos de veículo Pharmalyte 3-10, 4,2% de anfólitos de veículo Pharmalyte 8-10,5, e 0,2% de marcador pl 7,40 e 0,15% de marcador pl 9,77 em água purificada, O anólito era ácido fosfórico a 80 mM, e o

católito era hidróxido de sódio a 100 mM, ambos a 0,10% de metilcelulose. Amostras foram diluídas em água purificada e CpB foi adicionado a cada amostra diluída em uma enzima a razão de substrato de 1:100 seguido por incubação a 37°C por 20 minutos. As amostras tratadas com CpB foram misturadas com uma solução de anfólito e então foram focalizadas por introdução de um potencial de 1500 V por um minuto, seguido por um potencial de 3000 V por 10 minutos. Uma imagem das variantes de carga de α -PDL1 focalizadas foi obtida por passagem de luz ultravioleta de 280 nm através do capilar e na lente de uma câmera digital de dispositivo acoplado a carga. Esta imagem foi analisada para determinar a distribuição das várias variantes de carga.

Mapeamento de peptídeos

[0265] Uma técnica de mapeamento de peptídeos foi usada para monitorar oxidação de triptofano (W) e metionina (M). Para gerar mapas de peptídeo de α -PDL1, a proteína foi digerida com tripsina depois da exposição da proteína a ditioneitol (DTT) e ácido iodoacético (IAA), em um processo que reduz as ligações de dissulfeto e altera os tióis livres resultantes para produzir derivados de carboximetila. Os peptídeos resultantes foram separadamente por cromatografia líquida de alto desempenho de fase reversa (RP-HPLC) e foram monitorados a 214 nm. Massas dos peptídeos tripticos foram determinadas pela análise de LC-MS da mistura de digestão separada usando-se um espectrômetro de massa ThermoFisher Scientific LTQ-Orbitrap.

Resultados

Seleção de sistema de tampão

[0266] Durante o desenvolvimento de formulação, dois sistemas de tampão foram avaliados. Um foi de acetato de histidina a 20 mM com sacarose a 240 mM a pH 5,5, o outro um foi de succinato de arginina a 200 mM a pH 5,5, O estudo de estabilidade acelerada revelou que α -PDL1 tinha melhor estabilidade em tampão de acetato de histi-

dina comparado com tampão de succinato de arginina (Tabela 1), Portanto acetato de histidina foi escolhido para outros desenvolvimento de formulações.

Tabela 1. Taxas de degradação de ordem zero de α -PDL1 para pico principal de ICIEF e SE-HPLC em tampões de acetato de histidina e de succinato de arginina a 30°C.

Tampões	Taxa de % de diminuição de pico principal por mês a 30C	
	ICIEF	SE-HPLC
Acetato de histidina*	5,7	1,0
Succinato de arginina**	17,6	1,5

Observação: Todas as formulações foram paradas por até 1 mês a 30°C. Análise foi realizada usando-se ICIEF e SE-HP LC; * 150 mg/mL de α -PDL1 em L-acetato de histidina a 20 mM, sacarose a 240 mM , e 0,02% (p/v) de polissorbato 20 a pH 5,5; ** 150 mg/mL de α -PDL1 em succinato de arginina a 200 mM , 0,02% (p/v) de polissorbato 20 a pH 5,5.

Seleção de estabilizador

[0267] Sacarose (120 mM) foi selecionada como o estabilizador para a formulação líquida de α -PDL1 com base em sua capacidade de proteger a proteína contra agregação induzida por congelamento/descongelamento bem como função como um crioprotetor durante armazenagem congelada de longo prazo do substância de fármaco (DS) e subsequente produto de fármaco (DP) subsequente armazenagem a 2°C–8°C.

[0268] Durante desenvolvimento de formulação, α -PDL1 a 50 mg/mL em L-acetato de histidina a 20 mM, pH 5,5, 0,02% (p/v) de polissorbato 20, e várias concentrações de sacarose que variam de 0 mM a 120 mM foram submetidas a cinco ciclos de congelamento/descongelamento, Qualidade de produto foi medida por SE-HPLC

indicava que sacarose a 60 mM era suficiente para prevenir um aumento induzido por congelamento/descongelamento em α -PDL1 HMWS (Tabela 2). Também, sacarose a 120 mM foi mostrado manter estabilidade da substância de fármaco quando foi armazenada congelada a -20°C por pelo menos 6 meses (Tabela 3). Portanto, com base no resultado dos estudos de congelamento/descongelamento bem como a estabilidade de longo prazo de substância de fármaco armazenada a -20°C , sacarose em uma concentração de 120 mM foi escolhida como o crioprotetor para a formulação líquida de α -PDL1.

Tabela 2. Efeito de Concentração de sacarose na Estabilidade de α -PDL1 SE-HPLC de percentagem de espécie de alto peso molecular durante congelamento e descongelamento

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

Observação: Todas as formulações contêm 50 mg/mL de α -PDL1, L-acetato de histidina a 20 mM, 0,02% (p/v) de polissorbato 20, pH 5,5. Análise foi realizada usando-se SE-HPLC; F/T = congelamento/descongelamento; HMWS = espécie de alto peso molecular; SY = levemente amarelo; CL = claro; PFVP = praticamente livre de partículas visíveis.

Tabela 3. Dados de estabilidade de longo prazo para carga de desenvolvimento de substância de fármaco de α -PDL1

												Q12695		
												CE-SDS-NGS (non-(
												(não reudizado))		
												Q12708		
												Potência		
												(% relati-		
												ve potên-		
												cia)		
Temp	tempo	Q12005	pH de	Concentra-	Região	Pico	Região	formas	monô-	Soma de	Pico	Soma	Q12708	
(°C)	(di-	CAC	Q120	Q12398	(% de	(% de	(% de	(% de	(% de	(% de	(% de	Pré-	Pico	Pós-
	as/meses)		03	(mg/mL)	área)	área)	área)	área)	área)	área)	área)	picos	pal	picos
												(% CPA)	(% CPA)	(% CPA)
NA	T = 0/0	SY,CL,PFVP	f	60,1	17,3	79,7	3,0	0,7	99,2	0,1	2,7	97,0	0,3	107
-20°C	30/1	SY,CL,PFVP	5,9	62,9	16,9	80,2	2,9	0,6	99,3	0,1	2,8	97,0	0,2	109
-20°C	61/2	SY,CL,PFVP	5,9	61,4	16,5	80,8	2,7	0,6	99,4	0,1	2,5	97,3	0,3	NT
-20°C	91/3	SY,CL,PFVP	5,9	62,5	18,1	79,0	3,0	0,6	99,3	0,1	2,8	97,1	0,2	96
-20°C	183/6	SY,CL,PFVP	5,9	61,1	17,9	79,0	3,1	0,6	99,4	0,1	3,1	96,6	0,3	100
5°C	30/1	SY,CL,PFVP	5,9	61,1	18,1	79,0	2,9	0,7	99,2	0,1	2,6	97,0	0,4	101
5°C	61/2	SY,CL,PFVP	5,9	62,3	17,4	79,8	2,8	0,8	99,2	0,1	2,9	96,7	0,4	NT
5°C	91/3	SY,CL,PFVP	5,9	63,9	17,4	80,1	2,5	0,9	99,0	0,1	3,0	96,5	0,5	107
5°C	183/6	SY,CL,PFVP	5,9	59,5	19,7	77,4	3,0	1,1	98,8	0,1	3,3	95,9	0,8	102

Estudos de robustez da pré-formulação: Seleção de concentração de proteína, pH e concentração de polissorbato 20

[0269] Um projeto factorial fracional do projeto de experiências (DOE) foi usado para ulteriormente examinar os efeitos de parâmetros de formulação de α -PDL1 na estabilidade de proteína. Um total de doze diferentes formulações de α -PDL1 foram testadas (dez experiência se dois pontos centrais). Os três fatores variavam no estudo estavam na faixa de pH de 5,0 – 6,0 com intervalos de unidades de 0.5, faixa de concentração de proteína 40 – 120 mg/mL, e faixa de concentração de polissorbato 20 de 0,005% - 0,06% (p/v) (Tabela 4). Todas as formulações foram tamponadas por acetato de histidina a 20 mM com sacarose a 120 mM exceto as duas últimas formulações como indicadas na Tabela 4. A formulação de acetato de histidina a 25 mM foi avaliada uma vez que foi considerada como sendo um cenário de caso pior em termos de risco de oxidação. O tampão de acetato de sódio a 20 mM foi avaliado com um sistema backup de tampão e em comparação com tampão de acetato de histidina. As formulações foram paradas a 25°C por 2 meses e 40°C por 1 mês. Os dados de estabilidade oriundos dos estudos acima foram estatisticamente analisados quanto a interações entre parâmetros de formulação usando-se software JMP (JMP. versão 9, SAS Institute Inc. Cary. NC).

Tabela 4. Formulações de **substância de fármaco de α -PDL1** e de produto de fármaco avaliadas no estudo de DOE

Formulação	anti-PDL1 (mg/mL)	solução pH	PS20 (% de p/v)	His-Acetato (mM)	Sacarose (mM)
F1 ^a	50	5,5	0,04	20	120
F2 ^a	100	5,5	0,04	20	120
F3	40	6,0	0,06	20	120
F4	120	5,0	0,06	20	120

Formulação	anti-PDL1 (mg/mL)	solução pH	PS20 (% de p/v)	His-Acetato (mM)	Sacarose (mM)
F5	120	6,0	0,005	20	120
F6	40	5,0	0,06	20	120
F7	120	5,0	0,005	20	120
F8	40	6,0	0,005	20	120
F9	40	5,0	0,005	20	120
F10	120	6,0	0,06	20	120
F11 ^b	50	5,5	0,06	25	120
F12 ^c	50	5,5	0,04	20 (Na-Ace)	120

Observação: ^a Pontos centrais; ^b cenário de caso pior: baixa concentração de proteína, alta concentração de PS20, alta concentração de histidina; ^c acetato de sódio a 20 mM (Na-Ace) buffer foi testado.

[0270] Em comparação com pH 5,0 e 5,5, a formulação a pH 6,0 tem taxa de perda de pico principal levemente mais lenta, como determinado por ICIEF a 40°C e 25°C (Fig. 1A-B e Fig. 2A-B, respectivamente). Nenhum impacto significativo de concentração na perda de pico principal foi observado por ICIEF. Análise de formulação F1 mostrou que um aumento de variante ácida contribuiu principalmente para perda de pico principal em ICIEF enquanto a contribuição para perda de pico por uma variante de carga básica não foi significativa. Sob as mesmas condições de armazenagem, uma formulação a pH 6,0 também tinham uma taxa de perda de pico de monômero mais lenta, como medida SE-HPLC a 40°C e 25°C (Fig. 3A-B e Fig. 4A-B, respectivamente). Análise de formulação F1 mostrou que tanto formação de HMWS quanto LMWS contribuíram para perda de monômero em SEC a temperaturas elevadas (isto é, 40°C e 25°C). Tanto perfis de taxa de pH de SEC quanto ICIEF revelaram que pH de 5,5-6,0 é a ótima faixa de pH para α -PDL1. Para estar dentro da

ótima estabilidade de proteína acima de pH 5,5 e para permitir uma faixa de unidade de pH de $\pm 0,3$ na substância de fármaco formulada e produto de fármaco, um alvo de pH 5,8 foi escolhido.

[0271] Os estudos de formulação acima também revelavam que 120 mg/mL de formulações de α -PDL1 na faixa de pH de 5,0 – 6,0 tinham uma taxa de perda de pico de monômero levemente mais alta mas não significativa devido a taxa de formação de HMWS mais alta em comparação com 40 mg/mL de formulações no mesmo pH, como determinado por SE-HPLC (Fig. 3A-B e Fig. 4A-B). Com base nestes dados e para suportar a formulação com estabilidade de produto aperfeiçoada e para facilitar administração dosada ao paciente, α -PDL1 em uma concentração de 60 mg/mL foi selecionada.

