

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 813 580**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.04.2016 PCT/US2016/027913**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2016 WO16168716**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2016 E 16718835 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2020 EP 3283107**

54 Título: **Composiciones que comprenden una combinación de ipilimumab y nivolumab**

30 Prioridad:

**17.04.2015 US 201562149325 P**

**09.12.2015 US 201562265268 P**

**17.12.2015 US 201562269000 P**

**04.03.2016 US 201662303855 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**24.03.2021**

73 Titular/es:

**BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (100.0%)**

**Route 206 and Province Line Road**

**Princeton, NJ 08543, US**

72 Inventor/es:

**SADINENI, VIKRAM;**

**QUAN, YONG y**

**KASERER, WALLACE**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 813 580 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Composiciones que comprenden una combinación de ipilimumab y nivolumab

### 5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden una combinación de un anticuerpo de punto de control inmunitario y un segundo anticuerpo en una formulación de dosis fija.

### 10 **Antecedentes de la invención**

Los cánceres humanos albergan numerosas alteraciones genéticas y epigenéticas, generando neoantígenos potencialmente reconocibles por el sistema inmunitario (Sjoblom et al. (2006) Science 314:268-74). El sistema inmunitario adaptativo, compuesto por linfocitos T y B, tiene un poderoso potencial anticancerígeno, con una amplia capacidad y exquisita especificidad para responder a diversos antígenos tumorales. Además, el sistema inmunitario demuestra una considerable plasticidad y un componente de memoria. El aprovechamiento exitoso de todos estos atributos del sistema inmunitario adaptativo haría que la inmunoterapia sea única entre todas las modalidades de tratamiento del cáncer.

20 Recientemente, varios inhibidores de la vía del punto de control inmunitario han comenzado a proporcionar nuevos enfoques inmunoterapéuticos para tratar el cáncer, incluyendo el desarrollo de un anticuerpo (Ab), ipilimumab (YERVOY®), que se une e inhibe el Antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) para el tratamiento de pacientes con melanoma avanzado y el desarrollo de anticuerpos como nivolumab y pembrolizumab (anteriormente lambrolizumab; Declaración del Consejo de USAN (2013) Pembrolizumab: Declaración sobre un nombre no privado adoptado por el Consejo de USAN (ZZ-165), 27 de noviembre de 2013) que se unen específicamente al receptor de la muerte programada-1 (PD-1) y bloquean la vía inhibitoria del ligando PD-1/PD-1.

Los anticuerpos del punto de control inmunitario se pueden administrar en combinación con otros anticuerpos. No obstante, la administración de dos anticuerpos puede ser engorrosa debido a la dosificación e intervalo de dosificación diferentes entre dos anticuerpos, causando así múltiples inyecciones intravenosas en diferentes puntos de tiempo. Además, dos anticuerpos pueden tener perfiles de estabilidad drásticamente diferentes. Debido a la naturaleza única de cada anticuerpo, por ejemplo, variaciones en la glicosilación de Fc, el procesamiento de Lys de C-terminal de cadena pesada parcial, la oxidación de metionina de Fc, la escisión de la región de bisagra, y la glicación de restos de Lys, cada anticuerpo tiene propiedades fisicoquímicas y/o termodinámicas variadas, por ejemplo, diferentes perfiles de degradación cuando se exponen al calor, congelación, luz, pH extremos, agitación, puro estrés, algunos metales y disolventes orgánicos. Por lo tanto, mientras que una formulación única que contiene dos anticuerpos mejoraría la conveniencia, la naturaleza única de cada anticuerpo hace que una formulación única sea difícil de identificar. La administración concurrente de un anticuerpo anti-PD1 con un segundo anticuerpo se describe en el documento WO 2013/173223. El documento WO2014209804 describe un anticuerpo biespecífico, en donde el primer resto de unión a antígeno comprende una cadena pesada variable y una cadena ligera variable de ipilimumab, y el segundo resto de unión a antígeno comprende una cadena pesada variable y una cadena ligera variable de nivolumab. El documento WO2012135408 describe una formulación liofilizada de un anticuerpo anti-PD-1 humano, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende: a) dicho anticuerpo anti-PD-1 humano, o fragmento de unión a antígeno del mismo; b) tampón de histidina; c) polisorbato 80; y d) sacarosa.

### 45 **Sumario de la invención**

La invención es tal como se define en las reivindicaciones.

50 En el texto de la presente memoria descriptiva, se hace mención de "realización" o "realizaciones":

- Cuando dicha descripción de una realización se refiere a una característica técnica de al menos una reivindicación independiente y comprende todas las características técnicas de dicha reivindicación independiente, dicha realización forma parte de la divulgación de la invención.
- 55 - Cuando dicha descripción de una realización se refiere a una característica técnica de al menos una reivindicación independiente pero no comprende todas las características técnicas de dicha única reivindicación independiente, dicha realización forma parte de la divulgación general más que de la divulgación de la invención.
- Cuando dicha descripción de una realización se refiere a una característica técnica que no forma parte de al menos una reivindicación independiente, dicha descripción forma parte de la divulgación general y, sin embargo, puede constituir una descripción de una realización particular de la invención.

La presente invención se refiere en un primer aspecto a una composición farmacéutica que comprende una proporción de nivolumab frente a ipilimumab de 1:3 que comprende 4,62 mg/ml de ipilimumab, 1,54 mg/ml de nivolumab, Clorhidrato de Tris (HCl) 18,46 mM, citrato de sodio dihidrato 1,54 mM, NaCl 96,15 mM, manitol al 1,15 % en p/v, ácido pentético 93,85 µM y PS80 al 0,012 % p/v.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un kit que comprende la composición de la invención.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a un método para preparar la composición de la invención, que comprende mezclar novolumab e ipilimumab para obtener la proporción deseada.

5 En un cuarto aspecto, la invención se refiere a la composición de la invención para su uso en la modulación de una respuesta inmunitaria en un paciente que la necesita.

10 En un quinto aspecto, la invención se refiere a la composición de la invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección en un paciente.

15 En dicho quinto aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende una proporción de nivolumab frente a ipilimumab de 1:3 que comprende 4,62 mg/ml de ipilimumab, 1,54 mg/ml de nivolumab, Clorhidrato de Tris (HCl) 18,46 mM, citrato de sodio dihidrato 1,54 mM, NaCl 96,15 mM, manitol al 1,15 % en p/v, ácido pentético 93,85 µM y PS80 al 0,012 % p/v para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección en un paciente.

20 Las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento pueden comprender además uno o más componentes adicionales seleccionados del grupo que consiste en: un agente de carga, un agente estabilizante, un agente quelante, un tensioactivo, un agente de tampón, un agente iónico y cualquier combinación de los mismos.

25 En una realización, las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento se pueden formular en uno o más de diversos agentes de tampón. Por ejemplo, una composición desvelada en el presente documento se puede formular en un tampón de Tris-Cl, histidina, citrato o Tris-citrato. En una realización, las composiciones desveladas en el presente documento se formulan en un tampón Tris-Cl, la concentración de Tris-Cl es al menos de aproximadamente 5 mM, aproximadamente 10 mM, aproximadamente 15 mM, aproximadamente 20 mM, aproximadamente 25 mM, aproximadamente 30 mM, aproximadamente 35 mM, aproximadamente 40 mM, o aproximadamente 50 mM. En otra realización, la concentración de Tris-Cl es de aproximadamente 20 mM. En otras realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento se formulan en un tampón citrato, la concentración de citrato es de al menos aproximadamente 5 mM, aproximadamente 10 mM, aproximadamente 15 mM, aproximadamente 20 mM, aproximadamente 25 mM, aproximadamente 30 mM, aproximadamente 35 mM, aproximadamente 40 mM, o aproximadamente 50 mM. En una realización particular, la concentración de citrato es de aproximadamente 10 mM o aproximadamente 20 mM. En algunas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento se formulan en un tampón de histidina, la concentración de histidina es de al menos aproximadamente 5 mM, aproximadamente 10 mM, aproximadamente 15 mM, aproximadamente 20 mM, aproximadamente 25 mM, aproximadamente 30 mM, aproximadamente 35 mM, aproximadamente 40 mM, o aproximadamente 50 mM. En algunas realizaciones, la concentración de histidina es de aproximadamente 20 mM. En otras realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento se formulan en un tampón de Tris-citrato, la concentración de Tris-Cl es al menos de aproximadamente 5 mM, aproximadamente 10 mM, aproximadamente 15 mM, aproximadamente 20 mM, aproximadamente 25 mM, aproximadamente 30 mM, aproximadamente 35 mM, aproximadamente 40 mM, o aproximadamente 50 mM, y la concentración de citrato es al menos de aproximadamente 2 mM, aproximadamente 5 mM, aproximadamente 10 mM, aproximadamente 15 mM, aproximadamente 20 mM, aproximadamente 25 mM, aproximadamente 30 mM, aproximadamente 35 mM, aproximadamente 40 mM, o aproximadamente 50 mM. En ciertas realizaciones, la concentración de Tris-Cl es de aproximadamente 13,3 mM y la concentración de citrato es de aproximadamente 6,7 mM.

45 Las composiciones desveladas en el presente documento pueden tener un pH que varía de aproximadamente 5 a aproximadamente 8. Por ejemplo, el pH de las composiciones desveladas en el presente documento puede ser de al menos aproximadamente 5, aproximadamente 5,1, aproximadamente 5,2, aproximadamente 5,3, aproximadamente 5,4, aproximadamente 5,5, aproximadamente 5,6, aproximadamente 5,7, aproximadamente 5,8, aproximadamente 5,9, aproximadamente 6,0, aproximadamente 6,1, aproximadamente 6,2, aproximadamente 6,3, aproximadamente 6,4, aproximadamente 6,5, aproximadamente 6,6, aproximadamente 6,7, aproximadamente 6,8, aproximadamente 6,9, aproximadamente 7,0, aproximadamente 7,1, aproximadamente 7,2, aproximadamente 7,3, aproximadamente 7,4, aproximadamente 7,5, aproximadamente 7,6, aproximadamente 7,7, aproximadamente 7,8, aproximadamente 7,9, o aproximadamente 8,0. En algunas realizaciones, el pH de las composiciones desveladas en el presente documento es de al menos aproximadamente 6,0, aproximadamente 6,2, aproximadamente 6,5, aproximadamente 6,6 o aproximadamente 7,0. En una realización de la invención, el pH de la composición es de aproximadamente 6,0.

60 La composición desvelada en el presente documento puede comprender además un agente de carga. En ciertas realizaciones, el agente de carga se selecciona del grupo que consiste en NaCl, manitol, glicina, alanina, y cualquier combinación de los mismos.

65 En ciertas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden un agente estabilizante. El agente estabilizante se selecciona del grupo que consiste en sacarosa, trehalosa, rafinosa, arginina; o cualquier combinación de los mismos.

En otras realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden un agente quelante. El

agente quelante se selecciona del grupo que consiste en ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), ácido etilendiaminotetraacético, ácido nitrilotriacético, y cualquier combinación de los mismos.

5 En ciertas realizaciones, el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en polisorbato 80 (PS80), polisorbato 20 (PS20) y cualquier combinación de los mismos.

10 En algunas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden NaCl a una concentración de al menos aproximadamente 5 mM, al menos aproximadamente 10 mM, al menos aproximadamente 15 mM, al menos aproximadamente 20 mM, al menos aproximadamente 25 mM, al menos aproximadamente 30 mM, al menos aproximadamente 35 mM, al menos aproximadamente 40 mM, al menos aproximadamente 45 mM, al menos aproximadamente 50 mM, al menos aproximadamente 60 mM, al menos aproximadamente 70 mM, al menos aproximadamente 75 mM, al menos aproximadamente 80 mM, al menos aproximadamente 90 mM, al menos aproximadamente 100 mM, al menos aproximadamente 110 mM, al menos aproximadamente 120 mM, al menos aproximadamente 130 mM, al menos aproximadamente 140 mM, al menos aproximadamente 150 mM, al menos aproximadamente 175 mM, al menos aproximadamente 200 mM, al menos aproximadamente 225 mM, al menos aproximadamente 250 mM, al menos aproximadamente 275 mM, al menos aproximadamente 300 mM, al menos aproximadamente 350 mM, al menos aproximadamente 400 mM, al menos aproximadamente 450 mM o al menos aproximadamente 450 mM. En algunas realizaciones, la concentración de NaCl es de aproximadamente 100 mM, aproximadamente 96,15 mM, aproximadamente 83,3 mM, aproximadamente 78,57 mM o aproximadamente 50 mM.

20 En algunas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden manitol (% en p/v) USP a una concentración de al menos aproximadamente el 0,25 %, al menos aproximadamente el 0,5 %, al menos aproximadamente el 0,75 %, al menos aproximadamente el 1 %, al menos aproximadamente el 1,5 %, al menos aproximadamente el 2 %, al menos aproximadamente el 2,5 %, al menos aproximadamente el 3 %, al menos aproximadamente el 3,5 %, al menos aproximadamente el 4 %, al menos aproximadamente el 4,5 %, al menos aproximadamente el 5 %, al menos aproximadamente el 7,5 % o al menos aproximadamente el 10 %. En algunas realizaciones, la concentración de manitol es de aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 1,15 %, aproximadamente el 1,67 %, aproximadamente el 1,86 % o aproximadamente el 3 %.

30 En algunas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden DTPA, USP a una concentración de al menos aproximadamente 5  $\mu$ M, al menos aproximadamente 10  $\mu$ M, al menos aproximadamente 15  $\mu$ M, al menos aproximadamente 20  $\mu$ M, al menos aproximadamente 25  $\mu$ M, al menos aproximadamente 30  $\mu$ M, al menos aproximadamente 40  $\mu$ M, al menos aproximadamente 50  $\mu$ M, al menos aproximadamente 60  $\mu$ M, al menos aproximadamente 70  $\mu$ M, al menos aproximadamente 75  $\mu$ M, al menos aproximadamente 80  $\mu$ M, al menos aproximadamente 90  $\mu$ M, al menos aproximadamente 100  $\mu$ M, al menos aproximadamente 110  $\mu$ M, al menos aproximadamente 120  $\mu$ M, al menos aproximadamente 130  $\mu$ M, al menos aproximadamente 140  $\mu$ M, al menos aproximadamente 150  $\mu$ M, al menos aproximadamente 175  $\mu$ M o al menos aproximadamente 200  $\mu$ M. En algunas realizaciones, la concentración de DTPA es de aproximadamente 20  $\mu$ M, aproximadamente 50  $\mu$ M, aproximadamente 65,71  $\mu$ M, aproximadamente 73,3  $\mu$ M, aproximadamente 93,85  $\mu$ M o 100  $\mu$ M.

40 En algunas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden PS80 (% de p/v) a una concentración de al menos aproximadamente el 0,005 %, al menos aproximadamente el 0,01 %, al menos aproximadamente el 0,015 %, al menos aproximadamente el 0,02 %, al menos aproximadamente el 0,03 %, al menos aproximadamente el 0,04 %, al menos aproximadamente el 0,05 %, al menos aproximadamente el 0,06 %, al menos aproximadamente el 0,07 %, al menos aproximadamente el 0,08 %, al menos aproximadamente el 0,09 %, o al menos aproximadamente el 0,1 %. En algunas realizaciones, la concentración de PS80 es de aproximadamente el 0,01 %, aproximadamente el 0,012 %, aproximadamente el 0,013 %, aproximadamente el 0,02 %, aproximadamente el 0,23 %, aproximadamente el 0,04 % o aproximadamente el 0,05 %.

50 En algunas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden sacarosa (% de p/v) a una concentración de al menos aproximadamente el 1 %, al menos aproximadamente el 2 %, al menos aproximadamente el 3 %, al menos aproximadamente el 4 %, al menos aproximadamente el 4,5 %, al menos aproximadamente el 5 %, al menos aproximadamente el 5,5 %, al menos aproximadamente el 6 %, al menos aproximadamente el 6,5 %, al menos aproximadamente el 7 %, al menos aproximadamente el 7,5 %, al menos aproximadamente el 8 %, al menos aproximadamente el 8,5 %, al menos aproximadamente el 9 %, al menos aproximadamente el 9,5 %, al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 12 % o al menos aproximadamente el 15 %. En algunas realizaciones, la concentración de sacarosa es aproximadamente del 6 % o aproximadamente del 8,5 %.

60 En ciertas realizaciones, Las composiciones desveladas en el presente documento incluyen las siguientes composiciones: (i) una composición farmacéutica que comprende una relación de nivolumab frente a ipilimumab de 1:1 en un tampón que comprende aproximadamente Tris 13,3 mM, aproximadamente citrato 6,7 mM, aproximadamente manitol al 1,67 %, aproximadamente NaCl 83,3 mM, aproximadamente DTPA 73,3  $\mu$ M y aproximadamente PS80 al 0,013 % a un pH de aproximadamente 6,2; (ii) una composición farmacéutica que comprende una proporción de nivolumab frente a ipilimumab de 3:1 en un tampón Tris-citrato que comprende aproximadamente manitol al 1,15 %, aproximadamente NaCl 96,15 mM, aproximadamente DTPA 93,85  $\mu$ M y

aproximadamente PS80 al 0,012 % a un pH de aproximadamente 6,6; (iii) una composición farmacéutica que comprende una proporción de nivolumab frente a ipilimumab de 1:3 en un tampón Tris-citrato que comprende aproximadamente manitol al 1,86 %, aproximadamente NaCl 78,57 mM, aproximadamente DTPA 65,71  $\mu$ M y aproximadamente PS80 al 0,023 % a un pH de aproximadamente 6,0; (iv) una composición farmacéutica que comprende una proporción de nivolumab frente a ipilimumab de 3:1 en un tampón de histidina 20 mM que comprende aproximadamente NaCl 50 mM, aproximadamente DTPA 50  $\mu$ M, aproximadamente sacarosa al 6 % y aproximadamente PS80 al 0,05 % a aproximadamente pH 6; (v) una composición farmacéutica que comprende una proporción de nivolumab frente a ipilimumab de 3:1 en un tampón de aproximadamente histidina 20 mM que comprende aproximadamente NaCl 50 mM, aproximadamente DTPA 50  $\mu$ M, aproximadamente sacarosa al 6 % y aproximadamente PS80 al 0,05 % a aproximadamente pH 7; (vi) una composición farmacéutica que comprende una proporción de nivolumab frente a ipilimumab de 3:1 en un tampón de aproximadamente citrato 20 mM que comprende aproximadamente NaCl 50 mM, aproximadamente DTPA 50  $\mu$ M, aproximadamente sacarosa al 6 % y aproximadamente PS80 al 0,05 % a aproximadamente pH 6; (vii) una composición farmacéutica que comprende una proporción de nivolumab frente a ipilimumab de 3:1 en un tampón de aproximadamente citrato 20 mM que comprende aproximadamente NaCl 50 mM, aproximadamente DTPA 20  $\mu$ M, aproximadamente manitol al 3 % y aproximadamente PS80 a 0,04 % a aproximadamente pH 6; (ix) una composición farmacéutica que comprende una proporción de nivolumab frente a ipilimumab de 1:1 en un tampón de aproximadamente citrato 20 mM que comprende aproximadamente NaCl 50 mM, aproximadamente DTPA 100  $\mu$ M, aproximadamente manitol al 3 % y aproximadamente PS80 a 0,02 % a aproximadamente pH 6; (x) una composición farmacéutica que comprende una proporción de nivolumab frente a ipilimumab de 1:1 en un tampón de aproximadamente citrato 20 mM que comprende aproximadamente NaCl 50 mM, aproximadamente DTPA 100  $\mu$ M, aproximadamente manitol al 3 % y aproximadamente PS80 a 0,02 % a aproximadamente pH 6,5; (xi) una composición farmacéutica que comprende una proporción de nivolumab frente a ipilimumab de 1:1 en un tampón de aproximadamente citrato 20 mM que comprende aproximadamente NaCl 100 mM, aproximadamente DTPA 100  $\mu$ M, aproximadamente manitol al 1,0 % y aproximadamente PS80 a 0,02 % a aproximadamente pH 6,5; o (xii) una composición farmacéutica que comprende una proporción de nivolumab frente a ipilimumab a 1:1 en un tampón de aproximadamente citrato 20 mM que comprende aproximadamente NaCl 50 mM, aproximadamente DTPA 100  $\mu$ M, aproximadamente sacarosa al 6 % y aproximadamente PS80 al 0,02 % a aproximadamente pH 6,0.

Las composiciones desveladas en el presente documento después de la formulación pueden ser estables y se pueden almacenar a aproximadamente 5 °C durante al menos aproximadamente 1 semana, al menos aproximadamente 2 semanas, al menos aproximadamente 1 mes, al menos aproximadamente 2 meses, al menos aproximadamente 3 meses, al menos aproximadamente 6 meses, al menos aproximadamente 9 meses, al menos aproximadamente 1 año, al menos aproximadamente 2 años o al menos aproximadamente 5 años. En algunas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento son estables y se pueden almacenar a aproximadamente 40 °C durante al menos aproximadamente 1 semana, al menos aproximadamente 2 semanas, al menos aproximadamente 1 mes, al menos aproximadamente 2 meses, al menos aproximadamente 3 meses, al menos aproximadamente 6 meses, al menos aproximadamente 9 meses, al menos aproximadamente 1 año, al menos aproximadamente 2 años o al menos aproximadamente 5 años. En otras realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento son estables y se pueden almacenar a aproximadamente 25 °C durante al menos aproximadamente 1 semana, al menos aproximadamente 2 semanas, al menos aproximadamente 1 mes, al menos aproximadamente 2 meses, al menos aproximadamente 3 meses, al menos aproximadamente 6 meses, al menos aproximadamente 9 meses, al menos aproximadamente 1 año, al menos aproximadamente 2 años o al menos aproximadamente 5 años.

Las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento pueden presentar un cambio mínimo de un pico ácido tras el estrés, por ejemplo, después de ser almacenadas a una temperatura particular durante un largo período de tiempo. En una realización, las composiciones desveladas en el presente documento presentan un cambio de un pico ácido menor de aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 9 %, aproximadamente el 8 %, aproximadamente el 7 %, aproximadamente el 6 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 2 %, o aproximadamente el 1 % después de ser almacenadas durante aproximadamente 6 meses o aproximadamente 3 meses a aproximadamente 5 °C. En ciertas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento presentan un cambio de un pico ácido que es inferior a aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 14 %, aproximadamente el 13 %, aproximadamente el 12 %, aproximadamente el 11 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 9 %, aproximadamente el 8 %, aproximadamente el 7 %, aproximadamente el 6 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 2 % o aproximadamente el 1 % después de almacenarse durante aproximadamente 3 meses a aproximadamente 25 °C. En otras realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento presentan un cambio de un pico ácido que es inferior a aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 14 %, aproximadamente el 13 %, aproximadamente el 12 %, aproximadamente el 11 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 9 %, aproximadamente el 8 %, aproximadamente el 7 %, aproximadamente el 6 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 2 % o aproximadamente el 1 % después de almacenarse durante aproximadamente 3 meses a aproximadamente 40 °C.



aproximadamente el 1,5 %, aproximadamente el 1,4 %, aproximadamente el 1,3 %, aproximadamente el 1,2 %, aproximadamente el 1,1 %, aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 0,9 %, aproximadamente el 0,8 %, aproximadamente el 0,7 %, aproximadamente el 0,6 %, aproximadamente el 0,5 %, aproximadamente el 0,4 %, aproximadamente el 0,3 %, aproximadamente el 0,2 %, o aproximadamente el 0,1 % después de ser almacenadas durante aproximadamente 2 meses a aproximadamente 4 °C.

En algunas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento se diluyen antes de su uso. En algunas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento se diluyen con inyección de cloruro de sodio al 0,9 %, USP o inyección de dextrosa al 5 %, USP antes de su uso. En algunas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento se diluyen para obtener una concentración deseada de primer y segundo anticuerpo.

En algunas realizaciones, la divulgación se dirige a un kit que comprende una composición desvelada en el presente documento.

En algunas realizaciones, la divulgación se dirige al método de preparación de una composición desvelada en el presente documento. En algunas realizaciones, una formulación que comprende el producto farmacológico del anticuerpo anti-PD-1 se mezcla con una formulación que comprende el segundo producto farmacológico del anticuerpo para obtener la proporción deseada en un producto farmacológico final sin cambios de tampón. En algunas realizaciones, una formulación que comprende la sustancia de fármaco de anticuerpo anti-PD-1 y una formulación que comprende la segunda sustancia de fármaco de anticuerpo está sujeta a intercambios de tampón y/o de concentración antes de mezclarse para obtener la proporción deseada en un producto de fármaco final.

En algunas realizaciones, la divulgación se dirige a un método para modulación de una respuesta inmunitaria a un paciente que lo necesita, que comprende administrar una composición desvelada en el presente documento al paciente.

En algunas realizaciones, la divulgación se dirige a un método para administrar dos anticuerpos al mismo tiempo a un paciente que lo necesite, que comprende administrar al paciente una composición desvelada en el presente documento, en donde los anticuerpos son capaces de tratar al menos una enfermedad o afección.

En algunas realizaciones, la divulgación se dirige al método de tratamiento de una enfermedad o afección que comprende administrar una composición desvelada en el presente documento a un paciente.

En algunas realizaciones, la enfermedad o afección es una enfermedad infecciosa. En algunas realizaciones, la enfermedad es cáncer. En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer de tipo melanoma, cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de huesos, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma maligno cutáneo o intraocular, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer de útero, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer del esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de la uretra, cáncer del pene, leucemias crónicas o agudas, incluyendo leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, tumores sólidos de la infancia, linfoma linfocítico, cáncer de la vejiga, cáncer del riñón o del uréter, carcinoma de la pelvis renal, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), linfoma primario del SNC, angiogénesis tumoral, tumor del eje espinal, glioma del tronco encefálico, adenoma hipofisario, sarcoma de Kaposi, cáncer epidermoide, cáncer de células escamosas, linfoma de linfocitos T, cánceres inducidos por el medio ambiente, incluidos los inducidos por el asbesto, y cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento se administran por vía intravenosa. En algunas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento se diluyen antes de la administración. En algunas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento se administran a una dosis fija. En algunas realizaciones, la cantidad del primer anticuerpo y la cantidad del segundo anticuerpo administrada al paciente en una dosis única son idénticas a la cantidad X y a la cantidad Y, respectivamente. En algunas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento se administran a una dosis basada en el peso. En algunas realizaciones, la cantidad del primer anticuerpo administrada al paciente es de al menos aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 1,5 mg/kg, aproximadamente 2 mg/kg, aproximadamente 3 mg/kg o aproximadamente 5 mg/kg. En algunas realizaciones, la cantidad del primer anticuerpo administrada al paciente es al menos aproximadamente 1 mg/kg.

En algunas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento se administran al menos aproximadamente semanalmente, al menos aproximadamente dos veces por semana, al menos aproximadamente cada dos semanas, al menos aproximadamente cada tres semanas, o al menos aproximadamente mensualmente. En algunas realizaciones, la administración dura al menos unas 8 semanas, al menos aproximadamente 12 semanas, al menos aproximadamente 3 meses, al menos aproximadamente 6 meses, al menos aproximadamente 9 meses, al

menos aproximadamente 1 año, al menos aproximadamente 18 meses, al menos aproximadamente 2 años o más de 2 años. En algunas realizaciones, el paciente también es tratado con otro agente contra el cáncer.

### Breve descripción de las figuras

5

La Figura 1 muestra las composiciones de formulaciones de un anticuerpo anti-CTLA4 (es decir, ipilimumab) y un anticuerpo anti-PD-1 (es decir, nivolumab) de sustancias farmacéuticas (SF) y productos farmacéuticos (PF).

10

La Figura 2A muestra los resultados de la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) de la formulación combinada de combinación de dosis fija de proporción 1:1 (FDRC = combinación de proporción de dosis fija) de un anticuerpo anti-PD-1 (por ejemplo, nivolumab) y un anticuerpo anti-CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab). La Figura 2B muestra análisis de enfoque isoelectrónico capilar captado por imágenes (cIEF) de la formulación combinada de combinación de dosis fija de proporción 1:1 (FDRC = combinación de proporción de dosis fija) de un anticuerpo anti-PD-1 (por ejemplo, nivolumab) y un anticuerpo anti-CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab). CE indica una mezcla de tampones Tris y citrato. Los resultados de nivolumab PF e ipilimumab DF se muestran como controles; y la combinación de un anticuerpo anti-PD-1 y un anticuerpo anti-CTLA4 (por ejemplo, nivolumab e ipilimumab) se muestran como CE FDRC en las Figuras 2A-B. La Figura 2A muestra el cambio real en el tamaño de pico de alto peso molecular (APM) (%) en formulaciones almacenadas durante 3 meses a 40 °C en comparación con los controles del día 0. El pH ajustado a 25 °C y las concentraciones de polisorbato 80 (PS80), NaCl y Manitol para cada formulación prototipo se muestran debajo del eje x en la Figura 2A. La Figura 2B muestra el cambio real en el tamaño de pico ácido (%) de nivolumab e ipilimumab en formulaciones almacenadas durante 6 meses a 5 °C en comparación con los controles del día 0. El pH ajustado a 25 °C y las concentraciones de NaCl y Manitol para cada formulación se muestran debajo del eje x en la Figura 2B. Los puntos de datos están etiquetados como N (nivolumab), C (combinación de nivolumab e ipilimumab) e I (ipilimumab) en las Figuras 2A-B.

15

20

25

30

35

Las Figuras 3A-B muestran los resultados de los análisis de SEC de las formulaciones de dosificación fija de proporción 1:3, 1:1 o 3:1 para un anticuerpo anti-PD-1 (por ejemplo, nivolumab) y un anticuerpo anti-CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab). Los resultados de nivolumab PF e ipilimumab DF se muestran como controles; y la combinación de un anticuerpo anti-PD-1 y un anticuerpo anti-CTLA4 (por ejemplo, nivolumab e ipilimumab) se muestran como CE (Figuras 3A-B). La Figura 3A muestra el tamaño de pico de APM (%) en el día 0 (Inicial), el tamaño de pico de APM después de 2 meses a 40 °C, y el cambio en el tamaño de pico de APM entre el control del día 0 y la formulación a los 2 meses a 40 °C para cada muestra y formulación prototipo (CE: pH 6,0 (1 ipilimumab: 3 nivolumab); CE: pH 6,2 (1 ipilimumab: 1 nivolumab); y CE: pH 6,6 (3 ipilimumab: 1 nivolumab)). La Figura 3B muestra el tamaño de pico de BPM (%) en el día 0 (Inicial), el tamaño de pico de BPM después de 2 meses a 40 °C, el cambio en el tamaño de pico de BPM entre el control del día 0 y cada formulación después del almacenamiento durante 2 meses a 40 °C, y el cambio en el tamaño de pico de BPM entre el control del día 0 y cada formulación después del almacenamiento durante 3 meses a 25 °C. Las concentraciones del pH ajustado a 25 °C, la concentración de ipilimumab, la concentración de nivolumab, PS80 y NaCl para cada formulación se muestran debajo de los ejes x (Figuras 3A-B).

40

45

Las Figuras 4A-C muestran los resultados del análisis cIEF de las formulaciones de dosificación fija de proporción 1:3, 1:1 o 3:1 para un anticuerpo anti-PD-1 (por ejemplo, nivolumab) y un anticuerpo anti-CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab) después del almacenamiento durante 3 meses a 25 °C (Figura 4A), 3 meses a 5 °C (Figura 4B) y 1 mes a 25 °C (Figura 4C). Los resultados de nivolumab PF e ipilimumab PF se muestran como controles (Figuras 4A-C). Las diferencias reales en los tamaños de picos ácidos de nivolumab (N) e ipilimumab (I) (%) en los puntos de tiempo seleccionados en relación con los controles del día 0 se muestran para los controles y cada formulación prototipo (CE: pH 6,0 (1 ipilimumab: 3 nivolumab); CE: pH 6,2 (1 ipilimumab: 1 nivolumab); y CE: pH 6,6 (3 ipilimumab: 3 nivolumab)) (Figuras 4A-C). El pH teórico a 25 °C, el tipo de tampón y la proporción de ipilimumab frente a nivolumab para cada formulación se muestran debajo del eje x en las figuras 4A-B; y la concentración de NaCl, el pH teórico a 25 °C y la relación de ipilimumab frente a nivolumab para cada formulación se muestran debajo del eje x en las figuras 4C. El pH teórico es equivalente al pH del estudio de estabilidad (Figuras 4A-C).

50

55

60

Las Figuras 5A-B muestran los resultados de los análisis de SEC (Figura 5A) y cIEF (Figura 5B) de las nuevas formulaciones de dosificación fija de proporción de diseño de experimento (DdE) 3:1 para un anticuerpo anti-PD-1 (por ejemplo, nivolumab) y un anticuerpo anti-CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab). Los resultados de nivolumab PF e ipilimumab PF se muestran como controles (Figuras 5A-B). La Figura 5 A muestra el tamaño de pico de APM (%) en el día 0 (Inicial), el tamaño del pico de APM después de 3 meses a 40 °C, el cambio en el tamaño de pico de APM entre el control del día 0 y la formulación después del almacenamiento durante 3 meses a 40 °C, y el cambio en el tamaño máximo de APM entre el control del día 0 y la formulación después del almacenamiento durante 3 meses a 25 °C para las formulaciones de control y cada formulación de prototipo (Combo nuevo, Combo 4, Combo 5, Combo 6 y Combo 8). La Figura 5B muestra las diferencias reales en los tamaños de picos ácidos (%) de nivolumab (N) e ipilimumab (I) en relación con los controles del día 0 para cada prototipo de formulación después del almacenamiento durante 3 meses a 25 °C. La proporción de ipilimumab frente a nivolumab; las concentraciones de NaCl, manitol y sacarosa; el pH teórico a 25 °C y el tipo de tampón para cada formulación se muestran debajo de los ejes x (Figuras 5A-B).

65

Las Figuras 6A-B muestran los resultados de los análisis de SEC de las formulaciones de dosificación fija de plataforma combinada (PC) de proporción 1:1; 1:3 o 3:1 para un anticuerpo anti-PD-1 (por ejemplo, nivolumab) y un anticuerpo anti-CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab) después del almacenamiento durante 3 meses a 40 °C (Figura 6A) y 3 meses a 5 °C (Figura 6B). Los resultados de nivolumab PF e ipilimumab PF se muestran como controles (Figuras 6A-B). La Figura 6A muestra el cambio real en el tamaño máximo de APM (%) entre los controles del día

0 y cada control y formulación prototipo (PC: pH 6,0-1:1; PC: pH 5,5-1:3; PC: pH 6,0-1:3; PC: pH 6,5-1:3; y PC: pH 6,0-3:1) después del almacenamiento durante 3 meses a 40 °C. La Figura 6B muestra el tamaño máximo de APM (%) en el día 0 (Inicial) y el tamaño máximo de APM después de 3 meses a 5 °C para cada formulación. El tipo de tampón y la proporción de ipilimumab frente a nivolumab para cada formulación se muestran debajo de los ejes x (Figuras 6A-B).

Las Figuras 7A-B muestran los resultados de los análisis de cIEF de la plataforma combinada (PC) 1:1; 1:3; o formulaciones de dosificación fija de proporción 3:1 para un anticuerpo anti-PD-1 (por ejemplo, nivolumab) y un anticuerpo anti-CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab) después del almacenamiento durante 3 meses a 25 °C (Figura 7A) y 3 meses a 5 °C (Figura 7B). Los resultados de nivolumab PF e ipilimumab PF se muestran como controles (Figuras 7A-B). La Figura 7A muestra las diferencias reales en los tamaños de picos ácidos (%) de nivolumab (N) e ipilimumab (I) con respecto a los controles del día 0 para cada control y formulación prototipo (PC: pH 6,0-1:1; PC: pH 5,5-1:3; PC: pH 6,0-1:3; PC: pH 6,5-1:3; y PC: pH 6,0-3:1) después del almacenamiento durante 3 meses a 25 °C. La Figura 7B muestra las diferencias reales en los tamaños de pico ácido (%) de nivolumab (N) e ipilimumab (I) en relación con los controles del día 0 para cada formulación después del almacenamiento durante 3 meses a 5 °C. El tipo de tampón y la proporción de ipilimumab frente a nivolumab para cada formulación se muestran debajo de los ejes x (Figuras 7A-B).

La Figura 8 muestra los resultados de los análisis de SEC de las formulaciones de FDRC basadas en nivolumab-PF (1:1) después del almacenamiento durante 1 mes a 40 °C. Los resultados de nivolumab PF e ipilimumab PF se muestran como controles (Figura 8). El cambio real en el tamaño del pico de APM (%) entre los controles del día 0 y las formulaciones después del almacenamiento durante 1 mes a 40 °C se muestra para cada control y formulación prototipo (A, B, C y D) (Figura 8). La proporción de ipilimumab frente a nivolumab, el tipo de tampón y el pH teórico ajustado para cada formulación se muestran debajo del eje x (Figura 8).

La Figura 9 muestra los resultados de los análisis de cIEF de las formulaciones de FDRC basadas en nivolumab-PF (1:1) después del almacenamiento durante 3 meses a 25 °C. Los resultados de nivolumab PF e ipilimumab PF se muestran como controles. La Figura 9 muestra las diferencias reales en los tamaños de picos ácidos (%) de nivolumab (N) e ipilimumab (I) en relación con los controles del día 0 para cada control y formulación prototipo (A, B, C u D) después del almacenamiento durante 3 meses a 25 °C. La proporción de ipilimumab frente a nivolumab, el tipo de tampón y el pH teórico ajustado para cada formulación se muestran debajo del eje x.

La Figura 10 muestra la tasa de degradación de pico ácido de ipilimumab en la FDRC y la composición comercial a 25 °C/HR (humedad relativa) del 60 %. La composición de FDRC se muestra en la Tabla 7.

La Figura 11 muestra la tasa de degradación de pico ácido de nivolumab en la FDRC y la composición comercial a 25 °C /HR del 60 %. La composición de FDRC se muestra en la Tabla 7.

La Figura 12 muestra el perfil de pico ácido a 25 °C para ipilimumab y nivolumab en un estudio de pH.

La Figura 13 muestra el perfil de alto peso molecular de cromatografía de exclusión por tamaño de prototipos de PF del estudio de robustez. El perfil APM del FDRC PF permaneció sin cambios después de 6 meses de almacenamiento a 2-8 °C y 25 °C.

La Figura 14 muestra el perfil de monómero de cromatografía de exclusión por tamaño del FDRC PF después de 6 meses de almacenamiento a 2-8 °C y 25 °C.

La Figura 15 muestra el perfil de pico ácido de ipilimumab. La evaluación indica una dependencia del pH de la desamidación a una temperatura acelerada de 25 °C, tal como se indica por un aumento en el perfil de pico ácido a un intervalo de temperatura más alto de pH 7,0.

La Figura 16 muestra el perfil de pico ácido de nivolumab. La evaluación indica una dependencia del pH de la desamidación a una temperatura acelerada de 25 °C, tal como se indica por un aumento en el perfil de pico ácido a un intervalo de temperatura más alto de pH 7,0.

La Figura 17 muestra el perfil del pico principal de ipilimumab. La evaluación indica una dependencia del pH de la desamidación a una temperatura acelerada de 25 °C, tal como se indica por un aumento en el perfil de pico ácido a un intervalo de temperatura más alto de pH 7,0.

La Figura 18 muestra el perfil de pico principal de nivolumab. La evaluación indica una dependencia del pH de la desamidación a una temperatura acelerada de 25 °C, tal como se indica por un aumento en el perfil de pico ácido a un intervalo de temperatura más alto de pH 7,0.

La Figura 19 muestra el impacto del pH en el perfil de cIEF.

La Figura 20 muestra el perfil de iCIEF en un intervalo de pH de 5,4-6,6.

### Descripción detallada de la invención

La invención es tal como se define en las reivindicaciones.

La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden tanto nivolumab como ipilimumab. La composición es una formulación de dosis fija. Las ventajas de tal composición de dosis fija de formulación única pueden incluir un cumplimiento médico mejorado al reducir el tiempo de tratamiento (para una composición dada, por ejemplo, por vía intravenosa) o una carga de administración reducida (por ejemplo, inyecciones i.v. múltiples) y la capacidad de tener un perfil combinado de fármaco para ambos fármacos. Sin embargo, dicha composición de dosis fija de formulación única puede inducir interacciones indeseables entre los dos anticuerpos, reduciendo así la cantidad total de principio activo, así como una limitación en la capacidad de un médico para personalizar las dosis.

*Términos*

Con el fin de que se pueda entender más fácilmente la presente divulgación, se definen previamente determinadas expresiones. Tal como se usa en la presente solicitud, excepto que se indique expresamente lo contrario en el presente documento, cada uno de los siguientes términos tendrá el significado que se establece a continuación. Se establecen definiciones adicionales en toda la solicitud.