[0272] Nenhum impacto sobre estabilidade de proteína foi observado com concentrações de polissorbato 20 (PS20) que variam de 0,005%-0,06% (p/v) como indicado na análise estatística acima (FIGs, 1-4).

[0273] Foi conhecido que impureza de peróxido de hidrogênio contida na matéria prima de polissorbato 20 pode causar oxidação de triptofano (W) e metionina (M), L-histidina pode também aumentar o risco de oxidação acima. As amostras de piores formulações de cenário de caso selecionadas contendo concentrações mais altas de polissorbato 20 e L-histidina foram analisadas por mapeamento de peptídeos. Resultados da análise são mostrados que mesmo a combinação de concentração de histidina mais alta (tampão de acetato de histidina a 25 mM) e quantidade mais alta de PS20 (0,06% de PS20) não demonstravam risco de oxidação significativo (Tabela 5) e tampão de histidina é adequada para o uso para formular α -PDL1.

Tabela 5. Percentagem de oxidação de Trp e M²⁵³ em formulações selecionadas por mapa de peptídeos

Formulações selecionadas					% de Oxidação			
	Conc. (mg/mL)	Tampão (mM)	PS20 (%)	Pontos de tempo	W CDR HC2	W CDR HC4	W CDR HC10	LC27 M253
F1	50	His-Ace a 20 mM	0,04	T0	0,1	0,1	0,1	5,5
F3	40	His-Ace a 20 mM	0,06	25C, 2M	0,2	0,2	0,2	6,4
F10	120	His-Ace a 20 mM	0,06	25C, 2M	0,2	0,1	0,2	6,7
F11	50	25mM His- Ace	0,06	25C, 2M	0,2	0,2	0,2	6,6

Observação: Todas as formulações foram paradas por até 1 mês a 40°C. Análise foi realizada usando-se Peptide map,

W= Triptofano; M=Metionina

[0274] Para avaliar a degradação possível de PS20 na formulação na armazenagem, Formulações F1 a F10 (Tabela 4) foram paradas a 40°C por 1 mês, 25°C por 2 meses, 5°C por 2 meses ou 5° C por 6 meses, Nenhuma degradação de PS20 foi na formulações avaliadas em qualquer uma das temperaturas de armazenagem elevadas (*isto é*, 40°C e 25°C) e 5°C. Alteração do volume de carga das formulações selecionadas (*isto é*, F1, F2, F3, e F6) para 7 ml (carga alta) ou 4 ml (carga baixa) e então armazenagem a 5°C por 6 meses também teve um impacto significativo na taxa de degradação de PS20 (Fig. 5).

[0275] A formulação das partículas subvisíveis (SbVP) nas diferentes formulações quando armazenadas a 5°C por 6 meses foi avaliada pelo ensaio de HIAC como uma medida de estabilidade (Tabela 6). Nenhuma

mudança mensurável em SbVP foi observada na formulação testada.

Tabela 6. Dados de HIAC para a formação de SbVP depois de armazenagem de 6 meses a 5°C

Amostra	Ponto de tempo (mês)	Tamanho de partícula (contagens cumulativas/mL)			
		2 µM	5 µM	10 µM	25 µM
F1	0	802	193	61	5
	6	1190	278	80	6
F2	0	799	146	43	12
	6	370	112	29	2
F3	0	485	133	34	4
	6	163	52	14	2
F4	0	211	65	31	8
	6	181	48	8	1
F5	0	872	359	195	79
	6	340	89	23	1
F6	0	233	61	16	3
	6	116	34	16	3
F7	0	134	29	13	4
	6	144	42	9	0
F8	0	433	118	34	1
	6	564	98	23	2
F9	0	498	114	17	1
	6	144	21	6	0
F10	0	610	124	23	0
	6	248	75	28	3

Observação: Dois frascos de carga de 1 mL foram combinados entre si para realizar um ensaio de HIAC de volume pequeno.

[0276] Estabilidade das formulações foi ulteriormente investigada com uma experiência de congelamento descongelamento. Formulações F1 através de F10 (Tabela 4) foram submetidas a ou cinco ciclos de con-

gelamento e descongelamento durante a armazenagem a -20°C ou foram paradas em uma temperatura de armazenagem elevada de 5°C de 0 a 6 meses e subsequentemente foram analisadas por SEC e ICIEF para percentagem de monômero de α -PDL1 (Fig. 6A e B) e percentagem de pico principal na formulação (Fig. 6C e D). Nenhuma mudança significativa em por cento de monômero e por cento de pico principal foi observada depois dos ciclos de congelamento e descongelamento e armazenagem nos pontos de tempo indicados.

[0277] A estabilidade de substância de fármaco na formulação de F2 (Tabela 4) foi avaliada por condução de ciclo ciclos de congelamento e descongelamento durante a armazenagem em uma mini-lata de aço inoxidável a -20°C por até 6 meses seguido por medição de estabilidade por CAC, SEC, e ICIEF (Tabela 7). Nenhuma mudança foi observada depois de armazenagem de 6 meses a -20°C.

Tabela 7. Estabilidade de substância de fármaco em uma mini-lata de aço inoxidável armazenada a -20°C.

Pontos de tempo	Ciclos de F/T	Q12005 CAC Claridade	Q12589 SEC (% de monômero)	Q12631 ICIEF (% de pico principal)
T0	0	CL/SY	98,6	80,1
1M	1	CL/SY	98,6	79,1
2M	2	CL/SY	98,7	80,2
3M	3	CL/SY	98,8	80,9
6 M	5	CL/SY	98,6	80,2

Observação: F/T = congelamento/descongelamento; SY = levemente amarelo; CL = claro.

[0278] A estabilidade de substância de fármaco na formulação con-

tendo 100 mg/mL de α -PDL1, acetato de histidina a 20 mM, sacarose a 120 mM, 0,04% de PS20, pH 5,6 foi avaliada por condução de três ciclos de congelamento e descongelamento seguido por armazenagem em uma mini-lata de aço inoxidável ou mini-lata de hastelloy a -20°C, 5°C, ou 25°C por até 3 meses seguido por medição de estabilidade por SEC (Fig. 7A e B). Nenhuma diferença foi observada entre armazenagem de mini-latas de aço inoxidável e hastelloy a pH 5,6. A substância de fármaco era estável por até 3 meses a -20°C depois de três ciclos de congelamento descongelamento. Apesar das leves diferenças em mini-latas de aço inoxidável e de hastelloy, ambas eram apropriadas para o uso para a armazenagem de substância de fármaco.

[0279] A estabilidade de produto de fármaco na formulação contendo 50 mg/mL α -PDL1, acetato de histidina a 20 mM, sacarose a 120 mM, 0,04% de PS20, pH 5,6 foi avaliada como armazenada como uma carga de 16 mL em um frasco de 20cc a -5°C, 25°C, ou 40°C por até 3 meses seguido por medição de estabilidade com SEC e ICIEF (Fig. 8A e B). Nenhuma mudança foi observada a 5°C depois de três meses de armazenagem. A taxa de degradação de pH 5,6 por mês a 40°C foi de 0,66% e de 22% por análise de SEC e de ICIEF, respectivamente.

[0280] Avaliação do tampão na formulação de F12 indicava que o tampão de acetato de sódio proveu estabilidade de proteína similar como tampão de acetato de histidina, com base em taxas de degradação de pico principal medidas por SE-HPLC e ICIEF (Tabela 8). As duas formulações testadas foram de 50 mg/mL α -PDL1 em L-acetato de histidina a 20 mM, sacarose a 120 mM, e 0,04%(p/v) polissorbato 20 a pH 5,5 e 0 mg/mL de α -PDL1 em acetato de sódio a 20 mM, sacarose a 120 mM, e 0,04%(p/v) de polissorbato 20 a pH 5,5.

Tabela 8. Taxas de degradação de ordem zero de α -PDL1 para pico principal de ICIEF e SE-HPLC nos tampões de acetato de histidina e de acetato de sódio a 40°C

Concentração de α -PDL1 (mg/mL)	Taxa de % de diminuição de pico principal por mês	
	ICIEF	SE-HPLC
Acetato de histidina	23	0,67
Acetato de sódio	21	0,74

Observação: Todas as formulações foram paradas por até 1 mês a 40°C.

[0281] Além de tudo, os estudos de estabilidade projetada de DoE revelaram que a 40°C nenhum impacto significativo de concentração na perda de pico principal foi observada por ICIEF, embora pH mais baixo tenham uma perda de pico principal levemente mais baixa (Fig. 1A-B). A 40°C nenhuma interação significativa foi observada por qualquer SE-HPLC, no entanto, quanto as formulações de concentração mais alta mostram uma perda de monômero mais rápida (Fig. 3A-B). Foi também encontrado que pH mais baixo tem uma perda de taxa de monômero mais rápida. Resultados similares foram observados a 25°C (Fig. 2A-B e Fig. 4A-B). A análise estatística revelou nenhuma interação praticamente significativa (ligação) entre quaisquer parâmetros de formulação testados.

Estudos de estresse térmico e agitação

[0282] Estabilidade do produto de fármaco na presença de concentrações aumentadas de PS20 quando do sofrimento de estresse de agitação em frascos de vidros foi investigada. A formulação contendo 57 mg/mL em acetato de histidina a 20 mM, sacarose a 120 mM, pH 5,5 foi avaliada em uma carga de 1 mL em frascos de vidro de 2cc com várias concentrações de PS20 que variam de 0,005% a 0,06%. Frascos de vidro foram agitados a 70 rpm por 3 dias a temperatura ambiente antes da me-

dição da estabilidade por medições de SEC (Fig. 9A) e turvação (Fig. 9B). Formulação com níveis de PS20 entre 0,005-0,06% não tinha nenhuma mudança na estabilidade durante agitação. No entanto, formulações que carecem de PS20 mostrou um aumento na perda de monômero devido a um aumento de HMWS. Nesta experiência, 0,005% de PS20 foi suficiente para proteger proteína contra estresse de agitação em frascos de vidro.

[0283] Estabilidade das formulações de produto de fármaco (Tabela 4) quando armazenadas em várias temperatura e tempo e então sofrendo estresse de agitação em frascos de vidro foi investigada. Formulações F1-F10 foram cada uma avaliadas em uma carga de 1 mL em frasco de vidro de 2cc. Frascos de vidro foram agitados a 70 rpm por 1 dia a temperatura ambiente antes da medição da estabilidade por SEC (Fig. 10). Nesta experiência, agitação não tem impacto na estabilidade do produto de fármaco quando armazenado por um período de tempo a 40°C, 25°C ou 5°C.

[0284] A fim de suportar o transporte de bolsa IV que frequentemente ocorre nos ambientes hospitalares, um estudo de agitação de bolsa IV foi realizado com α -PDL1 formulado em acetato de histidina a 20 mM, sacarose a 240 mM, pH 5,5 com de 0,005%- 0,02% (p/v) de polissorbato 20. As bolsas IV mais comumente disponíveis de 250 mL de cloreto de polivinila (PVC) ou poliolefina (PO) contendo solução de cloreto de sódio isotônica (0,9% de NaCl) foram avaliadas por injeção de 400-600 mg de soluções de α -PDL1 e foram agitadas usando-se agitador orbital a 100rpm a 5°C por até 6 horas. Os resultados do estudo suportavam uma administração dosada com base em peso e demonstravam que um mínimo de 0,015% (p/v) de polissorbato 20 na solução de proteína é necessária a fim de prevenir formação de partículas visíveis (relacionada com precipi-

tação de proteína) durante o transporte (Tabela 9), além disso, para to mitigar o risco de degradação de polissorbato 20 no período de vida de prateleira, a concentração de polissorbato 20 foi aumentada de 0,02% (p/v) para 0,04%(p/v),

Tabela 9. Estudo de agitação da bolsa IV com quantidades diferentes de PS20 no produto de fármaco de α -PDL1

% de PS20 em DP	Amostras	CAC	SE-HPLC		Partículas sub-visíveis(ppmL)	
			% de HMWS	% de Monômero	≥10um	≥25um
0,005%	bolsa de PO de 250 ml, T0	CO, CL, PFVP	NT	NT	NT	NT
	bolsa de PO de 250 ml, agitação at 5°C for 2 horas	Partículas visíveis observadas Experiência parada	NT	NT	NT	NT
	bolsa de PVC de 250 ml, T0	CO, CL, PFVP	NT	NT	NT	NT
	bolsa de PVC de 250 ml, agitação a 5°C por 2 horas	Partículas visíveis observadas Experiência parada	NT	NT	NT	NT
0,01%	bolsa de PO de 250 ml, T0	CO, CL, PFVP	NT	NT	NT	NT
	bolsa de PO de 250 ml, agitação a 5°C por 2 horas	Partículas visíveis observadas Experiência parada	NT	NT	NT	NT
	bolsa de PVC de 250 ml, T0	CO, CL, PFVP	NT	NT	NT	NT
	bolsa de PVC de 250 ml, agitação a 5°C por 4 horas	CO, CL, PFVP	NT	NT	NT	NT
0,015%	bolsa de PO de 250 ml, T0	CO, CL, PFVP	1,2	98,8	21	2
	bolsa de PO de 250 ml, agitação a 5°C por 4 horas	CO, CL, PFVP	1,3	98,7	195	19
	bolsa de PVC de 250 ml, T0	CO, CL, PFVP	1,2	98,8	16	0
	bolsa de PVC de 250 ml, agitação a 5°C por 4 horas	CO, CL, PFVP	1,2	98,8	24	2

Observação: Todas as formulações 50 mg/mL α -PDL1 in L-acetato de

histidina a 20 mM, sacarose a 240 mM a pH 5,5. Análise foi realizada usando-se SE-HPLC, NT= não testado; CAC = cor, aparência e claridade; CO=Incolor; CL=Claro; PFVP = Particularmente livre de partículas visíveis,

Avaliação de estabilidade das formulações de α -PDL1

[0285] Uma triagem de pH adicional foi conduzida sobre os materiais produzidos a partir de um Banco de Células mestre ("Master Cell Bank") e um Banco de Células de Trabalho ("Working Cell Bank") através de uma faixa de pH de 5,2 a 6,3 na formulação contendo acetato de histidina a 20 mM, sacarose a 120 mM, e 0,04% de PS20 (Tabela 10). Análise por SE-HPLC e ICIEF mostravam que pH 5,7 -6,3 era quimicamente e fisicamente razoavelmente estável e uma faixa permitida de pH 5,5 -6,3 na formulação era apropriada (Fig. 11A e B). Taxas de degradação de pico principal e monômero de pH mais alto, com taxas que se fixam entre cerca de pH 5,7 e 6,3.

Tabela 10. Triagem de pH das Formulações

Concentração (mg/mL)	pH	recipiente	Temperatura (°C)	Pontos de tempo
120	5,2, 5,7, 6,0, 6,3	carga de 1mL em frasco de 2cc	40	T0, 1 semana, 2 semanas, 1 mês
40	5,2, 5,7, 6,0, 6,3	carga de 1mL em frasco de 2cc	40	T0, semana, 2 semanas, 1 mês

[0286] O efeito de experiências de formulação na oxidação de triptofano (W) e metionina (M) nas formulações de α -PDL1 formulações foi investigado. Mapeamentos de peptídeos mostraram que não havia nenhum aumento de oxidação significativa. Formulações contendo acetato de histidina a 20 mM, sacarose a 120 mM, 0,04% de PS20 com um pH de solução de 5,8 mostrou nenhum aumento de oxidação de triptofano e me-

tionina evidente quando uma formulação foi armazenada por um mês a temperaturas elevadas ou para o produto de fármaco ou substância de fármaco (Tabela 11),

Tabela 11. Percentagem de oxidação de Trp, M²⁵³ e M⁴²⁹ nas formulações selecionadas por mapa de peptídeos

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

Observação: Todas as formulações de α -PDL1 continham L-acetato de histidina a 20 mM, sacarose a 120 mM, 0,04% de PS20, pH 5,8.

[0287] Com base no resultado estes estudos de formulação e análise estatística, uma formulação líquida que consiste em 60 mg/mL de α -PDL1 em acetato de histidina a 20 mM, sacarose a 120 mM, 0,04% de polissorbatato 20 com um alvo pH 5,8 foi selecionado para os estudos clínicos.

[0288] A dosagem para experiências clínicas será conduzida como uma dose fixa de 1200 mg de α -PDL1 por paciente. Uma configuração de frasco de carga nominal de 20 mL (1200 mg de α -PDL1) em um frasco de vidro de 20cc foi selecionada para satisfazer o perfil de produto alvo.

[0289] Estudos de congelamento/descongelamento foram conduzidos com a formulação pretendida contendo 60 mg/mL de α -PDL1 em L-acetato de histidina a 20 mM, sacarose a 120 mM, e 0,02% (p/v) de polissorbatato 20 a pH 5,8. Resultados de ensaio depois de cinco ciclos de congelamento/descongelamento confirmaram 120 mM de sacarose protegi-

am α -PDL1 contra agregação induzida por congelamento/descongelamento (Tabela 12). Similarmente a estabilidade de longo prazo da formulação de líquido pretendida indicava que é estável por um período de 6 meses a 2-8°C (Tabela 13). Monitoramento contínuo no período de 36 meses está a caminho para essa formulação. Formulação alvo e faixas de estudo testadas para produto de fármaco e substância de fármaco de α -PDL1 são mostradas na Tabela 14.

Tabela 12. Dados de estabilidade de congelamento/descongelamento representativos para carga de desenvolvimento de substância de fármaco de α -PDL1

No. Ciclos de congelamento-descongelamento	CAC	Concentração (mg/mL)	pH	ICIEF			SE-HPLC			CE SDS NGS (não reduzido)			Potência (% atividade específica)
				Região ácida (% de área)	Pico principal (% de área)	Região básica (% de área)	Soma de formas de HMW (% de área)	Monômero (% de área)	Soma de Formas de LMW (% de área)	Soma de Pré-picos (% CPA)	Pico principal (% CPA)	Soma de Pós-picos (% CPA)	
NA	CL/SY/PFVP	60,1	5,9	19	78	3	0,5	99,4	0,1	2,9	97,0	0,1	107
5	CL/SY/PFVP	62,0	5,9	20	77	3	0,5	99,4	0,1	2,7	97,1	0,2	111

Observação: Carga PP400L-02142013 contém 60 mg/mL de α -PDL1 em L-acetato de histidina a 20 mM, sacarose a 120 mM, e 0,04%(p/v) de polissorbato 20 a pH 5,8, CL=Claro; SY=Levemente amarelo; PFVP = Particularmente livre de partículas visíveis; NA = não aplicável, ICIEF = focalização isoeletrica capilar fotografada; CE-SDS = eletroforese capilar sulfato de dodecila de sódio; HMW=alto peso molecular; LMW=baixo peso molecular.

Tabela 14. Faixas de formulação alvo e estudo testado para produto de fármaco e substância de fármaco de α -PDL1

Parâmetro	Alvo	Faixa de formulação testada
concentração de α -PDL1	60 mg/mL	40–120 mg/mL
concentração de L-Acetato de histidina	20 mM	20 mM
pH da solução	5,8	5,0–6,0
Concentração de sacarose	120 mM	0-240 mM
concentração de Polissorbato 20 (p/v)	0,04%	0,005%–0,06% ^a

[0290] Uma vez que o produto de fármaco de α -PDL1 (60 mg/mL) será administrado por infusão depois da diluição na solução de cloreto de sódio isotônica (0,9% NaCl), compatibilidade e estabilidade do ingrediente ativo foram testadas sob as seguintes condições de administração e preparação simuladas: 1) Diluição produto de fármaco de α -PDL1 em bolsas de infusão contendo 0,9% de NaCl na faixa de 2,4 – 9,6 mg/ml de (concentração nominal depois da diluição) para cobrir a faixa de dose ciclo estudo clínico; 2) Exposição de longo prazo a bolsas de infusão contendo solução de cloreto de sódio isotônica (material de superfície de contato de produto de bolsa que consiste em PVC ou Poliolefina); 3) Uso de linhas de infusão IV com (superfícies de contato de produto de PVC ou poliolefina); e 4) Uso de filtros em série de 0,2 μ m (membrana de filtro de PES),

[0291] Amostras foram testadas depois de 24 horas de armazenagem a 2°C–8°C ou depois de 24 horas a 30°C com exposição a luz difundida. As amostras foram testadas usando-se estabilidade apropriada que indica métodos incluindo: pureza por SE-HPLC e ICIEF, concentração de proteínas (por UV), partículas subvisíveis por obscurecimento de luz, color, claridade/opalescência, e pH (Tabela 15).

Tabela 15. Estabilidade de α -PDL1 diluído e armazenado a 5°C ou 30°C por 24 horas em 0,9% de NaCl bolsas de infusão com e sem filtros em série de 0,2 μ m

Amostra	CAC	Concen- tração (mg/mL)	Turva- çãoA ₃₅₀	ICIEF		SE-HPLC						Partículas (con- tagens/mL)	
				% de	% de	% de	% de	% de	% de	% de			
											Ácido	de Pico principal	Basic
2,4 mg/mL em bolsa de PVC, T0	CL, CO, PFVP	2,1	0,01	19,5	75,7	4,8	0,4	99,5	0,1	5,9	25	1	
2,4 mg/mL em bolsa de PVC, t=5°C, 24 hrs depois da infusão	CL, CO, PFVP	2,2	0,02	19,6	75,5	4,9	0,4	99,5	0,1	5,8	32	0	
2,4 mg/mL em bolsa de PVC, t=30°C, 24 hrs depois da infusão	CL, CO, PFVP	2,2	0,01	19,3	76,6	4,1	0,3	99,5	0,1	5,8	32	0	
2,4 mg/mL em bolsa de PVC, t=5°C, 24hrs, passando através de sistema de infusão sem filtro em série	CL, CO, PFVP	2,1	0,04	19,5	76,4	4,1	0,4	99,5	0,1	5,8	44	1	
2,4 mg/mL em bolsa de PVC, t=5°C, 24hrs, passando através de sistema de infusão com filtro em sérier	CL, CO, PFVP	2,1	0,01	19,3	76,7	4,1	0,3	99,5	0,1	5,9	4	0	
2,4 mg/mL em bolsa de PVC, t=30°C, 24hrs passando através de sistema de infusão sem filtro em série	CL, CO, PFVP	2,1	0,02	20,0	75,7	4,3	0,3	99,6	0,1	5,9	29	0	
2,4 mg/mL em bolsa de PVC, t=30°C,24hrs passando através de sistema de infusão com filtro em sérier	CL, CO, PFVP	2,0	0,04	19,5	76,4	4,1	0,3	99,6	0,1	6,0	5	0	

Tabela 15 (cont.): Estabilidade de α -PDL1 diluído e armazenado a 5°C ou 30°C por 24 horas em 0,9% NaCl bolsas de infusão with and without 0,2 μ m in-line filters