El término "y/o" cuando se usa en el presente documento debe tomarse como divulgación específica de cada una de las dos características o componentes especificados con o sin la otra. Por lo tanto, la expresión "y/o" tal como se utiliza en una frase tal como "A y/o B" del presente documento pretende incluir "A y B", "A o B", "A" (solo) y "B" (solo). Asimismo, la expresión "y/o" tal como se utiliza en una frase tal como "A, B y/o C" pretende abarcar cada uno de los siguientes aspectos: A, B y C; A, B o C; A o C; A o B; B o C; A y C; A y B; B y C; A (solo); B (solo); y C (solo).

Se entiende que siempre que se describan aspectos en el presente documento con el lenguaje "que comprende", se proporcionan también aspectos análogos descritos en términos de "que consisten en" y/o "que consisten esencialmente en".

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente una persona normalmente experta en la materia con la cual se relaciona la presente divulgación. Por ejemplo, el Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2ª ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3ª ed., 1999, Academic Press; y el Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revisado, 2000, Oxford University Press, proporcionan al experto un diccionario general de muchos de los términos usados en la presente divulgación.

Las unidades, los prefijos y los símbolos se denotan en su forma aceptada del Sistema Internacional de Unidades (SI). Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. Los títulos proporcionados en el presente documento no son limitaciones de los diversos aspectos de la divulgación, que se pueden obtener por referencia a la memoria descriptiva en su conjunto. Por consiguiente, los términos definidos inmediatamente a continuación se definen más completamente por referencia a la memoria descriptiva en su totalidad.

"Administrar" se refiere a la introducción física de una composición que comprende un agente terapéutico a un sujeto, usando cualquiera de los diversos métodos y sistemas de liberación conocidos por los expertos en la técnica. Las vías de administración preferidas para las formulaciones desveladas en el presente documento incluyen intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, medular u otras vías parenterales de administración, por ejemplo, mediante inyección o infusión. La expresión "administración parenteral" como se usa en el presente documento significa modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, normalmente mediante inyección e incluyen, sin limitación, inyección intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intralinfática, intralesional, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intramedular, epidural e intraesternal e infusión, así como electroporación *in vivo*. En algunas realizaciones, la formulación se administra por vía no parenteral, preferentemente oral. Otras vías no parenterales incluyen una vía de administración tópica, epidérmica o mucosa, por ejemplo, intranasal, vaginal, rectal, sublingual o tópica. La administración también se puede realizar, por ejemplo, una vez, una pluralidad de veces y/o durante uno o más períodos prolongados.

Un "evento adverso" (EA) tal como se usa en el presente documento es cualquier signo desfavorable y generalmente no intencionado o indeseable (incluido un hallazgo anómalo de laboratorio), síntoma, enfermedad asociada al uso de un tratamiento médico. Por ejemplo, un evento adverso puede estar asociado a la activación del sistema inmunitario o la expansión de las células del sistema inmunitario (por ejemplo, linfocitos T) en respuesta a un tratamiento. Un tratamiento médico puede tener uno o más EA asociados y cada EA puede tener el mismo nivel de gravedad o diferente. La referencia a métodos capaces de "alterar los eventos adversos" significa un régimen de tratamiento que disminuye la incidencia y/o severidad de uno o más EA asociados al uso de un régimen de tratamiento diferente.

Un "anticuerpo" (Ab) incluirá, sin limitación, una glucoproteína inmunoglobulina que se une específicamente a un antígeno y comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, o una porción de unión a antígeno de la misma. Cada cadena H comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como  $V_H$ ) y una región constante de cadena pesada. La región constante de la cadena pesada comprende tres dominios constantes,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  y  $C_{H3}$ . Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviado en el presente documento como  $V_L$ ) y una región constante de cadena ligera. La región constante de la cadena comprende un dominio constante,  $C_L$ . Las regiones  $V_H$  y  $V_L$  pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada  $V_H$  y  $V_L$  está compuesta de tres CDR y de cuatro FR, dispuestos desde el extremo amino hasta el extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del huésped, incluyendo varias células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico.

Una inmunoglobulina puede provenir de cualquiera de los isotipos comúnmente conocidos, incluyendo, pero sin limitación, IgA, IgA secretora, IgG e IgM. Las subclases de IgG también son bien conocidas por los expertos en la materia e incluyen, pero sin limitación, IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4 humanas. "Isotipo" se refiere a la clase o subclase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG1) que está codificada por los genes de la región constante de la cadena pesada.

5 El término "anticuerpo" incluye, a modo de ejemplo, tanto anticuerpos de origen natural como de no origen natural; anticuerpos monoclonales y policlonales; anticuerpos quiméricos y humanizados; anticuerpos humanos o no humanos; anticuerpos completamente sintéticos; y anticuerpos de cadena única. Un anticuerpo no humano puede humanizarse por métodos recombinantes para reducir su inmunogenicidad en el hombre. Cuando no se indique expresamente, y a menos que el contexto indique lo contrario, el término "anticuerpo" también incluye un fragmento de unión a antígeno

10 o una porción de unión a antígeno de cualquiera de las inmunoglobulinas mencionadas anteriormente, e incluye un fragmento o porción monovalente y una divalente y un anticuerpo de cadena única.

La expresión "anticuerpo monoclonal" ("mAb") se refiere a una preparación de origen no natural de moléculas de anticuerpo de composición molecular única, es decir, moléculas de anticuerpo cuyas secuencias primarias son esencialmente idénticas, y que muestran una especificidad y afinidad de unión únicas para un epítipo particular. Un mAb es un ejemplo de un anticuerpo aislado. Los mAb se pueden producir mediante hibridoma, técnicas recombinantes, transgénicas u otras conocidas por los expertos en la materia.

15

Un anticuerpo "humano" (HuMAb) se refiere a un anticuerpo que tiene regiones variables en el que tanto el marco como las regiones CDR provienen de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también proviene de las secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria y de sitio *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*). Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", tal como se usa en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que las secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como de un ratón, se han injertado en secuencias marco humanas. Las expresiones anticuerpos "humanos" y anticuerpos "completamente humanos" se usan como sinónimos.

20

25

Un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo en el que algunos, la mayoría o todos los aminoácidos fuera de los dominios CDR de un anticuerpo no humano se reemplazan por los aminoácidos correspondientes derivados de las inmunoglobulinas humanas. En una realización de una forma humanizada de un Ac, algunos, la mayoría o todos los aminoácidos fuera de los dominios CDR se han reemplazado por aminoácidos de las inmunoglobulinas humanas, mientras que algunos, la mayoría o todos los aminoácidos dentro de una o más regiones CDR no cambian. Pequeñas adiciones, deleciones, inserciones, sustituciones o modificaciones de aminoácidos son permisibles siempre que no anulen la capacidad del anticuerpo de unirse a un antígeno particular. Un anticuerpo "humanizado" conserva una especificidad antigénica similar a la del anticuerpo original.

30

35

Un "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo en el que las regiones variables se derivan de una especie y las regiones constantes se derivan de otra especie, tal como un anticuerpo en el que las regiones variables se derivan de un anticuerpo de ratón y las regiones constantes derivan de un anticuerpo humano.

40

Un anticuerpo "anti-antígeno" se refiere a un anticuerpo que se une específicamente al antígeno. Por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-1 se une específicamente a PD-1 y un anticuerpo anti-CTLA-4 se une específicamente a CTLA-4.

45

Una "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo (también llamada "fragmento de unión a antígeno") se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente al antígeno unido por el anticuerpo completo.

50

Un "cáncer" se refiere a un amplio grupo de diversas enfermedades caracterizadas por el crecimiento incontrolado de células anómalas en el cuerpo. La división y el crecimiento celular no regulados dan como resultado la formación de tumores malignos que invaden los tejidos vecinos y también pueden hacer metástasis a partes distantes del cuerpo a través del sistema linfático o del torrente sanguíneo. Un "cáncer" o "tejido canceroso" puede incluir un tumor.

55

"CD137", "CD-137", "miembro 9 de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFRSF9)", "4-1BB" e "inducido por activación de linfocitos (ILA)" se refieren al mismo miembro de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral. Una actividad en la que se ha implicado a CD137 es la actividad coestimuladora para los linfocitos T activados. (Jang et al. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 242 (3): 613-20). El término "CD137" tal como se usa en el presente documento incluye CD137 humano (hCTLA-4), variantes, isoformas y homólogos de especies de hCD137, y análogos que tienen al menos un epítipo común con hCD137. La secuencia de aminoácidos para hCD137 se puede encontrar en el N.º de registro de GenBank NP\_001552.

60

"Antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos" (CTLA-4) se refiere a un receptor inmunoinhibidor que pertenece a la familia CD28. CTLA-4 se expresa exclusivamente en linfocitos T *in vivo*, y se une a dos ligandos, CD80 y CD86 (también llamados B7-1 y B7-2, respectivamente). El término "CTLA-4" tal como se usa en el presente documento incluye CTLA-4 humano (hCTLA-4), variantes, isoformas y homólogos de especies de hCTLA-4, y análogos que tienen al menos un

65

epítopo común con hCTLA-4. La secuencia completa de hCTLA-4 se puede encontrar en el N.º de registro de GenBank AAB59385.

5 Una "enfermedad" se refiere a cualquier trastorno de estructura o función en un organismo, por ejemplo, un ser humano, que no es el resultado directo de una lesión física. Una "enfermedad infecciosa" es una enfermedad causada por un organismo tal como una bacteria, hongo, virus, parásito u otro patógeno.

10 "Intervalo de dosificación", tal como se usa en el presente documento, significa la cantidad de tiempo que transcurre entre múltiples dosis de una formulación desvelada en el presente documento que se administra a un sujeto. El intervalo de dosificación se puede indicar como intervalos.

15 El término "frecuencia de dosificación", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la frecuencia de administrar dosis de una formulación desvelada en el presente documento en un momento dado. La frecuencia de dosificación se puede indicar como el número de dosis por tiempo determinado, por ejemplo, una vez a la semana o una vez en dos semanas.

20 El uso del término "dosis fijada" con respecto a una composición de la invención significa que dos o más anticuerpos diferentes en una composición única están presentes en la composición en proporciones particulares (fijada) entre sí. En algunas realizaciones, la dosis fija se basa en el peso (por ejemplo, mg) de los anticuerpos. En ciertas realizaciones, la dosis fija se basa en la concentración (por ejemplo, mg/ml) de los anticuerpos. En algunas realizaciones, la proporción es al menos aproximadamente 1:1, aproximadamente 1:2, aproximadamente 1:3, aproximadamente 1:4, aproximadamente 1:5, aproximadamente 1:6, aproximadamente 1:7, aproximadamente 1:8, aproximadamente 1:9, aproximadamente 1:10, aproximadamente 1:15, aproximadamente 1:20, aproximadamente 1:30, aproximadamente 1:40, aproximadamente 1:50, aproximadamente 1:60, aproximadamente 1:70, aproximadamente 1:80, aproximadamente 1:90, aproximadamente 1:100, aproximadamente 1:120, aproximadamente 1:140, aproximadamente 1:160, aproximadamente 1:180, aproximadamente 1:200, aproximadamente 200:1, aproximadamente 180:1, aproximadamente 160:1, aproximadamente 140:1, aproximadamente 120:1, aproximadamente 100:1, aproximadamente 90:1, aproximadamente 80:1, aproximadamente 70:1, aproximadamente 60:1, aproximadamente 50:1, aproximadamente 40:1, aproximadamente 30:1, aproximadamente 20:1, aproximadamente 15:1, aproximadamente 10:1, aproximadamente 9:1, aproximadamente 8:1, aproximadamente 7:1, aproximadamente 6:1, aproximadamente 5:1, aproximadamente 4:1, aproximadamente 3:1, o aproximadamente 2:1 mg de primer anticuerpo frente a mg de segundo anticuerpo. Por ejemplo, la proporción de 3:1 de un primer anticuerpo y un segundo anticuerpo puede significar que un vial puede contener aproximadamente 240 mg del primer anticuerpo y 80 mg del segundo anticuerpo o aproximadamente 3 mg/ml del primer anticuerpo y 1 mg/ml del segundo anticuerpo.

35 El uso del término "dosis fija" con respecto a la composición de la invención significa una dosis que se administra a un paciente sin tener en cuenta el peso o el área de superficie corporal (BSA) del paciente. Por lo tanto, la dosis fija no se proporciona como una dosis de mg/kg, sino más bien como una cantidad absoluta del agente (por ejemplo, el anticuerpo anti-CTLA4 y/o el anticuerpo anti-PD-1). Por ejemplo, una persona de 60 kg y una persona de 100 kg recibirían la misma dosis de la composición (por ejemplo, 240 mg de un anticuerpo anti-PD-1 y 80 mg de un anticuerpo anti-CTLA4 en un solo vial de formulación de dosificación fijada que contiene 240 mg de un anticuerpo anti-PD-1 y 80 mg de un anticuerpo anti-CTLA4 (o dos viales de formulación de dosificación fijada que contienen 120 mg de un anticuerpo anti-PD-1 y 40 mg de un anticuerpo anti-CTLA4, etc.).

45 El término "dosis basada en el peso" tal como se menciona en el presente documento significa que una dosis que se administra a un paciente se calcula en función del peso del paciente. Por ejemplo, cuando un paciente con 60 kg de peso corporal requiere 3 mg/kg de un anticuerpo anti-PD-1 en combinación con 1 mg/kg de un anticuerpo anti-CTLA4, se pueden extraer las cantidades apropiadas del anticuerpo anti-PD-1 (es decir, 180 mg) y el anticuerpo anti-CTLA4 (es decir, 60 mg) a la vez a partir de una formulación de dosificación fija de proporción 3:1 de un anticuerpo anti-PD-1 y un anticuerpo anti-CTLA4.

50 La expresión "composición de referencia" tal como se usa en el presente documento se refiere a una composición que comprende el primer anticuerpo o el segundo anticuerpo, pero no ambos. La composición de referencia puede comprender los mismos componentes de la composición que comprende el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo, excepto la presencia de un anticuerpo. En otras realizaciones, la composición de referencia es una composición correspondiente comercialmente disponible, por ejemplo, OPDIVO® o KEYRUDAO para el anticuerpo anti-PD-1 o YERVOY® para el anticuerpo anti-CTLA-4.

60 Las expresiones "GITR", "miembro 18 de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral", "receptor de la familia de TNFR inducible por activación" o "proteína relacionada con TNFR inducida por glucocorticoides" se refieren a una proteína que es miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral. GITR está codificado por el gen *TNFRSF18* en seres humanos. Es una proteína transmembrana de tipo I de 241 aminoácidos caracterizada por tres pseudorrepeticiones de cisteína en el dominio extracelular y protege de manera específica la apoptosis inducida por el receptor de linfocitos T, aunque no protege a las células frente a otras señales apoptóticas, incluyendo el desencadenamiento por Fas, el tratamiento con dexametasona o la irradiación UV (Nocentini, G, et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci, Estados Unidos 94:6216-6222). El término GITR tal como se usa en el presente documento incluye

GITR humano (hGITR), variantes, isoformas y homólogos de especies de hGITR, y análogos que tienen al menos un epítipo común con hGITR. Se han identificado tres isoformas de hGITR, todas las cuales comparten el mismo dominio extracelular, a excepción su porción C-terminal. La variante 1 (número de registro NP\_004186) consta de 241 aminoácidos y representa el transcrito más largo. Contiene un segmento de codificación adicional que lleva a un desplazamiento de marco, en comparación con la variante 2. La proteína resultante (isoforma 1) contiene un extremo C-terminal distinto y más corto, en comparación con la isoforma 2. La variante 2 (número de registro NP\_683699) codifica la proteína más larga (isoforma 2), que consta de 255 aminoácidos, y es soluble. La variante 3 (número de registro NP\_683700) contiene un segmento de codificación adicional que lleva a un cambio de marco, en comparación con la variante 2. La proteína resultante (isoforma 3) contiene un extremo C-terminal distinto y más corto, en comparación con la isoforma 2, y consta de 234 aminoácidos.

El término "inmunoterapia" se refiere al tratamiento de un sujeto afectado por, o está en riesgo de contraer o padecer una recurrencia de, una enfermedad mediante un método que comprende inducir, aumentar, suprimir o modificar de otro modo modificar una respuesta inmunitaria.

El término "LAG3", "LAG-3" o "gen 3 de activación de linfocitos" se refiere al gen 3 de activación de linfocitos. El término LAG-3 tal como se usa en el presente documento incluye LAG-3 humano (hLAG-3), variantes, isoformas y homólogos de especies de hLAG-3, y análogos que tienen al menos un epítipo común con hLAG-3. El término "LAG-3 humano" se refiere a la secuencia de LAG-3 humano, tal como la secuencia de aminoácidos completa de LAG-3 humano que tiene el N.º de registro de Genbank NP\_002277. El término "LAG-3 de ratón" se refiere a la secuencia de LAG-3 de ratón, tal como la secuencia de aminoácidos completa de LAG-3 de ratón que tiene el número de registro de Genbank NP\_032505. LAG-3 también se conoce en la técnica como, por ejemplo, CD223. La secuencia de LAG-3 humano puede diferir del LAG-3 humano del número de registro de Genbank NP\_002277 al tener, por ejemplo, mutaciones conservadas o mutaciones en regiones no conservadas y el LAG-3 tiene sustancialmente la misma función biológica que el LAG-3 humano del número de registro de Genbank NP\_002277. Por ejemplo, una función biológica del LAG-3 humano es tener un epítipo en el dominio extracelular del LAG-3 que está unido específicamente por un anticuerpo de la presente divulgación o una función biológica del LAG-3 humano es la unión a las moléculas del MHC de clase II.

El término "liofilizado" tal como se usa en el presente documento en relación con la formulación según la invención denota una formulación que se fabrica mediante métodos de liofilización conocidos en la técnica per se. El disolvente (por ejemplo, agua) se elimina por congelación después de sublimación al vacío y desorción de agua residual a temperatura elevada. En el campo farmacéutico, el liofilizado tiene generalmente humedad residual de aproximadamente el 0,1 al 5 % (p/p) y está presente en forma de polvo o un polvo compacto para suspensión físicamente estable. El liofilizado se caracteriza por una rápida disolución después de la adición de un medio de reconstitución.

El término "receptor tipo Ig asesino", "receptor inhibidor asesino" o "KIR", se refiere a una proteína o polipéptido codificado por un gen que es miembro de la familia de genes KIR o por un ADNc preparado a partir de dicho gen. Una revisión detallada de la familia de genes KIR, incluyendo la nomenclatura de genes KIR y productos de genes KIR, y números de acceso de Genbank para KIR a modo de ejemplo, es "The KIR Gene Cluster" de M. Carrington y P. Norman, disponible en el sitio web del NCBI llamado Bookshelf (accesible en [ncbi.nlm.nih.gov/books](http://ncbi.nlm.nih.gov/books)). El término KIR tal como se usa en el presente documento incluye KIR humano (hKIR), variantes, isoformas y homólogos de especies de hKIR, y análogos que tienen al menos un epítipo común con hKIR. Las secuencias de los genes KIR humanos y de los ADNc, así como sus productos proteicos, están disponibles en bases de datos públicas, incluyendo GenBank. Las entradas de GenBank a modo de ejemplo no limitantes de KIR humanos tienen los siguientes números de registro: KIR2DL1: Número de registro de Genbank U24076, NM\_014218, AAR16197 o L41267; KIR2DL2: Número de registro de Genbank U24075 o L76669; KIR2DL3: Número de registro de Genbank U24074 o L41268; KIR2DL4: Número de registro de Genbank X97229; KIR2DS1: Número de registro de Genbank X89892; KIR2DS2: Número de registro de Genbank L76667; KIR2DS3: Número de registro de Genbank NM\_012312 o L76670 (variante de corte y empalme); KIR3DL1: Número de registro de Genbank L41269; y KIR2DS4: Número de registro de Genbank AAR26325. Un KIR puede comprender de 1 a 3 dominios extracelulares, y puede tener una cola citoplasmática larga (es decir, más de 40 aminoácidos) o corta (es decir, menos de 40 aminoácidos). Tal como se describió anteriormente en el presente documento, estas características determinan la nomenclatura de un KIR. KIR se describe más detalladamente en Int'l Publ. N.º WO / 2014/055648.

"Muerte programada 1 (PD-1)" se refiere a un receptor inmunoinhibidor que pertenece a la familia CD28. PD-1 se expresa predominantemente en linfocitos T previamente activados *in vivo*, y se une a dos ligandos, PD-L1 y PD-L2. El término "PD-1", tal como se usa en el presente documento, incluye PD-1 humana (hPD-1), variantes, isoformas y homólogos de especies de hPD-1, y análogos que tienen al menos un epítipo común con hPD-1. La secuencia completa de hPD-1 se puede encontrar en el número de registro de GenBank U64863. "PD-1" y "receptor PD-1" se usan indistintamente en el presente documento.

El "ligando de muerte programada 1 (PD-L1)" es uno de los dos ligandos de glucoproteína de la superficie celular para PD-1 (el otro es PD-L2) que regula negativamente la activación de los linfocitos T y la secreción de citocinas al unirse a PD-1. El término "PD-L1", tal como se usa en el presente documento, incluye PD-L1 humana (hPD-L1), variantes, isoformas y homólogos de especies de hPD-L1, y análogos que tienen al menos un epítipo común con hPD-L1. La

secuencia completa de hPD-L1 se puede encontrar en el número de registro de GenBank Q9NZQ7.

La expresión "formulación reconstituida" tal como se usa en el presente documento denota una formulación que se liofiliza y se redissuelve mediante la adición de un diluyente. El diluyente puede contener, por ejemplo, inyección de cloruro de sodio al 0,9 %, USP o inyección de dextrosa al 5 %, USP.

Un "sujeto" incluye cualquier humano o animal no humano. La expresión "animal no humano" incluye, pero sin limitación, vertebrados tales como primates no humanos, ovejas, perros y roedores tales como ratones, ratas y cobayas. En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano. Las expresiones, "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente en el presente documento.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" o "dosificación terapéuticamente eficaz" de un fármaco o agente terapéutico es cualquier cantidad del fármaco que, cuando se usa solo o en combinación con otro agente terapéutico, protege a un sujeto contra el inicio de una enfermedad o promueve la regresión de la enfermedad evidenciada por una disminución en la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento en la frecuencia y duración de los períodos libres de síntomas de la enfermedad, o una prevención del empeoramiento o discapacidad debido a la enfermedad. La capacidad de un agente terapéutico para promover la regresión de la enfermedad se puede evaluar utilizando varios métodos conocidos por el profesional experto, tal como en sujetos humanos durante ensayos clínicos, en sistemas de modelos animales que predicen la eficacia en seres humanos, o analizando la actividad del agente en ensayos *in vitro*.

Tal como se usa en el presente documento, "dosis subterapéutica" significa una dosis de un compuesto terapéutico (por ejemplo, un anticuerpo) que es inferior a la dosis habitual o típica del compuesto terapéutico cuando se administra solo para el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa (por ejemplo, cáncer).

El "tratamiento" o "terapia" de un sujeto se refiere a cualquier tipo de intervención o proceso realizado en, o la administración de un agente activo para, el sujeto con el objetivo de invertir, aliviar, mejorar, inhibir, ralentizar o prevenir la aparición, progresión, desarrollo, gravedad o recurrencia de un síntoma, complicación o afección o indicios bioquímicos asociados a una enfermedad.

El uso de la alternativa (por ejemplo, "o") debe entenderse que significa o bien uno, ambos o cualquier combinación de los mismos de las alternativas. Tal como se usa en el presente documento, los artículos indefinidos "un" o "uno" deben entenderse que se refieren a "uno o más" de cualquier componente citado o enumerado.

Las expresiones "aproximadamente" o "que comprende esencialmente" se refieren a un valor o composición que está dentro de un intervalo de error aceptable para el valor o composición particular según lo determine un experto en la materia, que dependerá en parte de cómo se mide o determina el valor o composición, es decir, de las limitaciones del sistema de medida. Por ejemplo, "aproximadamente" o "que comprende esencialmente" puede significar dentro de 1 o más de 1 desviación estándar según la práctica en la técnica. Como alternativa, "aproximadamente" o "que comprende esencialmente" puede significar un intervalo de hasta el 10 % o el 20 % (es decir,  $\pm$  el 10 % o  $\pm$  el 20 %). Por ejemplo, aproximadamente 3 mg puede incluir cualquier número entre 2,7 mg y 3,3 mg (para el 10 %) o entre 2,4 mg y 3,6 mg (para el 20 %). Además, particularmente con respecto a los sistemas o procesos biológicos, las expresiones pueden significar hasta un orden de magnitud o hasta 5 veces de un valor. Cuando se proporcionan valores o composiciones particulares en la solicitud y las reivindicaciones, salvo que se indique otra cosa, se debe asumir que el significado de "aproximadamente" o "que comprende esencialmente" está dentro de un intervalo de error aceptable para ese valor o composición particular.

Los términos "una vez cada semana", "una vez cada dos semanas", o cualquier otro término de intervalo de dosificación similar tal como se usa en el presente documento significa números aproximados. "Una vez cada semana" puede incluir cada siete días  $\pm$  un día, es decir, cada seis días a cada ocho días. "Una vez cada dos semanas" puede incluir cada catorce días  $\pm$  tres días, es decir, cada once días a cada diecisiete días. Se aplican aproximaciones similares, por ejemplo, a una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez cada cinco semanas, una vez cada seis semanas y una vez cada doce semanas. En algunas realizaciones, un intervalo de dosificación de una vez cada seis semanas o una vez cada doce semanas significa que la primera dosis se puede administrar cualquier día de la primera semana, y luego la siguiente dosis se puede administrar cualquier día de la sexta o duodécima semana, respectivamente. En otras realizaciones, un intervalo de dosificación de una vez cada seis semanas o una vez cada doce semanas significa que la primera dosis se administra un día particular de la primera semana (por ejemplo, lunes) y luego la siguiente dosis se administra el mismo día de la sexta o duodécimas semanas (es decir, lunes), respectivamente.

Tal como se describe en el presente documento, cualquier intervalo de concentración, intervalo de porcentaje, intervalo de relación o intervalo de número entero se entiende que incluye el valor de cualquier número entero dentro del intervalo citado y, cuando sea adecuado, fracciones del mismo (tal como una décima y una centésima de un número entero), a menos que se indique otra cosa.

Diversos aspectos de la divulgación se describen en más detalle en las siguientes subsecciones.

*Anticuerpos anti-PD-1 y anti-PD-L1*

5 Las composiciones desveladas en el presente documento incluyen un primer anticuerpo y un segundo anticuerpo en una proporción entre 1:100 a 100:1. En un aspecto, el primer anticuerpo es un anticuerpo anti-PD-1 o un anticuerpo anti-PD-L1. PD-1 es un receptor de punto de control inmunitario clave expresado por los linfocitos T y B activados y media la inmunosupresión. PD-1 es un miembro de la familia de receptores CD28, que incluye CD28, CTLA-4, ICOS, PD-1 y BTLA. Se han identificado dos ligandos de glicoproteína de la superficie celular para PD-1, ligando de muerte programada-1 (PD-L1) y ligando de muerte programada-2 (PD-L2), que se expresan en las células presentadoras de antígeno, así como en muchos cánceres humanos, y se ha demostrado que regulan negativamente la activación de los linfocitos T y la secreción de citocinas tras la unión a PD-1. La inhibición de la interacción PD-1/PD-L1 media la potente actividad antitumoral en modelos preclínicos.

15 Los HuMAb que se unen específicamente a PD-1 con alta afinidad se han desvelado en las patentes de EE. UU. N.º 8.008.449 y 8.779.105. Otros mAb anti-PD-1 se han descrito en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 6.808.710, 7.488.802, 8.168.757 y 8.354.509, y la Publicación PCT N.º WO 2012/145493. Se ha demostrado que cada uno de los HuMAb anti-PD-1 desvelados en la Patente de EE.UU. N.º 8.008.449 presenta una o más de las siguientes características: (a) se une a PD-1 humano con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-7}$  M o menos, tal como se determina por resonancia de plasmón de superficial usando un sistema de biosensor Biacore; (b) no se une sustancialmente al CD28 humano, CTLA-4 o ICOS; (c) aumenta la proliferación de linfocitos T en un ensayo de reacción mixta de linfocitos (MLR); (d) aumenta la producción de interferón- $\gamma$  en un ensayo de MLR; (e) aumenta la secreción de IL-2 en un ensayo de MLR; (f) se une a PD-1 humano y a PD-1 de mono cinomolgo; (g) inhibe la unión de PD-L1 y/o PD-L2 a PD-1; (h) estimula respuestas de memoria específicas de antígeno; (i) estimula las respuestas de Ab; y (j) inhibe el crecimiento de las células tumorales *in vivo*. Los anticuerpos anti-PD-1 útiles para la presente invención incluyen mAb que se unen específicamente a PD-1 humano y presentan al menos una, preferentemente al menos cinco, de las características anteriores.

30 De acuerdo con la invención, el anticuerpo anti-PD-1 es nivolumab. Nivolumab (también conocido como "OPDIVO®"; anteriormente designado 5C4, BMS-936558, MDX-1106 u ONO-4538) es un anticuerpo inhibidor del punto de control inmunitario PD-1 IgG4 (S228P) completamente humano que evita selectivamente la interacción con los ligandos PD-1 (PD-L1 y PD-L2), bloqueando así la baja regulación de funciones antitumorales de linfocitos T (Patente de Estados Unidos N.º 8.008.449; Wang et al., 2014 *Cancer Immunol Res.* 2(9):846-56). En otro aspecto de la divulgación, el anticuerpo anti-PD-1 o fragmento del mismo compite de manera cruzada con nivolumab. En otros aspectos de la divulgación, el anticuerpo anti-PD-1 o el fragmento del mismo se une al mismo epítipo que nivolumab. En determinados aspectos de la divulgación, el anticuerpo anti-PD-1 tiene las mismas CDR que nivolumab.

40 En otro aspecto de la divulgación, el anticuerpo anti-PD-1 o fragmento del mismo compite de manera cruzada con pembrolizumab. En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo anti-PD-1 o el fragmento del mismo se une al mismo epítipo que pembrolizumab. En determinados aspectos de la divulgación, el anticuerpo anti-PD-1 tiene las mismas CDR que el pembrolizumab. En otro aspecto de la divulgación, el anticuerpo anti-PD-1 es pembrolizumab. Pembrolizumab (también conocido como "KEYTRUDA®", lambrolizumab y MK-3475) es un anticuerpo monoclonal IgG4 humanizado dirigido contra el receptor de superficie celular humana PD-1 (muerte programada-1 o muerte celular programada-1). Se describe pembrolizumab, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos N.º 8.354.509 y 8.900.587; véase además <http://www.cancer.gov/drugdictionary?cdrid=695789> (último acceso: 14 de diciembre de 2014). El pembrolizumab ha sido aprobado por la FDA para el tratamiento del melanoma recidivante o refractario.

50 En otros aspectos de la divulgación, el anticuerpo anti-PD-1 o fragmento del mismo compite de manera cruzada con MEDI0608. En otros aspectos más de la divulgación, el anticuerpo anti-PD-1 o fragmento del mismo se une al mismo epítipo que MEDI0608. En determinados aspectos de la divulgación, el anticuerpo anti-PD-1 tiene las mismas CDR que MEDI0608. En otros aspectos de la divulgación, el anticuerpo anti-PD-1 es MEDI0608 (anteriormente AMP-514), que es un anticuerpo monoclonal. Se describe MEDI0608, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N.º 8.609.089B2 o en <http://www.cancer.gov/drugdictionary?cdrid=756047> (último acceso el 14 de diciembre de 2014).

55 En determinados aspectos de la divulgación, el primer anticuerpo es un antagonista anti-PD-1. Un ejemplo del antagonista anti-PD-1 es AMP-224, que es una proteína de fusión B7-DC Fc. AMP-224 se discute en la publicación de EE. UU. N.º 2013/0017199 o en <http://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-drug?cdrid=700595> (último acceso el 8 de julio de 2015).

60 En otros aspectos de la divulgación, el anticuerpo anti-PD-1 o fragmento del mismo compite de manera cruzada con BGB-A317. En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo anti-PD-1 o fragmento del mismo se une al mismo epítipo que BGB-A317. En determinados aspectos de la divulgación, el anticuerpo anti-PD-1 tiene las mismas CDR que BGB-A317. En determinados aspectos de la divulgación, el anticuerpo anti-PD-1 es BGB-A317, que es un anticuerpo monoclonal humanizado. BGB-A317 se describe en la Publ. de EE.UU. N.º 2015/0079109.

65 Los anticuerpos anti-PD-1 útiles para las composiciones desveladas también incluyen anticuerpos aislados que se unen específicamente a la PD-1 humana y compiten por la unión a la PD-1 humana con nivolumab (véase, por ejemplo,

- las Patentes de los Estados Unidos N.º 8.008.449 y 8.779.105; el documento WO 2013/173223). La capacidad de los anticuerpos para competir de forma cruzada por la unión a un antígeno indica que estos anticuerpos se unen a la misma región del epítipo del antígeno y estéricamente impiden la unión de otros anticuerpos de competencia cruzada a esa región del epítipo particular. Se espera que estos anticuerpos de competencia cruzada tengan propiedades funcionales muy similares a las de nivolumab en virtud de su unión a la misma región del epítipo de PD-1. Los anticuerpos de competencia cruzada se pueden identificar fácilmente en función de su capacidad de competir con nivolumab en ensayos de unión a PD-1 estándar, como el análisis Biacore, los ensayos ELISA o la citometría de flujo (véase, por ejemplo, el documento WO 2013/173223).
- En determinados aspectos de la divulgación, los anticuerpos que compiten de forma cruzada por unirse a la PD-1 humana con, o que se unen a la misma región del epítipo de la PD-1 humana que, nivolumab son mAb. Para la administración a sujetos humanos, estos anticuerpos de competencia cruzada pueden ser anticuerpos quiméricos, o anticuerpos humanizados o humanos. Tales mAb quiméricos, humanizados o humanos se pueden preparar y aislar mediante métodos bien conocidos en la técnica.
- Los anticuerpos anti-PD-1 útiles para las composiciones desveladas también incluyen porciones de unión a antígeno de los anticuerpos anteriores. Se ha demostrado ampliamente que la función de unión a antígeno de un anticuerpo se puede realizar por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de los fragmentos de unión abarcados en la expresión "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios  $V_L$ ,  $V_H$ , y los dominios  $C_L$  y  $C_{H1}$ ; (ii) un fragmento  $F(ab')_2$ , un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios  $V_H$  y  $C_{H1}$ ; y (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios  $V_L$  y  $V_H$  de un solo brazo de un anticuerpo.
- Los anticuerpos anti-PD-1 adecuados para su uso en las composiciones desveladas son anticuerpos que se unen a PD-1 con alta especificidad y afinidad, bloquean la unión de PD-L1 y/o PD-L2 e inhiben el efecto inmunosupresor de la vía de señalización de PD-1. En cualquiera de las composiciones o métodos desvelados en el presente documento, un "anticuerpo" anti-PD-1 incluye una porción o fragmento de unión a antígeno que se une al receptor PD-1 y presenta propiedades funcionales similares a las de los anticuerpos completos al inhibir la unión del ligando y regular el sistema inmunitario. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 o la porción de unión a antígeno del mismo compite de forma cruzada con nivolumab para unirse a PD-1 humano. En otros aspectos de la divulgación, el anticuerpo anti-PD-1 o la porción de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo monoclonal quimérico, humanizado o humano o una porción del mismo. En determinados aspectos de la divulgación, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En otros aspectos de la divulgación, el anticuerpo es un anticuerpo humano. Se pueden usar anticuerpos de un isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.
- En determinados aspectos de la divulgación, el anticuerpo anti-PD1 o la porción de unión a antígeno del mismo comprende una región constante de cadena pesada que es de un isotipo IgG1 o IgG4 humano. En ciertas otras realizaciones, la secuencia de la región constante de la cadena pesada de IgG4 del anticuerpo anti-PD-1 o la porción de unión a antígeno del mismo contiene una mutación S228P que reemplaza un resto de serina en la región de la bisagra con el resto de prolina que normalmente se encuentra en la posición correspondiente en los anticuerpos de isotipo IgG1. Esta mutación, que está presente en nivolumab, evita el intercambio de brazos Fab con anticuerpos IgG4 endógenos, mientras que mantiene la baja afinidad por la activación de los receptores Fc asociados a los anticuerpos IgG4 de tipo silvestre (Wang *et al.* 2014). En otros aspectos más de la divulgación, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena ligera que es una región constante kappa o lambda humana. En otros aspectos de la divulgación, el anticuerpo anti-PD-1 o la porción de unión a antígeno del mismo es un mAb o una porción de unión a antígeno del mismo. En cualquiera de los métodos terapéuticos descritos en el presente documento que comprenden la administración de un anticuerpo anti-PD-1, el anticuerpo anti-PD-1 es nivolumab. En otros aspectos de la divulgación, el anticuerpo anti-PD-1 es pembrolizumab. En otros aspectos de la divulgación, el anticuerpo anti-PD-1 se elige entre los anticuerpos humanos 17D8, 2D3, 4H1, 4A11, 7D3 y 5F4 descritos en la Patente de los Estados Unidos N.º 8.008.449. En otros aspectos más de la divulgación, el anticuerpo anti-PD-1 es MEDI0608 (anteriormente AMP-514), AMP-224 o Pidilizumab (CT-011).
- En determinados aspectos de la divulgación, el primer anticuerpo para la composición desvelada es un anticuerpo anti-PD-L1. Debido a que anti-PD-1 y anti-PD-L1 se dirigen a la misma vía de señalización y se ha demostrado en ensayos clínicos que presentan niveles similares de eficacia en varios cánceres, un anticuerpo anti-PD-L1 puede ser sustituido por el anticuerpo anti-PD-1 en cualquiera de los métodos o composiciones terapéuticas desvelados en el presente documento. En ciertos aspectos de la divulgación, el anticuerpo anti-PD-L1 es BMS-936559 (anteriormente 12A4 o MDX-1105) (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N.º 7.943.743; el documento WO 2013/173223). En otros aspectos de la divulgación, el anticuerpo anti-PD-L1 es MPDL3280A (también conocido como RG7446 y atezolizumab) (véase, por ejemplo, Herbst *et al.* 2013 J Clin Oncol 31(supl):3000; Patente de EE.UU. N.º 8.217.149), MEDI4736 (Khleif, 2013, En: Actas del Congreso Europeo del Cáncer 2013; 27 de septiembre-1 de octubre de 2013; Ámsterdam, Países Bajos. Resumen 802) o MSB0010718C (también llamado Avelumab; Véase el documento US 2014/0341917). En determinados aspectos de la divulgación, los anticuerpos que compiten de forma cruzada para unirse a PD-L1 humano con, o se unen a la misma región del epítipo de PD-L1 humano que los anticuerpos de PD-L1 de las referencias anteriores son mAb. Para la administración a sujetos humanos, estos anticuerpos de competencia

cruzada pueden ser anticuerpos quiméricos, o pueden ser anticuerpos humanizados o humanos. Tales mAb quiméricos, humanizados o humanos se pueden preparar y aislar mediante métodos bien conocidos en la técnica.

#### *Anticuerpos anti-CTLA-4*

5 Los anticuerpos anti-CTLA-4 desvelados en el presente documento se unen a CTLA-4 humano para alterar la interacción de CTLA-4 con un receptor B7 humano. Debido a que la interacción de CTLA-4 con B7 transduce una señal que conduce a la inactivación de los linfocitos T que llevan el receptor CTLA-4, la alteración de la interacción induce, mejora o prolonga de manera eficaz la activación de tales linfocitos T, induciendo, potenciando o prolongando de ese modo una respuesta inmunitaria.

15 Los HuMAb que se unen de manera específica a CTLA-4 con alta afinidad se han desvelado en las patentes de los Estados Unidos N.º 6.984.720 y 7.605.238. Otros mAb anti-CTLA-4 se han descrito en, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos N.º 5.977.318, 6.051.227, 6.682.736 y 7.034.121. Se ha demostrado que los HuMAb anti-CTLA-4 desvelados en las patentes de los Estados Unidos N.º 6.984.720 y 7.605.238 presentan una o más de las siguientes características: (a) se une específicamente a CTLA-4 humana con una afinidad de unión reflejada por una constante de asociación de equilibrio ( $K_a$ ) de al menos aproximadamente  $10^7$  M<sup>-1</sup>, o aproximadamente  $10^9$  M<sup>-1</sup>, o aproximadamente  $10^{10}$  M<sup>-1</sup> a  $10^{11}$  M<sup>-1</sup> o más alta, tal como se determina por el análisis Biacore; (b) una constante de asociación cinética ( $k_a$ ) de al menos aproximadamente  $10^3$ , aproximadamente  $10^4$ , o aproximadamente  $10^5$  m<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>; (c) una constante de disociación cinética ( $k_d$ ) de al menos aproximadamente  $10^3$ , aproximadamente  $10^4$ , o aproximadamente  $10^5$  m<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> y (d) inhibe la unión de CTLA-4 a B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86). Los anticuerpos anti-CTLA-4 útiles para la presente invención incluyen mAb que se unen específicamente a CTLA-4 humano y presentan al menos una, al menos dos, o al menos tres de las características anteriores. Un ejemplo de anticuerpo clínico anti-CTLA-4 es el mAb humano 10D1 (ahora conocido como ipilimumab y comercializado como YERVOY®) tal como se desvela en la Patente de Estados Unidos N.º 6.984.720.