Amostra	CAC	Concen- tração (mg/mL)	Tur- vação _{A₃₅₀}	ICIEF		SE-HPLC						Partículas (ppmL)	
				% Ácido	% de Pico principal	% Basic	% HMWS	% de Monômero	% de LMWS	pH		≥10um	≥25um
2,4 mg/mL em bolsa de PO, T0	CL, CO, PFVP	2,1	0,01	18,6	77,3	4,1	0,4	99,5	0,1	6,1		5	0
2,4 mg/mL em bolsa de PO, t=5°C, 24 hrs depois da infusão	CL, CO, PFVP	2,1	0,03	17,8	77,8	4,4	0,4	99,5	0,1	5,9		3	0
2,4 mg/mL em bolsa de PO, t=30°C, 24 hrs depois da infusão	CL, CO, PFVP	2,1	0,02	20,6	75,3	4,1	0,3	99,5	0,1	5,9		8	0
2,4 mg/mL em bolsa de PO, t=5°C, 24hrs, passando através de sistema de infusão sem filtro em série	CL, CO, PFVP	2,1	0,01	20,5	75,3	4,2	0,4	99,5	0,1	5,9		48	0
2,4 mg/mL em bolsa de PO, t=5°C, 24hrs, passando através de sistema de infusão com filtro em sériar	CL, CO, PFVP	2,1	0,02	21,0	74,8	4,3	0,4	99,5	0,1	5,9		1	0
2,4 mg/mL em bolsa de PO, t=30°C, 24hrs passando através de sistema de infusão sem filtro em série	CL, CO, PFVP	2,1	0,01	18,7	76,9	4,4	0,3	99,5	0,1	5,9		22	0
2,4 mg/mL em bolsa de PO, t=30°C, 24hrs passando através de sistema de infusão com filtro em sériar	CL, CO, PFVP	2,1	0,01	21,2	73,9	4,9	0,4	99,5	0,1	6,0		0	0

CO=Incolor, CL=Claro, PFVP = Particularmente livre de partículas visíveis, A₃₅₀=absorbância a 350 nm

Tabela 15 (cont.): Estabilidade de α -PDL1 diluído e armazenado a 5°C ou 30°C por 24 hor as em bolsas de infusão de 0,9% NaCl com e sem filtros em série de 0,2 μ m

Amostra	CAC	Concen- tração (mg/mL)	Tur- vação A ₃₅₀	ICIEF		SE-HPLC						partículas (ppmL)	
				%	de	%	%	de	%	de	%		
												Ácido	Pico principal
9,6 mg/mL em bolsa de PVC, T0	CL, CO, PFVP	8,7	0,05	18,3	77,3	4,4	0,4	99,5	0,1	5,9	35	0	
9,6 mg/mL em bolsa de PVC, t=5°C, 24 hrs depois da infusão	CL, CO, PFVP	8,6	0,03	19,0	76,8	4,2	0,4	9,5	0,1	5,9	6	1	
9,6 mg/mL em bolsa de PVC, t=30°C, 24 hrs depois da infusão	CL, CO, PFVP	8,5	0,05	18,9	77,0	4,1	0,4	99,5	0,2	5,9	10	0	
9,6 mg/mL em bolsa de PVC, t=5°C, 24hrs, passando através de sistema de infusão sem filtro em série	CL, CO, PFVP	8,8	0,03	19,2	76,4	4,4	0,3	99,6	0,1	6,0	29	0	
9,6 mg/mL em bolsa de PVC, t=5°C, 24hrs, passando através de sistema de infusão com filtro em sérier	CL, CO, PFVP	8,7	0,06	19,0	77,1	3,9	0,3	99,6	0,1	5,9	18	0	
9,6 mg/mL em bolsa de PVC, t=30°C, 24hrs passando através de sistema de infusão sem filtro em série	CL, CO, PFVP	8,1	0,04	19,1	76,6	4,3	0,4	99,5	0,2	6,0	8	0	
9,6 mg/mL em bolsa de PVC, t=30°C, 24hrs passando através de sistema de infusão com filtro em sérier	CL, CO, PFVP	8,8	0,04	19,6	76,4	4,0	0,3	99,6	0,1	5,9	19	2	

Tabela 15 (cont.): Estabilidade de α -PDL1 diluído e armazenado a 5°C ou 30°C para 24 horas em bolsas de infusão de 0,9% de NaCl com e sem filtros em série de 0,2 μ m

Amostra	CAC	Concen- tração (mg/mL)	Tur- vação A_{350}	ICIEF		SE-HPLC					Partículas (con- tagens/mL)	
				% Ácido	% de Pico principal	% Basic	% HMWS	% de Monômero	% de LMWS	pH	≥10 μ m	≥25 μ m
9,6 mg/mL em bolsa de PO, T0	CL, CO, PFVP	8,4	0,03	18,6	78,0	3,4	0,4	99,5	0,1	5,8	33	2
9,6 mg/mL em bolsa de PO, t=5°C, 24 hrs depois da infusão	CL, CO, PFVP	8,6	0,04	19,2	76,4	4,4	0,4	99,5	0,1	5,9	32	0
9,6 mg/mL em bolsa de PO, t=30°C, 24 hrs depois da infusão	CL, CO, PFVP	8,7	0,04	19,3	76,7	4,0	0,4	99,5	0,1	5,9	18	0
9,6 mg/mL em bolsa de PO, t=5°C, 24hrs, passando através de siste- ma de infusão sem filtro em série	CL, CO, PFVP	8,5	0,05	19,8	75,8	4,5	0,4	99,5	0,1	5,9	38	1
9,6 mg/mL em bolsa de PO, t=5°C, 24hrs, passando através de siste- ma de infusão com filtro em sériar	CL, CO, PFVP	8,2	0,04	18,6	77,2	4,3	0,3	99,5	0,1	5,8	8	0
9,6 mg/mL em bolsa de PO, t=30°C, 24hrs passando através de sistema de infusão sem filtro em série	CL, CO, PFVP	8,5	0,03	19,4	76,0	4,6	0,4	99,5	0,1	5,9	48	7
9,6 mg/mL em bolsa de PO, t=30°C, 24hrs passando através de sistema de infusão com filtro em sériar	CL, CO, PFVP	8,0	0,05	19,7	76,1	4,2	0,3	99,5	0,1	5,8	10	0

CO=Incolor, CL=Claro, PFVP = Particularmente livre de partículas visíveis, A_{350} =absorbância a 350 nm

Tabela 16. Estabilidade de agitação de α -PDL1 diluída em bolsas de infusão de 0,9% NaCl a 5°C por até 6 horas

Amostra	CAC	Concen- tração (mg/mL)	Turvação A_{350}	ICIEF		SE-HPLC					partículas (con- tagens/mL)	
				% Ácido	% de Pico principal	% Básico	% HMWS	% de Monômero	% de LMWS	% de pH	≥10um	≥25um
2,4 mg/mL em bolsa de PO, T0	CL, CO, PFVP	2,13	0,02	17,5	79,1	3,4	0,8	99,1	0,1	5,9	3	0
2,4 mg/mL em bolsa de PO, agitação por 2 hrs	CL, CO, PFVP	2,09	0,01	17,1	79,8	3,1	0,8	99,1	0,1	5,9	113	2
2,4 mg/mL em bolsa de PO, CL, CO, PFVP agitação por 4 hrs		2,12	0,02	17,3	79,6	3,1	0,8	99,1	0,1	5,9	31	0
2,4 mg/mL em bolsa de PO, CL, CO, PFVP agitação por 6 hrs		2,02	0,02	16,8	79,6	3,6	0,8	99,1	0,1	5,9	4	1
2,4 mg/mL em bolsa de PVC, T0	CL, CO, PFVP	2,42	0,02	17,9	78,6	3,5	0,8	99,1	0,1	5,9	6	0
2,4 mg/mL em bolsa de PVC, agitação por 2 hrs	CL, CO, PFVP	2,04	0,02	17,6	79,2	3,2	0,8	99,1	0,1	5,9	22	1
2,4 mg/mL em bolsa de PVC, agitação por 4 hrs	CL, CO, PFVP	2,10	0,03	18,5	78,0	3,6	0,8	99,1	0,1	5,9	22	1
2,4 mg/mL em bolsa de PVC, CL, CO, PFVP agitação por 6 hrs		2,05	0,01	18,6	78,2	3,3	0,8	99,1	0,1	5,9	10	0

CO=Incolor, CL=Claro, PFVP = Particularmente livre de partículas visíveis, A_{350} =absorbância a 350 nm

[0292] O produto testado nos estudos de administração simulados como descritos acima foi fisicamente e quimicamente estável como descrito acima sob as condições testadas. Bolsas de infusão, sistema de infusões, filtros, e/ou auxiliares de administração de IV constituídos de diferentes materiais de contato de produto são adicionados na qualificação com sucesso.

[0293] Além da estabilidade estática, um estudo de bolsa de agitação IV é realizado com α -PDL1 formulado em acetato de histidina a 20 mM, sacarose a 120 mM, pH 5,8 com 0,02% de PS20, que é potencialmente o nível de PS20 mais baixo que poderia ser observado em um produto de fármaco no período de vida de prateleira. A agitação é realizada a 2-8°C com agitador orbital a velocidade de 100 rpm. Os dados sugerem que com 0,02% de PS20 no produto de fármaco, α -PDL1 é estável na agitação a 5°C depois da diluição nas bolsas IV (Tabela 16).

[0294] *Sequências dos anticorpos usadas nos Exemplos*

Região variável de cadeia leve de α -PDL1

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVSTAVAWYQQK-
PGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTSS-
LQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 7)

Região variável de cadeia pesada de α -PDL1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVR-
QAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAY-
LQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLLTVSSASTK
(SEQ ID NO: 8)

Cadeia leve completa de α -PDL1

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVSTAVAWYQQK-
PGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTSS-
LQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS-
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE-

QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN-
GEC (SEQ ID NO: 9)

Cadeia pesada de complete de PDL1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVR-
QAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAY-
LQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVTVSSASTKG-
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL-
TSGVHTFPAVLQSSGLISLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT-
KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS-
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE-
QYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA-
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN-
GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN-
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 10)

REIVINDICAÇÕES

1. Formulação farmacêutica aquosa estável, caracterizada pelo fato de que compreende

o dito anticorpo monoclonal de anti-PDL1 em uma quantidade de 60 mg/mL, acetato de histidina em uma concentração de 20 mM, sacarose em uma concentração de 120 mM, e polissorbato 20 em uma concentração de 0,04% (p/v), e um pH de 5,8,

em que o dito anticorpo monoclonal compreende uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:7, e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:32; e é um anticorpo humanizado de IgG1.

2. Formulação, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o dito anticorpo monoclonal não está sujeito a liofilização anterior.

3. Formulação, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que o dito anticorpo monoclonal compreende uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:9, e uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:10.

4. Formulação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que o dito anticorpo monoclonal é armazenado em um frasco de vidro ou um recipiente de liga de metal, opcionalmente sendo que a liga de metal é de aço inoxidável 316L ou hastelloy.

5. Formulação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que a formulação é estável a 2-8°C por pelo menos 6 meses, pelo menos 12 meses, pelo menos 18 meses ou pelo menos 24 meses.

6. Formulação, de acordo com a reivindicação 5,

caracterizada pelo fato de que o anticorpo na formulação retém pelo menos cerca de 80% de sua atividade biológica depois da armazenagem.

7. Formulação, de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de que a atividade biológica é medida por ligação de anticorpo a PD-L1.

8. Formulação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo fato de que é estéril.

9. Formulação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizada pelo fato de que é adequada para ser administrada a um indivíduo, opcionalmente para uma administração intravenosa (IV).

10. Artigo de fabricação, caracterizado pelo fato de que compreende um recipiente que retém a formulação farmacêutica aquosa estável, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 9.

11. Artigo, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o recipiente é um frasco de vidro ou um recipiente de liga de metal, opcionalmente sendo que a liga de metal é aço inoxidável 316L ou hastelloy.