30 Un ejemplo de anticuerpo clínico anti-CTLA-4 es el mAb humano 10D1 (ahora conocido como ipilimumab y comercializado como YERVOY®) tal como se desvela en la Patente de Estados Unidos N.º 6.984.720. Ipilimumab es un anticuerpo anti-CTLA-4 para su uso en los métodos descritos en el presente documento. Ipilimumab es un anticuerpo monoclonal IgG1 completamente humano que bloquea la unión de CTLA-4 a sus ligandos B7, estimulando así la activación de los linfocitos T y mejorando la supervivencia general (SG) en pacientes con melanoma avanzado.

35 Otro anticuerpo anti-CTLA-4 útil para los métodos desvelados en el presente documento es tremelimumab (también conocido como CP-675,206). Tremelimumab es el anticuerpo monoclonal IgG2 humano anti-CTLA-4. Tremelimumab se describe en los documentos WO/2012/122444, Publ. de EE.UU. N.º 2012/263677, o Publ. WO N.º 2007/113648 A2.

40 Los anticuerpos anti-CTLA-4 útiles para la composición desvelada también incluyen anticuerpos aislados que se unen de manera específica a CTLA-4 de humano y compiten de manera cruzada por la unión a CTLA-4 de humano con ipilimumab o tremelimumab o se unen a la misma región del epítipo de CTLA-4 de humano como ipilimumab o tremelimumab. En ciertas realizaciones, los anticuerpos que compiten de forma cruzada por unirse al CTLA-4 humano con, o unirse a la misma región del epítipo del CTLA-4 humano que el ipilimumab o el tremelimumab, son anticuerpos que comprenden una cadena pesada del isotipo IgG1 humano. Para la administración a sujetos humanos, estos anticuerpos de competencia cruzada son anticuerpos quiméricos, o anticuerpos humanizados o humanos. Los anticuerpos anti-CTLA-4 útiles también incluyen porciones de unión a antígeno de los anticuerpos anteriores tales como fragmentos Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fd o Fv.

#### *Anticuerpos anti-LAG-3*

50 Los anticuerpos anti-LAG-3 desvelados en el presente documento se unen a LAG-3 humano. Los anticuerpos que se unen a LAG-3 se han revelado en Int'l Publ. N.º WO/2015/042246 y las Publ. de EE.UU. N.º 2014/0093511 y 2011/0150892.

55 Un ejemplo de anticuerpo de LAG-3 es 25F7 (descrito en la publicación de EE.UU. N.º 2011/0150892). Un anticuerpo de LAG-3 a modo de ejemplo adicional es BMS-986016. En un aspecto, un anticuerpo anti-LAG-3 útil para las composiciones desveladas en el presente documento compite de manera cruzada con 25F7 o BMS-986016. En otro aspecto, un anticuerpo anti-LAG-3 útil para las composiciones desveladas en el presente documento se une al mismo epítipo que 25F7 o BMS-986016. En otros aspectos, un anticuerpo anti-LAG-3 comprende seis CDR de 25F7 o BMS-986016.

#### *Anticuerpos anti-CD137*

65 Los anticuerpos anti-CD137 se unen específicamente a las células inmunitarias que expresan CD137 y las activan, estimulando una respuesta inmunitaria, en particular, una respuesta de linfocitos T citotóxicos, contra las células tumorales. Los anticuerpos que se unen a CD 137 se han desvelado en la publicación de EE.UU. N.º 2005/0095244 y las Pat. de Estados Unidos N.º 7.288.638, 6.887.673, 7.214.493, 6.303.121, 6.569.997, 6.905.685, 6.355.476,

6.362.325, 6.974.863 y 6.210.669.

En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD137 es urelumab (BMS-663513), descrito en la patente de EE.UU. N.º 7.288.638 (20H4.9-IgG4 [10C7 o BMS-663513]). En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD137 es BMS-663031 (20H4.9-IgG1), descrito en la patente de EE.UU. N.º 7.288.638. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD137 es 4E9 o BMS-554271, descrito en la patente de EE.UU. N.º 6.887.673. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD137 es un anticuerpo desvelado en las patentes de EE.UU. N.º 7.214.493; 6.303.121; 6.569.997; 6.905.685; o 6.355.476. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD137 es 1D8 o BMS-469492; 3H3 o BMS-469497; o 3E1, descrito en la patente de EE.UU. N.º 6.362.325. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD137 es un anticuerpo desvelado en la patente presentada en EE.UU. N.º 6.974.863 (tal como 53A2). En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD137 es un anticuerpo desvelado en la patente presentada en EE.UU. N.º 6.210.669 (como 1D8, 3B8 o 3E1). En algunos aspectos, el anticuerpo es PF-05082566 de Pfizer (PF-2566). En otros aspectos, un anticuerpo anti-CD137 compite de forma cruzada con los anticuerpos anti-CD137 desvelados en el presente documento. En algunos aspectos, un anticuerpo anti-CD137 se une al mismo epítipo que el anticuerpo anti-CD137 desvelado en el presente documento. En otros aspectos, un anticuerpo anti-CD 137 comprende seis CDR de los anticuerpos anti-CD137 desvelados en el presente documento.

#### *Anticuerpos anti-KIR*

Los anticuerpos que se unen específicamente a KIR bloquean la interacción entre los receptores tipo inmunoglobulina de células citolíticas (KIR) en las células NK con sus ligandos. El bloqueo de estos receptores facilita la activación de las células NK y, potencialmente, la destrucción de células tumorales por estas últimas. Se han desvelado ejemplos de anticuerpos anti-KIR en las Int'l Publ. N.º WO/2014/055648, WO 2005/003168, WO 2005/009465, WO 2006/072625, WO 2006/072626, WO 2007/042573, WO 2008/084106, WO 2010/065939, WO 2012/071411 y WO/2012/160448.

Un anticuerpo anti-KIR es lirilumab (también conocido como BMS-986015, IPH2102, o la variante S241P de I-7F9), descrita por primera vez en la Int'l Publ. N.º WO 2008/084106. Un anticuerpo anti-KIR adicional (también denominado IPH2101), se describe en la Int'l Publ. N.º WO 2006/003179. En un aspecto, un anticuerpo anti-KIR para la presente composición compite de manera cruzada por la unión a KIR con lirilumab o I-7F9. En otro aspecto, un anticuerpo anti-KIR se une al mismo epítipo que lirilumab o I-7F9. En otros aspectos, un anticuerpo anti-KIR comprende seis CDR de lirilumab o I-7F9.

#### *Anticuerpos anti-GITR*

Los anticuerpos anti-GITR para combinar con un anticuerpo anti-PD-1 en una dosis fija pueden ser cualquier anticuerpo anti-GITR que se una específicamente a la diana GITR humana y active el receptor del factor de necrosis tumoral inducido por glucocorticoides (GITR). GITR es un miembro de la superfamilia de receptores de TNF que se expresa en la superficie de múltiples tipos de células inmunitarias, incluidos los linfocitos T reguladores, los linfocitos T efectores, los linfocitos B, las células citolíticas naturales (NK) y células dendríticas activadas ("anticuerpos agonistas anti-GITR"). De manera específica, la activación de GITR aumenta la proliferación y la función de los linfocitos T efectores, además de abrogar la supresión inducida por los linfocitos T reguladores activados. Además, la estimulación GITR promueve la inmunidad antitumoral al aumentar la actividad de otras células inmunitarias tales como las células NK, las células presentadoras de antígeno y los linfocitos B. Se han desvelado ejemplos de anticuerpos anti-GITR en las Int'l Publ. N.º WO/2015/031667, WO2015/184.099, WO2015/026.684, WO11/028683 y WO/2006/105021, las Pat. N.º 7.812.135 y 8.388.967 y la Publ. de EE.UU. N.º 2009/0136494, 2014/0220002, 2013/0183321 y 2014/0348841.

En un aspecto, un anticuerpo anti-GITR es TRX518 (descrito en, por ejemplo, Schaer et al. Curr Opin Immunol. (2012) abr; 24(2): 217-224, y el documento WO/2006/105021). En otro aspecto, un anticuerpo anti-GITR es MK4166 o MK1248 y los anticuerpos descritos en los documentos WO11/028683 y U.S. 8.709.424, y que comprenden, por ejemplo, una cadena VH que comprende la SEQ ID NO: 104 y una cadena VL que comprende la SEQ ID NO: 105, en donde las SEQ ID NO son de los documentos WO11/028683 o US 8.709.424). En determinados aspectos, un anticuerpo anti-GITR es un anticuerpo anti-GITR que se desvela en el documento WO2015/031667, por ejemplo, un anticuerpo que comprende las CDR 1-3 de VH que comprende las SEQ ID NO: 31, 71 y 63 del documento WO2015/031667, respectivamente, y las CDR 1-3 de VL que comprenden las SEQ ID NO: 5, 14 y 30 del documento WO2015/031667. En determinados aspectos, un anticuerpo anti-GITR es un anticuerpo anti-GITR que se desvela en el documento WO2015/184099, por ejemplo, el anticuerpo Hum231 n.º 1 o Hum231 n.º 2, o las CDR del mismo, o un derivado del mismo (por ejemplo, pab1967, pab1975 o pab1979). En determinados aspectos, un anticuerpo anti-GITR es un anticuerpo anti-GITR que se desvela en los documentos JP2008278814, WO09/009116, WO2013/039954, US20140072566, US20140072565, US20140065152 o WO2015/026684 o es INBRX-110 (INHIBRx), LKZ-145 (Novartis) o MEDI-1873 (MedImmune). En determinados aspectos, un anticuerpo anti-GITR es un anticuerpo anti-GITR que se describe en el documento PCT/US2015/033991 (por ejemplo, un anticuerpo que comprende las regiones variables de 28F3, 18E10 o 19D3). Por ejemplo, un anticuerpo anti-GITR puede ser un anticuerpo que comprende las siguientes cadenas VH y VL o sus CDR:

VH:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWIYEG  
SNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSMVRGDY YYG  
MDVWGQGTTVTVS (SEQ ID NO: 1),

y

5 VL:

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDA  
SSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPYTFGQGTKLEIK (SEQ  
ID NO: 2);

o

10 VH:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGFHWVRQAPGKGLEWVA  
VIWYAGSNKIFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGQLDY  
YYYYVMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 3),

y

15 VL:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAA  
SSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFGQGTKLEIK  
(SEQ ID NO: 4);

o

20 VH:

VQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA  
VIWYAGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGRIAVA  
FYYSMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 5),

y

25 VL:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAA  
SSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFGQGTKLEIK  
(SEQ ID NO: 6).

30 En determinados aspectos, un anticuerpo que comprende un par de las cadenas ligeras VH y VL anteriores, o sus CDR, comprende una región constante de cadena pesada de un isotipo IgG1, ya sea de tipo silvestre o mutado, por ejemplo, para que no tenga efecto. En un aspecto, un anticuerpo anti-GITR comprende las siguientes secuencias de aminoácidos de cadenas pesadas y ligeras:

cadena pesada:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWV  
AVIWEYEGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSMV  
RGDYYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP  
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPKNTK  
VDKTRVERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE  
VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTIVHVDLWNGKEYKCKVSNK  
GLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN  
GQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS  
LSLSPG (SEQ ID NO: 7).

, y  
cadena ligera:

5

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDA  
SSLESGVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSTYPTFGQGTKLEIKRTV  
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD  
SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:  
8),

o  
cadena pesada:

10

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWV  
AVIWEYEGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSMV  
RGDYYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE  
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK  
VDKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAEPAGEAPSFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH  
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK  
VSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE  
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNH  
YTQKLSLSPG (SEQ ID NO: 9),

y  
cadena ligera:

15

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDA  
SSLESGVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSTYPTFGQGTKLEIKRTV  
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD  
SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:  
8).

En determinados aspectos, un anticuerpo anti-GITR para la presente composición compite de manera cruzada con un anticuerpo anti-GITR descrito en el presente documento, por ejemplo, TRX518, MK4166 o un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos del dominio VH y del dominio VL descrita en el presente documento. En algunos aspectos, un anticuerpo anti-GITR para la presente composición se une al mismo epítopo que el de un anticuerpo anti-GITR descrito en el presente documento, por ejemplo, TRX518, MK4166 o un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos del dominio VH y del dominio VL descrita en el presente documento. En determinados aspectos, un anticuerpo anti-GITR comprende las seis CDR de TRX518, MK4166 o los de un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos del dominio VH y del dominio VL descrita en el presente documento. Una composición farmacéutica a modo de ejemplo comprende un anticuerpo anti-PD-1, por ejemplo, nivolumab, MK-

20

25

3475 (pembrolizumab) o atezolizumab, y un anticuerpo agonista anti-GITR, por ejemplo, TRX518, MK4166 o un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos del dominio VH y del dominio VL descrita en el presente documento, en donde la proporción de la cantidad (por ejemplo, concentración (por ejemplo, mg/ml) o peso (por ejemplo, mg)) del anticuerpo anti-PD-1 a la cantidad del anticuerpo anti-GITR (por ejemplo, concentración (por ejemplo, mg/ml) o peso (por ejemplo, mg), respectivamente) es de aproximadamente 1:1-20; aproximadamente 1:1-10; aproximadamente 1:1-5; aproximadamente 1:2-5; aproximadamente 1:2-3; aproximadamente 1:3-5; aproximadamente 1-20:1; aproximadamente 1-10:1; aproximadamente 1-5:1; aproximadamente 2-5:1; aproximadamente 2-3:1; o aproximadamente 3-5:1. Por ejemplo, la proporción de (i) un anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 frente a (2) un anticuerpo anti-GITR, puede ser de 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1 o 10:1. ":" se refiere a "a" por ejemplo, "1:1-20" se refiere a una proporción de 1 a un número seleccionado de 1-20. La combinación se puede administrar semanalmente, quincenalmente, una vez cada tres semanas o mensualmente.

En determinados aspectos, un anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1, por ejemplo, nivolumab, pembrolizumab o atezolizumab, está formulado conjuntamente con un anticuerpo anti-GITR, en donde el anticuerpo anti-GITR está en una dosis, por ejemplo, una dosis fija, de 0,1 a 1000 mg, tal como 0,1 a 100 mg, 0,5 a 100 mg, 1 a 100 mg, 5 a 100 mg, 10 a 100 mg, 50 a 100 mg, 0,1 a 300 mg, 0,5 a 300 mg, 1 a 300 mg, 5 a 300 mg, 10 a 300 mg, 50 a 300 mg, 100 a 300 mg o 200 a 300 mg. Las cantidades a modo de ejemplo de anticuerpo anti-GITR que se pueden formular conjuntamente con un anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 incluyen aproximadamente 0,1 mg, aproximadamente 0,3 mg, aproximadamente 0,5 mg, aproximadamente 1 mg, aproximadamente 3 mg, aproximadamente 10 mg, aproximadamente 30 mg, aproximadamente 100 mg, aproximadamente 200 mg, aproximadamente 240 mg, aproximadamente 250 mg, aproximadamente 300 mg, aproximadamente 400 mg, aproximadamente 500 mg, aproximadamente 600 mg, aproximadamente 700 mg, aproximadamente 800 mg, aproximadamente 900 mg o aproximadamente 1000 mg. En ciertos aspectos, un anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 se formula conjuntamente con un anticuerpo anti-GITR, en donde la dosis del anticuerpo anti-PD-1 o PD-L1, es una dosis (por ejemplo, dosis fija) de 100-300 mg, tal como, 200-300 mg, 220-260 mg, 230-250 mg o 240 mg, como aproximadamente 60 mg, aproximadamente 80 mg, aproximadamente 100 mg, aproximadamente 120 mg, aproximadamente 140 mg, aproximadamente 160 mg, aproximadamente 180 mg, aproximadamente 200 mg, aproximadamente 220 mg, aproximadamente 240 mg, aproximadamente 260 mg, aproximadamente 280 o aproximadamente 300 mg.

En aspectos a modo de ejemplo, un anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1, por ejemplo, nivolumab, pembrolizumab o atezolizumab, está formulado conjuntamente con un anticuerpo anti-GITR, por ejemplo, un anticuerpo que comprende (i) un dominio VH y VL que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1 y 2, respectivamente, SEQ ID NO: 3 y 4, respectivamente, o las SEQ ID NO: 5 y 6, respectivamente; o la CDR1, CDR2, CDR3 de VH y la CDR1, CDR2 y CDR3 de VL de cualquiera de estos pares de regiones variables, o (ii) las cadenas pesadas y ligeras que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO 7 y 8, respectivamente, o las SEQ ID NO: 7 y 9, respectivamente, a las siguientes proporciones de dosis fijas: 80-300 mg de anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 a 1-1000 mg de anticuerpo anti-GITR; 80-300 mg de anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 a 1-100 mg de anticuerpo anti-GITR; 80-300 mg de anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 a 10-100 mg de anticuerpo anti-GITR; 80-300 mg de anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 a 10-300 mg de anticuerpo anti-GITR u 80-300 mg de anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 a 100-300 mg del anticuerpo anti-GITR. En aspectos a modo de ejemplo, nivolumab está formulado conjuntamente con un anticuerpo anti-GITR, en donde la dosis de nivolumab es de aproximadamente 80 mg o aproximadamente 240 mg. Se puede administrar una combinación de dosis fija como una infusión intravenosa durante, por ejemplo, aproximadamente 30, aproximadamente 30-60, aproximadamente 60 o aproximadamente 60-90 minutos cada aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3 o aproximadamente 4 semanas.

En determinados aspectos, aproximadamente 3 mg/kg de anticuerpo anti-PD-1, por ejemplo, nivolumab, pueden administrarse juntos, por ejemplo, como una combinación de dosis fija, con aproximadamente 0,1-10 mg/kg, aproximadamente 0,1-5 mg/kg, aproximadamente 0,5-10 mg/kg, aproximadamente 0,5-5 mg/kg, aproximadamente 0,5-2 mg/kg, aproximadamente 1-2 mg/kg o aproximadamente 2-5 mg/kg de anticuerpo anti-GITR, por ejemplo, TRX518, MK4166, o un anticuerpo que comprende las cadenas pesadas y ligeras o regiones variables o CDR descritas en el presente documento, por ejemplo, como una infusión intravenosa sobre, por ejemplo, aproximadamente 30, aproximadamente 30-60, aproximadamente 60 o aproximadamente 60-90 minutos cada aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3 o aproximadamente 4 semanas. En determinados aspectos, aproximadamente 2 mg/kg de anticuerpo anti-PD-1, por ejemplo, nivolumab o MK-3475, se administra en conjunto, por ejemplo, como una combinación de dosis fija, con aproximadamente 0,1-10 mg/kg, aproximadamente 0,1-5 mg/kg, aproximadamente 0,5-10 mg/kg, aproximadamente 0,5-5 mg/kg, aproximadamente 0,5-2 mg/kg, aproximadamente 1-2 mg/kg o aproximadamente 2-5 mg/kg de anticuerpo anti-GITR, por ejemplo, MK4166 o un anticuerpo que comprende las cadenas pesadas y ligeras o regiones variables o CDR descritas en el presente documento, por ejemplo, como una infusión intravenosa sobre, por ejemplo, aproximadamente 30, aproximadamente 30-60 o aproximadamente 60 minutos cada aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3 o aproximadamente 4 semanas. La cantidad de anticuerpos en mg/kg se puede calcular para determinar el peso (mg) o la concentración (mg/ml) de los anticuerpos requeridos para una formulación de proporción de dosificación fija. En determinados aspectos, un anticuerpo anti-PD-1 y un anticuerpo anti-GITR se proporcionan como una composición liofilizada, por ejemplo, en un vial o una jeringa de doble cámara. Una composición liofilizada puede comprender, por ejemplo, aproximadamente 50 mg de un anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1, por ejemplo, nivolumab, MK3475 o atezolizumab y aproximadamente 5-250 mg, aproximadamente 10-250, aproximadamente 30-100 mg, aproximadamente 30-70 mg o aproximadamente 50

mg de un anticuerpo anti-GITR, por ejemplo, TRX-518, MK4166 o un anticuerpo que comprende las cadenas pesadas y ligeras o regiones variables o CDR descritas en el presente documento.

*Formulaciones, composiciones farmacéuticas y dosificaciones*

5 En la formulación de la presente invención, un primer anticuerpo y un segundo anticuerpo se formulan en una composición única de la presente invención, por ejemplo, una composición farmacéutica que contiene el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 Tal como se usa en el presente documento, un "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y agentes retardantes de la absorción, y similares, que sean fisiológicamente compatibles. En ciertas realizaciones, el vehículo para una composición que contiene un anticuerpo es adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, medular o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión). Una  
15 composición farmacéutica desvelada en el presente documento puede incluir una o más sales farmacéuticamente aceptables, antioxidantes, vehículos acuosos y no acuosos, y/o adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes.

20 En una realización, la composición que comprende el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo se proporciona en un vial de un solo uso. En otra realización, la composición que comprende el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo se proporciona en un vial multiusos.

En algunos aspectos, el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo están presentes en las composiciones desveladas en el presente documento a una dosis fija (es decir, una proporción fija). En otros aspectos, esta dosis fija es de al menos aproximadamente 1:200 a al menos aproximadamente 200:1, al menos aproximadamente 1:150 a al menos aproximadamente 150:1, al menos aproximadamente 1:100 a al menos aproximadamente 100:1, al menos aproximadamente 1:75 a al menos aproximadamente 75:1, al menos aproximadamente 1:50 a al menos aproximadamente 50:1, al menos aproximadamente 1:25 a al menos aproximadamente 25:1, al menos aproximadamente 1:10 a al menos aproximadamente 10:1, al menos aproximadamente 1:5 a al menos aproximadamente 5:1, al menos aproximadamente 1:4 a al menos aproximadamente 4:1, al menos aproximadamente 1:3 a al menos aproximadamente 3:1, o al menos aproximadamente 1:2 a al menos aproximadamente 2:1 mg de anticuerpo anti-PD-1 (o anticuerpo anti-PD-L1) frente a mg de segundo anticuerpo. En algunos aspectos, la dosis fija es al menos aproximadamente 1:1, aproximadamente 1:2, aproximadamente 1:3, aproximadamente 1:4, aproximadamente 1:5, aproximadamente 1:6, aproximadamente 1:7, aproximadamente 1:8, aproximadamente 1:9, aproximadamente 1:10, aproximadamente 1:15, aproximadamente 1:20, aproximadamente 1:30, aproximadamente 1:40, aproximadamente 1:50, aproximadamente 1:60, aproximadamente 1:70, aproximadamente 1:80, aproximadamente 1:90, aproximadamente 1:100, aproximadamente 1:120, aproximadamente 1:140, aproximadamente 1:160, aproximadamente 1:180, o aproximadamente 1:200 de anticuerpo anti-PD-1 (o anticuerpo anti-PD-L1) frente al segundo anticuerpo. En algunos aspectos, la dosis fija es al menos aproximadamente 2:1, aproximadamente 3:1, aproximadamente 4:1, aproximadamente 5:1, aproximadamente 6:1, aproximadamente 7:1, aproximadamente 8:1, aproximadamente 9:1, aproximadamente 10:1, aproximadamente 15:1, aproximadamente 20:1, aproximadamente 30:1, aproximadamente 40:1, aproximadamente 50:1, aproximadamente 60:1, aproximadamente 70:1, aproximadamente 80:1, aproximadamente 90:1, aproximadamente 100:1, aproximadamente 120:1, aproximadamente 140:1, aproximadamente 160:1, aproximadamente 180:1, o aproximadamente 200:1 mg de primer anticuerpo frente a mg de segundo anticuerpo.

En otras realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden un primer anticuerpo y un segundo anticuerpo en una proporción (por ejemplo, de 200:1 a 1:200, 100:1 a 1:100, 20-1:1 a 1:1-20, o cualquier proporción desvelada en el presente documento), en donde las composiciones tienen una o más características seleccionadas del grupo que consiste en: (i) la agregación en las composiciones es comparable con la agregación en una composición de referencia (es decir, una composición que comprende el primer anticuerpo o el segundo anticuerpo) después de 6 meses de almacenamiento a una temperatura de 2 °C a 8 °C; (ii) la fragmentación en las composiciones es comparable a la agregación en una composición de referencia (es decir, una composición que comprende el primer anticuerpo o el segundo anticuerpo) después de 6 meses de almacenamiento a 2 °C a 8 °C; (iii) la desamidación del primer anticuerpo o el segundo anticuerpo en las composiciones es comparable a la desamidación del anticuerpo en una composición de referencia (es decir, una composición que comprende el primer anticuerpo o el segundo anticuerpo) después de 6 meses de almacenamiento a 2 °C a 8 °C; (iv) el nivel de materia particulada en las composiciones es comparable al nivel de materia particular en una composición de referencia (es decir, una composición que comprende el primer anticuerpo o el segundo anticuerpo) después de 6 meses de almacenamiento a 2 °C a 8 °C; y (v) cualquier combinación de los mismos.

En otras realizaciones más, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden un primer anticuerpo y un segundo anticuerpo en una proporción (por ejemplo, de 200:1 a 1:200, 100:1 a 1:100, 20-1:1 a 1:1-20, o cualquier proporción desvelada en el presente documento), en donde las composiciones tienen una o más características seleccionadas del grupo que consiste en: (i) la agregación en las composiciones es comparable a la agregación en una composición de referencia (es decir, una composición que comprende el primer anticuerpo o el

segundo anticuerpo) después de 6 meses de almacenamiento a 25 °C; (ii) la fragmentación en las composiciones es comparable a la agregación en una composición de referencia (es decir, una composición que comprende el primer anticuerpo o el segundo anticuerpo) después de 6 meses de almacenamiento a 25 °C; (iii) la desamidación del primer anticuerpo o el segundo anticuerpo en las composiciones son comparables a la desamidación del anticuerpo en una  
 5 composición de referencia (es decir, una composición que comprende el primer anticuerpo o el segundo anticuerpo) después de 6 meses de almacenamiento a 25 °C; (iv) el nivel de materia particulada en las composiciones es comparable al nivel de materia particulada en una composición de referencia (es decir, una composición que comprende el primer anticuerpo o el segundo anticuerpo) después de 6 meses de almacenamiento a 25 °C; y (v) cualquier combinación de los mismos.

10 En algunas realizaciones, la agregación de una composición se mide por un nivel de especies de alto peso molecular (APM) en la composición, que puede detectarse por cromatografía líquida de alto rendimiento con exclusión de tamaño (SE-HPLC). En algunas realizaciones, la fragmentación de una composición se mide por un nivel de especies de bajo peso molecular (BPM) en la composición, que se detecta por SE-HPLC. En algunas realizaciones, la desamidación de una composición se mide por un nivel de variantes de carga ácida en la composición, que se detecta por cromatografía de intercambio catiónico (CEX) o enfoque isoeléctrico capilar con imágenes (iCIEF).

15 En algunas realizaciones, el anticuerpo de PD-1 y el segundo anticuerpo se combinan usando las formulaciones actuales de los dos anticuerpos (por ejemplo, 2 ml de un anticuerpo anti-PD-1 en un tampón a base de citrato se combinan con 2 ml de un anticuerpo anti-CTLA4 en tampón a base de Tris sin intercambio de tampón).

20 En algunas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden uno o más componentes adicionales seleccionados del grupo que consiste en: un agente de carga, un agente estabilizante, un agente quelante, un tensioactivo, un agente tamponador, y cualquier combinación de los mismos. En algunos aspectos de la divulgación, el agente tamponador contiene un tampón citrato, un tampón Tris, un tampón Tris-Cl, un tampón de histidina, un tampón TAE, un tampón HEPES, un tampón TBE, un tampón de fosfato de sodio, un tampón MES, un tampón de sulfato de amonio, un tampón de fosfato de potasio, un tampón de tiocianato de potasio, un tampón de succinato, un tampón de tartrato, un tampón DIPSO, un tampón HEPPSO, un tampón POPSO, un tampón PIPES, un  
 25 tampón PBS, un tampón MOPS, un tampón de acetato, un tampón de fosfato, un tampón de cacodilato, un tampón de glicina, un tampón de sulfato, un tampón de imidazol, un tampón de clorhidrato de guanidina, un tampón de fosfato-citrato, un tampón de borato, un tampón de malonato, un tampón de 3-picolina, un tampón de 2-picolina, un tampón de 4-picolina, un tampón de 3,5-lutidina, un tampón de 3,4-lutidina, un tampón de 2,4-lutidina, un Aces, un tampón de dietilmalonato, un tampón de N-metilimidazol, un tampón de 1,2-dimetilimidazol, un tampón TAPS, un tampón bis-Tris, un tampón de L-arginina, un tampón de lactato, un tampón de glicolato.

30 En algunas realizaciones, el anticuerpo de PD-1 y el segundo anticuerpo se formulan en un tampón que se basa en las condiciones del tampón de una de las dos formulaciones de anticuerpos individuales. En algunas realizaciones, las condiciones de tampón utilizadas son las del anticuerpo anti-PD-1. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 es nivolumab, y los dos anticuerpos están formulados en el sistema tampón a base de citrato de nivolumab. En algunas realizaciones, el tampón es un tampón de citrato.

35 En algunas realizaciones, el anticuerpo PD-1 y el segundo anticuerpo se formulan en condiciones de tampón que son diferentes de las condiciones de tampón de cualquiera de los dos anticuerpos por sí solo. En algunas realizaciones, el tampón es un tampón a base de citrato. En algunas realizaciones, la concentración de citrato en el tampón es de al menos aproximadamente 5 mM, aproximadamente 10 mM, aproximadamente 15 mM, aproximadamente 20 mM, aproximadamente 25 mM, aproximadamente 30 mM, aproximadamente 35 mM, aproximadamente 40 mM, o aproximadamente 50 mM. En algunas realizaciones, la concentración de citrato está entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 50 mM, en algunas realizaciones, entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 40 mM, entre  
 40 aproximadamente 5 mM y aproximadamente 30 mM, entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 20 mM, entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 15 mM, entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 30 mM, o entre aproximadamente 15 mM y aproximadamente 25 mM. En algunas realizaciones, La concentración de citrato es de aproximadamente 10 mM. En algunas realizaciones, La concentración de citrato es de aproximadamente 20 mM.

45 En algunas realizaciones, el tampón utilizado es un tampón a base de Tris. En algunas realizaciones, el tampón de Tris es un tampón Tris-Cl. En algunas realizaciones, la concentración de Tris-Cl en el tampón es de al menos aproximadamente 5 mM, aproximadamente 10 mM, aproximadamente 15 mM, aproximadamente 20 mM, aproximadamente 25 mM, aproximadamente 30 mM, aproximadamente 35 mM, aproximadamente 40 mM, o aproximadamente 50 mM. En algunas realizaciones, la concentración de Tris-Cl está entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 50 mM, entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM, entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 40 mM, entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 30 mM o entre aproximadamente 15 mM y aproximadamente 25 mM. En algunas realizaciones, la concentración de Tris-Cl es de aproximadamente 20 mM.

50 En algunas realizaciones, el tampón utilizado es un tampón a base de histidina. En algunas realizaciones, la concentración de histidina es al menos aproximadamente 5 mM, aproximadamente 10 mM, aproximadamente 15 mM, aproximadamente 20 mM, aproximadamente 25 mM, aproximadamente 30 mM, aproximadamente 35 mM,

aproximadamente 40 mM, o aproximadamente 50 mM. En algunas realizaciones, la concentración de histidina está entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 50 mM, entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 40 mM, entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 30 mM, entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 25 mM o entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 15 mM. En algunas realizaciones, la concentración de histidina es de aproximadamente 20 mM.

De acuerdo con la invención, el tampón utilizado es un tampón Tris-citrato. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de Tris-Cl es al menos aproximadamente 5 mM, aproximadamente 10 mM, aproximadamente 15 mM, aproximadamente 20 mM, aproximadamente 25 mM, aproximadamente 30 mM, aproximadamente 35 mM, aproximadamente 40 mM, o aproximadamente 50 mM y la concentración de citrato es al menos aproximadamente 2 mM, aproximadamente 5 mM, aproximadamente 10 mM, aproximadamente 15 mM, aproximadamente 20 mM, aproximadamente 25 mM, aproximadamente 30 mM, aproximadamente 35 mM, aproximadamente 40 mM, o aproximadamente 50 mM. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de Tris-Cl está entre aproximadamente 5 y aproximadamente 20 mM, entre aproximadamente 5 y aproximadamente 15 mM, o entre aproximadamente 10 y aproximadamente 15 mM y la concentración de citrato está entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 15 mM, entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 10 mM, o entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 10 mM. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de Tris-Cl es de aproximadamente 13,3 mM y la concentración de citrato es de aproximadamente 6,7 mM.

En algunas realizaciones, el pH de las composiciones desveladas en el presente documento es de al menos aproximadamente 5, aproximadamente 5,1, aproximadamente 5,2, aproximadamente 5,3, aproximadamente 5,4, aproximadamente 5,5, aproximadamente 5,6, aproximadamente 5,7, aproximadamente 5,8, aproximadamente 5,9, aproximadamente 6,0, aproximadamente 6,1, aproximadamente 6,2, aproximadamente 6,3, aproximadamente 6,4, aproximadamente 6,5, aproximadamente 6,6, aproximadamente 6,7, aproximadamente 6,8, aproximadamente 6,9, aproximadamente 7,0, aproximadamente 7,1, aproximadamente 7,2, aproximadamente 7,3, aproximadamente 7,4, aproximadamente 7,5, aproximadamente 7,6, aproximadamente 7,7, aproximadamente 7,8, aproximadamente 7,9, o aproximadamente 8,0. En algunas realizaciones, el pH de las composiciones desveladas en el presente documento está entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 8,0, entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 6,5, entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 7,0, o entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,5. En algunas realizaciones, el pH es de aproximadamente 6,0, en otras realizaciones, el pH es de aproximadamente 7,0. En otras realizaciones, el pH es de aproximadamente 6,2. En otras realizaciones, el pH es de aproximadamente 6,5. En otras realizaciones, el pH es de aproximadamente 6,6. En otras realizaciones, el pH es de aproximadamente 5,5.

En algunas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden además un agente de carga. Se puede seleccionar un agente de carga del grupo que consiste en NaCl, manitol, glicina, alanina, y cualquier combinación de los mismos. En otras realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden un agente estabilizante. El agente estabilizante se puede seleccionar del grupo que consiste en sacarosa, trehalosa, rafinosa, arginina; o cualquier combinación de los mismos. En otras realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden un tensioactivo. El tensioactivo se puede seleccionar del grupo que consiste en polisorbato 80 (PS80), polisorbato 20 (PS20) y cualquier combinación de los mismos. En ciertas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden además un agente quelante. El agente quelante se puede seleccionar del grupo que consiste en ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), ácido etilendiaminotetraacético, ácido nitrilotriacético, y cualquier combinación de los mismos.

En una realización, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden NaCl, manitol, ácido pentético (DTPA), sacarosa, PS80, y cualquier combinación de los mismos. En otra realización, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden NaCl a una concentración de al menos aproximadamente 5 mM, al menos aproximadamente 10 mM, al menos aproximadamente 15 mM, al menos aproximadamente 20 mM, al menos aproximadamente 25 mM, al menos aproximadamente 30 mM, al menos aproximadamente 35 mM, al menos aproximadamente 40 mM, al menos aproximadamente 45 mM, al menos aproximadamente 50 mM, al menos aproximadamente 60 mM, al menos aproximadamente 70 mM, al menos aproximadamente 75 mM, al menos aproximadamente 80 mM, al menos aproximadamente 90 mM, al menos aproximadamente 100 mM, al menos aproximadamente 110 mM, al menos aproximadamente 120 mM, al menos aproximadamente 130 mM, al menos aproximadamente 140 mM, al menos aproximadamente 150 mM, al menos aproximadamente 175 mM, al menos aproximadamente 200 mM, al menos aproximadamente 225 mM, al menos aproximadamente 250 mM, al menos aproximadamente 275 mM, al menos aproximadamente 300 mM, al menos aproximadamente 350 mM, al menos aproximadamente 400 mM, al menos aproximadamente 450 mM o al menos aproximadamente 450 mM. En otras realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden entre aproximadamente 10 y aproximadamente 200 mM de NaCl, entre aproximadamente 25 y aproximadamente 150 mM de NaCl, entre aproximadamente 40 y aproximadamente 125 mM de NaCl, entre aproximadamente 25 y aproximadamente 75 mM de NaCl, entre aproximadamente 50 y aproximadamente 100 mM de NaCl o entre aproximadamente 75 y 125 mM de NaCl. En algunas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden aproximadamente NaCl 100 mM. En ciertas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden aproximadamente NaCl 50 mM. En otras realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden aproximadamente NaCl 83,3 mM. En otras realizaciones más, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden aproximadamente NaCl 96,15 mM. En una realización particular, las

composiciones desveladas en el presente documento comprenden aproximadamente NaCl 78,57 mM.

En ciertas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden manitol (% en p/v) USP a una concentración de al menos aproximadamente el 0,25 %, al menos aproximadamente el 0,5 %, al menos aproximadamente el 0,75 %, al menos aproximadamente el 1 %, al menos aproximadamente el 1,5 %, al menos aproximadamente el 2 %, al menos aproximadamente el 2,5 %, al menos aproximadamente el 3 %, al menos aproximadamente el 3,5 %, al menos aproximadamente el 4 %, al menos aproximadamente el 4,5 %, al menos aproximadamente el 5 %, al menos aproximadamente el 7,5 % o al menos aproximadamente el 10 %. En otras realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden entre aproximadamente el 0,5 % y aproximadamente 5 % de manitol, entre aproximadamente el 0,5 % y aproximadamente el 4 % de manitol, entre aproximadamente el 0,5 % y aproximadamente el 1,5 % de manitol, entre aproximadamente 1 % y aproximadamente el 2 % de manitol, o entre aproximadamente el 2,5 % y aproximadamente el 3,5 % de manitol. En otras realizaciones más, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden aproximadamente el 1 % de manitol. En otras realizaciones más, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden aproximadamente el 3,0 % de manitol. En algunas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden aproximadamente el 1,67 % de manitol. En ciertas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden aproximadamente el 1,15 % de manitol. En una realización particular, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden aproximadamente el 1,86 % de manitol.

En otras realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden ácido pentético (DTPA), USP a una concentración de al menos aproximadamente 5 µM, al menos aproximadamente 10 µM, al menos aproximadamente 15 µM, al menos aproximadamente 20 µM, al menos aproximadamente 25 µM, al menos aproximadamente 30 µM, al menos aproximadamente 40 µM, al menos aproximadamente 50 µM, al menos aproximadamente 60 µM, al menos aproximadamente 70 µM, al menos aproximadamente 75 µM, al menos aproximadamente 80 µM, al menos aproximadamente 90 µM, al menos aproximadamente 100 µM, al menos aproximadamente 110 µM, al menos aproximadamente 120 µM, al menos aproximadamente 130 µM, al menos aproximadamente 140 µM, al menos aproximadamente 150 µM, al menos aproximadamente 175 µM o al menos aproximadamente 200 µM. En algunas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden entre aproximadamente 10 µM y aproximadamente 200 µM de DTPA, entre aproximadamente 10 µM y aproximadamente 150 µM de DTPA, entre aproximadamente 10 µM y aproximadamente 100 µM de DTPA, entre aproximadamente 10 µM y aproximadamente 30 µM de DTPA, entre aproximadamente 50 µM y aproximadamente 100 µM de DTPA, o entre aproximadamente 75 µM y aproximadamente 125 µM de DTPA. En otras realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden DTPA a aproximadamente 100 µM. En ciertas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden DTPA a aproximadamente 20 µM. En otras realizaciones más, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden DTPA a aproximadamente 73,3 µM. En una realización particular, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden DTPA a aproximadamente 50 µM. En realizaciones específicas, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden DTPA a aproximadamente 93,85 µM. En ciertas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden DTPA a aproximadamente 65,71 µM.