12. Composição para o tratamento de uma doença ou um distúrbio em um indivíduo, caracterizada pelo fato de que compreende uma quantidade eficaz da formulação, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 9, sendo que a doença ou distúrbio é selecionado do grupo que consiste em infecção, câncer, e doença inflamatória.

13. Formulação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizada pelo fato de que o anticorpo monoclonal compreende uma substituição de N297A ou D265A/N297A na região constante, e a numeração do resíduo é aquela do índice EU como em Kabat.

14. Formulação de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a dita formulação compreende anticorpo monoclonal em uma concentração de cerca de 60 mg/mL, acetato de histidina em uma concentração de 20 mM, sacarose em uma concentração de cerca de 120 mM, polissorbato 20 em uma concentração de 0,04% (p/v), e tem pH de 5,8; em que o dito anticorpo monoclonal compreende uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:9, e uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

15. Uso de um anticorpo monoclonal de anti-PDL1, de um acetato de histidina ou acetato de sódio, de sacarose, e de polissorbato, caracterizado pelo fato de que é para fabricação de uma formulação farmacêutica aquosa estável, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 9 e 12 a 14, para o tratamento de uma doença ou um distúrbio em um indivíduo, sendo que a doença ou distúrbio é selecionado do grupo que consiste em infecção, câncer, e doença inflamatória.

FIG. 1A

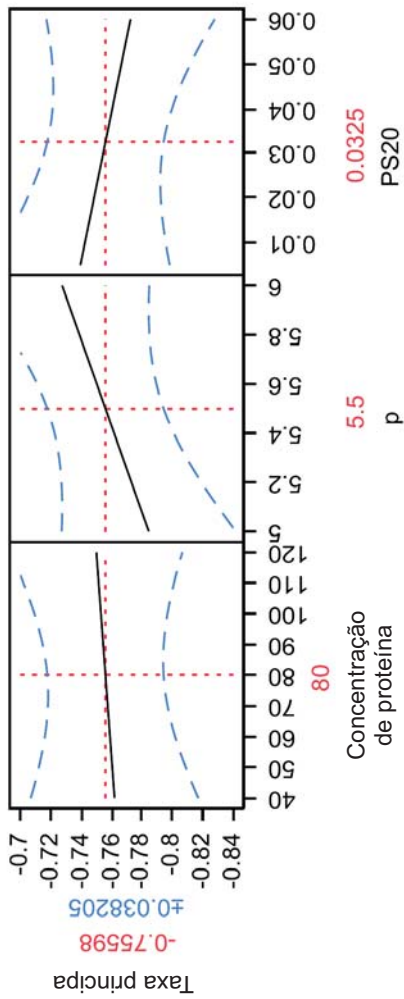


FIG. 1B

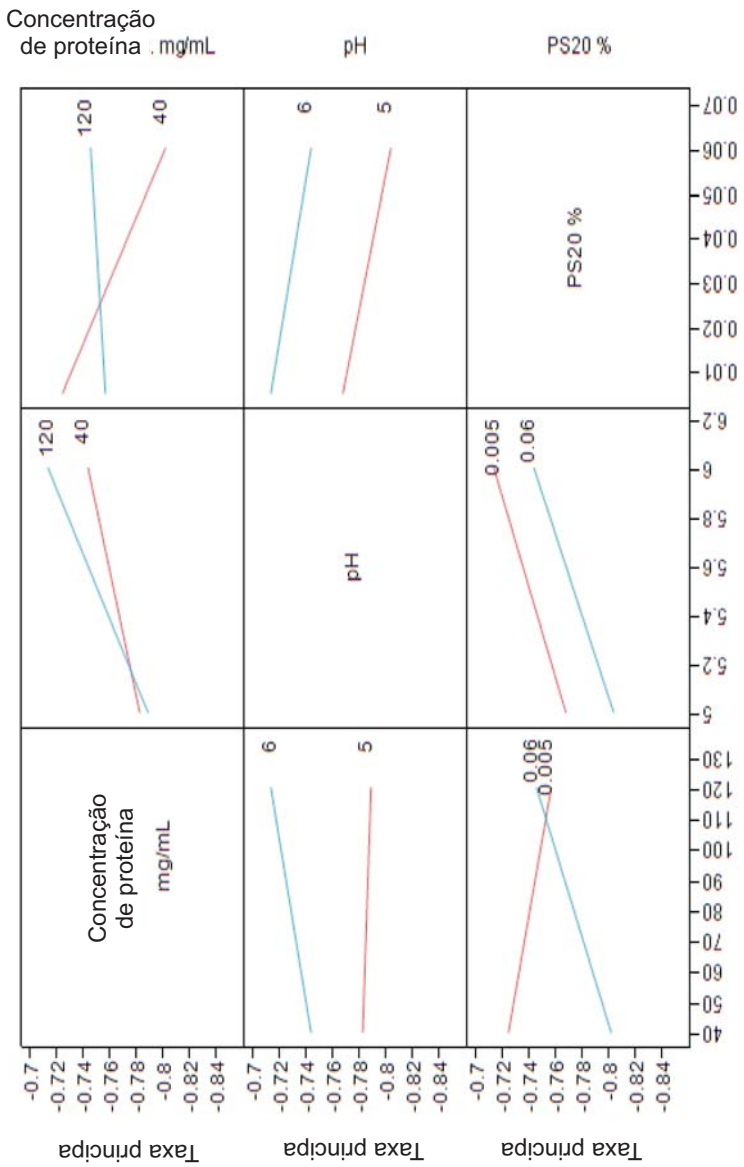


FIG. 2A

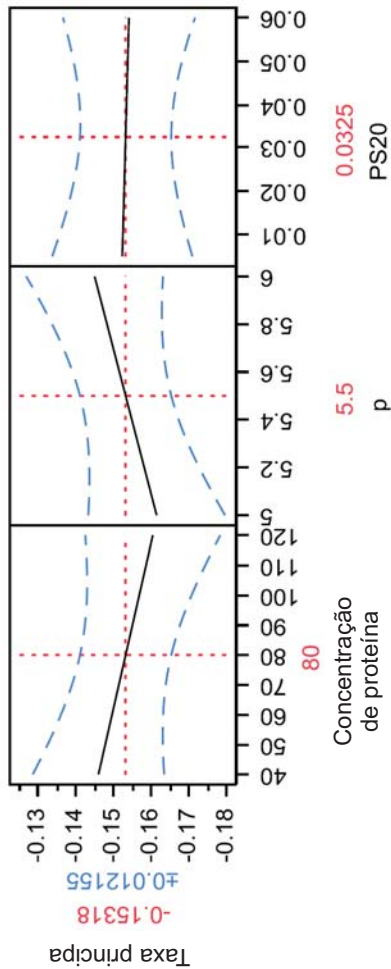


FIG. 2B

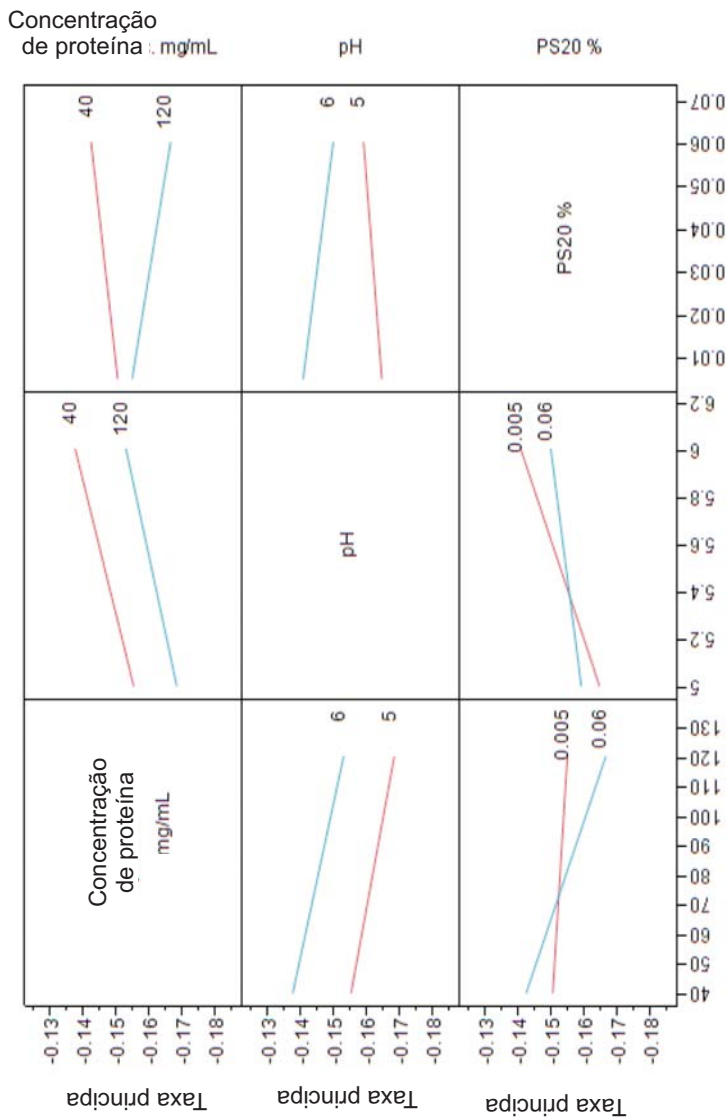


FIG. 3A

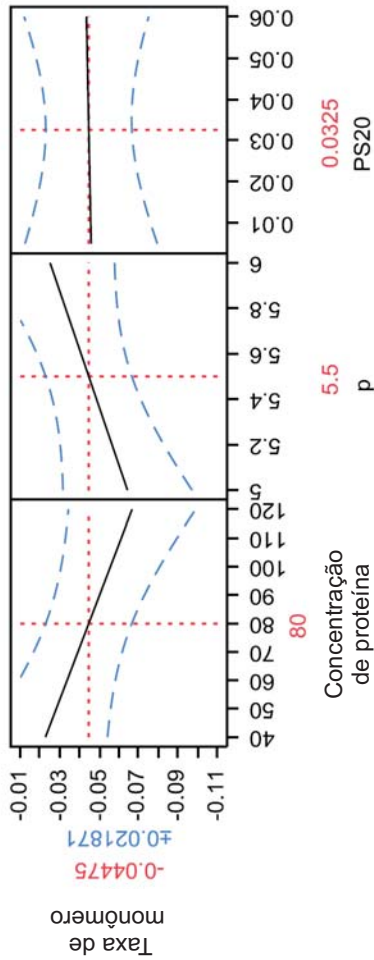


FIG. 3B

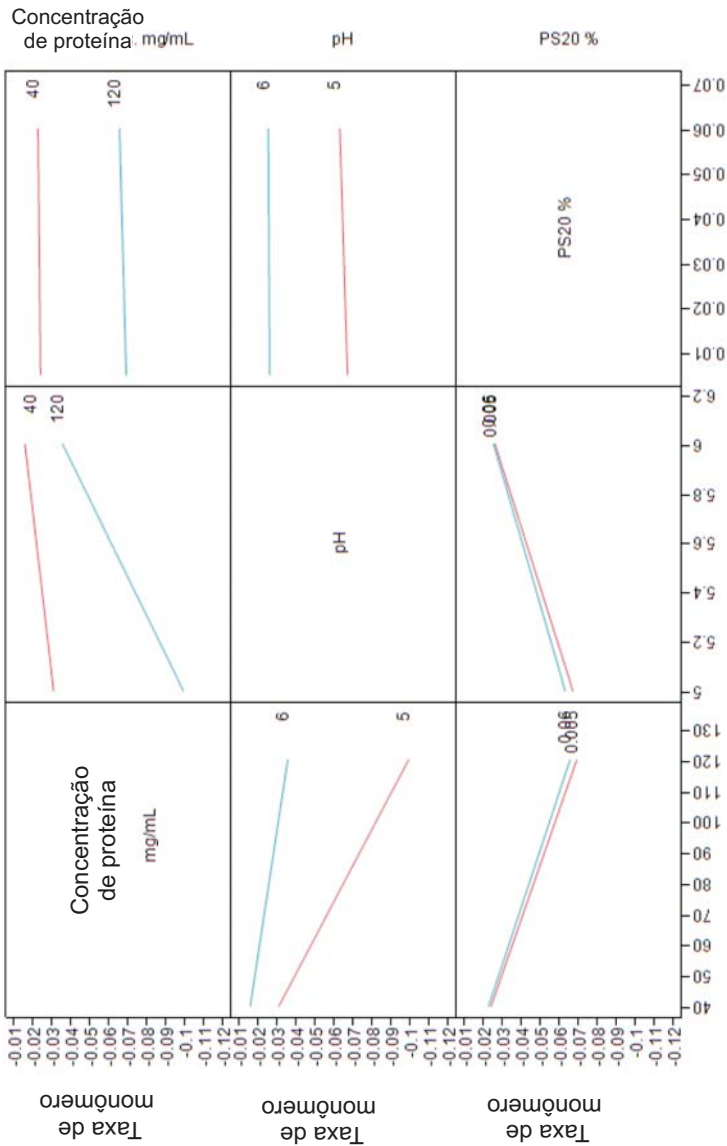


FIG. 4A

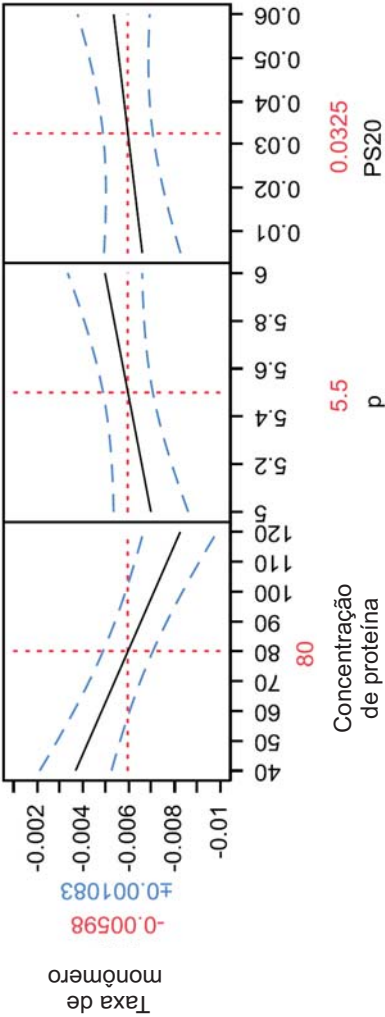


FIG. 4B

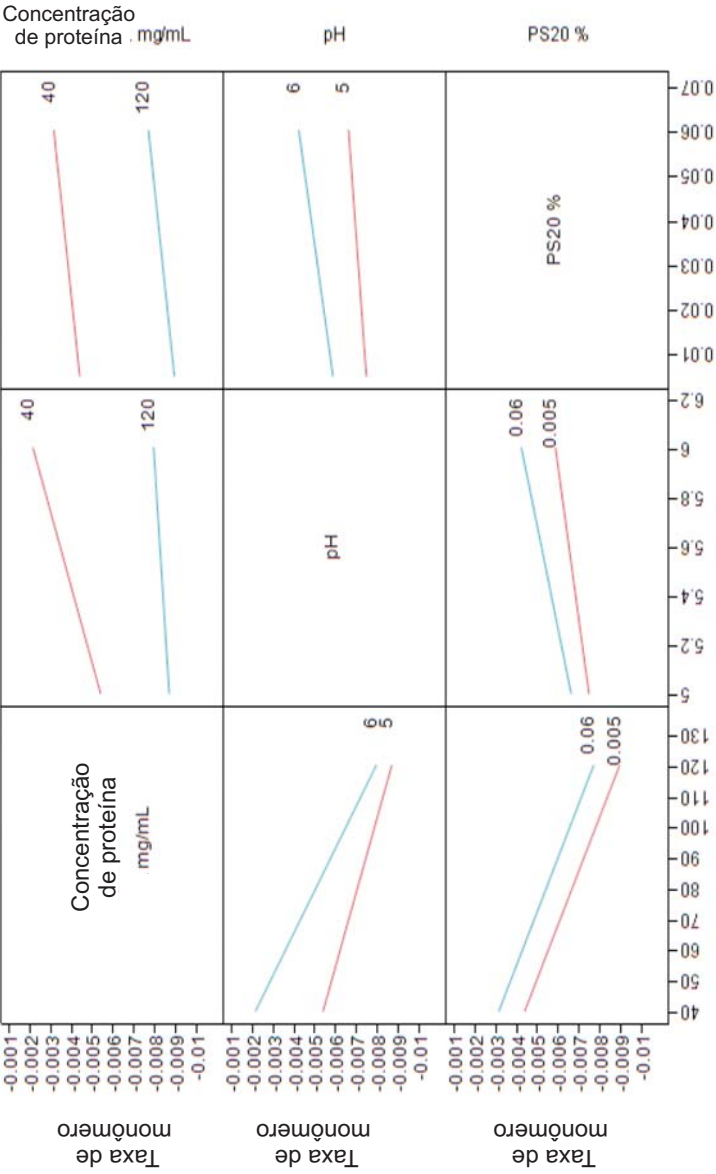


FIG. 5

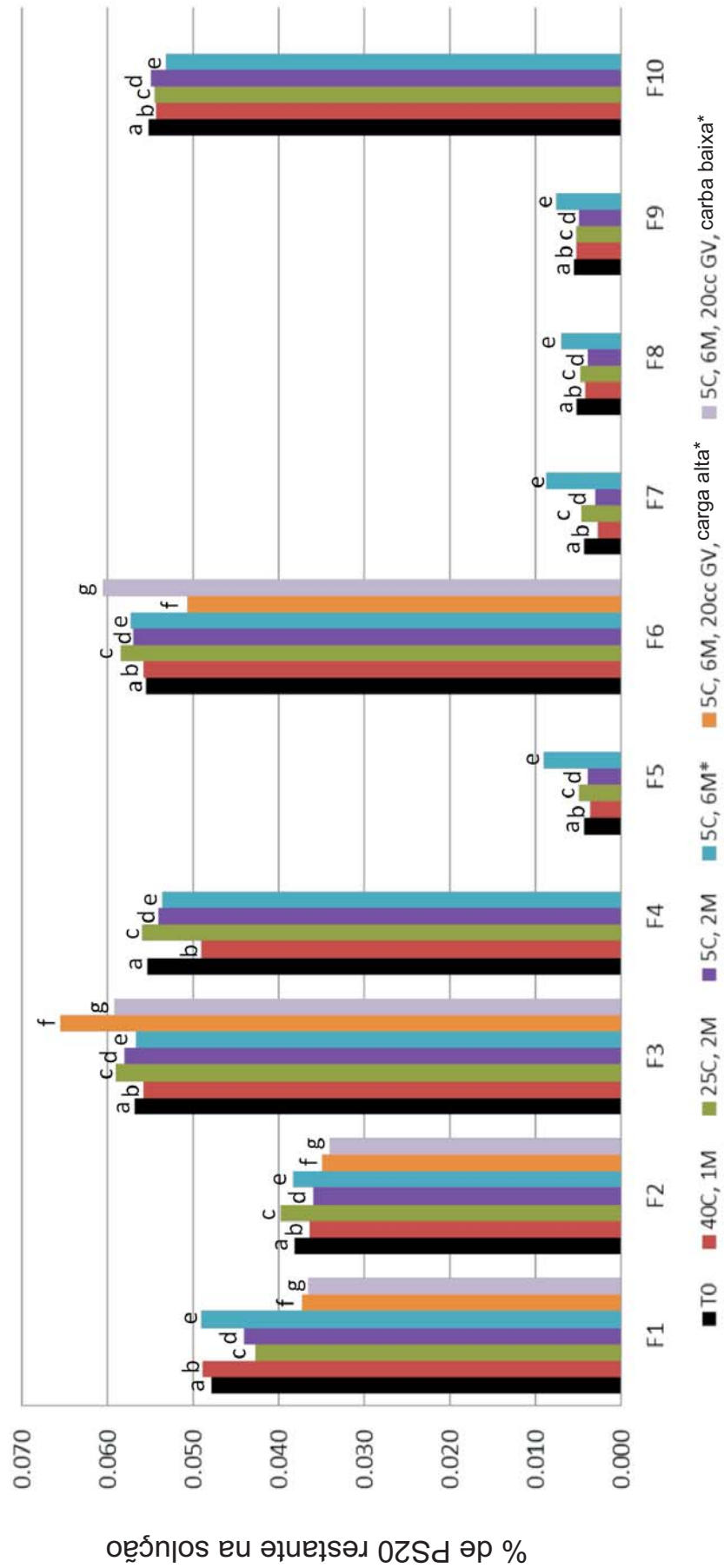


FIG. 6A

% de monômero a – 20°C (em GV)