En algunas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden polisorbato 80, NF (PS80) (% p/v) a una concentración de al menos aproximadamente el 0,005 %, al menos aproximadamente el 0,01 %, al menos aproximadamente el 0,015 %, al menos aproximadamente el 0,02 %, al menos aproximadamente el 0,03 %, al menos aproximadamente el 0,04 %, al menos aproximadamente el 0,05 %, al menos aproximadamente el 0,06 %, al menos aproximadamente el 0,07 %, al menos aproximadamente el 0,08 %, al menos aproximadamente el 0,09 %, o al menos aproximadamente el 0,1 %. En otras realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden entre aproximadamente el 0,005 % y aproximadamente el 0,1 % de PS80, entre aproximadamente el 0,005 % y aproximadamente el 0,02 % de PS80, entre aproximadamente el 0,005 % y aproximadamente el 0,05 % de PS80, entre aproximadamente el 0,01 % y aproximadamente el 0,02 % de PS80, entre aproximadamente el 0,02 % y aproximadamente el 0,1 % de PS80 o entre aproximadamente el 0,01 % y aproximadamente el 0,03 % de PS80. En otras realizaciones más, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden PS80 a una concentración de aproximadamente el 0,01 %. En otras realizaciones más, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden PS80 a una concentración de aproximadamente el 0,04 %. En algunas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden PS80 a una concentración de aproximadamente el 0,013 %. En una realización particular, la composición desvelada en el presente documento comprende PS80 a una concentración de aproximadamente el 0,05 %. En algunas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden PS80 a una concentración de aproximadamente el 0,02 %. En otras realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden PS80 a una concentración de aproximadamente el 0,012 %. En una realización específica, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden PS80 a una concentración de aproximadamente el 0,23 %.

En ciertas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden sacarosa (% de p/v) a una concentración de al menos aproximadamente el 1 %, al menos aproximadamente el 2 %, al menos aproximadamente el 3 %, al menos aproximadamente el 4 %, al menos aproximadamente el 4,5 %, al menos aproximadamente el 5 %, al menos aproximadamente el 5,5 %, al menos aproximadamente el 6 %, al menos aproximadamente el 6,5 %, al menos aproximadamente el 7 %, al menos aproximadamente el 7,5 %, al menos

aproximadamente el 8 %, al menos aproximadamente el 8,5 %, al menos aproximadamente el 9 %, al menos aproximadamente el 9,5 %, al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 12 % o al menos aproximadamente el 15 % de sacarosa. En otras realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden entre aproximadamente el 1 % y aproximadamente el 10 %, entre aproximadamente el 2 % y aproximadamente el 10 %, entre aproximadamente el 5 % y aproximadamente el 10 %, entre aproximadamente el 5 % y aproximadamente el 7 %, o entre aproximadamente el 7,5 % y aproximadamente el 10 % de sacarosa. En otras realizaciones más, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden aproximadamente el 6 % de sacarosa. En otras realizaciones más, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden aproximadamente el 8,5 % de sacarosa. En otras realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden aproximadamente el 8,0 % de sacarosa.

En ciertas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden nivolumab e ipilimumab en un tampón Tris-citrato. En algunas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden una proporción de 1:1 de nivolumab a ipilimumab en un tampón que comprende aproximadamente Tris 13,3 mM (o Tris 13,3 mM  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %), aproximadamente citrato 6,7 mM, (o citrato 6,7 mM  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %), aproximadamente manitol al 1,67 % (manitol al 1,67 %  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %), aproximadamente NaCl 83,3 mM (o NaCl 83,3 mM  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %), aproximadamente DTPA 73,3  $\mu$ M (o DTPA 73,3  $\mu$ M  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %) y aproximadamente PS80 al 0,013 % (o PS80 al 0,013 %  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %) a un pH de aproximadamente 6,2. En algunas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden una proporción de 3:1 de nivolumab frente a ipilimumab en un tampón Tris-citrato que comprende aproximadamente manitol al 1,15 % (o manitol al 1,15 %  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %), aproximadamente NaCl 96,15 mM (o NaCl 96,15 mM  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %), aproximadamente DTPA 93,85  $\mu$ M (o DTPA 93,85  $\mu$ M  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %) y aproximadamente PS80 al 0,012 % (o PS80 al 0,012 %  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %) a un pH de aproximadamente 6,6. En algunas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden una proporción de 1:3 de nivolumab frente a ipilimumab en un tampón Tris-citrato que comprende aproximadamente manitol al 1,86 % (o manitol al 1,86 %  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %), aproximadamente NaCl 78,57 mM (o NaCl 78,57 mM  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %), aproximadamente DTPA 65,71  $\mu$ M (o DTPA 65,71  $\mu$ M  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %) y aproximadamente PS80 al 0,023 % (o PS80 al 0,023 %  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %) a un pH de aproximadamente 6,0.

En otras realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden nivolumab e ipilimumab en un tampón de histidina. En algunas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden una proporción de 3:1 de nivolumab frente a ipilimumab en un tampón de histidina 20 mM (o tampón de histidina 20 mM  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %) que comprende aproximadamente NaCl 50 mM (o NaCl 50 mM  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %), aproximadamente DTPA 50  $\mu$ M (o DTPA 50  $\mu$ M  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %), aproximadamente sacarosa al 6 % (o sacarosa al 6 %  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %), y aproximadamente PS80 al 0,05 % (o PS80 al 0,05 %  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %) a aproximadamente pH 6. En algunas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden una proporción de 3:1 de nivolumab frente a ipilimumab en un tampón de histidina de aproximadamente 20 mM que comprende aproximadamente NaCl 50 mM (o NaCl 50 mM  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %), aproximadamente DTPA 50  $\mu$ M (o DTPA 50  $\mu$ M  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %), aproximadamente sacarosa al 6 % (o sacarosa al 6 %  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %), y aproximadamente PS80 al 0,05 % (o PS80 al 0,05 %  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %) a aproximadamente pH 7. En algunas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden una proporción de 3:1 de nivolumab frente a ipilimumab en un tampón de aproximadamente histidina 20 mM (o tampón de histidina 20 mM  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %) que comprende aproximadamente DTPA 50  $\mu$ M (o DTPA 50  $\mu$ M  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %), aproximadamente sacarosa al 8,5 % (o sacarosa al 8,5 %  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %), y aproximadamente PS80 al 0,05 % (o PS80 al 0,05 %  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %) a aproximadamente pH 6. En algunas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden una proporción 1:1, 3:1 o 1:3 de nivolumab frente a ipilimumab en un tampón de histidina (20 mM  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %) que comprende DTPA 5  $\mu$ M (o DTPA 5  $\mu$ M  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %), PS80 al 0,05 % (o PS80 al 0,05 %  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %) y sacarosa al 8,0 % (o sacarosa al 8,0 %  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %) a pH 5,5, 6,0 o 6,5. En una realización, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden nivolumab e ipilimumab en un tampón citrato. En otra realización, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden una proporción de 3:1 de nivolumab frente a ipilimumab en un tampón de citrato de aproximadamente 20 mM (o tampón de citrato de 20 mM  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %) que comprende aproximadamente NaCl 50 mM (o NaCl 50 mM  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %), aproximadamente DTPA 50  $\mu$ M (o DTPA 50  $\mu$ M  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %), aproximadamente sacarosa al 6 % (o sacarosa al 6 %  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %), y aproximadamente PS80 al 0,05 % (o PS80 al 0,05 %  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %) a aproximadamente pH 6. En otras realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden una proporción de 3:1 de nivolumab frente a ipilimumab en un tampón de citrato de aproximadamente 20 mM (o tampón de citrato de 20 mM  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %) que comprende aproximadamente NaCl 50 mM (o NaCl 50 mM  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %), aproximadamente DTPA 20  $\mu$ M (o DTPA 20  $\mu$ M  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %), aproximadamente manitol al 3 % (o manitol al 3 %  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %), y aproximadamente PS80 al 0,04 % (o PS80 al 0,04 %  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %) a aproximadamente pH 6. En otras realizaciones más, las composiciones desveladas en el presente documento

- comprenden una proporción de 1:1 de nivolumab frente a ipilimumab en un tampón de citrato de aproximadamente 20 mM (o tampón de citrato de 20 mM  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %) que comprende aproximadamente NaCl 50 mM (o NaCl 50 mM  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %), aproximadamente DTPA 100  $\mu$ M (o DTPA 100  $\mu$ M  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %), aproximadamente manitol al 3 % (o manitol al 3 %  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %), y aproximadamente PS80 al 0,02 % (o PS80 al 0,02 %  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %) a aproximadamente pH 6. En ciertas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden una proporción de 1:1 de nivolumab frente a ipilimumab en un tampón de citrato de aproximadamente 20 mM (o tampón de citrato de 20 mM  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %) que comprende aproximadamente NaCl 50 mM (o NaCl 50 mM  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %), aproximadamente DTPA 100  $\mu$ M (o DTPA 100  $\mu$ M  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %), aproximadamente manitol al 3 % (o manitol al 3 %  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %), y aproximadamente PS80 al 0,02 % (o PS80 al 0,02 %  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %) a aproximadamente pH 6,5. En algunas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden una proporción de 1:1 de nivolumab frente a ipilimumab en un tampón de citrato de aproximadamente 20 mM (o tampón de citrato de 20 mM  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %) que comprende aproximadamente NaCl 100 mM (o NaCl 100 mM  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %), aproximadamente DTPA 100  $\mu$ M (o DTPA 100  $\mu$ M  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %), aproximadamente manitol al 1,0 % (o manitol al 1,0 %  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %), y aproximadamente PS80 al 0,02 % (o PS80 al 0,02 %  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %) a aproximadamente pH 6,5. En otras realizaciones más, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden una proporción de 1:1 de nivolumab frente a ipilimumab en un tampón de citrato de aproximadamente 20 mM (o tampón de citrato de 20 mM  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %) que comprende aproximadamente NaCl 50 mM (o NaCl 50 mM  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %), aproximadamente DTPA 100  $\mu$ M (o DTPA 100  $\mu$ M  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %), aproximadamente sacarosa al 6 % (o sacarosa al 6 %  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %), y aproximadamente PS80 al 0,02 % (o PS80 al 0,02 %  $\pm$  el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %) a aproximadamente pH 6,0.
- En algunas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden una proporción de 1:3 de nivolumab frente a ipilimumab que comprende aproximadamente 4,62 mg/ml de nivolumab, aproximadamente 1,54 mg/ml de ipilimumab, aproximadamente clorhidrato de Tris 18,5 mM, aproximadamente citrato de sodio dihidrato 1,5 mM, aproximadamente NaCl 96,2 mM, aproximadamente manitol al 1,2 %, aproximadamente ácido pentético 93,9  $\mu$ M, y aproximadamente PS80 al 0,012 % a aproximadamente pH 6,0. De acuerdo con la invención, la composición comprende una proporción de 1:3 de nivolumab frente a ipilimumab que comprende 4,62 mg/ml de ipilimumab, 1,54 mg/ml de nivolumab, Clorhidrato de Tris (HCl) 18,46 mM, citrato de sodio dihidrato 1,54 mM, NaCl 96,15 mM, manitol al 1,15 % en p/v, ácido pentético 93,85 microM y PS80 al 0,012 % en p/v.
- En algunas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden una proporción de 1:3 de nivolumab frente a ipilimumab que comprende aproximadamente 4,61 mg/ml de nivolumab, aproximadamente 1,54 mg/ml de ipilimumab, aproximadamente clorhidrato de Tris 18,46 mM, aproximadamente citrato de sodio dihidrato 1,54 mM, aproximadamente NaCl 96,15 mM, aproximadamente manitol al 1,15 %, aproximadamente ácido pentético 93,85  $\mu$ M, y aproximadamente PS80 al 0,012 % a aproximadamente pH 6,3.
- En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento comprenden 30 mg de nivolumab y 90 mg de ipilimumab por vial. En otras realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden 40 mg de nivolumab y 120 mg de ipilimumab por vial.
- En otras realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento comprenden un tercer anticuerpo.
- En algunas realizaciones, el tercer anticuerpo es cualquier anticuerpo desvelado en el presente documento.

#### *Estabilidad de las composiciones*

- En una realización, una composición desvelada en el presente documento es estable a aproximadamente 0 °C, aproximadamente 5 °C, aproximadamente 10 °C, aproximadamente 15 °C, aproximadamente 20 °C, aproximadamente 25 °C, aproximadamente 30 °C, aproximadamente 35 °C, aproximadamente 40 °C, aproximadamente 45 °C, aproximadamente 50 °C, o aproximadamente 55 °C durante al menos aproximadamente 1 semana, al menos aproximadamente 2 semanas, al menos aproximadamente 1 mes, al menos aproximadamente 2 meses, al menos aproximadamente 3 meses, al menos aproximadamente 6 meses, al menos aproximadamente 9 meses, al menos aproximadamente 1 año, al menos aproximadamente 2 años o al menos aproximadamente 5 años.
- En otra realización, las composiciones desveladas en el presente documento presentan un cambio del pico ácido (por ejemplo, desamidación) que es inferior a aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 14 %, aproximadamente el 13 %, aproximadamente el 12 %, aproximadamente el 11 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 9 %, aproximadamente el 8 %, aproximadamente el 7 %, aproximadamente el 6 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 2 % o aproximadamente el 1 % después de ser almacenado durante aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 6 meses, o aproximadamente 1 año a aproximadamente 5 °C. En otras realizaciones, la composición presenta un cambio en el pico ácido que es menor de aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 14 %, aproximadamente el 13 %, aproximadamente el 12 %, aproximadamente el 11 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 9 %, aproximadamente el 8 %, aproximadamente el 7 %, aproximadamente el 6 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 2 % o aproximadamente el 1 % después de ser almacenado durante aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 6 meses, o aproximadamente 1 año a aproximadamente 5 °C.

aproximadamente el 6 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 2 % o aproximadamente el 1 % después de ser almacenado durante aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 6 meses, o aproximadamente 1 año a aproximadamente 25 °C. En algunas realizaciones, la composición presenta un cambio en el pico ácido que es menor de aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 14 %, aproximadamente el 13 %, aproximadamente el 12 %, aproximadamente el 11 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 9 %, aproximadamente el 8 %, aproximadamente el 7 %, aproximadamente el 6 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 2 % o aproximadamente el 1 % después de ser almacenado durante aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 6 meses, o aproximadamente 1 año a aproximadamente 40 °C. En algunas realizaciones, el pico ácido se mide usando un ensayo de Enfoque Isoeléctrico Capilar con imágenes (cIEF).

En algunas realizaciones, la desamidación de las composiciones desveladas en el presente documento es comparable a la desamidación de una composición de referencia (una composición que comprende el primer anticuerpo o el segundo anticuerpo) si las composiciones desveladas en el presente documento muestran un cambio del pico ácido (por ejemplo, desamidación) que es inferior a aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 14 %, aproximadamente el 13 %, aproximadamente el 12 %, aproximadamente el 11 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 9 %, aproximadamente el 8 %, aproximadamente el 7 %, aproximadamente el 6 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 2 % o aproximadamente el 1 % en comparación con el pico ácido de la composición de referencia.

En ciertas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento presentan un cambio del pico de alto peso molecular (APM) (por ejemplo, agregación) que es inferior a aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 14 %, aproximadamente el 13 %, aproximadamente el 12 %, aproximadamente el 11 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 9 %, aproximadamente el 8 %, aproximadamente el 7 %, aproximadamente el 6 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 2 % o aproximadamente el 1 % después de ser almacenado durante aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 6 meses, o aproximadamente 1 año a aproximadamente 5 °C. En algunas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento presentan un cambio del pico de APM que es inferior a aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 14 %, aproximadamente el 13 %, aproximadamente el 12 %, aproximadamente el 11 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 9 %, aproximadamente el 8 %, aproximadamente el 7 %, aproximadamente el 6 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 2 % o aproximadamente el 1 % después de ser almacenado durante aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 6 meses, o aproximadamente 1 año a aproximadamente 25 °C. En algunas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento presentan un cambio del pico de APM que es inferior a aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 14 %, aproximadamente el 13 %, aproximadamente el 12 %, aproximadamente el 11 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 9 %, aproximadamente el 8 %, aproximadamente el 7 %, aproximadamente el 6 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 2 % o aproximadamente el 1 % después de ser almacenado durante aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 6 meses, o aproximadamente 1 año a aproximadamente 40 °C. En algunas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento presentan un cambio del pico de APM que es inferior a aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 2 %, aproximadamente el 1,5 %, aproximadamente el 1,4 %, aproximadamente el 1,3 %, aproximadamente el 1,2 %, aproximadamente el 1,1 %, aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 0,9 %, aproximadamente el 0,8 %, aproximadamente el 0,7 %, aproximadamente el 0,6 %, aproximadamente el 0,5 %, aproximadamente el 0,4 %, aproximadamente el 0,3 %, aproximadamente el 0,2 %, aproximadamente 0,1 %, o menos de aproximadamente el 0,1 %. En ciertas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento presentan un pico de APM que es aproximadamente del 15 %, aproximadamente el 14 %, aproximadamente el 13 %, aproximadamente el 12 %, aproximadamente el 11 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 9 %, aproximadamente el 8 %, aproximadamente el 7 %, aproximadamente el 6 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 2,5 %, aproximadamente el 2 %, aproximadamente el 1,5 %, aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 0,9 %, aproximadamente el 0,8 %, aproximadamente el 0,7 %, aproximadamente el 0,6 %, aproximadamente el 0,5 %, aproximadamente el 0,4 %, aproximadamente el 0,3 %, aproximadamente el 0,2 % o aproximadamente el 0,1 % después de ser almacenado durante aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 6 meses, o aproximadamente 1 año a aproximadamente 5 °C, a aproximadamente 25 °C o a aproximadamente 40 °C. En algunas realizaciones, el pico de alto peso molecular se mide mediante cromatografía. En algunas realizaciones, la cromatografía es cromatografía de exclusión por tamaño.

En algunas realizaciones, la agregación (por ejemplo, un nivel de especies de APM) de composiciones desveladas en el presente documento es comparable a la agregación de una composición de referencia (una composición que comprende el primer anticuerpo o el segundo anticuerpo), si las composiciones desveladas en el presente documento muestran un cambio en el pico de la especie de APM que es inferior a aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 14 %, aproximadamente el 13 %, aproximadamente el 12 %, aproximadamente el 11 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 9 %, aproximadamente el 8 %, aproximadamente el 7 %, aproximadamente el 6 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 2 %, aproximadamente el 1,5 %, aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 0,9 %, aproximadamente el 0,8 %, aproximadamente el 0,7 %, aproximadamente el 0,6 %, aproximadamente el 0,5 %, aproximadamente el 0,4 %, aproximadamente el 0,3 %, aproximadamente el 0,2 % o aproximadamente el 0,1 % después de ser almacenado durante aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 6 meses, o aproximadamente 1 año a aproximadamente 5 °C, a aproximadamente 25 °C o a aproximadamente 40 °C. En algunas realizaciones, el pico de alto peso molecular se mide mediante cromatografía. En algunas realizaciones, la cromatografía es cromatografía de exclusión por tamaño.



aproximadamente el 0,5 %, aproximadamente el 0,4 %, aproximadamente el 0,3 %, aproximadamente el 0,2 % o aproximadamente el 0,1 % después de ser almacenado durante aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 6 meses, o aproximadamente 1 año a aproximadamente 5 °C, a aproximadamente 25 °C o a aproximadamente 40 °C. En algunas realizaciones, el pico de bajo peso molecular se mide usando cromatografía. En algunas realizaciones, la cromatografía es cromatografía de exclusión por tamaño.

En algunas realizaciones, la fragmentación (por ejemplo, un nivel de especies de BPM) de composiciones desveladas en el presente documento es comparable a la fragmentación de una composición de referencia (una composición que comprende el primer anticuerpo o el segundo anticuerpo), si las composiciones desveladas en el presente documento que comprenden el primer y el segundo anticuerpo presentan un cambio del pico de la especie de BPM que es inferior a aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 14 %, aproximadamente el 13 %, aproximadamente el 12 %, aproximadamente el 11 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 9 %, aproximadamente el 8 %, aproximadamente el 7 %, aproximadamente el 6 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 2 % o aproximadamente el 1 % en comparación con el pico de especies de BPM de la composición de referencia.

#### *Método de preparación de las composiciones desveladas en el presente documento*

En una realización, la divulgación se dirige a un método para preparar cualquier composición desvelada en el presente documento. En otra realización, la formulación que comprende el producto de fármaco de anticuerpo anti-PD-1 se mezcla con una formulación que comprende el segundo producto de fármaco de anticuerpo para obtener la proporción deseada en un producto de fármaco final sin cambios de tampón. En otras realizaciones, la composición final está en tampón Tris-citrato.

En algunas realizaciones, la formulación que comprende la sustancia de fármaco de anticuerpo anti-PD-1 y una formulación que comprende la segunda sustancia de fármaco de anticuerpo está sujeta a intercambios de tampón y/o concentración antes de mezclarse para obtener la proporción deseada en un producto de fármaco final.

En otras realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento se diluyen antes de su uso. En ciertas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento se diluyen con inyección de cloruro de sodio al 0,9 %, USP o inyección de dextrosa al 5 %, USP antes de su uso. En otras realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento se diluyen para obtener una infusión con una concentración deseada de primer y segundo anticuerpo. En otras realizaciones más, la concentración final del primer y segundo anticuerpo está entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 500 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 450 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 400 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 350 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 300 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 250 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 200 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 150 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 90 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 80 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 70 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 60 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 40 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 30 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 15 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 9 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 8 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 7 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 6 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 5 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 4 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 3 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 2 mg/ml, aproximadamente 0,5 mg/ml y aproximadamente 3 mg/ml, aproximadamente 50 mg/ml y aproximadamente 400 mg/ml, o aproximadamente 100 mg/ml y aproximadamente 300 mg/ml.

En ciertas realizaciones, la infusión diluida se almacena durante no más de aproximadamente 10, aproximadamente 9, aproximadamente 8, aproximadamente 7, aproximadamente 6, aproximadamente 5, aproximadamente 4, aproximadamente 3, aproximadamente 2 o aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente después de la dilución.

En algunas realizaciones, la infusión diluida se almacena bajo refrigeración (aproximadamente a 2 °C - aproximadamente a 8 °C) durante no más de aproximadamente 1 semana, aproximadamente 6 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 2 días, aproximadamente 1 día o aproximadamente 12 horas después de la dilución.

#### **Métodos de la invención**

La presente divulgación proporciona composiciones para su uso en un método de tratamiento de un sujeto afectado por una enfermedad o afección. En un aspecto, el método está dirigido a administrar una composición farmacéutica que comprende una cantidad X de un primer anticuerpo, que es un anticuerpo anti-PD-1 o un anticuerpo anti-PD-L1, y una cantidad Y de un segundo anticuerpo, en donde la proporción de la cantidad del primer anticuerpo frente a la cantidad del segundo anticuerpo está presente en una proporción de dosis fija de aproximadamente 100:1 a

aproximadamente 1:100 en las composiciones desveladas en el presente documento.

En algunas realizaciones, la enfermedad o afección es una enfermedad infecciosa. En otras realizaciones, la enfermedad o afección es cáncer. En otras realizaciones más, el cáncer es cáncer de tipo melanoma, cáncer renal, 5 cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de huesos, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma maligno cutáneo o intraocular, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer de útero, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer del esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, 10 cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de la uretra, cáncer del pene, leucemias crónicas o agudas, incluyendo leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, tumores sólidos de la infancia, linfoma linfocítico, cáncer de la vejiga, cáncer del riñón o del uréter, carcinoma de la pelvis renal, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), linfoma primario del SNC, angiogénesis tumoral, tumor del eje espinal, glioma del tronco encefálico, adenoma hipofisario, sarcoma de Kaposi, cáncer epidermoide, 15 cáncer de células escamosas, linfoma de linfocitos T, cánceres inducidos por el medio ambiente, incluidos los inducidos por el amianto, o cualquier combinación de los mismos. En otras realizaciones más, el cáncer es cáncer de pulmón, melanoma metastásico, glioblastoma o carcinoma de células renales.

En ciertas realizaciones, el cáncer es carcinoma de células escamosas, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de pulmón escamoso no microcítico (CPNM), CPNM no escamoso, glioma, cáncer gastrointestinal, cáncer renal (por ejemplo, carcinoma de células claras), cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer colorrectal, 20 cáncer de endometrio, cáncer de riñón (por ejemplo, carcinoma celular renal (RCC)), cáncer de próstata (por ejemplo, adenocarcinoma de próstata refractario a hormonas), cáncer de tiroides, neuroblastoma, cáncer de páncreas, glioblastoma (glioblastoma multiforme), cáncer de cuello uterino, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, carcinoma de colon y cáncer de cabeza y cuello (o carcinoma), cáncer gástrico, tumor de células germinales, sarcoma pediátrico, linfoma sinonasal de células citolíticas naturales, melanoma (por ejemplo, melanoma maligno metastásico, tal como melanoma maligno cutáneo o intraocular), cáncer de huesos, cáncer de piel, 25 cáncer de útero, cáncer de la región anal, cáncer testicular, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, cáncer del esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de la uretra, cáncer del pene, tumores sólidos de la infancia, cáncer del útero, carcinoma de la pelvis renal, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), linfoma primario del SNC, angiogénesis tumoral, tumor del eje espinal, glioma del tronco encefálico, adenoma hipofisario, sarcoma de Kaposi, 30 cáncer epidermoide, cáncer de células escamosas, linfoma de linfocitos T, cánceres inducidos por el medio ambiente incluyendo aquellos inducidos por amianto, cánceres relacionados con virus (por ejemplo, tumor relacionado con el virus del papiloma humano (VPH), y neoplasias derivadas de ambos de los dos linajes principales de células sanguíneas, es decir, línea celular mieloide (la cual produce granulocitos, eritrocitos, trombocitos, macrófagos y mastocitos) o línea celular mieloide (que produce linfocitos B, T, NK y células plasmáticas), como todos los tipos de leucemias, linfomas, y mielomas, por ejemplo, leucemias agudas, crónicas, linfocíticas y/o mielógena, tales como leucemia aguda (ALL), leucemia mielógena aguda (AML), leucemia linfocítica crónica (CLL), y leucemia mielógena crónica (CML), AML no diferenciada (M0), leucemia mieloblástica (M1), leucemia mieloblástica (M2; con maduración celular), leucemia promielocítica (M3 o variante de M3 [M3V]), leucemia mielomonocítica (M4 o variante de M4 con eosinofilia [M4E]), leucemia monocítica (M5), eritroleucemia (M6), leucemia megacarioblástica (M7), sarcoma 35 granulocítico aislado y cloroma; linfomas, tal como linfoma de Hodgkin (HL), linfoma no Hodgkin (NHL), neoplasia hematológica de linfocitos B, por ejemplo, linfomas de linfocitos B, linfomas de linfocitos T, linfoma linfoplasmocitoide, linfoma de linfocito B monocitoide, linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa (MALT), linfoma de célula grande anaplásico (por ejemplo, Ki 1+), linfoma/leucemia de linfocitos T adulto, linfoma de células del manto, linfoma de linfocitos T angioinmunoblásticos, linfoma angiocéntrico, linfoma intestinal de linfocitos T, linfoma mediastinal de linfocitos B primario, linfoma linfoblástico de precursores T, linfoblástico T; y linfoma/leucemia (T-Lbly/T-ALL), linfoma periférico de linfocitos T, linfoma linfoblástico, trastorno linfoproliferativo después del trasplante, linfoma histiocítico verdadero, linfoma primario del sistema nervioso central, linfoma de derrame primario, linfoma linfoblástico (LBL), tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, leucemia linfoblástica aguda, linfoma difuso de linfocitos B grandes, linfoma de Burkitt, linfoma folicular, linfoma histiocítico difuso (DHL), linfoma inmunoblástico de células grandes, linfoma 40 linfoblástico B precursores, linfoma cutáneo de linfocitos T (CTLC) (también denominado fungoides o síndrome de Sezary), y linfoma linfoplasmocitoide (LPL) con macroglobulinemia de Waldenstrom; mielomas, tal como mieloma IgG, mieloma de cadena ligera, mieloma no secretor, mieloma latente (también denominado mieloma indolente), plasmocitoma solitario, y mielomas múltiples, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma de células pilosas; tumores hematopoyéticos de linaje mieloide, tumores de origen mesenquimatoso, incluyendo fibrosarcoma y rhabdomiocarcinoma; seminoma, teratocarcinoma, tumores del sistema nervioso central y periférico, incluyendo astrocitoma, schwannomas; tumores de origen mesenquimatoso, incluyen fibrosarcoma, rhabdomiocarcinoma y osteosarcoma; y otros tumores, incluyendo melanoma, xeroderma pigmentoso, queratoacantoma, seminoma, cáncer folicular de tiroides y teratocarcinoma, tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, por ejemplo, tumores de linfocitos T y linfocitos B, incluyendo pero sin limitación trastornos de linfocitos T tales como leucemia prolinfocítica T (T-PLL), 45 incluyendo la célula pequeña y el tipo de célula cerebriforme; leucemia de linfocitos granulares grandes (LGL) preferiblemente del tipo de linfocitos T; linfoma hepatosplénico a/d T-NHL; linfoma de linfocitos T periférico/postímico

(subtipos pleomórficos e inmunoblásticos); linfoma angiocéntrico (nasal) de linfocitos T; cáncer de cabeza o cuello, cáncer renal, cáncer rectal, cáncer de la glándula tiroidea; linfoma mielóide agudo, así como cualquier combinación de dichos cánceres. Los métodos descritos en el presente documento también se pueden usar para el tratamiento de cánceres metastáticos.

5 En ciertas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento se administran con cualquier agente adicional contra el cáncer. En otras realizaciones, el agente contra el cáncer es cualquier agente contra el cáncer conocido en la técnica. En otras realizaciones más, el agente contra el cáncer es un tercer anticuerpo. En algunas realizaciones, el tercer anticuerpo es cualquier anticuerpo desvelado en el presente documento.

10 En otras realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento se administran por vía intravenosa. En algunas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento se reconstituyen antes de la administración. En otras realizaciones más, las composiciones desveladas en el presente documento se diluyen antes de la administración. En una realización particular, las composiciones desveladas en el presente documento se administran a una dosis fija. En otras realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento se administran a una dosis basada en el peso.

20 En algunas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento se administran al menos aproximadamente semanalmente, al menos aproximadamente dos veces por semana, al menos aproximadamente cada dos semanas, al menos aproximadamente cada tres semanas, o al menos aproximadamente mensualmente. En algunas realizaciones, el tratamiento dura al menos aproximadamente 4 semanas, al menos aproximadamente 8 semanas, al menos aproximadamente 12 semanas, al menos aproximadamente 3 meses, al menos aproximadamente 6 meses, al menos aproximadamente 9 meses, al menos aproximadamente 1 año, al menos aproximadamente 18 meses, al menos aproximadamente 2 años o más de 2 años.

25 En algunas realizaciones, la invención se refiere a composiciones para su uso en un método de modulación de la respuesta inmunitaria que comprende administrar las composiciones.

30 En ciertas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento (por ejemplo, la administración de un anticuerpo anti-PD-1 o la administración de un anticuerpo anti-PD-1 y otra terapia contra el cáncer) aumentan de manera eficaz la duración de la supervivencia del sujeto. Por ejemplo, la duración de la supervivencia del sujeto aumenta al menos aproximadamente 1 mes, al menos aproximadamente 2 meses, al menos aproximadamente 3 meses, al menos aproximadamente 4 meses, al menos aproximadamente 5 meses, al menos aproximadamente 6 meses, al menos aproximadamente 7 meses, al menos aproximadamente 8 meses, al menos aproximadamente 9 meses, al menos aproximadamente 10 meses, al menos aproximadamente 11 meses o al menos aproximadamente 1 año o más en comparación con otro sujeto tratado solo con otra terapia (por ejemplo, el tratamiento habitual) o solo uno de los dos miembros de las composiciones por separado (por ejemplo, solo un anticuerpo anti-PD-1). En algunas realizaciones, la duración de la supervivencia aumenta en al menos aproximadamente 2 meses. En ciertas realizaciones, la terapia desvelada en el presente documento aumenta de manera eficaz la duración de la supervivencia libre de progresión del sujeto. Por ejemplo, la supervivencia libre de progresión del sujeto aumenta en al menos aproximadamente 1 mes, al menos aproximadamente 2 meses, al menos aproximadamente 3 meses, al menos aproximadamente 4 meses, al menos aproximadamente 5 meses, al menos aproximadamente 6 meses, al menos aproximadamente 7 meses, al menos aproximadamente 8 meses, al menos aproximadamente 9 meses, al menos aproximadamente 10 meses, al menos aproximadamente 11 meses o al menos aproximadamente 1 año en comparación con un sujeto no tratado o un sujeto tratado solo con otra terapia (por ejemplo, el tratamiento habitual) o solo uno de los dos miembros de las composiciones por separado (por ejemplo, solo un anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1). En algunas realizaciones, la supervivencia libre de progresión aumenta al menos aproximadamente 2 meses. En ciertas realizaciones, la terapia desvelada en el presente documento aumenta de manera eficaz la tasa de respuesta en un grupo de sujetos. Por ejemplo, la tasa de respuesta en un grupo de sujetos aumenta al menos aproximadamente el 2 %, al menos aproximadamente el 3 %, al menos aproximadamente el 4 %, al menos aproximadamente el 5 %, al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 15 %, al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 25 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 35 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 45 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 55 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 99 % o al menos aproximadamente el 100 % en comparación con otro grupo de sujetos tratados solo con otra terapia (por ejemplo, el tratamiento habitual) o solo uno de los dos miembros de las composiciones solo (por ejemplo, solo un anticuerpo anti-PD-1), es decir, monoterapia.

60 *Dosis de composiciones desveladas en el presente documento*

65 En algunas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento se administran a una dosis fija independientemente del peso del paciente. Por ejemplo, el anticuerpo anti-PD-1 con el segundo anticuerpo se puede administrar a una dosis plana de 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 50, 75, 80, 200, 240, 300, 360, 400, 480, 500, 750 o 1500 mg o cualquier otra dosis desvelada en el presente documento, sin tener en cuenta el peso del paciente. En

algunas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento se administran a una dosis basada en el peso a cualquier dosis desvelada en el presente documento. En algunas realizaciones, la cantidad del primer anticuerpo y la cantidad del segundo anticuerpo administrada al paciente en una dosis única son idénticas a la cantidad X y a la cantidad Y, respectivamente.

5 En ciertas realizaciones de los presentes métodos de terapia de combinación, la dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-PD-1 o la porción de unión a antígeno del mismo comprende 60 mg, aproximadamente 80 mg, aproximadamente 100 mg, aproximadamente 120 mg, aproximadamente 140, aproximadamente 160 mg, aproximadamente 180 mg, aproximadamente 200 mg, aproximadamente 220 mg, aproximadamente 240 mg, 10 aproximadamente 260 mg, aproximadamente 280 mg o aproximadamente 300 mg. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-PD-1 o la porción de unión a antígeno del mismo comprende aproximadamente 310 mg, aproximadamente 320 mg, aproximadamente 330 mg, aproximadamente 340 mg, aproximadamente 350 mg, aproximadamente 360 mg, aproximadamente 370 mg, aproximadamente 380 mg, aproximadamente 390 mg, aproximadamente 400 mg, aproximadamente 410 mg, aproximadamente 420 mg, 15 aproximadamente 430 mg, aproximadamente 440 mg, aproximadamente 450 mg, aproximadamente 460 mg, aproximadamente 470 mg, aproximadamente 480 mg, aproximadamente 490 mg o aproximadamente 500 mg. En algunas realizaciones, la dosis del anticuerpo anti-PD-1 en las composiciones desveladas en el presente documento está entre aproximadamente 60 mg y aproximadamente 300 mg, entre aproximadamente 60 mg y aproximadamente 100 mg, entre aproximadamente 100 mg y aproximadamente 200 mg, o entre aproximadamente 200 mg y 20 aproximadamente 300 mg. En algunas realizaciones, la dosis del anticuerpo anti-PD-1 en las composiciones desveladas en el presente documento está entre aproximadamente 300 mg y aproximadamente 500 mg, entre aproximadamente 300 mg y aproximadamente 450 mg, entre aproximadamente 300 mg y aproximadamente 400 mg, entre aproximadamente 300 mg y aproximadamente 350 mg, entre aproximadamente 350 mg y aproximadamente 500 mg, entre aproximadamente 400 mg y aproximadamente 500 mg, o entre aproximadamente 450 mg y 25 aproximadamente 500 mg. En algunas realizaciones, la cantidad del anticuerpo anti-PD-1 en las composiciones desveladas en el presente documento es al menos aproximadamente 80 mg, aproximadamente 160 mg o aproximadamente 240 mg. En ciertas realizaciones, la cantidad del anticuerpo anti-PD-1 en las composiciones desveladas en el presente documento es al menos aproximadamente 360 mg o 480 mg. En algunas realizaciones, la dosis del anticuerpo anti-PD-1 en las composiciones desveladas en el presente documento es al menos 30 aproximadamente 240 mg o al menos aproximadamente 80 mg. En una realización, la cantidad del anticuerpo anti-PD-1 en las composiciones desveladas en el presente documento es de aproximadamente 360 mg. En otra realización, la cantidad del anticuerpo anti-PD-1 en las composiciones desveladas en el presente documento es de aproximadamente 480 mg. En algunas realizaciones, la dosis del anticuerpo anti-PD-1 en las composiciones desveladas en el presente documento es de al menos aproximadamente 0,5 mg/kg, al menos aproximadamente 1 mg/kg, al menos aproximadamente 2 mg/kg, al menos aproximadamente 3 mg/kg o al menos aproximadamente 5 mg/kg. En algunas realizaciones, la dosis de anticuerpo anti-PD-1 en las composiciones desveladas en el presente documento está entre aproximadamente 0,5 mg/kg y aproximadamente 5 mg/kg, entre aproximadamente 0,5 mg/kg y 35 aproximadamente 5 mg/kg, entre aproximadamente 0,5 mg/kg y aproximadamente 3 mg/kg o entre aproximadamente 0,5 mg/kg y aproximadamente 2 mg/kg. En algunas realizaciones, la dosis del anticuerpo anti-PD-1 en las composiciones desveladas en el presente documento es de al menos aproximadamente 1 mg/kg. La dosis correspondiente del segundo anticuerpo se calcula usando la proporción deseada.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD1 se administra a una dosis subterapéutica, es decir, una dosis del agente terapéutico que es significativamente más baja que la dosis habitual o aprobada por la FDA cuando se 45 administra como monoterapia para el tratamiento del cáncer. La cantidad del segundo anticuerpo en las composiciones desveladas en el presente documento se calcula basándose en la proporción deseada. Las dosis de nivolumab que son inferiores a los 3 mg/kg típicos, pero no menos de 0,001 mg/kg, son dosis subterapéuticas. Las dosis subterapéuticas de un anticuerpo anti-PD-1 utilizado en los métodos de la presente invención son superiores a 0,001 mg/kg e inferiores a 3 mg/kg. En algunas realizaciones, una dosis subterapéutica es de aproximadamente 0,001 mg/kg 50 - aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 0,01 mg/kg - aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 0,1 mg/kg - aproximadamente 1 mg/kg, o aproximadamente 0,001 mg/kg - aproximadamente 0,1 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, la dosis subterapéutica es de al menos aproximadamente 0,001 mg/kg, al menos aproximadamente 0,005 mg/kg, al menos aproximadamente 0,01 mg/kg, al menos aproximadamente 0,05 mg/kg, al menos aproximadamente 0,1 mg/kg, al menos aproximadamente 0,5 mg/kg, o al menos aproximadamente 1,0 mg/kg 55 de peso corporal. Los datos de ocupación del receptor de 15 sujetos que recibieron una dosis de 0,3 mg/kg a 10 mg/kg de nivolumab indican que la ocupación de PD-1 parece ser independiente de la dosis en este intervalo de dosis. En todas las dosis, la tasa de ocupación media fue del 85 % (intervalo del 70 % al 97 %), con una ocupación media de meseta del 72 % (intervalo del 59 % al 81 %). En algunas realizaciones, una dosis de 0,3 mg/kg puede permitir una exposición suficiente para llevar a una actividad biológica máxima.

60 En algunas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento se administran mediante infusión intravenosa una vez aproximadamente por semana, una vez aproximadamente cada 2 semanas, una vez aproximadamente cada 3 semanas, o una vez aproximadamente al mes. En ciertas realizaciones, las composiciones desveladas en el presente documento se administran una vez aproximadamente cada 3 semanas. En una realización, 65 se administran 360 mg del anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento de unión a antígeno una vez cada 3 semanas. En otra realización, se administran 480 mg del anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento de unión a antígeno una vez

aproximadamente cada 4 semanas. En algunas realizaciones, la infusión se produce durante al menos aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 20 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 45 minutos, aproximadamente 60 minutos, aproximadamente 90 minutos, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas o aproximadamente 5 horas.

Los niveles reales de dosificación de los principios activos en las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento pueden ser fijos o variados para obtener una cantidad del principio activo que sea eficaz para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particular, sin que sean indebidamente tóxicos para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de varios factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares desveladas en el presente documento, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se está empleando, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados junto con las composiciones particulares empleadas, la edad, el sexo, el peso, la afección, estado de salud general e historial médico previo del paciente a tratar, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. Una composición desvelada en el presente documento se puede administrar a través de una o más vías de administración utilizando uno o más de diversos métodos bien conocidos en la técnica. Como apreciarán lo expertos en la técnica, la vía y/o el modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados.