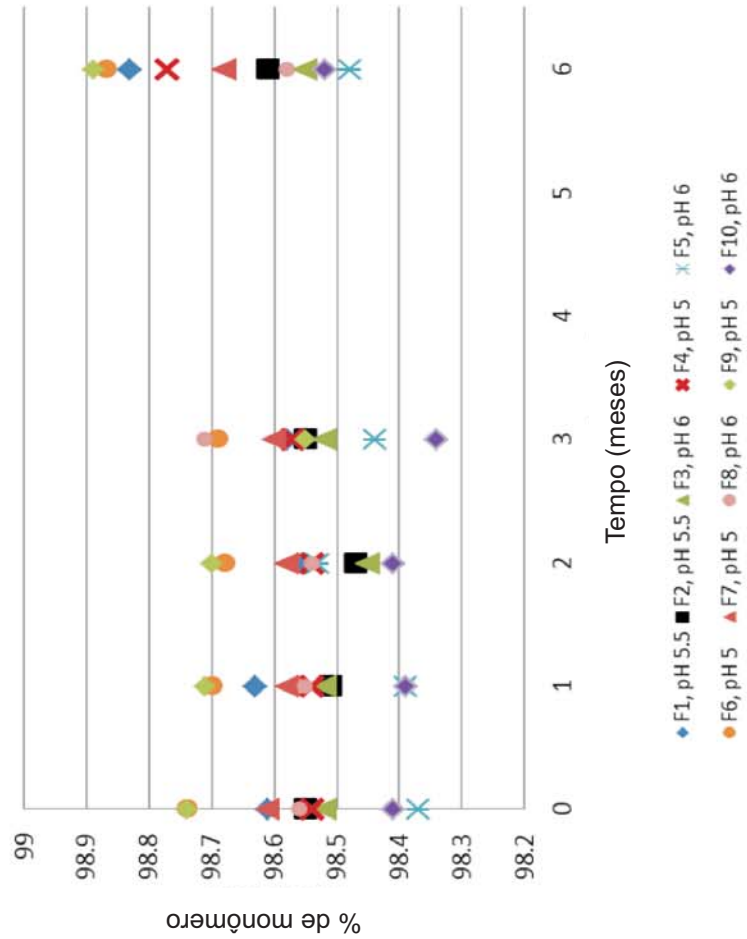


FIG. 6B

% de monômero a – 5°C

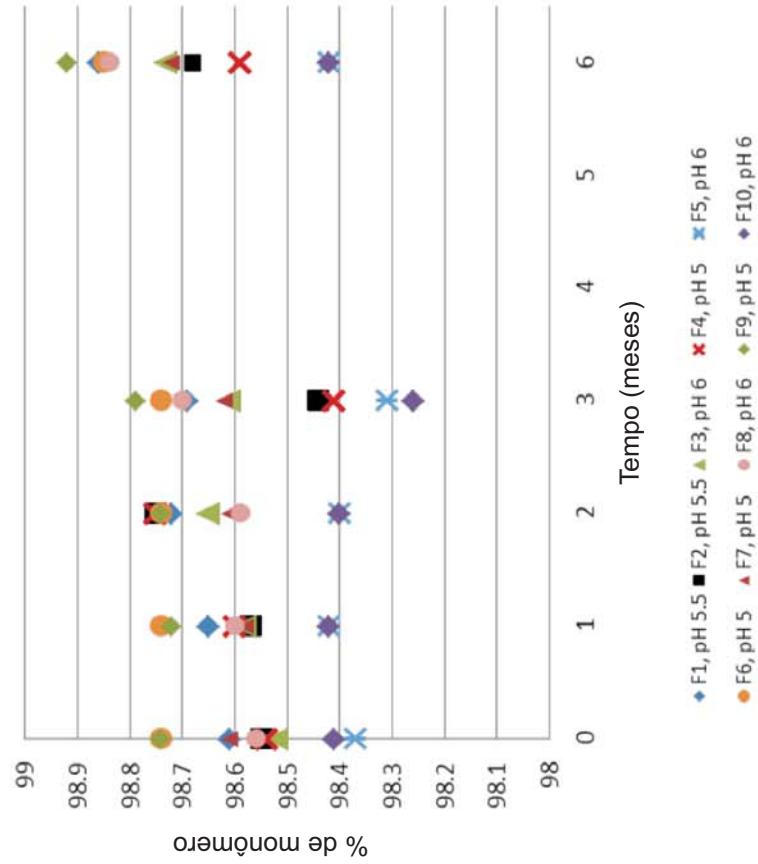


FIG. 6D

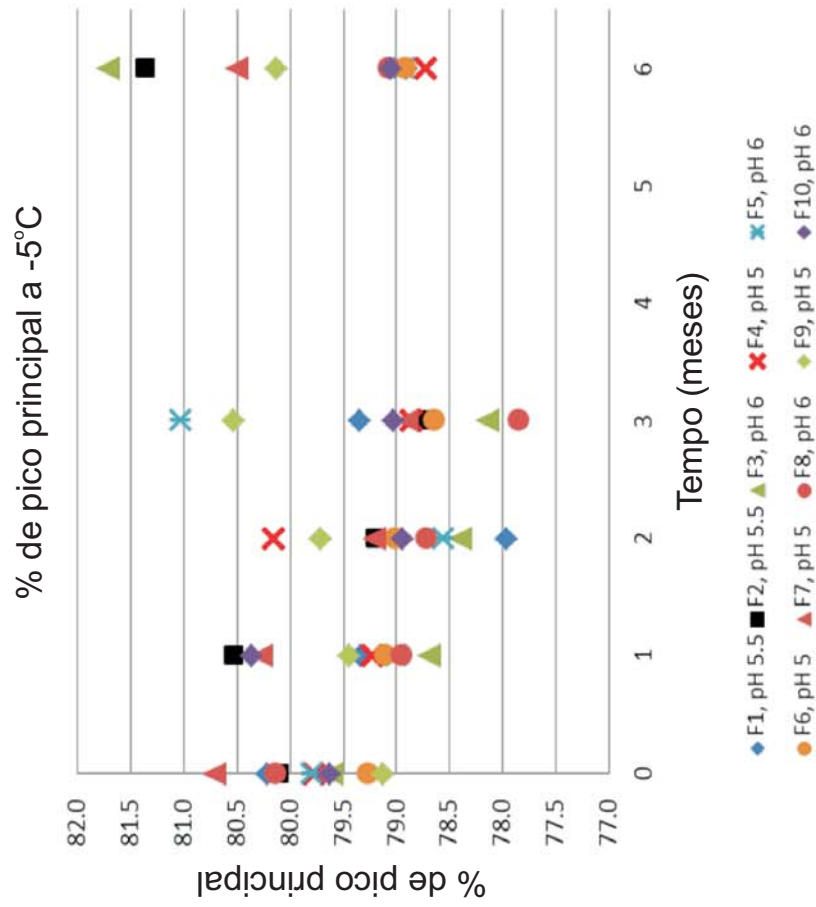


FIG. 6C

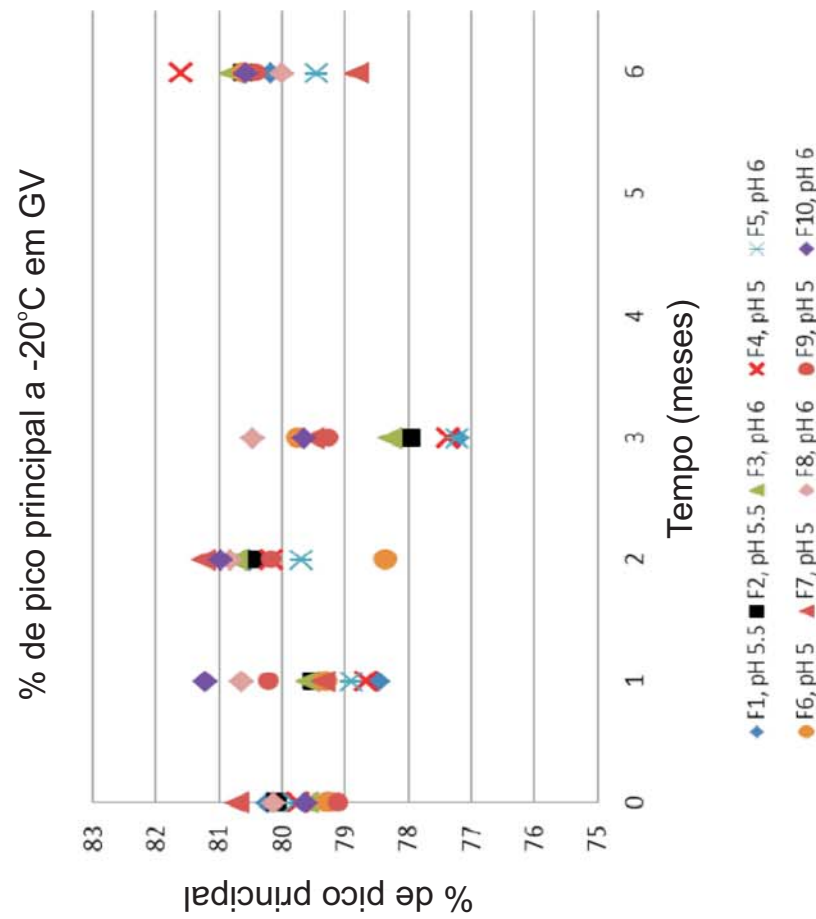


FIG. 7A

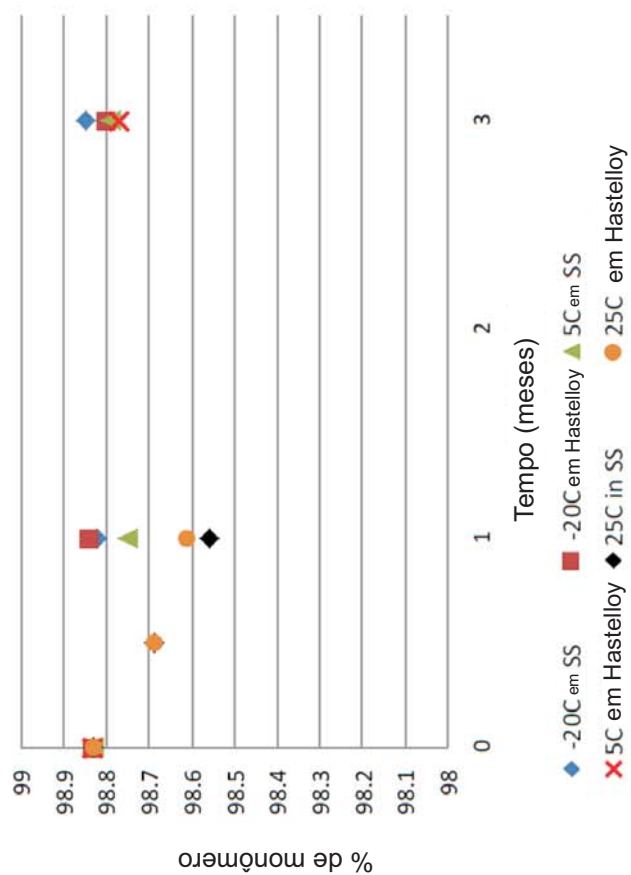


FIG. 7B

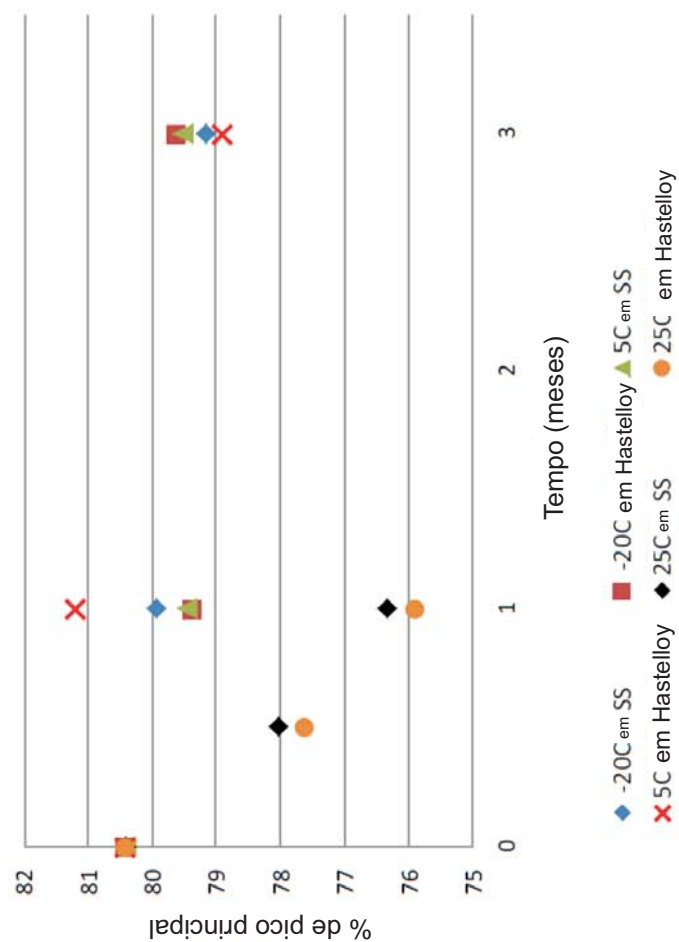


FIG. 8A

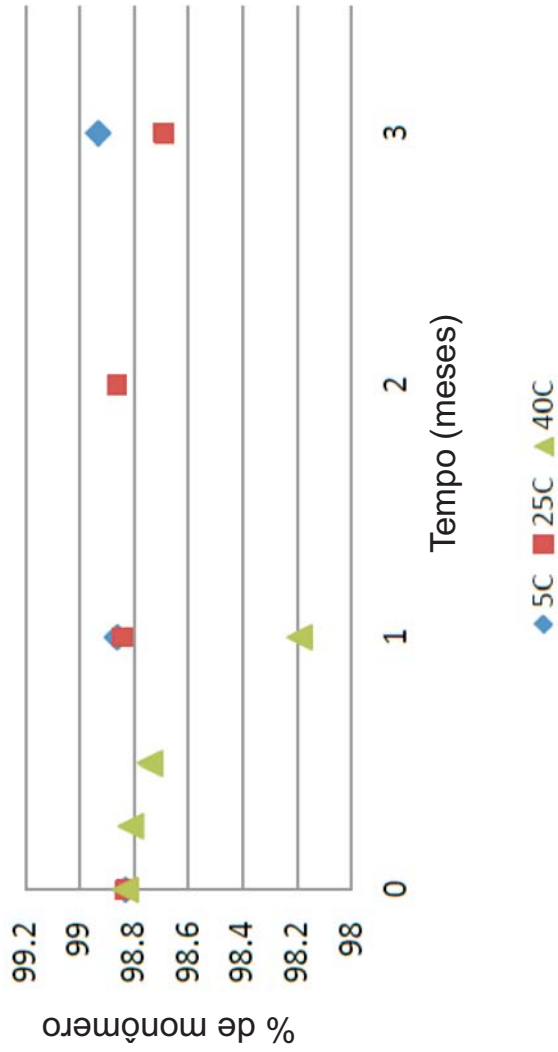