#### Kits

También se desvelan en el presente documento kits que comprenden un anticuerpo anti-PD-1/composiciones de segundos anticuerpos e instrucciones para usos terapéuticos. Los kits generalmente incluyen una etiqueta que indica el uso previsto del contenido del kit y las instrucciones de uso. El término etiqueta incluye cualquier material escrito o grabado suministrado en o con el kit, o que de otro modo acompaña al kit. Por consiguiente, la presente divulgación proporciona un kit que comprende: (a) una dosificación apropiada de composiciones desveladas en el presente documento y (b) instrucciones para el uso de las composiciones en cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como limitantes adicionales.

#### Ejemplos

Se realizaron varios estudios de viabilidad para evaluar la estabilidad de ipilimumab y nivolumab en una formulación de combinación de dosis fija única (FDRC). La Figura 1 muestra las formulaciones de ipilimumab y nivolumab en sus formulaciones de sustancia farmacológica (SF) o producto farmacológico (PF), que se usaron como controles donde se indica en los siguientes ejemplos.

#### Ejemplo 1

Se realizó un estudio de viabilidad para evaluar la estabilidad de ipilimumab y nivolumab en una formulación de combinación de dosis fija única (FDRC) creada al mezclar las formulaciones individuales de ipilimumab y nivolumab (Figura 1) a una proporción final de ipilimumab frente a nivolumab de 1:1.

Ipilimumab (BMS-734016) PF contiene 5 mg/ml de ipilimumab en Tris-HCl 20 mM, NaCl 100 mM, manitol al 1,0 % (p/v), ácido pentético 100 µM (DTPA) y polisorbato 80 al 0,01 % (PS80), a pH 7,0, y está disponible como 40 ml en una botella de 50 ml y 10 ml en un vial de 10 ml (Figura 1). El nivolumab (BMS-936558) PF contiene 10 mg/ml de nivolumab en tampón de citrato 20 mM (dihidrato de citrato de sodio), NaCl 50 mM, manitol al 3,0 % (p/v), DTPA 20 µM y PS80 al 0,02 %, a pH 6,0, y está disponible como 10 ml en un vial de 10 ml (Figura 1).

Para lograr una proporción 1:1 de ipilimumab frente a nivolumab, se mezclaron 80 ml de ipilimumab PF (2 frascos) con 40 ml de nivolumab PF (4 viales), obteniéndose un producto combinado que tenía 3,3 mg/ml de ipilimumab y 3,3 mg/ml de nivolumab. La formulación FDRC resultante contenía Tris-HCl 13,3 mM, citrato 6,7 mM, NaCl 83,3 mM, manitol al 1,67 % (p/v), DTPA 73,3 µM, y PS80 al 0,013 % p/v, a pH 6,2 tal como se muestra en la Tabla 1.

**Tabla 1: Formulación combinada CE FDRC (1:1)**

Prototipo	Proporción	Conc. final en el vial: (mg/ml)		Tris mM	Citrato mM	pH	Manitol % en p/v	NaCl mM	DTPA µM	PS 80 % en p/v
		Ipi (mg/ml)	Nivo (mg/ml)							
1	1:1	3,3	3,3	13,3	6,7	6,2	1,67	83,3	73,3	0,013

La formulación de FDRC (1:1) se filtró y se dividió en alícuotas en viales de vidrio de 10 cc (5 ml por vial), se tapó y se selló. Los viales se almacenaron a 5 °C o a 40 °C. Las muestras fueron analizadas a los 0 días, 1 semana, 2 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses y 6 meses. Las muestras del día 0 se usaron como controles.

#### Análisis de muestra - Métodos

En cada punto de tiempo, los viales de muestra se analizaron por su aspecto visual, pH a temperatura ambiente, HIAC, cromatografía de exclusión por tamaño y enfoque isoelectrico capilar con imágenes (cIEF). HIAC (Royco) es un instrumento de técnica de conteo de partículas basado en el oscurecimiento de la luz.

5 La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) se realizó mediante HPLC analítica de exclusión por tamaño (SE-HPLC) usando un TSKGEL® G3000SW<sub>XL</sub> con una columna de protección de TSKGEL® Guard SW<sub>XL</sub> una HPLC WATERS® 2695 ALLIANCE® con un detector UV de longitud de onda doble 2497 utilizando el programa informático EMPOWER™ 2. El sistema se equilibró con NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 M y acetonitrilo (ACN) al 15 %, a pH 6,8 (fase móvil). Las muestras se analizaron solo a menos que la concentración fuera superior a 125 mg/ml. Si la concentración de la muestra era superior a 125 mg/ml, la muestra se diluyó a 50 mg/ml con el tampón correspondiente. Las muestras se transfirieron a un vial de HPLC antes del análisis y se almacenaron en el sistema analítico de HPLC a una temperatura de 5 °C ± 3 °C. Se inyectaron un total de 100 µg de muestra para análisis y se procesaron isocráticamente con una temperatura de columna de 22 °C usando la fase móvil. El caudal fue de 1,0 ml/min con un tiempo de ejecución por muestra de 20 min y una longitud de onda de detección de 280 nm.

El enfoque isoelectrico capilar con imágenes (cIEF) se realizó utilizando un instrumento Protein SIMPLE™ iCE3 con un muestreador Alcott. Las muestras se analizaron a una concentración de 25 mg/ml con urea 2 M y metilcelulosa (MC) al 0,35%. Se usó un capilar de 50 mm con un diámetro interno de 100 µm para realizar la separación. La solución electrolítica fue H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 80 mM en MC al 0,1 %, y la solución de catolito fue NaOH 100 mM en MC al 0,1 %. Los anfolitos del vehículo fueron PHARMALYTE® 5-8 al 1 % y PHARMALYTE® 8-10.5 al 3 %. El tiempo de enfoque fue de 13 minutos con un voltaje de enfoque que comenzó a 1,5 kV (300 V/cm) durante el primer minuto seguido de 3 kV (600 V/cm) durante los 12 minutos restantes. La detección se realizó a 280 nm.

#### 25 *Análisis de la muestra - Resultados*

La SEC se realizó en los controles de nivolumab PF e ipilimumab PF y la formulación de combinación de dosis fija de proporción 1:1 (CE FDRC (1:1)) después del almacenamiento durante 3 meses a 40 °C (Figura 2A). El tamaño de pico de APM de control de PF de nivolumab aumentó en aproximadamente un 1,6 %, y el tamaño de pico de APM de control de PF de ipilimumab aumentó en aproximadamente un 0,25 % después del almacenamiento durante 3 meses a 40 °C (Figura 2A). El tamaño del pico de APM de la formulación de CE FDRC (1:1) aumentó en aproximadamente el 0,7 % después del almacenamiento durante 3 meses a 40 °C (Figura 2A). Después del almacenamiento durante 6 meses a 40 °C, el tamaño de pico de APM de la formulación CE FDRC (1:1) aumentó del 0,555 % a un tamaño de pico final de APM del 2,82 %, un aumento de aproximadamente el 2,265 % (Tabla 2). Después del almacenamiento durante 6 meses a 5 °C, el tamaño de pico de APM de la formulación CE FDRC (1:1) disminuyó del 0,555 % a un tamaño de pico de APM final del 0,525 % (Tabla 2).

**Tabla 2: Resultados combinados de enfoque isoelectrico capilar y cromatografía de exclusión por tamaño en CE FDRC (1:1).**

Fármaco	Pico ácido de cIEF (Inicial)	Pico ácido de cIEF (6 M / 5 °C)	Pico ácido de cIEF (cambio a 5 °C)	APM de SEC inicial	APM de SEC 6M / 40 °C	APM de SEC 6M / 5 °C	Cambio de APM de SEC a 40 °C	Cambio de APM de SEC a 5 °C
Ipilimumab	34	38,16	4,16	0,555	2,82	0,525	2,265	-0,03
Nivolumab	35,09	38,65	3,56					

40 El cIEF se realizó en los controles nivolumab PF e ipilimumab PF y la formulación CE FDRC (1:1) después del almacenamiento durante 6 meses a 5 °C (Figura 2B). El tamaño del pico ácido del control de nivolumab PF aumentó en aproximadamente el 1,3 %, y el tamaño del pico ácido de ipilimumab PF aumentó en aproximadamente un 3 % después del almacenamiento durante 6 meses a 5 °C (Figura 2B). Para la formulación CE FDRC (1:1), el tamaño máximo ácido de nivolumab aumentó en aproximadamente el 3,56 %, del 35,09 % al día 0 (inicial) al 38,65 % a los 6 meses, mientras que el tamaño máximo ácido de ipilimumab aumentó en aproximadamente el 4,16 %, del 34 % al día 0 (inicial) al 38,16 % a los 6 meses (Tabla 2 y Figura 2B).

50 El presente estudio se puede utilizar para aprovechar un amplio intervalo de concentración de un sistema de tampón mixto, es decir, una composición tampón de Tris-Citrato.

#### Ejemplo 2

55 Se realizó un estudio de viabilidad para evaluar la estabilidad de un FDRC de ipilimumab/nivolumab creado mediante la mezcla de las formulaciones individuales de ipilimumab y nivolumab con proporciones finales de 3:1, 1:1 y 1:3 (Tabla 3). Las formulaciones de FDRC se generaron mezclando el ipilimumab SF a 5 mg/ml y el nivolumab SF a 20 mg/ml para lograr proporciones de proteínas de 3:1, 1:1 y 1:3 (Tabla 3). Cada solución combinada se mezcló adicionalmente con una barra de agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos, se transfirió a viales y se almacenó para la estabilidad en el tiempo. Los viales se almacenaron a 5 °C, 25 °C y 40 °C durante hasta 12 meses.

**Tabla 3: CE FDRC (3:1; 1:1; 1:3) - Combinaciones de formulaciones de Ipilimumab PF y Nivolumab PF**

Prototipo	Proporción	Conc. final en el vial: (mg/ml)		pH	Manitol	NaCl	DTPA	PS 80
		Ipi	Nivo		% en p/v	mM	µM	% en p/v
CE: pH 6,6	3:1	4,62	1,54	6,6	1,15	96,15	93,85	0,012
CE: pH 6,0	1:3	2,86	8,57	6,0	1,86	78,57	65,71	0,023
CE: pH 6,2	1:1	4,00	4,00	6,2	1,67	83,33	73,33	0,013

El prototipo CE: pH 6,6, que tiene una proporción de 3:1 de ipilimumab frente a nivolumab, contenía 4,62 mg/ml de ipilimumab, 1,54 mg/ml de nivolumab, manitol al 1,15 % en p/v, NaCl 96,15 mM, DTPA 93,85 µM, y PS80 al 0,012 % p/v, a pH 6,6. El prototipo CE: pH 6,0, que tiene una proporción de 1:3 de ipilimumab frente a nivolumab, contenía 2,86 mg/ml de ipilimumab, 8,57 mg/ml de nivolumab, manitol al 1,86 % en p/v, NaCl 78,57 mM, DTPA 65,71 µM, y PS80 al 0,023 % p/v, a pH 6,0. El prototipo CE: pH 6,2, que tiene una proporción de 1:1 de ipilimumab frente a nivolumab, contenía 4,00 mg/ml de ipilimumab, 4,00 mg/ml de nivolumab, manitol al 1,67 % en p/v, NaCl 83,33 mM, DTPA 73,33 µM, y PS80 al 0,013 % p/v, a pH 6,2.

#### Análisis por SEC

En general, se observaron pequeños aumentos en APM y BPM en los 3 prototipos (Figuras 3A-B). La SEC se realizó en el control de nivolumab PF, el control de ipilimumab PF y las formulaciones CE FDRC CE: pH 6,0 (1:3), CE: pH 6,2 (1:1) y CE: pH 6,6 (3:1) después del almacenamiento durante 2 meses a 40 °C (Figuras 3A y 3B). La formulación de control de ipilimumab tenía un tamaño de pico inicial de APM de aproximadamente el 0,4 % en el día 0, que aumentó en aproximadamente el 0,1 % a un tamaño de pico final de APM de poco más del 0,5 % después de 2 meses a 40 °C (Figura 3A). La formulación de control de nivolumab tenía un tamaño de pico de APM inicial de aproximadamente el 0,8 % en el día 0, que aumentó en aproximadamente el 0,7 % a un tamaño de pico de APM final de más del 1,5 % después de 2 meses a 40 °C (Figura 3A). La formulación CE: pH 6,0 FDRC (1:3) tenía un tamaño de pico de APM inicial de aproximadamente el 0,6 % en el día 0, que aumentó en aproximadamente el 0,7 % a un tamaño de pico de APM final de aproximadamente el 1,3 % después de 2 meses a 40 °C (Figura 3A). La formulación CE: pH 6,2 FDRC (1:1) tenía un tamaño de pico de APM inicial de aproximadamente el 0,5 % en el día 0, que aumentó en aproximadamente el 0,5 % a un tamaño de pico de APM final de aproximadamente el 1,0 % después de 2 meses a 40 °C (Figura 3A). La formulación CE: pH 6,6 FDRC (3:1) tenía un tamaño de pico de APM inicial de aproximadamente el 0,5 % en el día 0, que aumentó en aproximadamente el 0,3 % a un tamaño de pico de APM final de aproximadamente el 0,8 % después de 2 meses a 40 °C (Figura 3A).

Los tamaños de pico de bajo peso molecular (BPM) para las diversas formulaciones también se midieron en el día 0, después de 2 meses a 40 °C y después de 3 meses a 25 °C (Figura 3B). La formulación de control de ipilimumab tenía un tamaño de pico de BPM inicial de aproximadamente el 0,2 % en el día 0, que aumentó en aproximadamente un 0,65 % a un tamaño de pico final de BPM de aproximadamente un 0,85 % después de 2 meses a 40 °C (Figura 3B). Tras el almacenamiento a 25 °C durante 3 meses, el tamaño de pico de BPM de la formulación de control de ipilimumab aumentó en aproximadamente el 0,1 % (Figura 3B). La formulación de control de nivolumab tenía un tamaño de pico de BPM inicial de aproximadamente el 0,2 % en el día 0, que aumentó en aproximadamente un 0,6 % a un tamaño de pico final de BPM de aproximadamente un 0,8 % después de 2 meses a 40 °C (Figura 3B). Tras el almacenamiento a 25 °C durante 3 meses, el tamaño de pico de BPM de la formulación de control de nivolumab aumentó en menos del 0,1 % (Figura 3B). La formulación CE: pH 6,0 FDRC (1:3) tenía un tamaño de pico de BPM inicial de aproximadamente el 0,15 % en el día 0, que aumentó en aproximadamente un 0,8 % a un tamaño de pico final de BPM de aproximadamente un 0,95 % después de 2 meses a 40 °C (Figura 3B). Tras el almacenamiento a 25 °C durante 3 meses, el tamaño de pico de BPM de la formulación CE: pH 6,0 FDRC (1:3) aumentó en aproximadamente el 0,2 % (Figura 3B). La formulación CE: pH 6,2 FDRC (1:1) tenía un tamaño de pico de BPM inicial de aproximadamente el 0,15 % en el día 0, que aumentó en aproximadamente un 1,2 % a un tamaño de pico final de BPM de aproximadamente un 1,35 % después de 2 meses a 40 °C (Figura 3B). Tras el almacenamiento a 25 °C durante 3 meses, el tamaño de pico de BPM de la formulación CE: pH 6,2 FDRC (1:1) aumentó en aproximadamente el 0,3 % (Figura 3B). La formulación CE: pH 6,6 FDRC (3:1) tenía un tamaño de pico de BPM inicial de aproximadamente el 0,15 % en el día 0, que aumentó en aproximadamente un 1,5 % a un tamaño de pico final de BPM de aproximadamente un 1,65 % después de 2 meses a 40 °C (Figura 3B). Tras el almacenamiento a 25 °C durante 3 meses, el tamaño de pico de BPM de la formulación CE: pH 6,6 FDRC (3:1) aumentó en aproximadamente el 0,1 %.

#### Análisis por cIEF

La cIEF se realizó en el control de nivolumab PF, el control de ipilimumab PF y las formulaciones CE FDRC CE: pH 6,0 (1:3), CE: pH 6,2 (1:1) y CE: pH 6,6 (3:1) después del almacenamiento durante 3 meses a 25 °C (Figura 4A), 3 meses a 5 °C (Figura 4B) y 1 mes a 25 °C (Figura 4C). El tamaño del pico ácido de control de nivolumab PF disminuyó en aproximadamente un 0,05 % y el tamaño del pico ácido de control de ipilimumab PF aumentó en aproximadamente un 5,59 % después del almacenamiento durante 3 meses a 25 °C (Figura 4A). Los tamaños de los picos ácidos de nivolumab e ipilimumab de la formulación de FDRC de CE: pH 6,0 (1:3) aumentaron en aproximadamente el 5 % y aproximadamente el 5,7 %, respectivamente, después del almacenamiento durante 3 meses a 25 °C (Figura 4A). Los

tamaños de los picos ácidos de nivolumab e ipilimumab de la formulación de FDRC de CE: pH 6,2 (1:1) aumentaron en aproximadamente el 6,8 % y aproximadamente el 6,3 %, respectivamente, después del almacenamiento durante 3 meses a 25 °C (Figura 4A). Los tamaños de los picos ácidos de nivolumab e ipilimumab de la formulación de FDRC de CE: pH 6,6 (3:1) aumentaron en aproximadamente el 4 % y aproximadamente el 7,8 %, respectivamente, después del almacenamiento durante 3 meses a 25 °C (Figura 4A). En las tres formulaciones de FDRC, el tamaño del pico ácido de ipilimumab aumentó en aproximadamente el 5,7 % - 7,8 %, o en un promedio de aproximadamente el 2,2 % por mes; y el tamaño del pico ácido de nivolumab aumentó en aproximadamente el 4 % - 6,8 %, o en un promedio de menos del 2 % (aproximadamente el 1,76 %) por mes (Figura 4A).

La Figura 4B muestra el cambio real en el tamaño de pico ácido en relación con los controles iniciales (Día 0) para las muestras almacenadas durante 3 meses a 5 °C utilizando el análisis cIEF. El tamaño del pico ácido de control de nivolumab PF disminuyó en aproximadamente un 5,1 % y el tamaño del pico ácido de control de ipilimumab PF disminuyó en aproximadamente un 1 % después del almacenamiento durante 3 meses a 5 °C (Figura 4B). Los tamaños de los picos ácidos de nivolumab e ipilimumab de la formulación de FDRC de CE: pH 6,0 (1:3) aumentaron en aproximadamente el 0,1 % y se redujo en aproximadamente el 1,5 %, respectivamente, después del almacenamiento durante 3 meses a 5 °C (Figura 4B). Los tamaños de los picos ácidos de nivolumab e ipilimumab de la formulación de FDRC de CE: pH 6,2 (1:1) aumentaron en aproximadamente el 2,1 % y aproximadamente el 0,5 %, respectivamente, después del almacenamiento durante 3 meses a 5 °C (Figura 4B). La formulación de FDRC EC: pH 6,6 (3:1) no mostró cambios en el tamaño de pico ácido de ipilimumab y una disminución de menos del 0,1 % en el tamaño de pico ácido de nivolumab después del almacenamiento durante 3 meses a 5 °C (Figura 4B).

La Figura 4C muestra el cambio real en el tamaño de pico ácido en relación con los controles iniciales (Día 0) para muestras almacenadas durante 1 mes a 25 °C. El tamaño de pico ácido de control de nivolumab PF aumentó en aproximadamente el 1,05 %, y el tamaño de pico ácido de control de ipilimumab PF aumentó en aproximadamente el 1,16 % después del almacenamiento durante 1 mes a 25 °C (Figura 4C). Los tamaños de los picos ácidos de nivolumab e ipilimumab de la formulación de FDRC de CE: pH 6,0 (1:3) aumentaron en aproximadamente el 2,8 % y aproximadamente el 1 %, respectivamente, después del almacenamiento durante 1 mes a 25 °C (Figura 4C). Los tamaños de los picos ácidos de nivolumab e ipilimumab de la formulación de FDRC de CE: pH 6,2 (1:1) aumentaron en aproximadamente el 3,1 % y aproximadamente el 1,6 %, respectivamente, después del almacenamiento durante 1 mes a 25 °C (Figura 4C). El tamaño del pico ácido de nivolumab de la formulación de FDRC CE: pH 6,6 (3:1) no cambió, y el tamaño del pico ácido de ipilimumab aumentó en aproximadamente un 2,8 % después del almacenamiento durante 1 mes a 25 °C (Figura 4C).

### Ejemplo 3

Se realizó un estudio de diseño de experimentos (DdE) para identificar nuevas formulaciones candidatas de ipilimumab/nivolumab. Se realizaron formulaciones prototipo de FDRC de ipilimumab/nivolumab (3:1) en formulaciones seleccionadas de histidina o citrato, tal como se muestra en la Tabla 4. Todos los prototipos de DdE de FDRC se prepararon a una concentración final de ipilimumab/nivolumab de 10 mg/ml en una proporción de 3:1 (Tabla 4). El prototipo e FDRC "Combo 4" contenía citrato 20 mM, NaCl 50 mM, DTPA 50 µM, sacarosa al 6 % de p/v y PS80 al 0,05 % de p/v, a un pH teórico de 6. El prototipo de FDRC "Combo 5" contenía histidina 20 mM, NaCl 50 mM, DTPA 50 µM, sacarosa al 6 % de p/v y PS80 al 0,05 % de p/v, a un pH teórico de 6,0. El prototipo de FDRC "Combo 6" contenía histidina 20 mM, NaCl 50 mM, DTPA 50 µM, sacarosa al 6 % de p/v y PS80 al 0,05 % de p/v, a un pH teórico de 7. El prototipo de FDRC "Combo Nuevo" contenía histidina 20 mM, DTPA 50 µM, sacarosa al 8,5 % de p/v y PS80 al 0,05 % de p/v, a un pH teórico de 6. El prototipo de FDRC "Combo 8", que era similar a la formulación actual de nivolumab PF, contenía citrato 20 mM, NaCl 50 mM, DTPA 20 µM, manitol AL 3 % en p/v y PS80 al 0,04 % en p/v, a un pH teórico de 6.

**Tabla 4: DdE FDRC (3:1) - Nuevas formulaciones**

Prototipo (3:1)	pH	Tampón 20 mM	Concentración	NaCl	DTPA	Sacarosa	Manitol	PS80
			mg/ml	mM	µM	% en p/v	% en p/v	% en p/v
Combo 4	6	Citrato	10	50	50	6	-	0,05
Combo 5	6	Histidina	10	50	50	6	-	0,05
Combo 6	7	Histidina	10	50	50	6	-	0,05
Combo nuevo	6	Histidina	10	-	50	8,5	-	0,05
Combo 8	6	Citrato	10	50	20	-	3	0,04

Las formulaciones de DdE de FDRC se crearon de acuerdo con el siguiente ejemplo de preparación de combo nuevo. El combo nuevo se preparó sometiendo primero ipilimumab SF y nivolumab SF (ELN 96488-024 y -025) a ultrafiltración/diafiltración. En particular, se utilizó un casete desechable de UFDF para nivolumab SF e ipilimumab SF. Se usaron aproximadamente 250 ml de la SF no formulada de nivolumab (~ 21 mg/ml) para UF/DF, utilizando el modo de diafiltración/concentración. La presión transmembrana (TMP) se ajustó a 15 psi, mientras que se estableció una velocidad de flujo de 0,3 litros por minuto para la bomba de alimentación. La diafiltración se completó después de usar 3 litros del tampón. La muestra en el recipiente se concentró adicionalmente basándose en una reducción de peso a escala, y se recogió en una botella de 250 PETG. La concentración de nivolumab tras la UFDF fue de 30,6 mg/ml. Se

usaron aproximadamente 500 ml de SF no formulada de ipilimumab (~ 5,2 mg/ml) para la UF/DF, utilizando el modo de diafiltración/concentración. La concentración de ipilimumab en el producto final fue de 16,2 mg/ml por A280.

5 A continuación, se añadieron 20 ml de ipilimumab SF en un tampón basado en histidina-sacarosa y 7,5 ml de nivolumab SF en un tampón basado en histidina-sacarosa en unidades del D-Tube Dialyzer y se dializaron contra el tampón de combo nuevo, tal como se muestra en la Tabla 4, durante 24 horas en una cámara fría con suficiente volumen (cambio de tampón de 3 veces). La concentración de proteínas de ipilimumab y nivolumab se midió luego mediante HIAC. Luego se añadieron ipilimumab SF y/o nivolumab SF adicionales y los tampones apropiados para llevar la concentración final de ipilimumab a 7,5 mg/ml y nivolumab a 2,5 mg/ml (3:1). Los prototipos restantes Combo 4, Combo 10 5, Combo 6 y Combo 8 se prepararon de la misma manera que Combo nuevo, se modificaron a las concentraciones específicas que se muestran en la Tabla 4.

Las formulaciones de PF combinadas se filtraron y se llenaron de forma estéril en viales de 10 cc (SAP n.º 1215125, lote n.º 2L68780), se taparon (SAP n.º 1239068, lote n.º 0H49862), y se plegaron. Algunos viales se guardaron para el análisis de control del día 0. El resto fue puesto en estaciones de estabilidad a 5 °C, 25 °C y 40 °C hasta que se extrajeron los viales en puntos de tiempo específicos para el análisis.

#### *Análisis por SEC*

20 La SEC se realizó en el control de nivolumab PF, el control ipilimumab PF y las formulaciones de DdE de FDRC (3:1) Combo nuevo, Combo 4, Combo 5, Combo 6 y Combo 8 después del almacenamiento durante 3 meses a 40 °C (Figura 5A). La formulación de control de ipilimumab tenía un tamaño de pico inicial de APM de aproximadamente el 0,4 % en el día 0, que aumentó en aproximadamente el 0,2 % a un tamaño de pico de APM final de aproximadamente el 0,6 % después de 3 meses a 40 °C (Figura 5 A). La formulación de control de nivolumab tenía un tamaño de pico de APM inicial de aproximadamente el 0,7 % en el día 0, que aumentó en aproximadamente el 1,6 % a un tamaño de pico de APM final de aproximadamente el 2,4 % después de 3 meses a 40 °C (Figura 5 A). La formulación Combo nuevo FDRC tenía un tamaño de pico inicial de APM de aproximadamente el 0,4 % en el día 0, que aumentó en aproximadamente el 0,1 % a un tamaño de pico final de APM de poco más del 0,5 % después de 3 meses a 40 °C (Figura 5 A). La formulación de Combo 4 de FDRC tenía un tamaño pico inicial de APM de aproximadamente el 0,6 % en el día 0, que aumentó en aproximadamente el 0,7 % a un tamaño de pico de APM final de aproximadamente el 1,3 % después de 3 meses a 40 °C (Figura 5 A). La formulación de Combo 5 de FDRC tenía un tamaño de pico de APM inicial de poco menos del 0,5 % en el día 0, que aumentó en aproximadamente el 0,3 % a un tamaño de pico de APM final de menos del 0,8 % después de 3 meses a 40 °C (Figura 5A). La formulación de Combo 6 de FDRC tenía un tamaño pico inicial de APM de aproximadamente el 0,5 % en el día 0, que aumentó en aproximadamente el 0,3 % a un tamaño de pico de APM final de aproximadamente el 0,8 % después de 3 meses a 40 °C (Figura 5 A). La formulación de Combo 8 de FDRC tenía un tamaño pico inicial de APM de aproximadamente el 0,5 % en el día 0, que aumentó en aproximadamente el 1,0 % a un tamaño de pico de APM final de aproximadamente el 1,5 % después de 3 meses a 40 °C (Figura 5 A).

40 La SEC analizó las mismas formulaciones después del almacenamiento durante 3 meses a 25 °C (Figura 5A). El tamaño del pico de APM de la formulación de control de ipilimumab y la formulación de control de nivolumab aumentaron cada 0,1 % o menos después del almacenamiento durante 3 meses a 25 °C (Figura 5A). Los tamaños de pico de APM de las formulaciones de Combo nuevo y Combo 8 de FDRC aumentaron cada uno en un 0,1 % o menos, y los tamaños máximos de APM las formulaciones de FDRC del Combo 4, Combo 5 y Combo 6 disminuyeron cada una aproximadamente un 0,1 % o menos después del almacenamiento durante 3 meses a 25 °C (Figura 5A).

#### *Análisis por cIEF*

50 La cIEF se realizó en el control de nivolumab PF, el control ipilimumab PF y las formulaciones de DdE de FDRC (3:1) Combo nuevo, Combo 4, Combo 5, Combo 6 y Combo 8 después del almacenamiento durante 3 meses a 25 °C (Figura 5B). El tamaño del pico ácido de control de ipilimumab aumentó en aproximadamente un 5,59 %, y el tamaño del pico ácido de control de nivolumab PF disminuyó en aproximadamente el 0,05 % después del almacenamiento durante 3 meses a 25 °C (Figura 5B). Los tamaños de picos ácidos de nivolumab e ipilimumab de la formulación de FDRC de Combo nuevo aumentaron en aproximadamente un 0,64 % y un 5,98 %, respectivamente, después del almacenamiento durante 3 meses a 25 °C (Figura 5 B). Los tamaños de pico ácidos de nivolumab e ipilimumab de la formulación de FDRC de Combo 4 aumentaron en aproximadamente el 5,32 % y el 6,97 %, respectivamente, después del almacenamiento durante 3 meses a 25 °C (Figura 5 B). Los tamaños de pico ácidos de nivolumab e ipilimumab de la formulación de FDRC de Combo 5 aumentaron en aproximadamente el 0,12 % y el 5,34 %, respectivamente, después del almacenamiento durante 3 meses a 25 °C (Figura 5 B). Los tamaños de pico ácidos de nivolumab e ipilimumab de la formulación de FDRC de Combo 6 aumentaron en aproximadamente el 7,01 % y el 12,19 %, respectivamente, después del almacenamiento durante 3 meses a 25 °C (Figura 5 B). Los tamaños de picos ácidos de nivolumab e ipilimumab de la formulación de FDRC de Combo 8 aumentaron cada uno aproximadamente un 7,17 % después del almacenamiento durante 3 meses a 25 °C (Figura 5B).

#### **Ejemplo 4**

Se realizó un estudio de viabilidad para evaluar la estabilidad de un FDRC de ipilimumab/nivolumab en proporciones variables de ipilimumab frente a nivolumab, utilizando una versión modificada de la formulación de DdE de FDRC (3:1) de Combo nuevo, caracterizada en el Ejemplo 3, como la formulación base. Las formulaciones de plataforma combinada (PC) de FDRC de ipilimumab/nivolumab se hicieron en proporciones de ipilimumab frente a nivolumab de 3:1, 1:3 y 1:1, tal como se muestra en la Tabla 5. Todas las formulaciones se prepararon en un tampón de histidina y a concentraciones finales de DTPA 50 µM, PS80 al 0,05 % de p/v y sacarosa al 8,0 % de p/v (Tabla 5). Prototipo 4 de PC de FDRC ("PC: pH 5,5-1:3") tenía una proporción de 1:3 y un pH de 5,5; Prototipo 5 de PC de FDRC ("PC: pH 6,0-1:3") tenía una proporción de 1:3 y un pH de 6,0; Prototipo 6 de PC de FDRC ("PC: pH 6,5-1:3") tenía una proporción de 1:3 y un pH de 6,5; Prototipo 7 de PC de FDRC ("PC: pH 6,0-1:1") tenía una proporción de 1:1 y un pH de 6,0; y Prototipo 8 de PC de FDRC ("PC: pH 6,0-3:1") tenía una proporción de 3:1 y un pH de 6,0 (Tabla 5).

**Tabla 5: Formulaciones combinadas de plataforma de FDRC de Ipilimumab/Nivolumab**

Prototipo	Proporción	Conc. final en el vial: (mg/ml)		pH	Manitol % en p/v	NaCl mM	DTPA µM	PS 80 % en p/v	Sacarosa % en p/v
		Ipi	Nivo						
4	1:3	2,5	7,5	5,5	-	-	50	0,05	8,0
5	1:3	2,5	7,5	6,0	-	-	50	0,05	8,0
6	1:3	2,5	7,5	6,5	-	-	50	0,05	8,0
7	1:1	5	5	6,0	-	-	50	0,05	8,0
8	3:1	7,5	2,5	6,0	-	-	50	0,05	8,0

*Análisis por SEC*

La SEC se realizó en el control de nivolumab PF, el control de ipilimumab PF y las formulaciones de plataforma combinada (PC) FDRC PC: pH 6,0-1:1, PC: pH 5,5-1:3, PC: pH 6,0-1:3, PC: pH 6,5-1:3 y PC: pH 6,0-3:1 después del almacenamiento durante 3 meses a 40 °C (Figura 6A). Los tamaños de pico de APM de las formulaciones de control de nivolumab e ipilimumab aumentaron en aproximadamente el 1,7 % y el 0,25 %, respectivamente, después del almacenamiento durante 3 meses a 40 °C (Figura 6A). El tamaño de pico de APM de la formulación de FDRC de PC: pH 6,0-1:1 aumentó en aproximadamente el 0,5 % después del almacenamiento durante 3 meses a 40 °C (Figura 6A). El tamaño de pico de APM de la formulación de FDRC de PC: pH 5,5-1:3 aumentó en aproximadamente el 1,25 % después del almacenamiento durante 3 meses a 40 °C (Figura 6A). El tamaño de pico de APM de la formulación de FDRC de PC: pH 6,0-1:3 aumentó en aproximadamente el 0,75 % después del almacenamiento durante 3 meses a 40 °C (Figura 6A). El tamaño de pico de APM de la formulación de FDRC de PC: pH 6,5-1:3 aumentó en aproximadamente el 0,1 % después del almacenamiento durante 3 meses a 40 °C (Figura 6A). El tamaño de pico de APM de la formulación de FDRC de PC: pH 6,0-3:1 aumentó en aproximadamente el 0,25 % después del almacenamiento durante 3 meses a 40 °C (Figura 6A).

La SEC analizó las mismas formulaciones después del almacenamiento durante 3 meses a 5 °C (Figura 6B). La formulación de control de nivolumab tenía un tamaño de pico de APM inicial de aproximadamente el 0,70 % en el día 0, que aumentó a un tamaño de pico de APM final de aproximadamente el 0,71 % después de 3 meses a 5 °C (Figura 6B). La formulación de control de ipilimumab tenía un tamaño de pico inicial de APM de aproximadamente el 0,4 % en el día 0, que no cambió después de 3 meses a 5 °C (Figura 6B). La formulación de FDRC de PC: pH 6,0-1:1 tenía un tamaño de pico de APM inicial de aproximadamente el 0,44 % en el día 0, que aumentó a un tamaño de pico de APM final de aproximadamente el 0,45 % después de 3 meses a 5 °C (Figura 6B). La formulación de FDRC de PC: pH 5,5-1:3 tenía un tamaño de pico de APM inicial de aproximadamente el 0,47 % en el día 0, que aumentó a un tamaño de pico de APM final de aproximadamente el 0,48 % después de 3 meses a 5 °C (Figura 6B). La formulación de FDRC de PC: pH 6,0-1:3 tenía un tamaño de pico de APM inicial de aproximadamente el 0,51 % en el día 0, que no cambió después de 3 meses a 5 °C (Figura 6B). La formulación de FDRC de PC: pH 6,5-1:3 tenía un tamaño de pico de APM inicial de aproximadamente el 0,56 % en el día 0, que aumentó a un tamaño de pico de APM final de aproximadamente el 0,58 % después de 3 meses a 5 °C (Figura 6B). La formulación de FDRC de PC: pH 6,0-3:1 tenía un tamaño de pico de APM inicial de aproximadamente el 0,37 % en el día 0, que aumentó a un tamaño de pico de APM final de aproximadamente el 0,39 % después de 3 meses a 5 °C (Figura 6B).

*Análisis por cIEF*

La cIEF se realizó en el control de nivolumab PF, el control de ipilimumab PF y las formulaciones de plataforma combinada (PC) FDRC PC: pH 6,0-1:1, PC: pH 5,5-1:3, PC: pH 6,0-1:3, PC: pH 6,5-1:3 y PC: pH 6,0-3:1 después del almacenamiento durante 3 meses a 25 °C (Figura 7A) y 3 meses a 5 °C (Figura 7B).

Después del almacenamiento durante 3 meses a 25 °C, el tamaño de pico ácido de control de nivolumab disminuyó en aproximadamente un 0,05 %, y el tamaño de pico ácido de control de ipilimumab aumentó en aproximadamente un 5,59 % (Figura 7A). Los tamaños de pico ácidos de nivolumab e ipilimumab de la formulación de PC: pH 6,0-1:1 de FDRC aumentó en aproximadamente el 2,6 % y el 7 %, respectivamente, después del almacenamiento durante 3 meses a 25 °C (Figura 7A). Los tamaños de pico ácido de nivolumab e ipilimumab de la formulación de FDRC de PC: pH 5,5-1:3 aumentaron en aproximadamente 2,1 % y 5,9 %, respectivamente, después del almacenamiento durante 3 meses a 25 °C (Figura 7A). Los tamaños de pico ácido de nivolumab e ipilimumab de la formulación de FDRC de

PC: pH 6,0-1:3 aumentaron en aproximadamente 3,7 % y 6,8 %, respectivamente, después del almacenamiento durante 3 meses a 25 °C (Figura 7 A). Los tamaños de pico ácido de nivolumab e ipilimumab de la formulación de FDRC de PC: pH 6,5-1:3 aumentaron en aproximadamente 5,9 % y 6,3 %, respectivamente, después del almacenamiento durante 3 meses a 25 °C (Figura 7 A). Los tamaños de pico ácido de nivolumab e ipilimumab de la formulación de FDRC de PC: pH 6,0-3:1 aumentaron en aproximadamente 1,3 % y 6,2 %, respectivamente, después del almacenamiento durante 3 meses a 25 °C (Figura 7 A). En todas las formulaciones de FDRC de PC almacenadas durante 3 meses a 25 °C, el tamaño de pico ácido de ipilimumab aumentó en aproximadamente del 5,9-7,0 %, o en un promedio de aproximadamente el 2,0 % por mes (Figura 7A). El tamaño de pico ácido de nivolumab de las formulaciones de FDRC de FC aumentó en aproximadamente el 1,3-5,9 %, o en un máximo de aproximadamente el 2 % por mes (Figura 7A).

Después del almacenamiento durante 3 meses a 5 °C, el tamaño de pico ácido de control de nivolumab disminuyó en aproximadamente un 5,2 %, y el tamaño de pico ácido de control de ipilimumab se redujo en aproximadamente un 1 % (Figura 7B). Los tamaños de pico ácidos de nivolumab e ipilimumab de la formulación de PC: pH 6,0-1:1 de FDRC se redujo en aproximadamente el 2 % y aumentó en aproximadamente el 2,2 %, respectivamente, después del almacenamiento durante 3 meses a 5 °C (Figura 7 B). Los tamaños de pico ácidos de nivolumab e ipilimumab de la formulación de FDRC de PC: pH 5,5-1:3 disminuyó en aproximadamente el 1,1 % y aproximadamente el 0,3 %, respectivamente, después del almacenamiento durante 3 meses a 5 °C (Figura 7 B). Los tamaños máximos ácidos de nivolumab e ipilimumab de la formulación de FDRC de PC: pH 6,0-1:3 disminuyó cada una aproximadamente un 0,2 % después del almacenamiento durante 3 meses a 5 °C (Figura 7B). Los tamaños de pico ácidos de nivolumab e ipilimumab de la formulación de FDRC de PC: pH 6,5-1:3 aumentó en aproximadamente el 0,5 % y se redujo aproximadamente el 3,1 %, respectivamente, después del almacenamiento durante 3 meses a 5 °C (Figura 7 B). Los tamaños de pico ácidos de nivolumab e ipilimumab de la formulación de FDRC de PC: pH 6,0-3:1 aumentó en aproximadamente el 0,1 % y se redujo aproximadamente el 0,2 %, respectivamente, después del almacenamiento durante 3 meses a 5 °C (Figura 7 B). En resumen, los tamaños máximos ácidos de ipilimumab y nivolumab en las formulaciones de 1:3 a pH 5,5-6,5 no mostraron esencialmente ningún cambio después del almacenamiento durante 3 meses a 5 °C, y no hubo cambios apreciables en ipilimumab y nivolumab en las 3 proporciones diferentes (Figura 7B).

### 30 Ejemplo 5

Se realizó un estudio de viabilidad para evaluar la estabilidad de un FDRC de ipilimumab/nivolumab (1:1) en varias formulaciones basadas en nivolumab-PF, tal como se muestra en la Tabla 6. Estas formulaciones se diseñaron mediante la modificación de la formulación de nivolumab PF (Figura 1). Un total de 24 viales de ipilimumab PF y nivolumab PF se sometieron a intercambio de tampón de sus formulaciones de tampón de PF originales en una formulación de tampón que contenía ácido cítrico 20 mM y NaCl 50 mM a pH 6,0 (Prototipo A) usando unidades de filtro centrífugo con un peso molecular corte de 50 kDa. Los prototipos B-D se prepararon de la misma manera para alcanzar las especificaciones mostradas en la Tabla 6. El prototipo A contenía 7,5 mg/ml de ipilimumab, 7,5 mg/ml de nivolumab, citrato 20 mM, NaCl 50 mM, manitol al 3,0 % en p/v, ácido pentético 100 µM (DTPA) y PS80 al 0,02 %, a pH 6,0. El prototipo A era idéntico al nivolumab PF, excepto que el prototipo A tenía ácido pentético 100 µM, mientras que el nivolumab PF tenía ácido pentético 20 µM. El prototipo B contenía 7,5 mg/ml de ipilimumab, 7,5 mg/ml de nivolumab, citrato 20 mM, NaCl 50 mM, manitol al 3,0 % en p/v, ácido pentético 100 µM (DTPA) y PS80 al 0,02 %, a pH 6,5. El prototipo C contenía 7,5 mg/ml de ipilimumab, 7,5 mg/ml de nivolumab, citrato 20 mM, NaCl 100 mM, manitol al 1,0 % en p/v, ácido pentético 100 µM (DTPA) y PS80 al 0,02 %, a pH 6,5. El prototipo D contenía 7,5 mg/ml de ipilimumab, 7,5 mg/ml de nivolumab, citrato 20 mM, NaCl 50 mM, sacarosa al 6 % en p/v, ácido pentético 100 µM (DTPA) y PS80 al 0,02 %, a pH 6,0.

**Tabla 6: Formulaciones de FDRC basadas en Nivolumab-PF (1:1)**

Prototipo A:	Ipi/Nivo: 7,5 + 7,5 en citrato (20 mM), pH 6.0, NaCl 50 mM, manitol al 3,0 % en p/v, ácido <b>pentético 100 uM</b> , PS80 al 0,02 %
Prototipo B:	Ipi/Nivo: 7,5 + 7,5 en citrato (20 mM), <b>pH 6,5</b> , NaCl 50 mM, manitol al 3,0 % en p/v, ácido pentético 100 uM, PS80 al 0,02 %
Prototipo C:	Ipi/Nivo: 7,5 + 7,5 en citrato (20 mM), <b>pH 6,5, NaCl 100 mM, manitol al 1,0 % en p/v</b> , ácido pentético 100 uM, PS80 al 0,02 %
Prototipo D:	Ipi/Nivo: 7,5 + 7,5 en citrato (20 mM), pH 6.0, NaCl 50 mM, <b>sacarosa al 6 % en p/v</b> , ácido pentético 100 uM, PS80 al 0,02 %
* Nota: El prototipo A es similar a la formulación de nivolumab PF excepto que la concentración de ácido pentético (DTPA) es la misma que en la formulación de ipilimumab PF (véase la Figura 1).	

50 Los prototipos de FDRC A, B, C y D se filtraron con una unidad de 0,2 micrómetros y se introdujeron en viales SCHOTT® de 10 cc (1 o 2 ml por vial), se tapó y se selló. Luego fueron puestos en estaciones de estabilidad durante hasta 12 meses para el análisis de estabilidad por el aspecto, pH, SEC, HIAC y cIEF.

#### 55 *Análisis por SEC*

La SEC se realizó en el control de nivolumab PF, el control de ipilimumab PF y los prototipos de FDRC (1:1) basados en nivolumab-DP A, B, C y D después del almacenamiento durante 1 mes a 40 °C (Figura 8). Los tamaños de pico de APM de las formulaciones de control de nivolumab e ipilimumab aumentaron en aproximadamente el 0,38 % y el 0,02 %, respectivamente, después del almacenamiento durante 1 mes a 40 °C (Figura 8). El tamaño máximo de APM de la formulación del prototipo A de FDRC aumentó en aproximadamente un 0,36 % después del almacenamiento durante 1 mes a 40 °C (Figura 8). El tamaño máximo de APM de la formulación del prototipo B de FDRC aumentó en aproximadamente un 0,41 % después del almacenamiento durante 1 mes a 40 °C (Figura 8). El tamaño de pico de APM del prototipo C de FDRC aumentó en aproximadamente un 0,37 % después del almacenamiento durante 1 mes a 40 °C (Figura 8). El tamaño máximo de APM del prototipo D de FDRC aumentó en aproximadamente un 0,24 % después del almacenamiento durante 1 mes a 40 °C (Figura 8). La formulación de control de nivolumab y las formulaciones de FDRC de prototipo A y B contenían cada una un 3 % en p/v de manitol, mientras que la formulación de control de ipilimumab y la formulación de FDRC de prototipo C tenían manitol al 1 % y la formulación de FDRC de prototipo D no tenía manitol (véase la Tabla 6).

#### 15 *Análisis por cIEF*

La cIEF se realizó en el control de nivolumab PF, el control de ipilimumab PF y las formulaciones de FDRC a base de nivolumab-PF (1:1) de prototipo A, B, C y D después del almacenamiento durante 3 meses a 25 °C (Figura 9). El tamaño de pico ácido de control de nivolumab aumentó en aproximadamente un 7,5 %, y el tamaño de pico ácido de control de ipilimumab aumentó en aproximadamente un 8,8 % después del almacenamiento durante 3 meses a 25 °C (Figura 9). Los tamaños máximos ácidos de nivolumab e ipilimumab de la formulación del prototipo A de FDRC aumentaron cada uno aproximadamente un 9,4 % después del almacenamiento durante 3 meses a 25 °C (Figura 9). Los tamaños máximos ácidos de nivolumab e ipilimumab de la formulación del prototipo B de FDRC aumentaron en aproximadamente el 8,2 % y el 13,8 %, respectivamente, después del almacenamiento durante 3 meses a 25 °C (Figura 9). Los tamaños de pico ácidos de nivolumab e ipilimumab de la formulación del prototipo C de FDRC aumentaron en aproximadamente el 8,7 % y el 10,2 %, respectivamente, después del almacenamiento durante 3 meses a 25 °C (Figura 9). Los tamaños máximos ácidos de nivolumab e ipilimumab de la formulación del prototipo D de FDRC aumentaron en aproximadamente el 10,1 % y el 9 %, respectivamente, después del almacenamiento durante 3 meses a 25 °C (Figura 9). El efecto del NaCl sobre el cambio de pico ácido se puede observar comparando la formulación de control de ipilimumab y la formulación del prototipo C de FDRC, que cada una tenía NaCl 100 mM, con la formulación de control de nivolumab y las formulaciones de prototipo A, B y D, que cada uno tenía NaCl 50 mM (Figura 9; Tabla 6).

#### 35 **Ejemplo 6**

Se desarrolló un producto de combinación de dosis fija (FDRC) de Nivolumab e Ipilimumab en una proporción de 1:3. El FDRC de ipilimumab/nivolumab se preparó a partir de la sustancia farmacológica comercial de ipilimumab y nivolumab. Véase la Figura 1. La sustancia farmacológica ipilimumab es una solución acuosa que contiene 5 mg/ml de ipilimumab en clorhidrato de Tris 20 mM, cloruro de sodio 100 mM, manitol al 1,0 % (p/v), ácido pentético 100 µM, polisorbato 80 al 0,01 % (p/v) a pH 7,0. La sustancia farmacológica de nivolumab es una solución acuosa que contiene 20 mg/ml de nivolumab en citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 50 mM, manitol al 3,0 % (p/v), ácido pentético 20 µM, polisorbato 80 al 0,04 % (p/v) a pH 6,0. Tanto el fármaco ipilimumab como el nivolumab se almacenan a 2-8 °C.

El producto farmacológico FDRC de ipilimumab/nivolumab (3:1) se formula combinando las sustancias farmacológicas ipilimumab y nivolumab en una proporción de proteína ipilimumab frente a nivolumab de 3 a 1. Los datos de estabilidad del desarrollo hasta 6 meses mostraron que el medicamento FDRC era estable cuando se almacenaba entre 2° y 8 °C, la condición de almacenamiento prevista. El medicamento FDRC es una solución acuosa isotónica estéril, no pirogénica, de un solo uso, sin conservantes, para administración IV. El producto farmacológico FDRC se puede administrar sin diluir a una concentración de proteína total de 6,2 mg/ml o diluido adicionalmente con inyección de cloruro de sodio al 0,9 %, USP o inyección de dextrosa al 5 %, USP a las concentraciones deseadas. El FDRC está empacquetado en un tubo de vidrio flint tipo I o vial moldeado y tapado con un tapón de caucho butílico recubierto con película FLUROTEC®. La composición de FDRC se proporciona en la Tabla 7.

**Tabla 7. Comparación de las composiciones de los productos farmacológicos FDRC, Ipilimumab y Nivolumab**

Componente	Función	Cantidad (concentración)			
		FDRC	Ipilimumab	Nivolumab	Unidad
Ipilimumab (BMS-734016)	Principio activo	4,62	5	-	mg/ml
Nivolumab (BMS-936558)	Principio activo	1,54	-	10	mg/ml
Clorhidrato de tris	Agente tamponador	18,5	20	-	mM
Citrato sódico, Dihidrato	Agente tamponador	1,5	-	20	mM
Cloruro de sodio	Modificador de la tonicidad	96,2	100	50	mM
Manitol	Modificador de la tonicidad	1,2	1,0	3,0	% (p/v)

(continuación)

Componente	Función	Cantidad (concentración)			
		FDRC	Ipilimumab	Nivolumab	Unidad
Ácido pentético <sup>1</sup>	Quelante de ión metálico	93,9	100,0	20,0	µM
Polisorbato 80	Tensioactivo	0,012	0,010	0,020	% (p/v)
pH a 20 ° hasta 25 °C <sup>2</sup>	ajuste del pH	6,0	7,0 (a 4 °C)	6,0	unidad de pH
Agua para inyección	Disolvente	c.s.			

<sup>1</sup> También conocido como ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA)  
<sup>2</sup> Las soluciones diluidas de ácido clorhídrico e hidróxido de sodio se pueden usar para ajustar el pH durante la fabricación de ipilimumab y nivolumab SF. El pH de la solución no se ajusta durante la fabricación del PF

La estabilidad de las muestras de FDRC PF preparadas tal como se muestra en la Tabla 7 se controló en condiciones de almacenamiento previstas (5 °C), aceleradas (25 °C) y estresadas (40 °C).

5 Las principales vías de degradación de ipilimumab y nivolumab se identificaron como agregación (especies de APM detectadas por SE-HPLC), fragmentación (especies de BPM detectadas por SE-HPLC) y desamidación (variantes de carga ácida detectadas por CEX o iCIEF) como se muestra en los Ejemplos 1 a 5. Estos cambios se controlaron por SE-HPLC e iCIEF en el estudio de estabilidad de desarrollo de FDRC. Además, el material particulado y las actividades de unión fueron monitoreadas por HIAC y ELISA, respectivamente, en estos estudios en puntos de tiempo designados.

15 Los resultados obtenidos de los estudios mostraron que en el FDRC PF, los niveles de especies de APM combinadas, especies de BPM combinadas, variantes de carga ácida de nivolumab, variantes de carga ácida de ipilimumab, y las partículas permanecieron esencialmente sin cambios después de 6 meses de almacenamiento a 2 °C a 8 °C.

20 Los estudios realizados durante 6 meses bajo la condición acelerada de 25 °C mostraron que la tasa de formación de especies de APM es comparable entre el FDRC PF, nivolumab PF e ipilimumab PF. La tasa de formación de especies de BPM en el FDRC PF es del 0,15 % por mes, que es comparable con la del 0,18 % por mes en el ipilimumab PF, ya que el FDRC se compone principalmente de ipilimumab. La tasa de formación de variantes ácidas de nivolumab en el FDRC PF es del 1,98 % por mes, que es comparable con la del 1,76 % por mes en el nivolumab PF. La tasa de formación de variantes ácidas de ipilimumab en la FDRC y en el ipilimumab PF se considera comparable en el 2,4 % y el 1,9 % por mes, respectivamente. El nivel de material particulado permaneció esencialmente sin cambios.

25 Los estudios realizados durante 3 meses de almacenamiento a 40 °C mostraron que se observaron cambios similares pero mayores en el FDRC PF bajo esta condición.

30 Los datos del estudio de tiempo de uso demuestran la estabilidad, compatibilidad y equivalencia de las soluciones de dosificación preparadas a partir de FDRC PF y de la combinación de nivolumab e ipilimumab PF individuales en una bolsa IV.

35 En resumen, Tasas de formación comparables de atributos de calidad críticos (ACC) tales como especies APM, especies de BPM y las variantes ácidas en condiciones estresadas y aceleradas y los cambios insignificantes en estos ACC en las condiciones de almacenamiento recomendadas indican el potencial para desarrollar un FDRC PF con la SF comercializada de nivolumab e ipilimumab. Cada uno de los estudios enumerados anteriormente se muestra con más detalle a continuación:

#### *Agregación y fragmentación detectada por SE-HPLC*

40 La SE-HPLC examinó el grado de agregación (especies de APM) y fragmentación (especies de BPM) del FDRC. Las especies de APM, los monómeros y las especies de ipilimumab de BPM co-eluyen con las especies de APM, monómeros y especies de nivolumab de BPM, respectivamente. Los resultados presentados en la Tabla 8 se documentan como el porcentaje de área de monómero combinado, especies de APM combinadas y especies de BPM combinadas de ipilimumab y nivolumab. El nivel de especies de APM combinadas se probó inicialmente al 0,5 % y permaneció esencialmente sin cambios durante 6 meses de almacenamiento a 5 °C y 25 °C (intervalo del 0,5 al 0,6 %) y aumentó al 1,0 % durante 3 meses de almacenamiento a 40 °C. El nivel de especies combinadas de BPM se probó inicialmente al 0,1 % y permaneció esencialmente sin cambios durante 6 meses de almacenamiento a 5 °C (intervalo del 0,1 al 0,2 %), aumentó al 1,0% durante 6 meses de almacenamiento a 25 °C, y aumentó al 2,4 % a través de 3 meses de almacenamiento a 40 °C.

50

**Tabla 8. Combinación de monómeros, especies de APM y especies de BPM en el FDRC detectadas por SE-HPLC**

Tiempo (meses)	Monómero combinado (%)			Especies combinadas de APM (%)			Especies combinadas de BPM (%)		
	5 °C	25 °C	40 °C	5 °C	25 °C	40 °C	5 °C	25 °C	40 °C
Inicial	99,3	99,3	99,3	0,5	0,5	0,5	0,1	0,1	0,1
1	NP	99,3	98,9	NP	0,6	0,6	NP	0,2	0,4
2	99,3	99,2	97,5	0,5	0,5	0,8	0,2	0,3	1,7
3	99,3	98,8	96,7	0,5	0,6	1,0	0,2	0,6	2,4
6	99,3	98,4	NP	0,6	0,7	NP	0,2	1,0	NP

NP=No probado

- 5 Estos resultados se compararon con los controles de formulación de PF comercial de ipilimumab (5 mg/ml) y nivolumab (10 mg/ml) colocados en la estación a 5 °C, 25 °C y 40 °C junto con FDRC PF analizado de manera similar con este método de SEC-HPLC modificado tal como se muestra en la Tabla 9 y 10 respectivamente. Según los datos disponibles, es evidente que tanto ipilimumab, como nivolumab y FDRC no son propensos a la formación de especies de APM a la temperatura de almacenamiento recomendada de 2-8 °C; y la tasa de formación de especies de APM/mes es comparable entre ipilimumab, nivolumab y FDRC en condiciones de 25 °C y 40 °C tal como se muestra en la Tabla 11. Más importante aún, las tasas de formación de especies de APM y BPM en FDRC son equivalentes a las tasas de formación de especies de APM y BPM en ipilimumab, ya que el FDRC está compuesto predominantemente por ipilimumab y la concentración de proteína total en FDRC, es decir, 6,2 mg/ml está muy cerca de la concentración de ipilimumab PF de 5 mg/ml. Las tasas de formación comparables de ACC tales como especies de APM y BPM en condiciones estresadas y aceleradas y un cambio insignificante en estas ACC en las condiciones de almacenamiento recomendadas indican el potencial para un desarrollo de FDRC PF.
- 10
- 15

**Tabla 9. Monómeros, especies de APM y BPM en Ipilimumab detectadas por SE-HPLC**

Tiempo (meses)	Monómero (%)			Especies de APM (%)			Especies de BPM (%)		
	5 °C	25 °C	40 °C	5 °C	25 °C	40 °C	5 °C	25 °C	40 °C
Inicial	99,38	99,38	99,38	0,4	0,4	0,4	0,22	0,22	0,22
1	99,37	99,33	98,98	0,4	0,38	0,42	0,23	0,29	0,6
2	99,39	99,26	98,54	0,39	0,395	0,51	0,22	0,325	0,955
3	99,37	99,16	96,65	0,4	0,43	0,635	0,23	0,415	2,54
6	99,29	98,62	NP	0,475	0,535	NP	0,245	1,32	NP

**Tabla 10. Monómeros, especies de APM y BPM en Nivolumab detectadas por SE-HPLC**

Tiempo (meses)	Monómero (%)			Especies de APM (%)			Especies de BPM (%)		
	5 °C	25 °C	40 °C	5 °C	25 °C	40 °C	5 °C	25 °C	40 °C
Inicial	98,99	98,99	98,99	0,705	0,705	0,705	0,315	0,315	0,315
1	98,98	98,94	98,35	0,705	0,73	1,115	0,32	0,33	0,55
2	98,98	98,91	97,56	0,705	0,76	1,595	0,305	0,34	0,81
3	98,98	98,79	96,45	0,715	0,815	2,37	0,31	0,395	1,18
6	98,91	98,14	NP	0,795	0,965	NP	0,3	0,425	NP

20

**Tabla 11. Tasa de formación/mes de monómeros, especies de APM y especies de BPM en Ipilimumab, Nivolumab y FDRC detectados por SE-HPLC**

Tiempo (meses)	Monómero (%)			Especies de APM (%)			Especies de BPM (%)		
	5 °C	25 °C	40 °C	5 °C	25 °C	40 °C	5 °C	25 °C	40 °C
FDRC	0,00	0,16	0,92	0,02	0,03	0,17	0,02	0,15	0,82
Ipilimumab	0,01	0,13	0,86	0,01	0,02	0,08	0,00	0,18	0,73
Nivolumab	0,01	0,14	0,84	0,02	0,04	0,55	0,00	0,02	0,29

25 *Variantes de carga detectadas por iCIEF*

- El perfil de la variante de carga del FDRC se determinó mediante análisis iCIEF. Los picos de ipilimumab y nivolumab se separan en el perfil cromatográfico. La cantidad relativa de las áreas de pico ácido, el área de pico principal y las áreas de pico básicas de ipilimumab se proporcionan en la Tabla 12 y la cantidad relativa de las áreas de pico ácido, el área pico principal y las áreas pico básicas de nivolumab se proporcionan en la Tabla 13. Las áreas de pico ácido, principal y básico de ipilimumab y nivolumab permanecieron esencialmente sin cambios durante 6 meses de almacenamiento a 5 °C. Se observaron cambios en el perfil de carga a 25 °C y 40 °C tanto para ipilimumab como para nivolumab. La degradación fue significativa a 40 °C dentro de una duración muy corta y, por lo tanto, no se usó para comparación y se consideró demasiado agresiva para evaluar la estabilidad del PF.
- 30

**Tabla 12. Perfil de carga de ipilimumab en el FDRC detectado por iCIEF**

Tiempo (meses)	Picos ácidos (%)			Pico principal (%)			Picos básicos (%)		
	5 °C	25 °C	40 °C	5 °C	25 °C	40 °C	5 °C	25 °C	40 °C
Inicial	34,6	34,6	34,6	59,5	59,5	59,5	5,9	5,9	5,9
1	NP	37,2	48,7	NP	56,7	45,2	NP	6,2	6,1
2	34,5	39,6	61,2	57,9	54,5	33,7	7,6	5,9	5,1
3	34,6	42,4	68,3	59,2	51,9	27,4	6,2	5,7	4,3
6	35,6	49,0	NP	59,0	45,9	NP	5,4	5,1	NP

**Tabla 13. Perfil de carga de nivolumab en el FDRC detectado por iCIEF**

Tiempo (meses)	Picos ácidos (%)			Pico principal (%)			Picos básicos (%)		
	5 °C	25 °C	40 °C	5 °C	25 °C	40 °C	5 °C	25 °C	40 °C
Inicial	33,7	33,7	33,7	59,8	59,8	59,8	6,5	6,5	6,5
1	NP	34,3	45,0	NP	59,8	46,3	NP	5,9	8,7
2	34,8	39,1	61,3	59,3	54,5	31,2	5,9	6,5	7,5
3	33,6	37,7	65,9	60,6	55,2	27,9	5,9	7,1	6,2
6	33,7	45,5	NP	59,3	46,4	NP	7,1	8,1	NP

5 Además, tal como se discutió anteriormente, la composición de FDRC evaluada anteriormente está compuesta de tris-HCl y dihidrato de citrato de sodio, y por lo tanto es propensa a cambios de pH con la temperatura debido al tampón de amina Tris-HCl. Por tanto, los cambios en el perfil de carga entre FDRC y nivolumab se realizaron a 25 °C, para ser consistentes con la temperatura de preparación de la muestra y la temperatura de almacenamiento.

10 La comparación del perfil de carga ácida de ipilimumab en FDRC que se muestra en la Tabla 12 con el PF de control de ipilimumab en tampón Tris-HCl (composición comercial) a pH 7 (4 °C) en condiciones de 25 °C (Tabla 14) ha indicado que la formación de pico ácido es comparable al 2,4 % y el 1,93 % / mes respectivamente tal como se muestra en la Figura 10. Esta diferencia relativamente menor en condiciones de estrés se considera insignificante para la estabilidad del producto farmacológico FDRC en las condiciones de almacenamiento recomendadas (2-8 °C) tal como se observa en la Tabla 12.

15 Históricamente, CEX ha monitoreado los cambios en el perfil de carga de ipilimumab y, por lo tanto, se están recopilando datos para identificar la comparabilidad del perfil de carga en diversas condiciones para ipilimumab, sin embargo, el potencial de desamidación, la vía de degradación primaria para ipilimumab, está potencialmente reducido ya que la cinética de desamidación generalmente es más lenta a un pH más bajo.

**Tabla 14. Perfil de carga de ipilimumab por iCIEF a 25C**

Tiempo (meses)	Picos ácidos (%)	Pico principal (%)	Picos básicos (%)
	Lote de estabilidad de laboratorio	Lote de estabilidad de laboratorio	Lote de estabilidad de laboratorio
Inicial	39,71	56,59	3,69
1	42,34	54,84	2,82
3	45,3	51,2	3,5
6	51,6	45	3,4

25 La comparación del perfil de carga ácida de nivolumab en FDRC que se muestra en la Tabla 15 contra tres lotes de estabilidad a largo plazo de nivolumab (LTSP) en condiciones de 25 °C ha indicado que la formación de pico ácido es comparable al 1,97 % y el 1,75 %/mes respectivamente, tal como se muestra en la Figura 11.

**Tabla 15. Perfil de carga de nivolumab (en lotes GMP) por iCIEF a 25 °C**

Tiempo (meses)	Picos ácidos (%)			Pico principal (%)			Picos básicos (%)		
	Lote 2J71008	Lote 2J71191	Lote 2J71192	Lote 2J71008	Lote 2J71191	Lote 2J71192	Lote 2J71008	Lote 2J71191	Lote 2J71192
Inicial	36,1	36,3	35,2	58,1	56,6	58,8	5,8	7,1	6,0
1	33,0	29,6	36,2	61,8	62,9	57,2	5,2	7,5	6,6
3	40,8	39,3	37,2	52,9	52,4	55,6	6,3	8,3	7,2
6	45,7	44,1	44,3	46,4	47,2	47,8	7,9	8,7	7,9

**Materia particulada detectada por HIAC**

Las muestras almacenadas a 5 ° y 25 °C durante un máximo de 6 meses se examinaron utilizando el procedimiento de recuento de partículas de oscurecimiento de luz (HIAC) para determinar el tamaño y el número de partículas según

el tamaño en el FDRC PF. Tal como se muestra en la Tabla 16, los valores de materia particulada para  $\geq 2$  micrómetros,  $\geq 5$  micrómetros,  $\geq 10$  micrómetros, y  $\geq 25$  micrómetros fueron variables, pero estaban dentro de los criterios de aceptación descritos en USP <787>.

5

**Tabla 16. Materia particulada por HIAC**

	Materia Particulada (Partículas/ml)			
	$\geq 2 \mu\text{m}$	$\geq 5 \mu\text{m}$	$\geq 10 \mu\text{m}$	$\geq 25 \mu\text{m}$
Inicial	161	21	5	0
6 meses a 5 °C	134	43	13	2
6 meses a 25 °C	174	34	6	1

*Actividad de unión determinada por ensayos ELISA*

10 Los ensayos ELISA se utilizaron para examinar la unión específica de ipilimumab al receptor CTLA-4 humano y la unión específica de nivolumab al receptor PD-1 humano. Las actividades de unión de ipilimumab y nivolumab en las muestras de FDRC se calcularon en relación con los estándares de referencia de ipilimumab y nivolumab, respectivamente. Las actividades de unión de las muestras de FDRC durante 2 meses de almacenamiento a 25 °C se encontraban dentro del criterio de aceptación propuesto (del 70 al 130 %) (Tabla 17).

15 **Tabla 17. Actividades de unión determinadas por ensayos ELISA**

Condición de almacenamiento	Actividad de unión de ipilimumab relativa al estándar de referencia de ipilimumab (%)	Actividad de unión de nivolumab relativa al estándar de referencia de nivolumab (%)
Inicial	87	119
2 meses a 25 °C	87	78

*Ensayo de mapeo de péptidos tripticos*

20 Se realizó un ensayo de mapeo de péptidos tripticos para medir la desamidación y la oxidación. Las muestras fueron reducidas, alquiladas y digeridas con tripsina. Los péptidos tripticos se separaron en una columna C-18 y se detectaron mediante un detector UV a 215 y 280 nm, seguido de un espectrómetro de masas (LTQ-Orbitrap-Elite). La cuantificación relativa se logró mediante la comparación de áreas de pico de los péptidos intactos, así como los péptidos modificados en cromatogramas iónicos seleccionados. Los resultados del ensayo se muestran en las Tablas 18 y 19.

25

**Tabla 18. Mapeo de péptidos tripticos - Desamidación**

Condición de almacenamiento	Nivo H <sub>4</sub> <sup>3</sup> (%)	Ipi H <sub>5</sub> <sup>4</sup> (%)	Ipi H <sub>37</sub> /Nivo H <sub>36</sub> Deam1 <sup>5</sup> (%)	Ipi H <sub>37</sub> /Nivo H <sub>36</sub> Deam2 <sup>6</sup> (%)	Ipi H <sub>37</sub> /Nivo H <sub>36</sub> Deam3 <sup>7</sup> (%)	Ipi H <sub>37</sub> /Nivo H <sub>36</sub> Deam4 <sup>8</sup> (%)
Inicial	0,5	2,8	3,4	3,2	1,4	3,6
2 meses a 25 °C	0,7	4,6	4,7	4,6	1,5	3,7
6 meses a 25 °C	1,0	3,9	5,2	5,9	0,7	2,5

<sup>3</sup> Nivo H<sub>4</sub> = Péptido triptico de cadena pesada n.º 4 para nivolumab

<sup>4</sup> Ipi H<sub>5</sub> = Péptido triptico de cadena pesada n.º 5 para ipilimumab

<sup>5</sup> Ipi H<sub>37</sub>/Nivo H<sub>36</sub> Deam1 = Péptido triptico de cadena pesada n.º 37 para ipilimumab (Asn n.º) y n.º 36 para nivolumab (Asn n.º)

<sup>6</sup> Ipi H<sub>37</sub>/Nivo H<sub>36</sub> Deam2 = Péptido triptico de cadena pesada n.º 37 para ipilimumab (Asn n.º) y n.º 36 para nivolumab (Asn n.º)

<sup>7</sup> Ipi H<sub>37</sub>/Nivo H<sub>36</sub> Deam3 = Péptido triptico de cadena pesada n.º 37 para ipilimumab (Asn n.º) y n.º 36 para nivolumab (Asn n.º)

<sup>8</sup> Ipi H<sub>37</sub>/Nivo H<sub>36</sub> Deam4 = Péptido triptico de cadena pesada n.º 37 para ipilimumab (Asn n.º) y n.º 36 para nivolumab (Asn n.º)

**Tabla 19. Mapeo de péptidos tripticos - Oxidación**

Condición de almacenamiento	Ipi H <sub>21</sub> /Nivo H <sub>22</sub> <sup>9</sup> (%)	Nivo H <sub>4</sub> <sup>10</sup> (%)	Ipi H <sub>3</sub> <sup>11</sup> (%)
Inicial	4,4	0,2	0,5
2 meses a 25 °C	4,9	0,6	0,5
6 meses a 25 °C	3,3	0,3	0,2

<sup>9</sup> Ipi H<sub>21</sub>/Nivo H<sub>22</sub> = Péptido triptico de cadena pesada n.º 21 para ipilimumab (His/Met n.º) y n.º 22 para nivolumab (His/Met n.º)

<sup>10</sup> Nivo H<sub>4</sub> = Péptido triptico de cadena pesada n.º 4 para nivolumab

<sup>11</sup> Ipi H<sub>3</sub> = Péptido triptico de cadena pesada n.º 3 para ipilimumab

30 *Análisis de pH de muestras*

Se midió el pH del FDRC PF, tal como se ve en la Tabla 20.

**Tabla 20. pH de las soluciones de PF**

Condición de almacenamiento	25 °C	5 °C
Inicial	6,58	6,58
2 Meses	6,59	6,56
6 Meses	6,44	6,38

5

*Estabilidad en el tiempo de uso del medicamento FDRC*

Se realizó un estudio para demostrar la estabilidad y compatibilidad del FDRC PF con la inyección de cloruro de sodio al 0,9 %, USP (NS), bolsas IV, conjuntos de infusión IV y filtros en línea. Después de 2 meses de almacenamiento a 5 °C, las muestras de FDRC PF se diluyeron en NS en una bolsa IV que se almacenó a 25 °C durante 4 horas, seguido de 20 horas a 5 °C. La solución en la bolsa IV se infundió luego a través de un conjunto IV y un filtro en línea. Las muestras fueron recolectadas y analizadas por HIAC, obtención de imágenes por microflujo (MFI), SE-HPLC, CE-SDS, iCIEF, y cromatografía líquida de ultra rendimiento de fase inversa (RP-UPLC).

10

15 Los resultados del estudio se presentan en las Tablas 21-23. Los datos muestran poco o ningún cambio con respecto a los valores iniciales para partículas (por HIAC), agregación (por SE-HPLC), fragmentación (por SE-HPLC), pureza (por CE-SDS), perfil de variante de carga (por iCIEF) y relación de proteínas ipilimumab/nivolumab (por RP-UPLC) después de completar el estudio de compatibilidad.

20 Los resultados indican que el FDRC PF se puede diluir con una inyección de cloruro de sodio al 0,9 %, USP a un intervalo de concentración de 1,5/0,5 a 4,2/1,4 mg/ml de ipilimumab/nivolumab para infusión intravenosa. La solución diluida en una bolsa IV puede almacenarse a 5 °C durante hasta 24 horas y hasta 4 horas de las 24 horas pueden estar a temperatura ambiente (25 °C).

25

**Tabla 21. Estabilidad en el tiempo de uso y comparabilidad del producto farmacéutico FDRC**

Condición	HIAC (Partículas/ml)				MFI (Partículas/ml)			SE-HPL			CE-SDS (reducido)
	≥ 2 µm	≥ 5 µm	≥ 10 µm	≥ 25 µm	2-10 µm	≥ 10 µm	≥ 25 µm	APM (%)	Monómero (%)	BPM (%)	Pureza (%)
1,5/0,5 mg/ml de ipilimumab/nivolumab											
Inicial <sup>12</sup>	138	26	5	0	353	11,5	0	0,4	99,4	0,3	99,6
24 horas <sup>13</sup>	213	52	14	0	414	18	1,6	0,3	99,3	0,4	99,6
4,2/1,4 mg/ml de ipilimumab/nivolumab											
Inicial	345	77	24	1	888	6,5	0	0,4	99,3	0,3	99,6
24 horas	193	36	12	1	455	0	0	0,4	99,3	0,3	99,6

**Tabla 22. Estabilidad en el tiempo de uso y comparabilidad del producto farmacéutico FDRC**

Condición	iCIEF-Ipilimumab			iCIEF-Nivolumab			RP-UPLC
	Picos ácidos (%)	Pico principal (%)	Picos básicos (%)	Picos ácidos (%)	Pico principal (%)	Picos básicos (%)	Proporción de proteína de Ipilimumab/Nivolumab
1,5/0,5 mg/ml de ipilimumab/nivolumab							
Inicial	38,9	56,2	4,9	34,3	57,5	8,3	2,8
24 horas	38,0	56,8	5,1	34,2	57,7	8,1	2,8
4,2/1,4 mg/ml de ipilimumab/nivolumab							
Inicial	37,2	58,1	4,7	34,2	58,0	7,8	2,9
24 horas	37,9	57,2	4,9	34,8	57,9	7,3	2,8

**Tabla 23. Estabilidad en el tiempo de uso y comparabilidad del producto farmacéutico FDRC**

Condición	A280 (tradicional)	A280 (Solo-VPE)	pH
1,5/0,5 mg/ml de ipilimumab/nivolumab			
Inicial	2,07	1,998	6,36
24 horas	1,924	2,012	6,33

30

(continuación)

Condición	A280 (tradicional)	A280 (Solo-VPE)	pH
4,2/1,4 mg/ml de ipilimumab/nivolumab			
Inicial	5,618	5,615	6,38
24 horas	5,529	5,647	6,37
<sup>12</sup> Muestras recogidas de una bolsa IV en el momento cero después de la dilución del FDRC PF en la bolsa IV			
<sup>13</sup> Muestras recolectadas después de 24 horas de almacenamiento e infusión a través de un equipo IV y un filtro en línea			

*Estabilidad en el tiempo de uso del fármaco coadministrado de Ipilimumab y Nivolumab*

- 5 Se realizó un estudio para demostrar la estabilidad y compatibilidad del PF administrado conjuntamente con la inyección de cloruro de sodio al 0,9 %, USP (NS), bolsas IV, conjuntos de infusión IV y filtros en línea. Los viales de PF de monoterapia con ipilimumab y nivolumab se diluyeron en NS en una bolsa IV que se almacenó a 25 °C durante 4 horas, seguido de 20 horas a 5 °C. La solución en la bolsa IV se infundió luego a través de un conjunto IV y un filtro en línea. Las muestras fueron recolectadas y analizadas por HIAC, obtención de imágenes por microflujo (MFI), SE-HPLC, CE-SDS, iCIEF, y cromatografía líquida de ultra rendimiento de fase inversa (RP-UPLC).

Los resultados del estudio se presentan en las Tablas 24-26. Los datos muestran poco o ningún cambio con respecto a los valores iniciales para partículas (por HIAC), agregación (por SE-HPLC), fragmentación (por SE-HPLC), pureza (por CE-SDS), perfil de variante de carga (por iCIEF) y relación de proteínas ipilimumab/nivolumab (por RP-UPLC) después de completar el estudio de compatibilidad. Los resultados indican que el PF administrado conjuntamente se puede diluir con una inyección de cloruro de sodio al 0,9 %, USP a un intervalo de concentración de 1,5/0,5 a 4,2/1,4 mg/ml de ipilimumab/nivolumab para infusión intravenosa. La solución diluida en una bolsa IV puede almacenarse a 5 °C durante hasta 24 horas y hasta 4 horas de las 24 horas pueden estar a temperatura ambiente (25 °C).

**Tabla 24. Estabilidad en el tiempo de uso y comparabilidad del fármaco coadministrado de Ipilimumab y Nivolumab**

Condición	HIAC (Partículas/ml)				MFI (Partículas/ml)			SE-HPLC			CE-SDS (reducido)
	≥ 2 μ	≥ 5 μ	≥ 10 μ	≥ 25 μ	2-10 μ	≥ 10 μ	≥ 25 μ	APM (%)	Monómero (%)	BPM (%)	Pureza (%)
1,5/0,5 mg/ml de ipilimumab/nivolumab (bolsas Intravia sin DEHP)											
Inicial <sup>14</sup>	327	75	10	0	1078	8	1	0,3	99,4	0,2	99,6
24 horas <sup>15</sup>	49	9	1	0	152	3	1	0,3	99,4	0,3	99,6
1,5/0,5 mg/ml de ipilimumab/nivolumab (bolsas Viaflex DEHP)											
Inicial	373	54	8	0	1233	2	0	0,4	99,3	0,3	99,6
24 horas	35	5	1	0	71	5	1	0,4	99,4	0,3	99,6
4,2/1,4 mg/ml de ipilimumab/nivolumab (bolsas Intravia sin DEHP)											
Inicial	862	170	17	0	2979	8	1	0,4	99,3	0,3	99,6
24 horas	112	21	3	0	237	8	0	0,4	99,4	0,3	99,6
4,2/1,4 mg/ml de ipilimumab/nivolumab (bolsas Viaflex DEHP)											
Inicial	431	91	15	0	1400	11	1	0,4	99,4	0,3	99,6
24 horas	53	11	4	0	150	3	1	0,4	99,4	0,3	99,6
<sup>14</sup> Muestras recogidas de una bolsa IV en el momento cero después de la dilución del PF administrado conjuntamente en la bolsa IV											
<sup>15</sup> Muestras recolectadas después de 24 horas de almacenamiento e infusión a través de un equipo IV y un filtro en línea											

**Tabla 25. Estabilidad en el tiempo de uso y comparabilidad del fármaco coadministrado de Ipilimumab y Nivolumab (Continuación 2)**

Condición	iCIEF-Ipilimumab			iCIEF-Nivolumab			RP-UPLC
	Picos ácidos (%)	Pico principal (%)	Picos básicos (%)	Picos ácidos (%)	Pico principal (%)	Picos básicos (%)	Proporción de proteína de Ipilimumab/Nivolumab
1,5/0,5 mg/ml de ipilimumab/nivolumab (bolsas Intravia sin DEHP)							
Inicial	36,3	59,9	3,8	35,9	59,1	5,0	2,85
24 horas	36,2	59,9	3,9	33,8	60,7	5,5	2,80

25

(continuación)

Condición	iCIEF-Ipilimumab			iCIEF-Nivolumab			RP-UPLC
	Picos ácidos (%)	Pico principal (%)	Picos básicos (%)	Picos ácidos (%)	Pico principal (%)	Picos básicos (%)	Proporción de proteína de Ipilimumab/Nivolumab
1,5/0,5 mg/ml de ipilimumab/nivolumab (bolsas Viaflex DEHP)							
Inicial	36,8	59,8	3,4	35,2	58,6	6,2	2,87
24 horas	36,2	60,1	3,7	35,3	58,3	6,4	2,79
4,2/1,4 mg/ml de ipilimumab/nivolumab (bolsas Intravia sin DEHP)							
Inicial	36,6	59,8	3,6	34,1	59,8	6,1	2,9
24 horas	36,9	59,5	3,6	33,6	60,4	6,0	2,87
4,2/1,4 mg/ml de ipilimumab/nivolumab (bolsas Viaflex DEHP)							
Inicial	36,3	59,9	3,8	36,0	57,3	6,7	2,93
24 horas	36,7	59,5	3,8	35,2	58,6	6,2	2,92

**Tabla 26. Estabilidad en el tiempo de uso y comparabilidad del fármaco coadministrado de Ipilimumab y Nivolumab (Continuación 3)**

Condición	A280 (tradicional)	A280 (Solo-VPE)	pH
1,5/0,5 mg/ml de ipilimumab/nivolumab (bolsas Intravia sin DEHP)			
Inicial	1,994	1,941	6,21
24 horas	1,898	1,936	6,19
1,5/0,5 mg/ml de ipilimumab/nivolumab (bolsas Viaflex DEHP)			
Inicial	2,019	1,982	6,2
24 horas	1,879	1,986	6,2
4,2/1,4 mg/ml de ipilimumab/nivolumab (bolsas Intravia sin DEHP)			
Inicial	5,701	5,481	6,26
24 horas	5,338	5,538	6,24
4,2/1,4 mg/ml de ipilimumab/nivolumab (bolsas Viaflex DEHP)			
Inicial	5,586	5,509	6,26
24 horas	5,363	5,499	6,26

5

**Ejemplo 7**

Se determinaron los límites de calificación de rendimiento del proceso (CRP) para pH y Polisorbato 80 en una combinación de proporción de dosis fija de Nivolumab-Ipilimumab de 1:3 (FDRC) para la combinación de proporción de dosis fija de nivolumab-Ipilimumab de 1:3. Las composiciones cuantitativas del producto farmacológico de FDRC se ven en la Tabla 27.