FIG. 8B

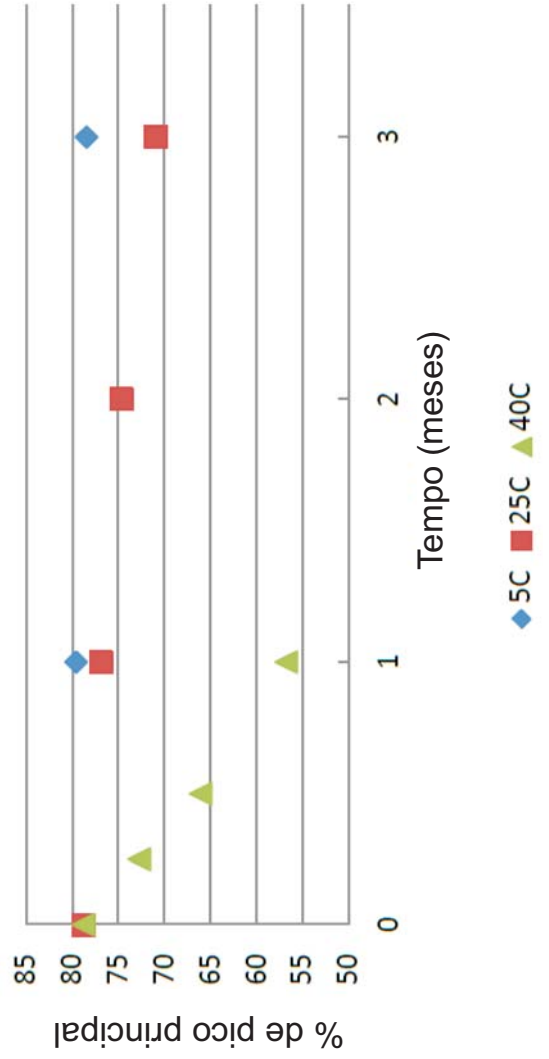


FIG. 9A

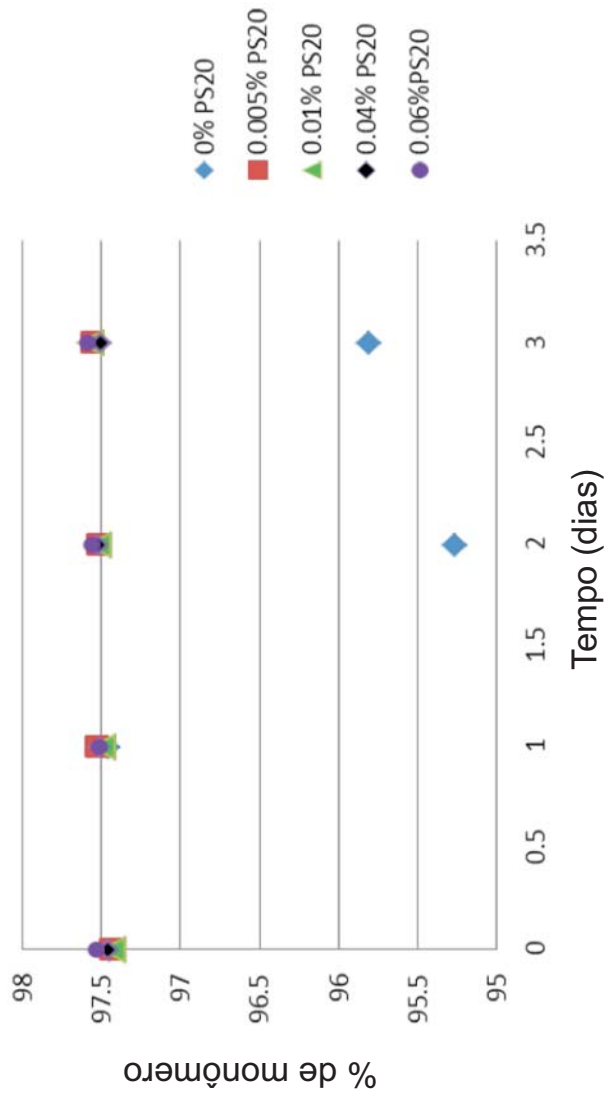


FIG. 9B

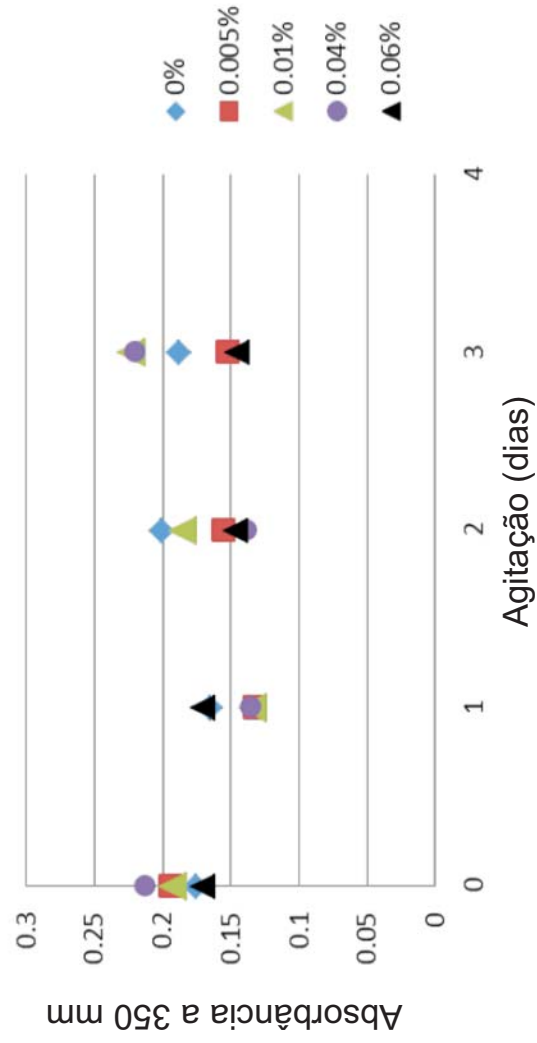


FIG. 10

% de mudanças de monômero

■ Antes da agitação ■ Depois da agitação

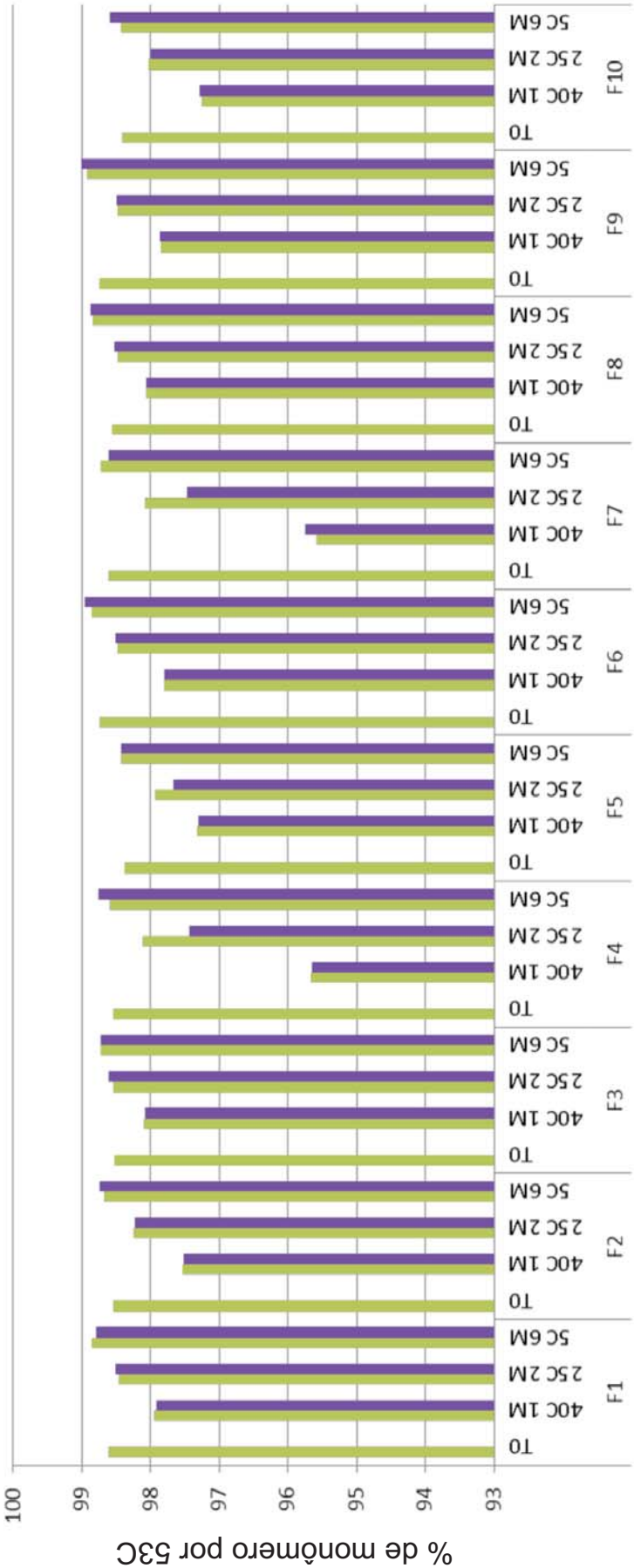


FIG. 11B

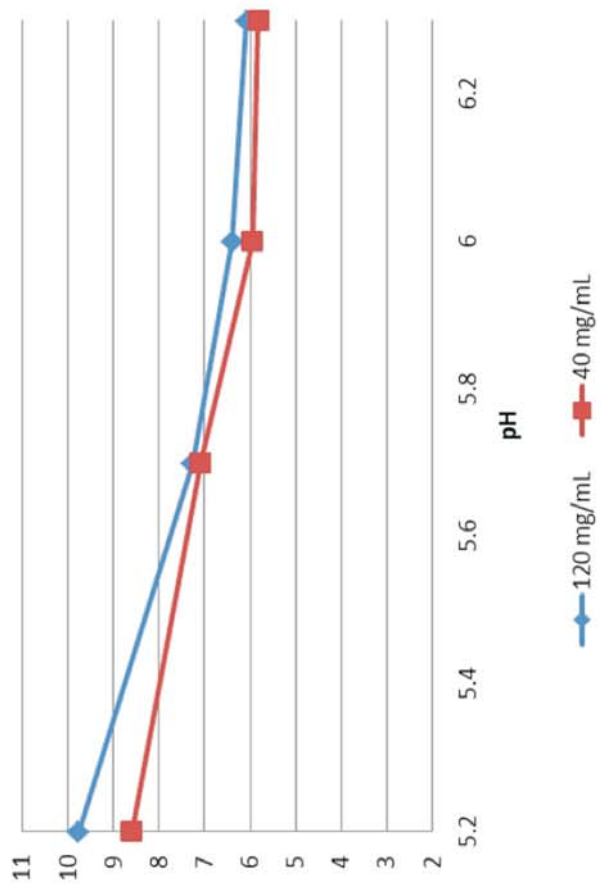


FIG. 11A