10

**Tabla 27. Composiciones cuantitativas del producto farmacológico de FDRC**

Componente	Función	Composición	Cantidad (mg) por vial (nivolumab / ipilimumab)	
			30/90	40/120
Nivolumab (BMS-936558)	Principio activo	1,54 mg/ml	31,11	41,58
Ipilimumab (BMS-734016)	Principio activo	4,61 mg/ml	93,32	124,74
Citrato sódico, Dihidrato	ng de agente de tampón	1,54 mM	9,15	12,23
Clorhidrato de tris	Agente tamponador	18,46 mM	58,76	78,55
Cloruro de sodio	Modificador de la tonicidad	96,15 mM	113,50	151,71
Manitol	Modificador de la tonicidad	1,15 % en p/v	232,30	310,50
Ácido pentético <sup>16</sup>	Quelante de ión metálico	93,85 µM	0,75	1,00
Polisorbato 80	Tensioactivo	0,012 % en p/v	2,42	3,24

(continuación)

Componente	Función	Composición	Cantidad (mg) por vial (nivolumab / ipilimumab)	
			30/90	40/120
Ácido clorhídrico hidróxido de sodio <sup>17</sup>	ajuste del pH	c.s. a pH 6,3		
Agua para inyección	Disolvente		c.s. a 20,2 ml	c.s. a 27,0 ml
c.s. = cantidad suficiente <i>límite de pH</i> <sup>16</sup> También conocido como ácido dietilentriaminopentaacético <sup>17</sup> Se pueden usar soluciones diluidas de ácido clorhídrico e hidróxido de sodio para ajustar el pH durante la fabricación de nivolumab e ipilimumab SF. El pH de la solución no se ajusta durante la fabricación de FDRC PF				

El ipilimumab SF y el nivolumab SF comerciales tienen un criterio de aceptación de pH de 6,6-7,6 (4 °C) y 5,5-6,5 respectivamente. Dado que, el FDRC PF se fabrica sin ninguna otra manipulación para la SF entrante, se realizó un estudio para comprender el posible intervalo de pH en el FDRC PF debido a la variabilidad de SF entrante.

**Tabla 28. Variabilidad en el pH del FDRC PF debido a la variabilidad de SF entrante**

Tris-HCl 20 mM	Citrato de sodio 20 mM	pH final	
		pH (4 °C)	pH (21 °C)
pH 6,6	pH 5,5	5,77	5,64
pH 7,0	pH 6,0	6,47	6,32
pH 7,6	pH 6,5	7,34	6,99

Las soluciones se prepararon añadiendo 42 ml de Tris-HCl 20 mM y 3,5 ml de tampón de citrato de sodio 20 mM para imitar la preparación de FDRC PF. Los resultados de esta evaluación (Tabla 28) indicaron que el intervalo de pH de FDRC PF podría estar en el intervalo de 5,7 - 7,0, con un pH diana de 6,2-6,3 en condiciones ambientales. Este atributo está bien controlado en la SF entrante de nivolumab e ipilimumab, por lo tanto, es poco probable que el FDRC PF experimente los pH extremos de 5,7 o 7,0. Además, basándose en el conocimiento actual de las ACC de ipilimumab y nivolumab, se espera que el riesgo para los atributos de calidad de FDRC PF sea mayor en el intervalo de pH más alto. Basándose en este entendimiento, se iniciaron dos estudios adicionales para evaluar el impacto del pH en los atributos de calidad del PF y también para comprender el impacto de la variabilidad en diversos excipientes (incluido el pH) de la SF entrante en los atributos de calidad del PF.

La evaluación de los datos del estudio de intervalo de pH se centró en los atributos de calidad en FDRC influenciados por la variación en el pH, como el perfil de carga monitoreado por enfoque isoeléctrico capilar (icIEF) y agregados de alto peso molecular monitoreados por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). No existe un cambio apreciable en el perfil SEC de FDRC PF en el intervalo de pH de 5,4 - 6,6 (ambiente) en las condiciones de almacenamiento recomendadas de 2-8 °C o hasta 3 meses a 25 °C. Los cambios cuantificables solo se observaron en condiciones aceleradas (40 °C), en donde era evidente que el intervalo de pH evaluado no tiene impacto en el perfil SEC (Tabla 29).

**Tabla 29. Monómero, especies de APM y BPM (%) debido a la variabilidad en el pH**

Prototipo de PF (pH)	Especies de APM (%)			Monómero (%)			Especies de BPM (%)		
	Inicial	1 M/40 °C	3M/40 °C	Inicial	1M/40 °C	3M/40 °C	Inicial	1M/40 °C	3M/40 °C
5,4	1,12	1,25	1,79	98,7	98,2	96,8	0,1	0,53	1,35
5,7	1,19	1,24	1,69	98,7	98,3	97,1	0,1	0,46	1,16
6,0	1,23	1,24	1,65	98,6	98,3	97,2	0,1	0,43	1,07
6,3	1,24	1,2	1,63	98,6	98,3	97,3	0,1	0,42	1,04
6,6	1,33	1,33	1,7	98,6	98,2	97,2	0,1	0,43	1,05

El perfil de carga de ipilimumab y nivolumab no mostró diferencias significativas más allá del error analítico a la temperatura de almacenamiento recomendada de 2-8 °C después de 6 meses tal como se muestra en la Tabla 30. El perfil de carga para ipilimumab y nivolumab se evalúa principalmente a la temperatura de almacenamiento de 25 °C, ya que las diferencias son más perceptibles, a diferencia de 40 °C, en donde el perfil se altera considerablemente y las moléculas se desmoronan significativamente. La Figura 12 ilustra el perfil ácido de ipilimumab y nivolumab en FDRC PF en comparación con sus controles respectivos a pH 6,0.

**Tabla 30. Perfil de pico ácido y principal (cIEF) debido a la variabilidad en el pH después de 6 meses a 5 ° C**

Prototipo de PF (pH)	Perfil de pico ácido (%) (% de cambio desde inicial después de 6 M a 5 ° C)		Cambio de pico principal (%) (% de cambio desde inicial después de 6 M a 5 ° C)	
	Ipilimumab	Nivolumab	Ipilimumab	Nivolumab
5,4	-1,0	-0,3	-1,0	-0,4
5,7	0,6	-3,7	1,4	-1,8
6,0	0,6	-1,5	0,8	-1,2
6,3	0,9	-2,3	1,5	-1,6
6,6	1,1	-1,9	1,6	-0,7

Además, Se inició un estudio de resistencia del pH con las variables que se muestran en la Tabla 31, en donde el intervalo de pH evaluado varió entre 5,8-7,0 ha dado como resultado observaciones similares para los perfiles SEC y cIEF.

**Tabla 31. Diseño de estudio de robustez del PF**

Prototipo	Conc. final en el vial: (mg/ml)		pH	Tris	Citrato	NaCl	Manitol	PS 80	DTPA
	Ipilimumab (mg/ml)	Nivolumab (mg/ml)		mM	mM	mM	% en p/v	% en p/v	µM
1	4,62	1,54	5,8	18,46	1,54	76,92	1,38 %	0,005	93,85
2	4,62	1,54	5,8	18,46	1,54	115,38	1,38 %	0,020	93,85
3	4,62	1,54	5,8	18,46	1,54	76,92	0,92 %	0,020	93,85
4	4,62	1,54	6,4	18,46	1,54	96,15	1,15 %	0,012	93,85
5	4,62	1,54	7	18,46	1,54	115,38	1,38 %	0,005	93,85
6	4,62	1,54	7	18,46	1,54	76,92	0,92 %	0,005	93,85
7	4,62	1,54	6,4	18,46	1,54	96,15	1,15 %	0,012	93,85
8	4,62	1,54	5,8	18,46	1,54	115,38	0,92 %	0,005	93,85
9	4,62	1,54	7	18,46	1,54	115,38	0,92 %	0,020	93,85
10	4,62	1,54	7	18,46	1,54	76,92	1,38 %	0,020	93,85

El perfil de APM del FDRC PF permaneció sin cambios después de 6 meses de almacenamiento a 2-8 ° C y 25 ° C tal como se muestra en la Figura 13 (Perfil de Monómero visto en la Figura 14), lo que indica la falta de efecto de pH incluso en presencia de otras variables tales como la concentración de cloruro de sodio, Manitol y PS80. La evaluación de los perfiles de pico ácido y principal de ipilimumab y nivolumab en FDRC PF (Figura 15-18) indica claramente una dependencia del pH de la desamidación a una temperatura acelerada de 25 ° C, tal como se indica por un aumento en el perfil de pico ácido a un intervalo de temperatura más alto de pH 7,0. Este efecto a temperaturas aceleradas, sin embargo, no se traduce en una diferencia cuantificable a la temperatura de almacenamiento recomendada de 2-8 ° C.

El perfil de pico cIEF y el impacto del pH se muestran en la Figura 19, y el Perfil iCIEF: el intervalo de pH de 5,4-6,6 se muestra en la Figura 20.

**20 Límite de polisorbato 80: NLT 60 µg/ml**

La concentración de polisorbato 80 en el FDRC PF se define principalmente por la proporción de ipilimumab y nivolumab SF mezcladas para fabricar el FDRC PF, en donde la concentración diana de PS 80 en FDRC PF es 120 µg/ml, con una concentración teórica de 100 µg/ml y 400 µg/ml para ipilimumab y nivolumab SF, respectivamente. No hay criterios de aceptación de liberación para PS 80 para nivolumab e ipilimumab SF; sin embargo, la fabricación de nivolumab SF e ipilimumab SF tiene un límite en proceso de 275-525 µg/ml y 60-140 µg/ml, respectivamente.

El análisis preliminar de los atributos del PF que se ven afectados por la variabilidad de PS80, como el APM de la SEC (%) no tuvo un cambio perceptible (Figura 13) y las partículas de HIAC en el intervalo de 10-25 micrómetros, cumplió con los criterios actuales de aceptación de USP. Además, el proceso de fabricación de FDRC PF está diseñado para que no sea necesario un lavado del filtro antes del llenado del vial del PF, debido a la presencia de un tanque intermedio (35-40 litros) aguas abajo de los filtros estériles redundantes, que se llena antes de iniciar la operación de llenado.

Además, durante los estudios de optimización de PF, se evaluó un intervalo de concentración de PS 80 de 120 µg/ml-1000 µg/ml en el FDRC PF bajo el peor de los casos de agitación a 300 rpm durante hasta 72 horas en un agitador horizontal. Estos estudios cuando se analizaron por apariencia visual mostraron la falta de partículas visuales después de 72 horas y el perfil de SEC para todos los prototipos no tuvo una diferencia perceptible desde el punto de tiempo inicial. Basándose en esto, se decidió no cambiar la concentración diana del FDRC PF al aumentar la concentración concentrada de PS 80 en el sitio de fabricación del PF.

Sin embargo, Con el fin de comprender el riesgo potencial de generación de partículas o formación de especies de APM debido a niveles significativamente más bajos de PS80 tras la dilución con soluciones de infusión como solución

salina, se realizó un estudio en el que la solución de FDRC PF con PS 80 a una concentración diana de 120 µg/ml se sometió a una dilución de 20 veces (6 µg/ml) con solución salina normal, y las soluciones resultantes se evaluaron durante hasta 24 horas por apariencia visual, partículas por HIAC y APM en SEC (%). Este estudio demostró que hasta una concentración de PS 80 de 6 µg/ml en soluciones de infusión preparadas a partir de FDRC PF no causa ningún cambio en la apariencia visual, el perfil de APM o características de HIAC de la solución, lo que fortaleció la justificación para mantener la concentración diana en 120 µg/ml. Además, se anticipa que el FDRC PF se diluirá ~ 3X usando soluciones de infusión, durante la administración clínica y comercial que lleva a una concentración de PS 80 de 40 µg/ml. La concentración propuesta de PS 80 de NLT de 60 µg/ml aún daría como resultado una concentración final de solución de infusión de 20 µg/ml, que está por encima de la concentración evaluada de 6 µg/ml en el estudio de dilución tratado anteriormente.

La presente solicitud reivindica beneficios para las solicitudes provisionales de los Estados Unidos N.º 62/303.855, presentada el 4 de marzo de 2016; 62/269.000, presentada el 17 de diciembre de 2015; 62/265.268, presentada el 9 de diciembre de 2015; y 62/149.325, presentada el 17 de abril de 2015.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY  
SADINENI, VIKRAM  
QUAN, YONG  
KASERER, WALLACE

<120> COMPOSICIONES QUE COMPRENDEN UNA COMBINACIÓN DE UN ANTICUERPO ANTI-PD1 Y OTRO ANTICUERPO

<130> 3338.026PC04/ELE/C-K/E-H

<150> US 62/149.325  
<151> 17/04/2015

<150> US 62/303.855  
<151> 04/03/2016

<150> US 62/269.000  
<151> 17/12/2015

<150> US 62/265.268  
<151> 09/12/2015

<160> 9

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1  
<211> 123  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> cadena VH

<400> 1

ES 2 813 580 T3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
1                   5                   10                   15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
          20                   25                   30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
          35                   40                   45

Ala Val Ile Trp Tyr Glu Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
          50                   55                   60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65                   70                   75                   80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
          85                   90                   95

Ala Arg Gly Gly Ser Met Val Arg Gly Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp  
                          100                   105                   110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser  
          115                   120

5 <210> 2  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> cadena VL  
<400> 2

ES 2 813 580 T3

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala  
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Tyr  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 3  
 <211> 123  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cadena VH

<400> 3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

5

10

ES 2 813 580 T3

Gly Phe His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Ala Gly Ser Asn Lys Phe Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Gly Gly Gln Leu Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Val Met Asp Val  
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 4  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cadena VL

<400> 4

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp  
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 5  
 <211> 122

ES 2 813 580 T3

<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> cadena VH

<400> 5

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser  
 1 5 10 15  
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly  
 20 25 30  
 Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala  
 35 40 45  
 Val Ile Trp Tyr Ala Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 50 55 60  
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu  
 65 70 75 80  
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95  
 Arg Gly Gly Arg Ile Ala Val Ala Phe Tyr Tyr Ser Met Asp Val Trp  
 100 105 110  
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

10 <210> 6  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> cadena VL

20 <400> 6

ES 2 813 580 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp  
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 7  
 <211> 449  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cadena pesada

<400> 7

5

10

ES 2 813 580 T3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Glu Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Gly Gly Ser Met Val Arg Gly Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp  
 100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys  
 115 120 125

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu  
 130 135 140

Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro



ES 2 813 580 T3

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
435 440 445

Gly

- <210> 8
- <211> 214
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
  
- <220>
- 10 <223> cadena ligera
  
- <400> 8

ES 2 813 580 T3

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala  
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Tyr  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 9  
 <211> 453  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> cadena pesada

10

<400> 9

ES 2 813 580 T3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Glu Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Gly Gly Ser Met Val Arg Gly Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp  
 100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys  
 115 120 125

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly  
 130 135 140

ES 2 813 580 T3

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro  
 145 150 155 160

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr  
 165 170 175

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val  
 180 185 190

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn  
 195 200 205

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro  
 210 215 220

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu  
 225 230 235 240

Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
 245 250 255

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 260 265 270

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
 275 280 285

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn  
 290 295 300

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
 305 310 315 320

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro  
 325 330 335

Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 340 345 350

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn  
 355 360 365

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
 370 375 380

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr



**REIVINDICACIONES**

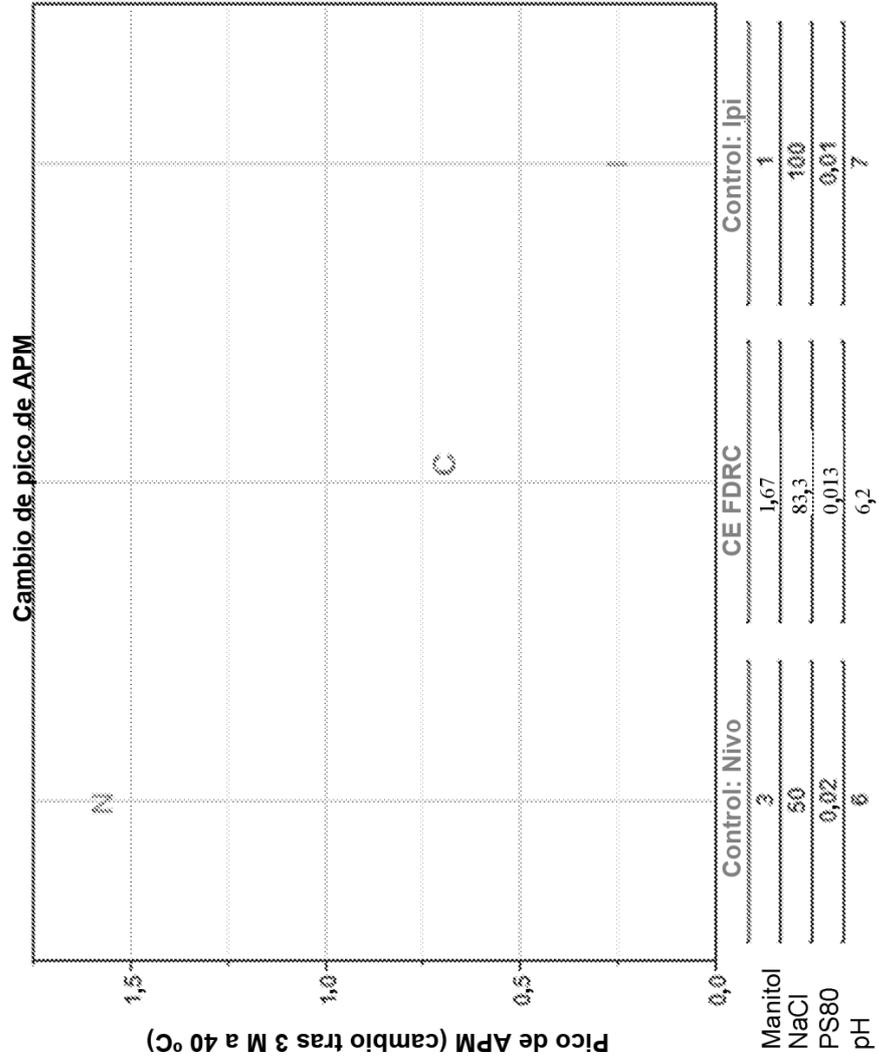
- 5 1. Una composición farmacéutica que comprende una proporción de 1:3 de nivolumab frente a ipilimumab, que comprende 4,62 mg/ml de ipilimumab, 1,54 mg/ml de nivolumab, clorhidrato tris (HCl) 18,46 mM, citrato de sodio dihidrato 1,54 mM, NaCl 96,15 mM, manitol al 1,15 % en p/v, ácido pentético 93,85 µM y PS80 al 0,012 % p/v.
2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, que comprende un pH de 6,0.
- 10 3. Un kit que comprende la composición de las reivindicaciones 1 o 2.
4. Un método para preparar la composición de las reivindicaciones 1 o 2, que comprende mezclar nivolumab e ipilimumab para obtener la proporción deseada.
- 15 5. La composición de las reivindicaciones 1 o 2 para su uso en la modulación de una respuesta inmunitaria en un paciente que la necesita.
6. La composición de las reivindicaciones 1 o 2 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o una afección en un paciente.
- 20 7. La composición para el uso de la reivindicación 6, en donde la enfermedad o la afección son una enfermedad autoinmune.
8. La composición para el uso de la reivindicación 6, en donde la enfermedad es cáncer.
- 25 9. La composición para el uso de la reivindicación 8, en donde el cáncer es cáncer de melanoma, cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de huesos, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma maligno cutáneo o intraocular, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer de útero, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer del esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de la uretra, cáncer del pene, leucemias crónicas o agudas, incluyendo leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, tumores sólidos de la infancia, linfoma linfocítico, cáncer de la vejiga, cáncer del riñón o del uréter, carcinoma de la pelvis renal, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), linfoma primario del SNC, angiogénesis tumoral, tumor del eje espinal, glioma del tronco encefálico, adenoma hipofisario, sarcoma de Kaposi, cáncer epidermoide, cáncer de células escamosas, linfoma de linfocitos T, cánceres inducidos por el medio ambiente, incluidos los inducidos por el asbesto, y cualquier combinación de los mismos.
- 30
- 35

Fig. 1: Formulaciones comerciales de Ipilimumab y Nivolumab

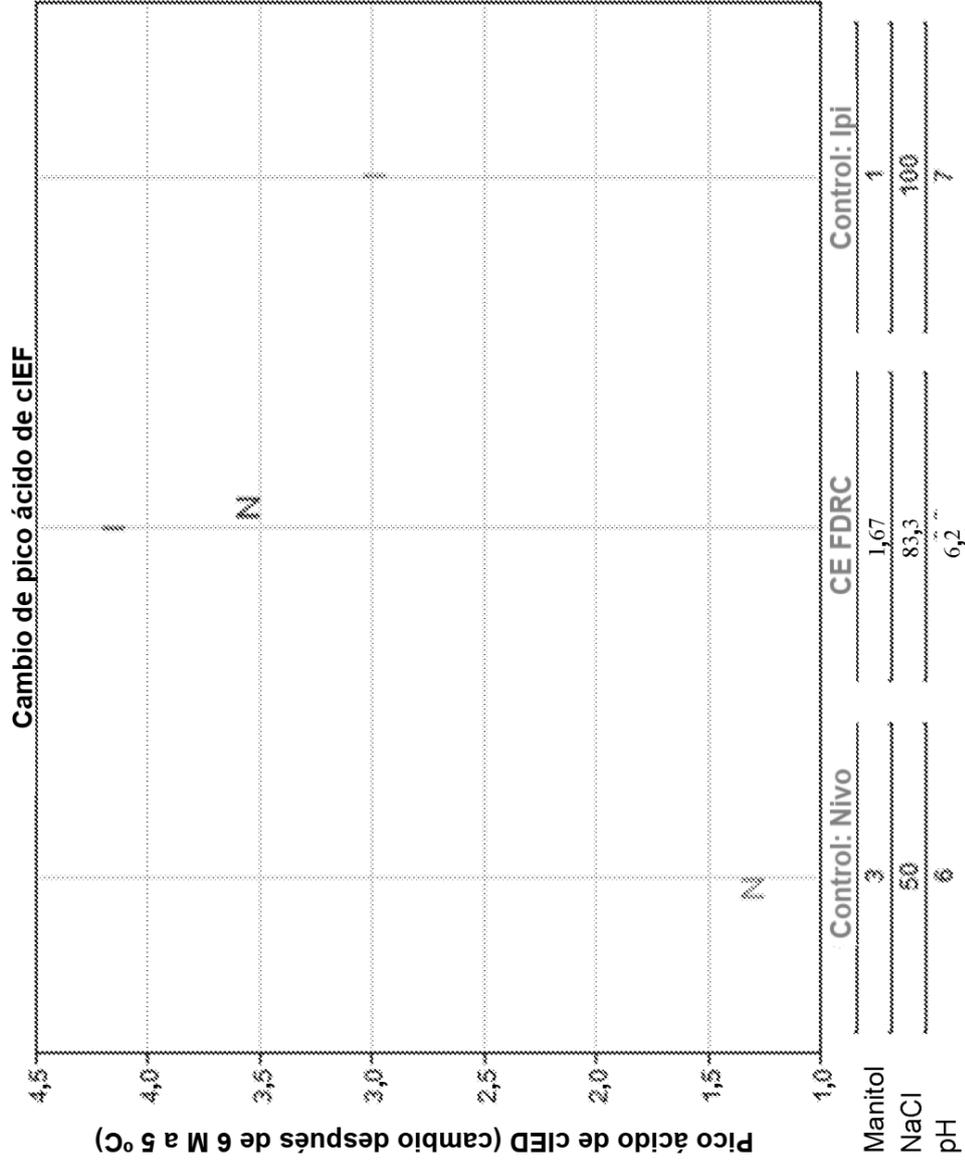
Composición de Ipilimumab	SF	PF	Composición de Nivolumab	SF	PF
Tipo	IgG1; Peso Mol.: 147.991 Daltons		Tipo	IgG4; Peso Mol.: 143.567 Daltons	
pl:	8,7-8,8		pl:	8.0-8.1	
BMS-734016	5 mg/ml	5 mg/ml	BMS-936558	20 mg/ml	10 mg/ml
Tris HCl, USP	20 mM	20 mM	Citrato sódico dihidratado, USP	20mM	20mM
pH	7,0	7,0	pH	6,0	6,0
Cloruro sódico, USP	100 mM	100 mM	Cloruro sódico, USP	50 mM	50 mM
Manitol (% de p/v), USP	1,0 %	1,0%	Manitol (% de p/v), USP	3,0 %	3,0 %
Ácido pentético (DTPA), USP	100 µM	100 µM	Ácido pentético (DTPA), USP	20 µM	20 µM
Polisorbato 80, NF	0,01 %	0,01%	Polisorbato 80, NF	0,04 %	0,02 %
Presentación (volúmenes de relleno): 50 mg (10 ml en un vial de 10 ml) y 200 mg (40 ml en un vial de 50 ml) Op. de unidad de PF: relleno, acabado			Presentación (volúmenes de relleno): 100 mg (10 ml en un vial de 10 ml) Op. de unidad de PF: dilución, relleno, acabado		

SF: Sustancia del fármaco; PF: Producto del fármaco

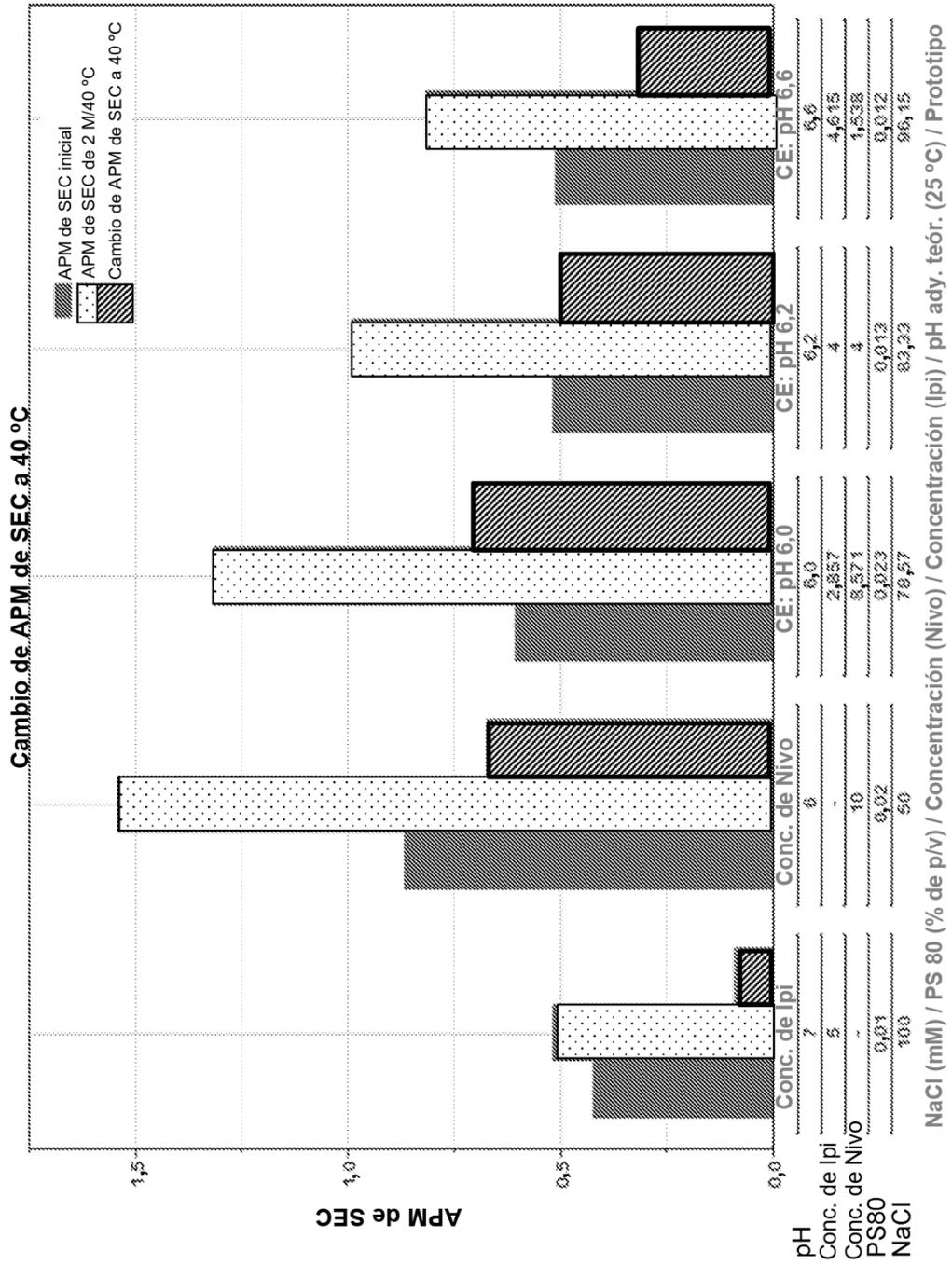
**Fig. 2A: Formulación de dosis fija de proporción 1:1 para Nivolumab e Ipilimumab  
Cambio de perfil de APM (3 M a 40 °C)**



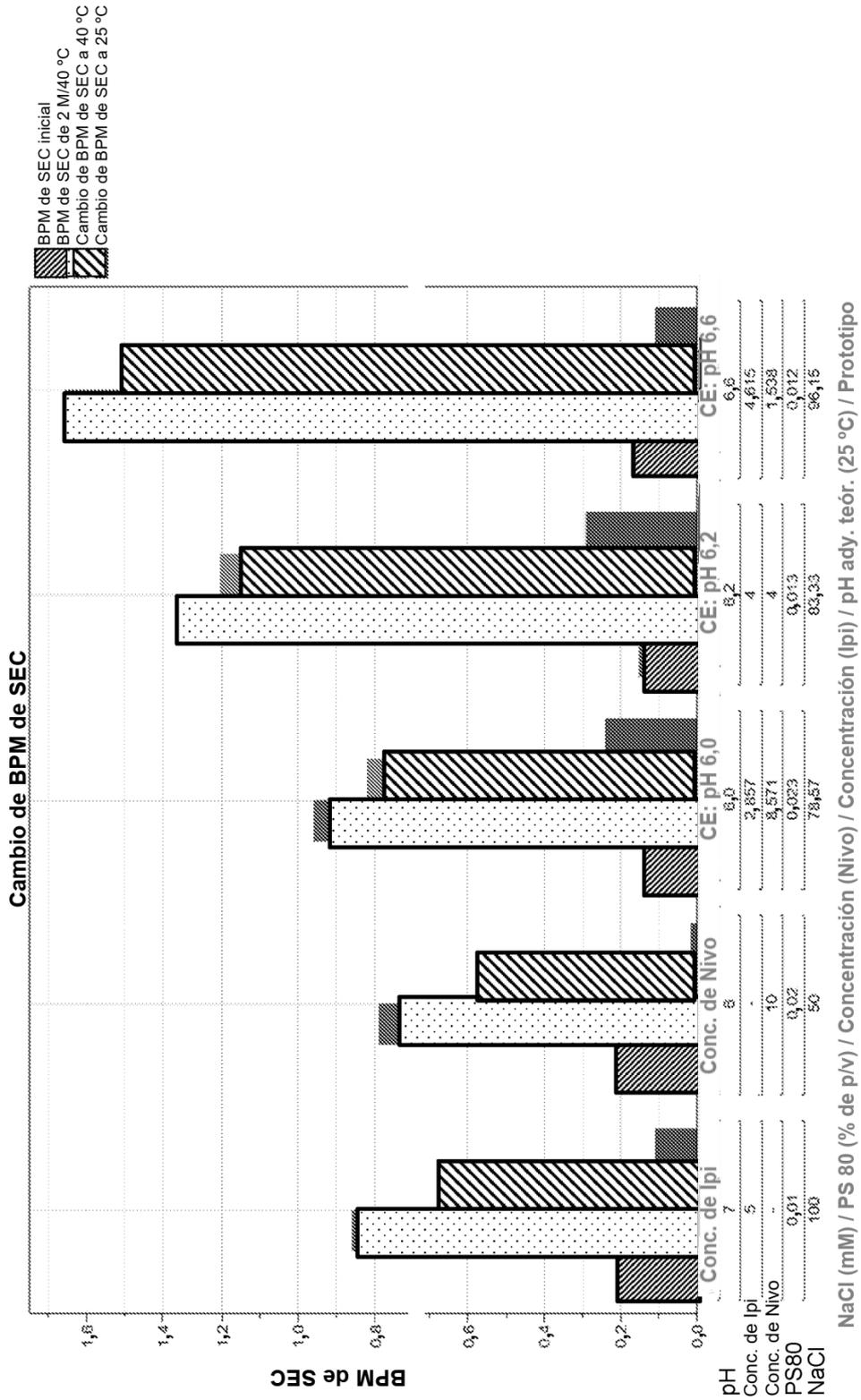
**Fig. 2B: Formulación de dosis fija de proporción 1:1 para Nivolumab e Ipilimumab  
Cambio en el perfil de carga (cIEF) (6 M a 5 °C)**



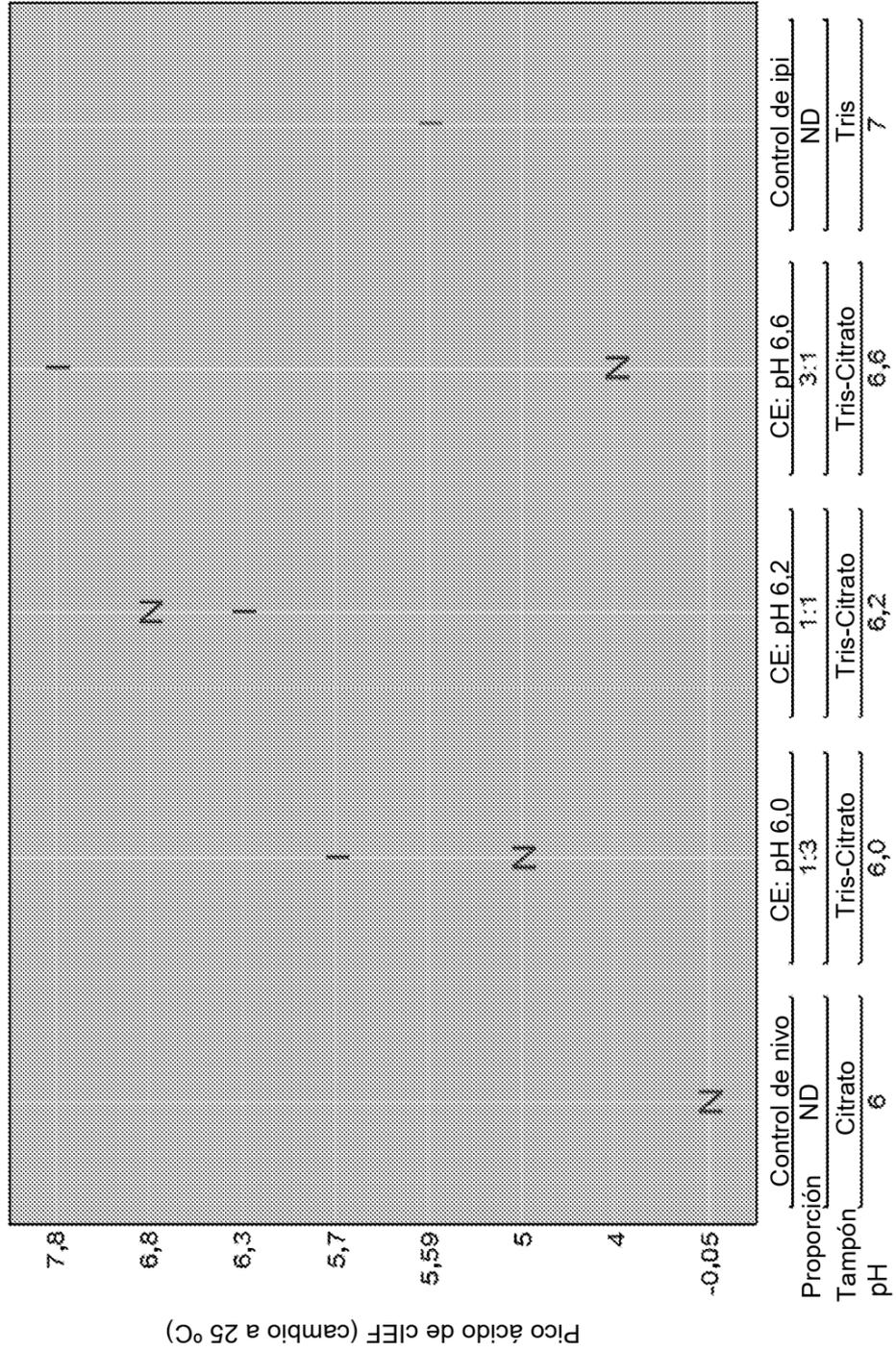
**Fig. 3A: Formulaciones de dosis fija de proporciones 1:3, 1:1 o 3:1 para Nivolumab e Ipilimumab: cambio del perfil de APM (2 M a 40 °C)**



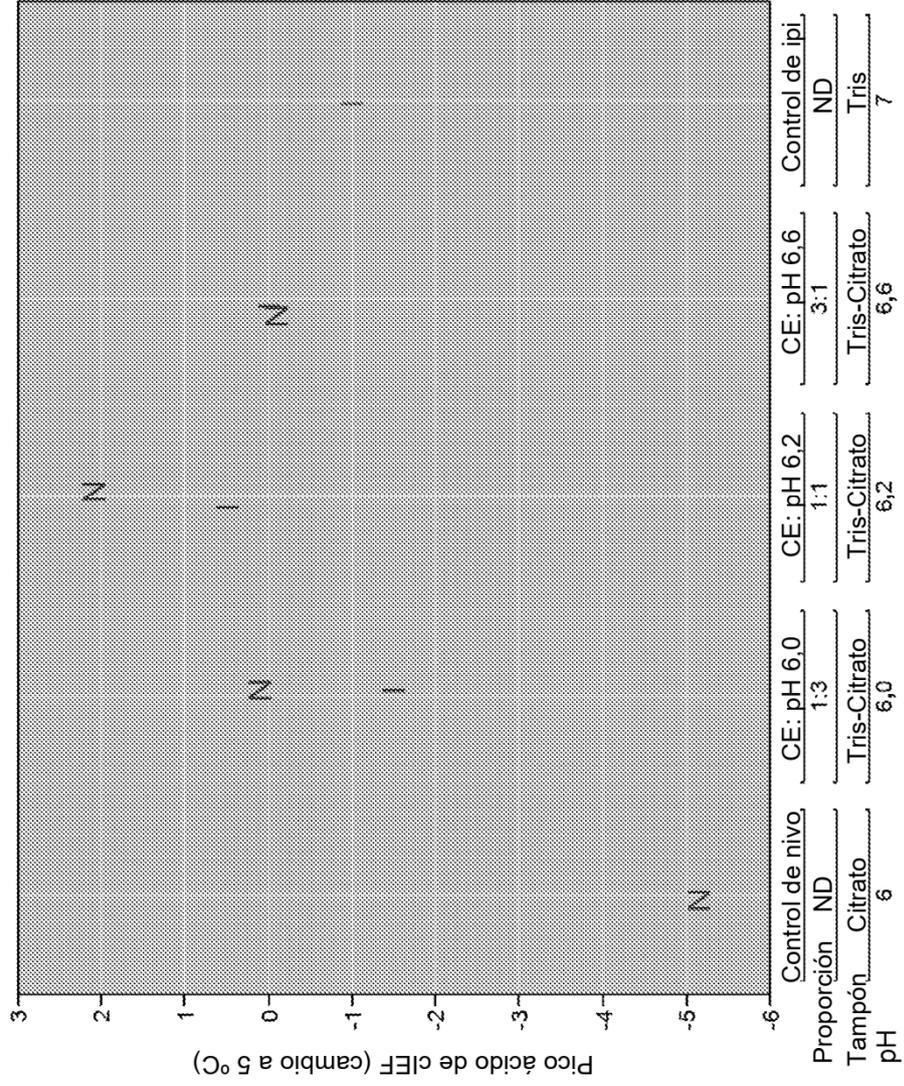
**Fig. 3B: Formulaciones de dosis fija de proporciones 1:3, 1:1 o 3:1 para Nivolumab e Ipilimumab: cambio del perfil de BPM (2 M a 40 °C y 3 M a 25 °C)**



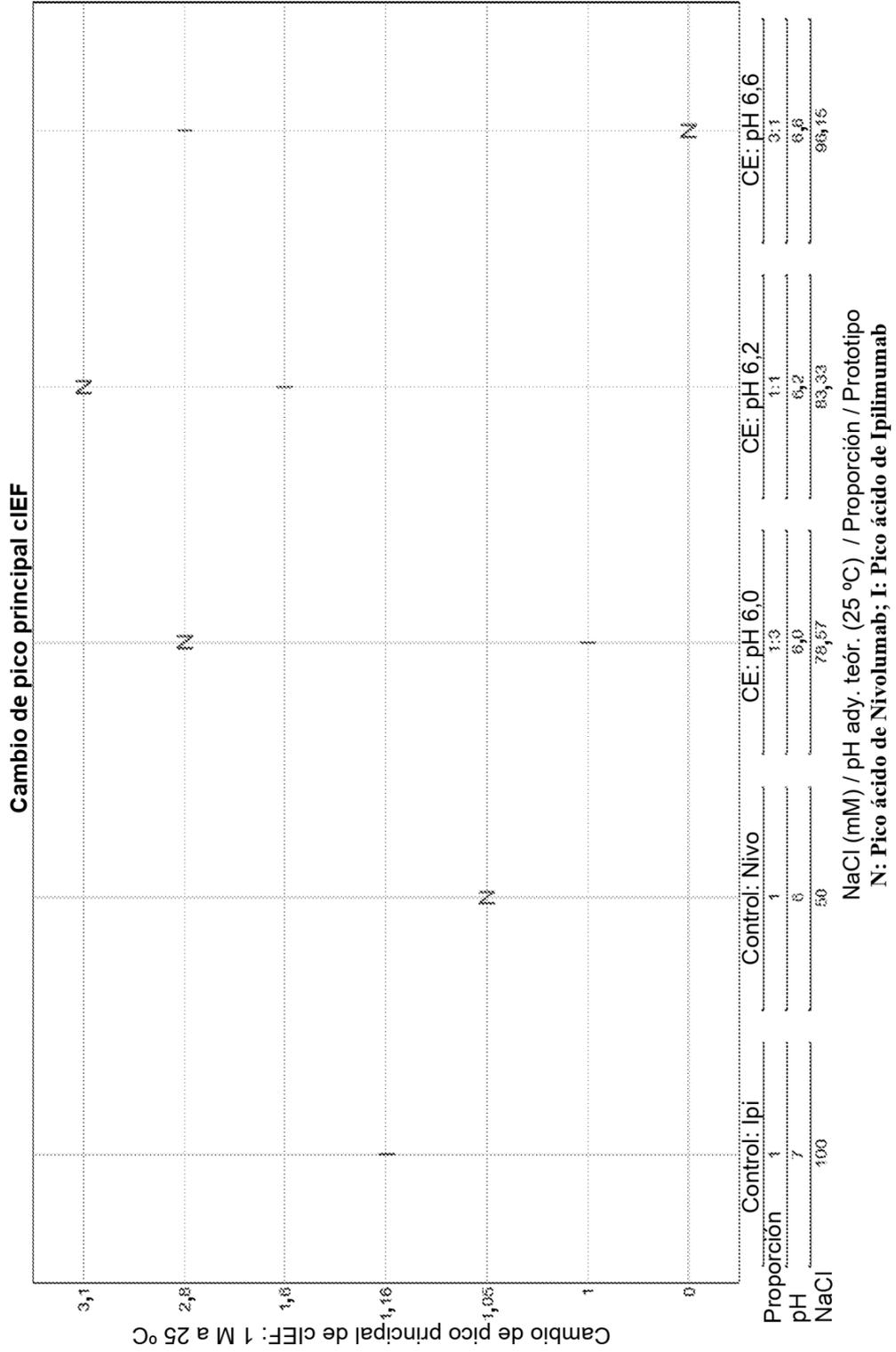
**Fig. 4A: Formulaciones de dosis fija de proporciones 1:3, 1:1 o 3:1 para Nivolumab e Ipilimumab: cambio de pico ácido de cIEF (3 M a 25 °C)**



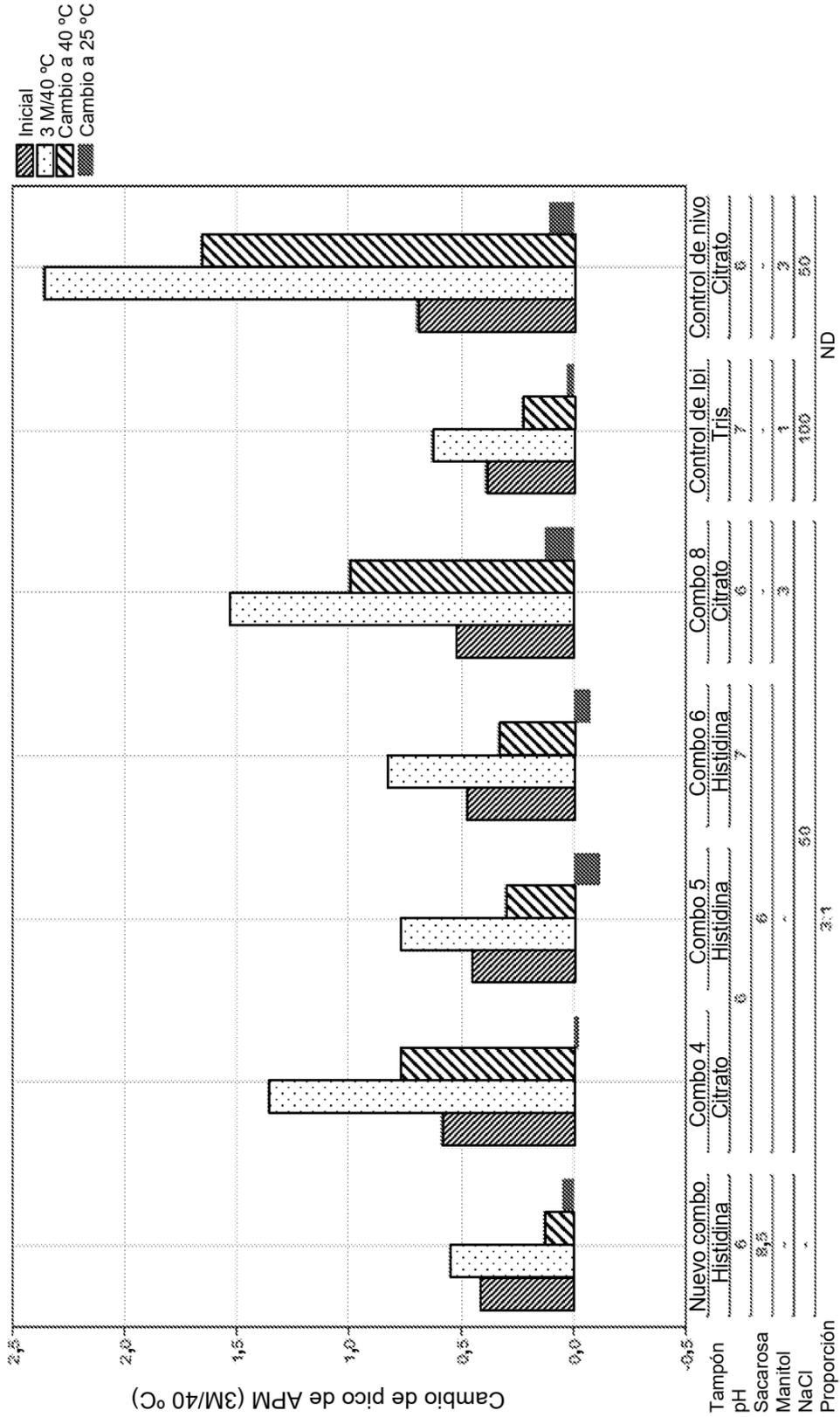
**Fig. 4B: Formulaciones de dosis fija de proporciones 1:3, 1:1 o 3:1 para Nivolumab e Ipilimumab: cambio de pico ácido de cIEF (3 M a 5 °C)**



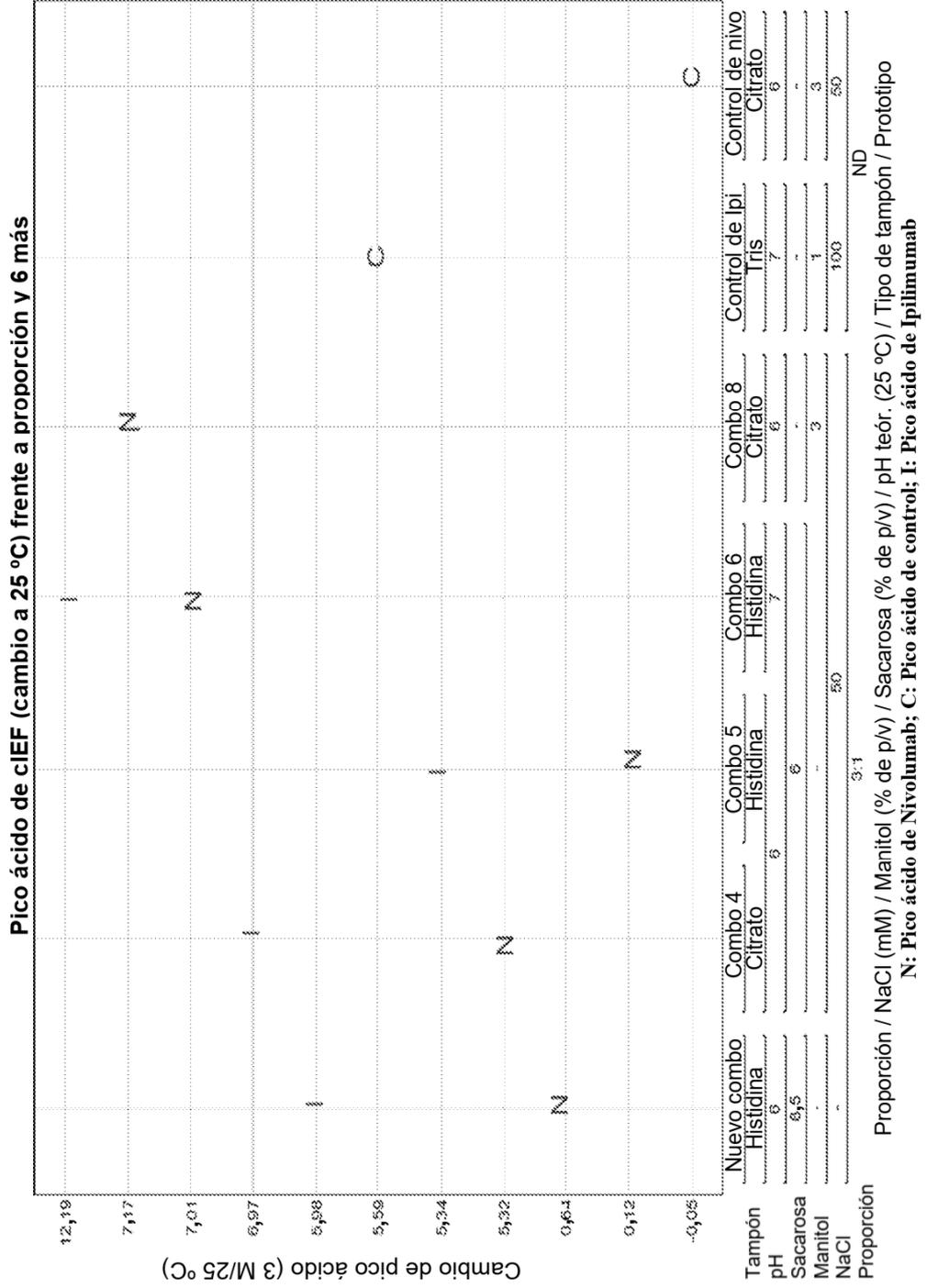
**Fig. 4C: Formulaciones de dosis fija de proporciones 1:3, 1:1 o 3:1 para Nivolumab e Ipilimumab: cambio de pico ácido de cIEF (1 M a 25 °C)**



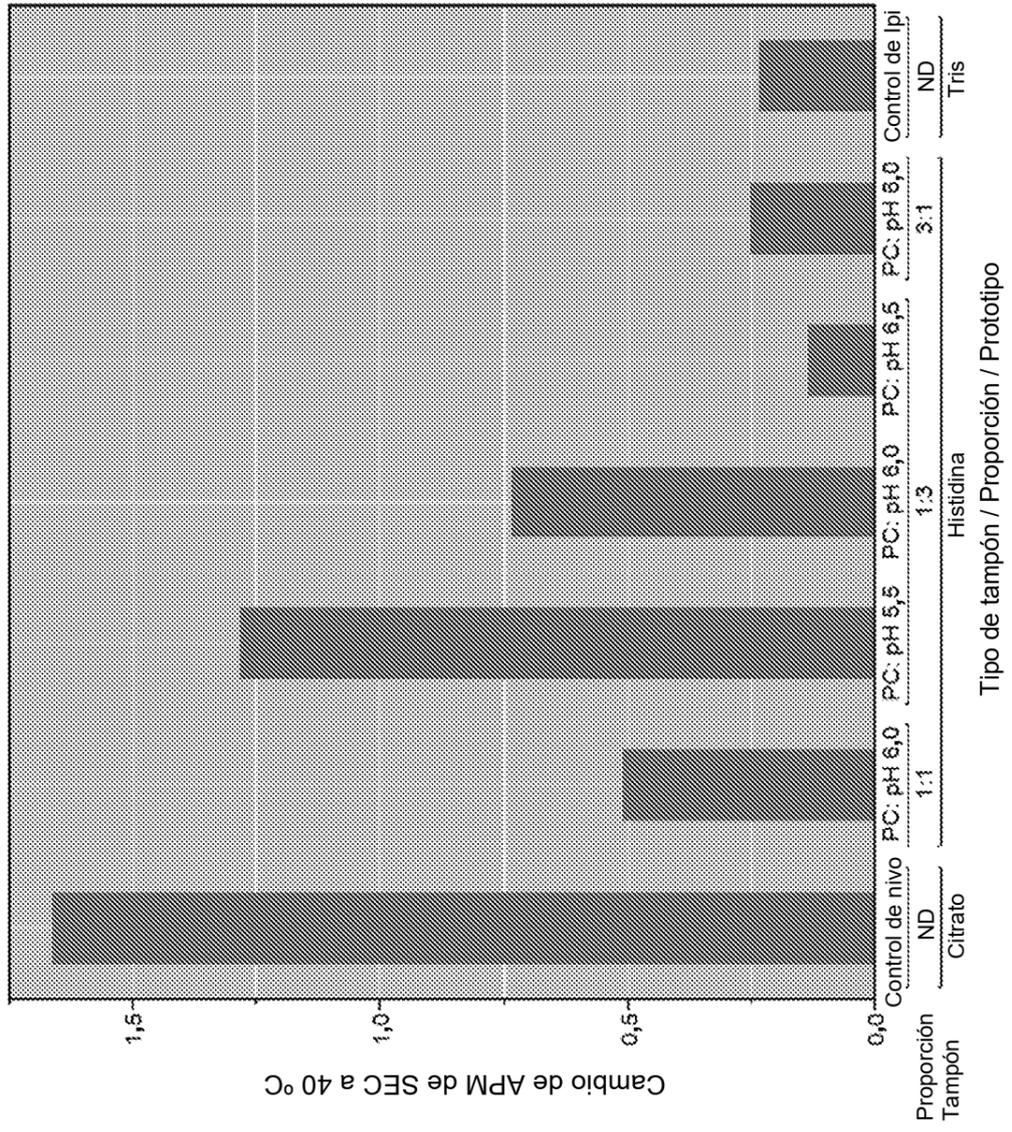
**Fig. 5A: DdE FDRC (3:1) – Nuevas formulaciones  
Cambio de APM de SEC (3 M a 40 °C o 25 °C)**



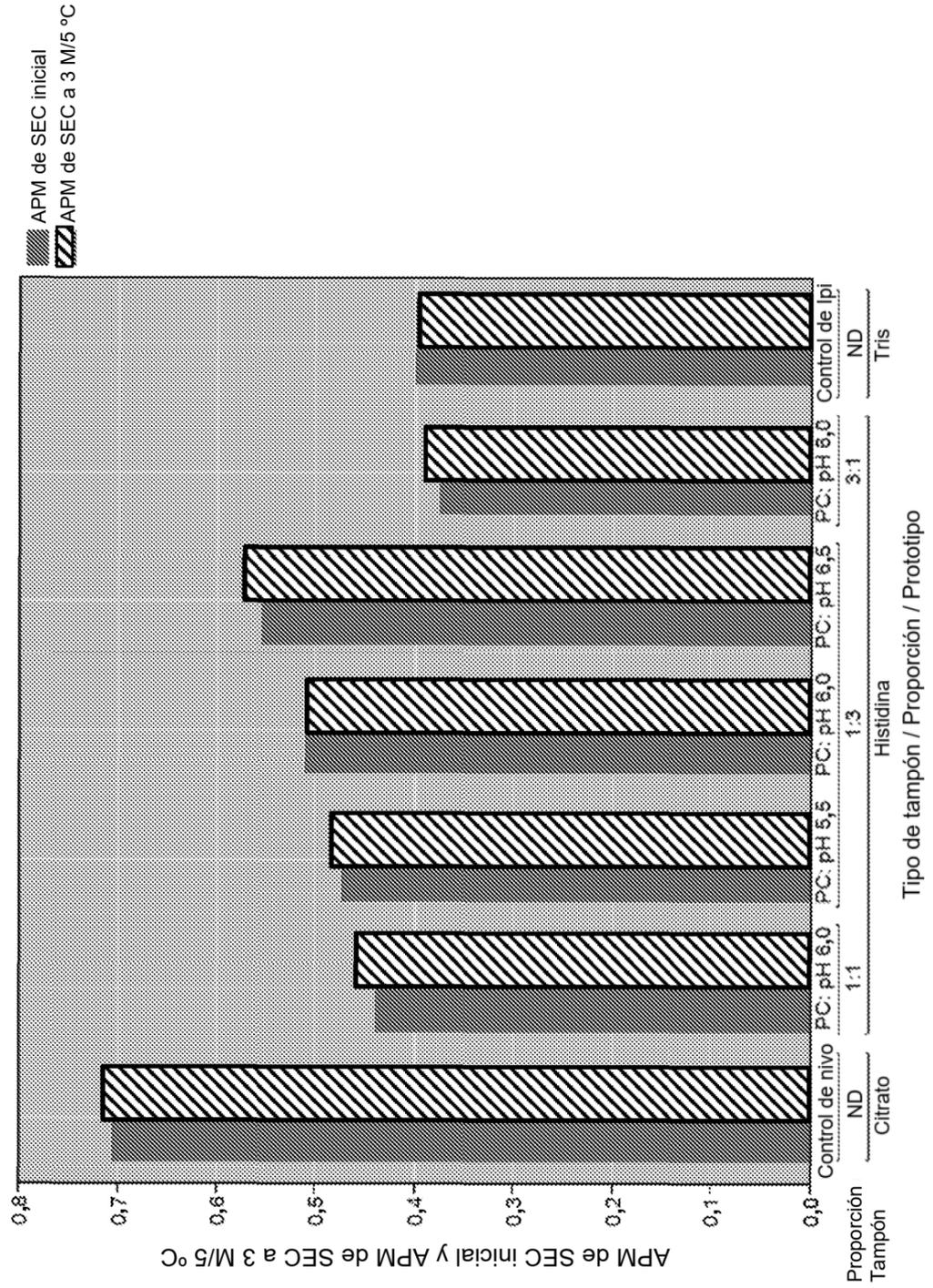
**Fig. 5B: DdE FDRC (3:1) – Nuevas formulaciones  
Pico ácido de cIEF (3 M a 25 °C)**



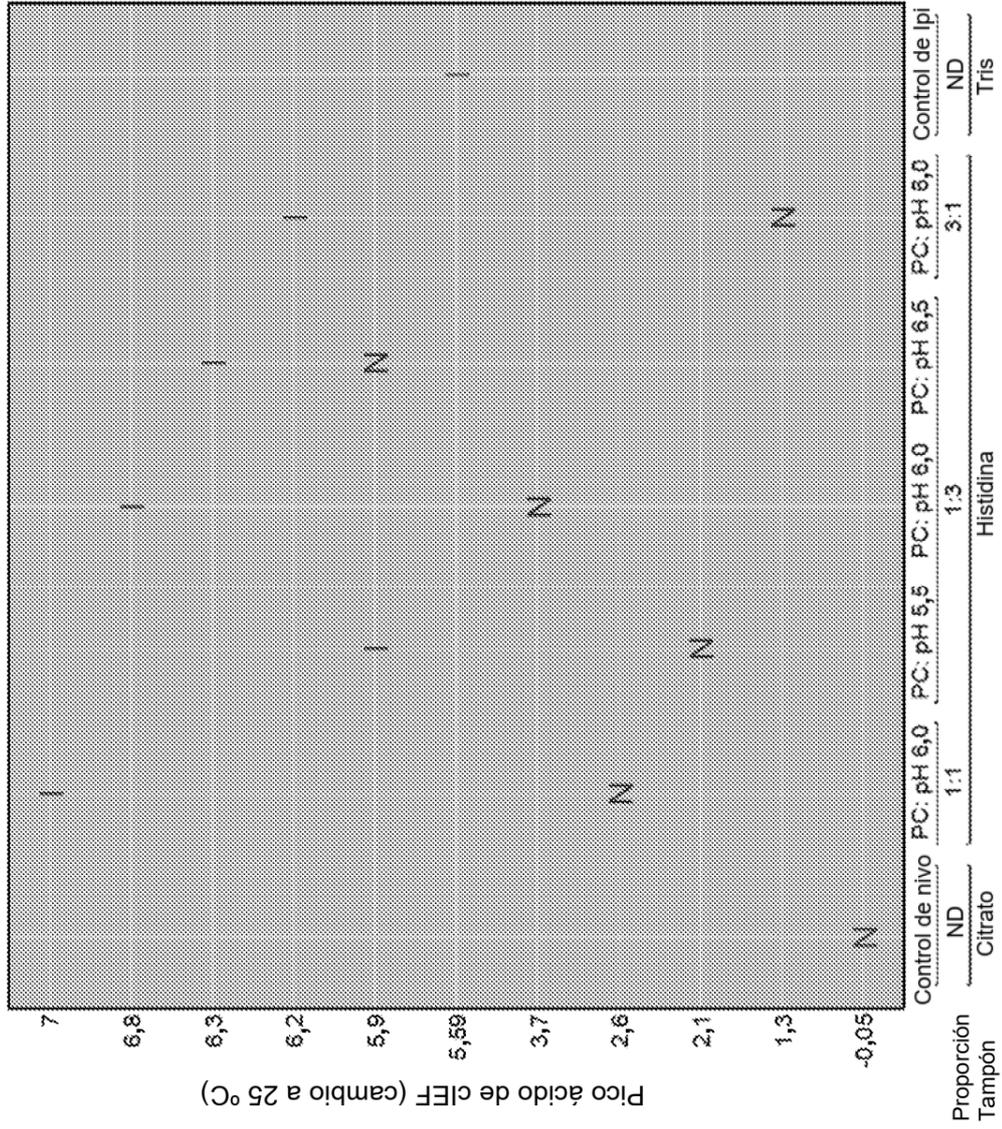
**Fig. 6A: Plataforma combinada (PC) de FDRC  
Cambio de APM de SEC (3 M a 40 °C)**



**Fig. 6B: Plataforma combinada (PC) de FDRC  
Cambio de APM de SEC (3 M a 5 °C)**

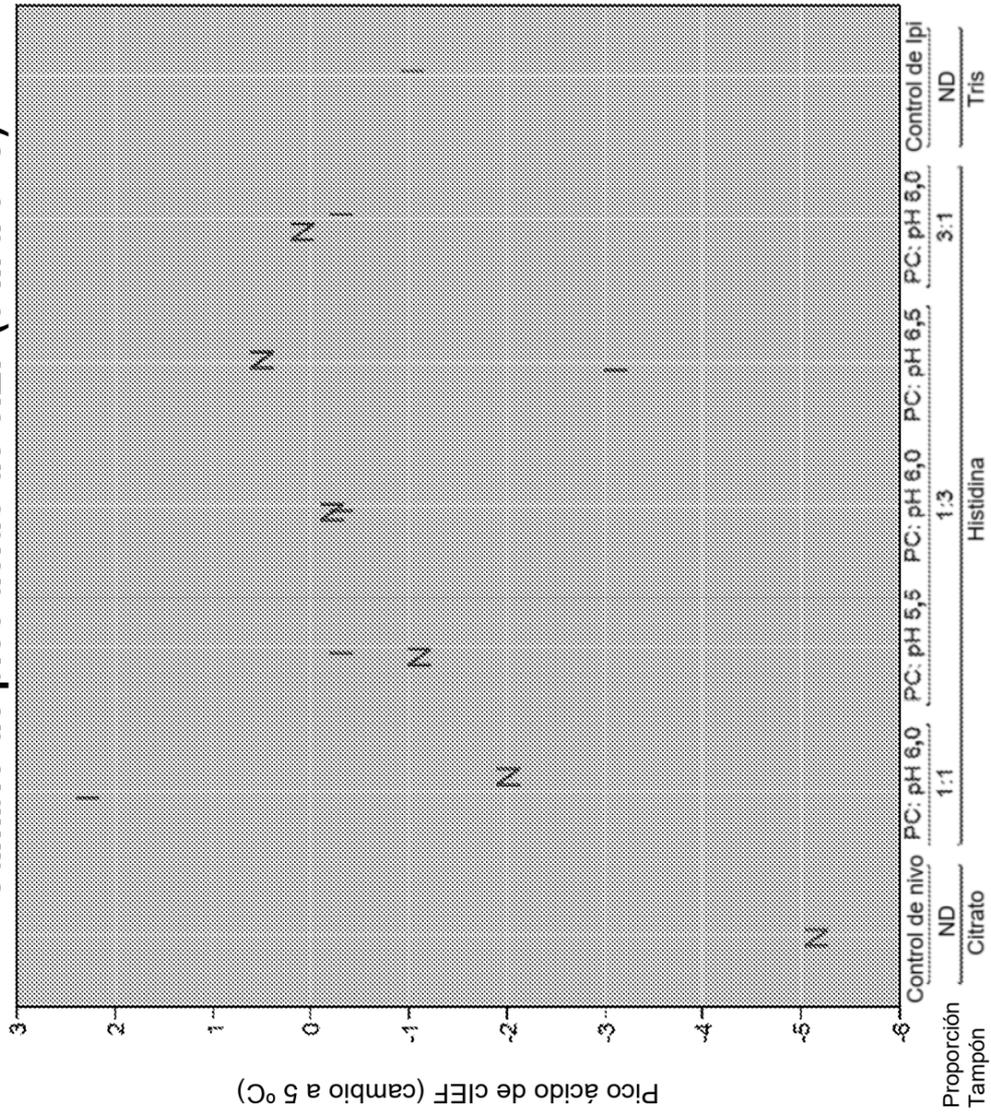


**Fig. 7A: Plataforma combinada (PC) de FDRC  
Cambio de pico ácido de cIEF (3 M a 25 °C)**



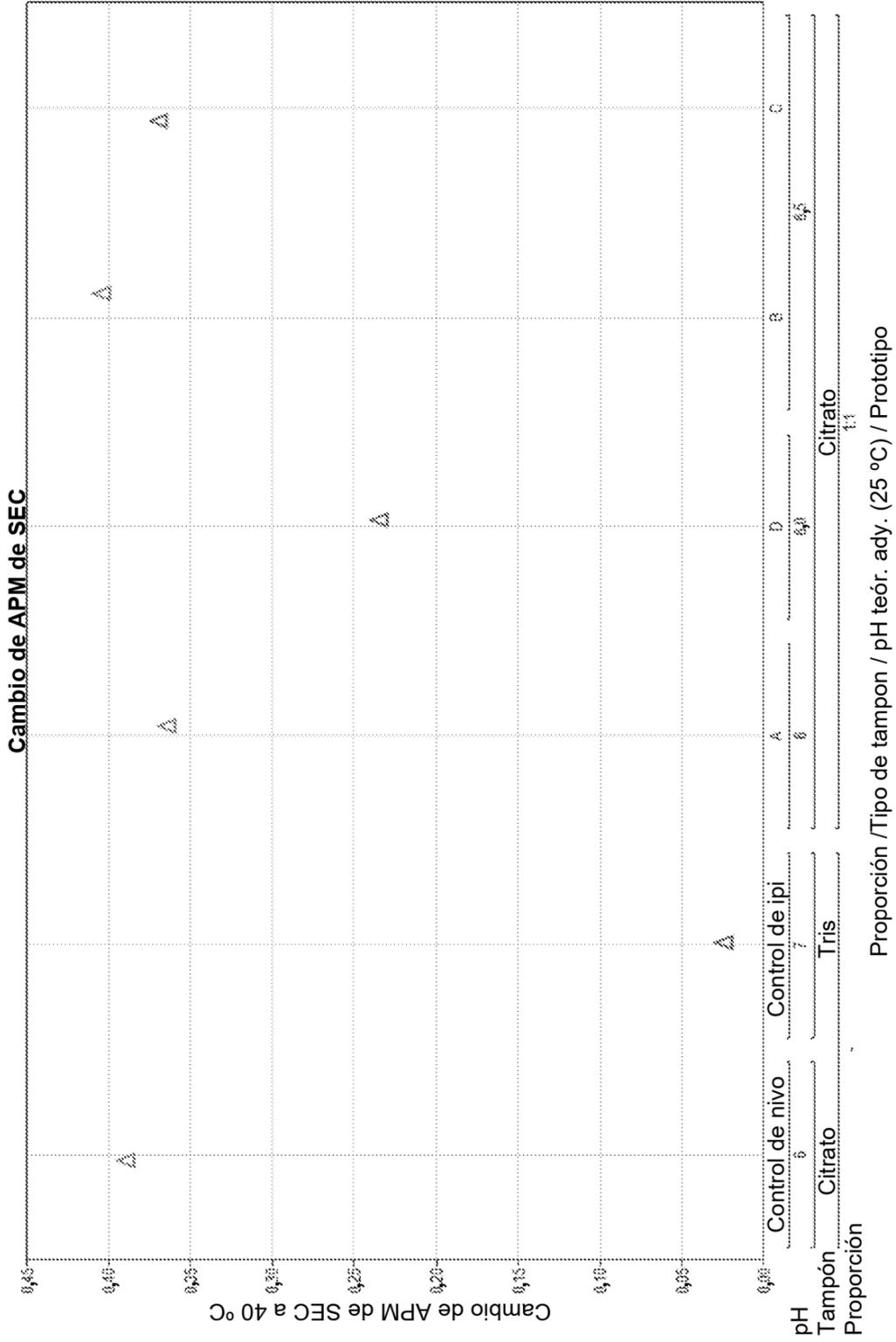
**N: Pico ácido de Nivolumab; I: Pico ácido de Ipilimumab**

**Fig. 7B: Plataforma combinada (PC) de FDRC  
Cambio de pico ácido de cIEF (3 M a 5 °C)**

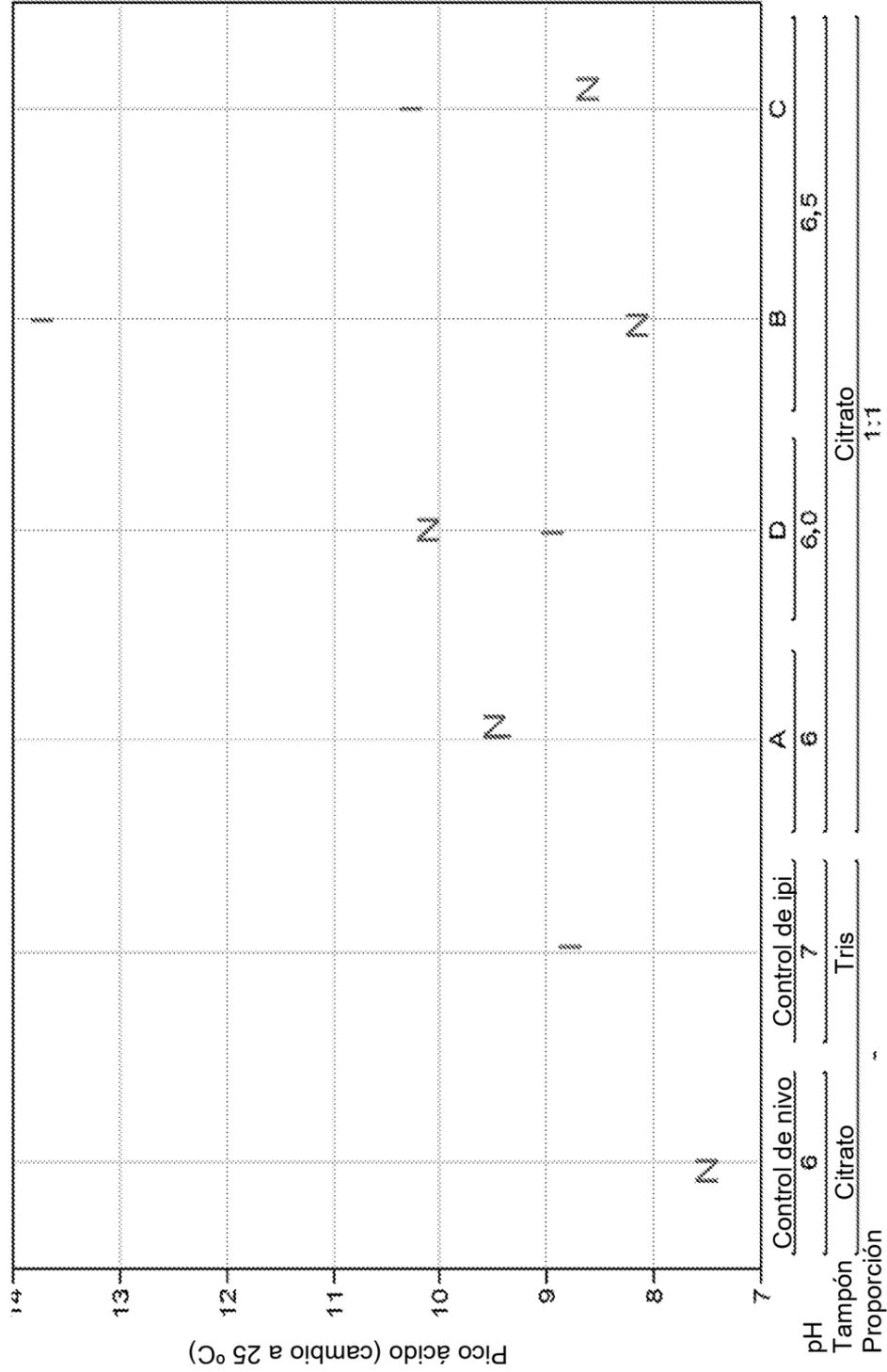


Tipo de tampón / Proporción / Prototipo  
**N: Pico ácido de Nivolumab; I: Pico ácido de Ipilimumab**

**Fig. 8: Formulaciones de FDR (1:1) a base del PF Nivelumab  
Cambio de APM de SEC (1 M a 40 °C)**

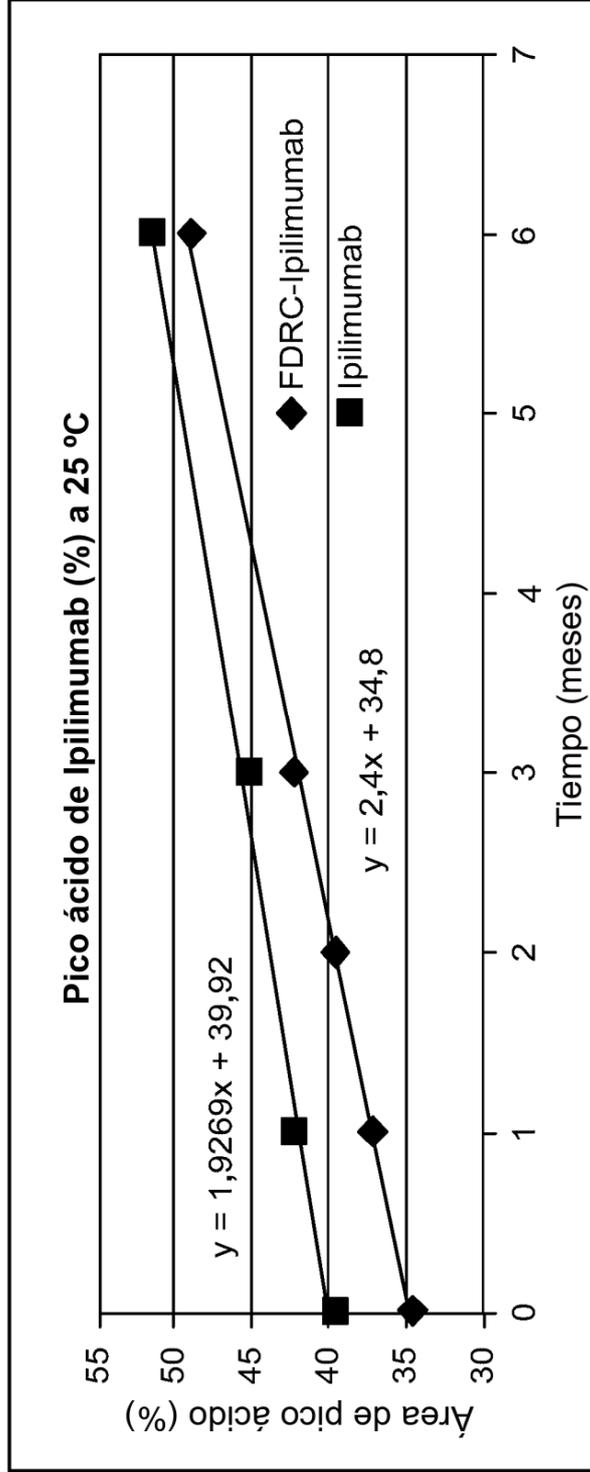


**Fig. 9: Formulaciones de FDRC (1:1) a base del PF Nivolumab  
Cambio de pico ácido (3 M a 25 °C)**

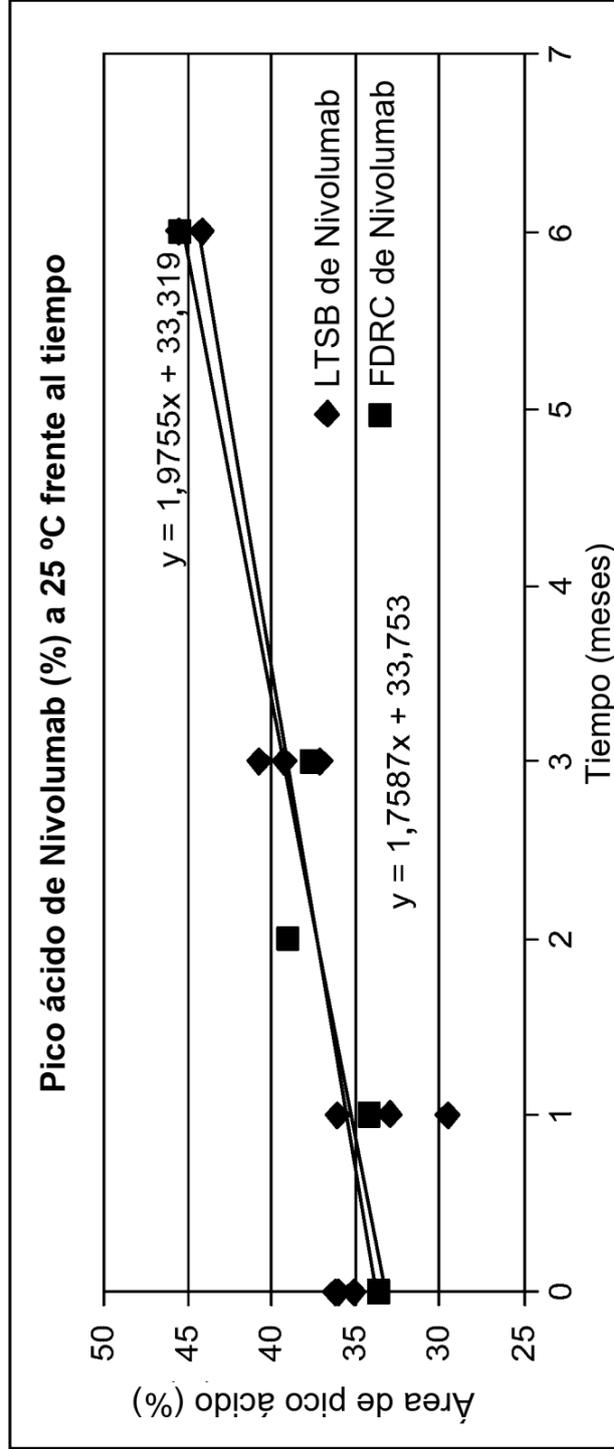


Proporción /Tipo de tampón / pH teór. ady. (25 °C) / Prototipo  
 N: Pico ácido de Nivolumab; I: Pico ácido de Ipilimumab

**Fig. 10: Tasa de degradación de pico ácido de Ipilimumab en FDRC y composición comercial a 25 °C/HR al 60 %**



**Fig. 11 Pico ácido de Nivolumab (%) en FDRC y composición comercial a 25 °C/HR del 60 %**



**Fig. 12: Perfil de pico ácido a 25 °C en estudio de variación de pH para Ipilimumab y Nivolumab**

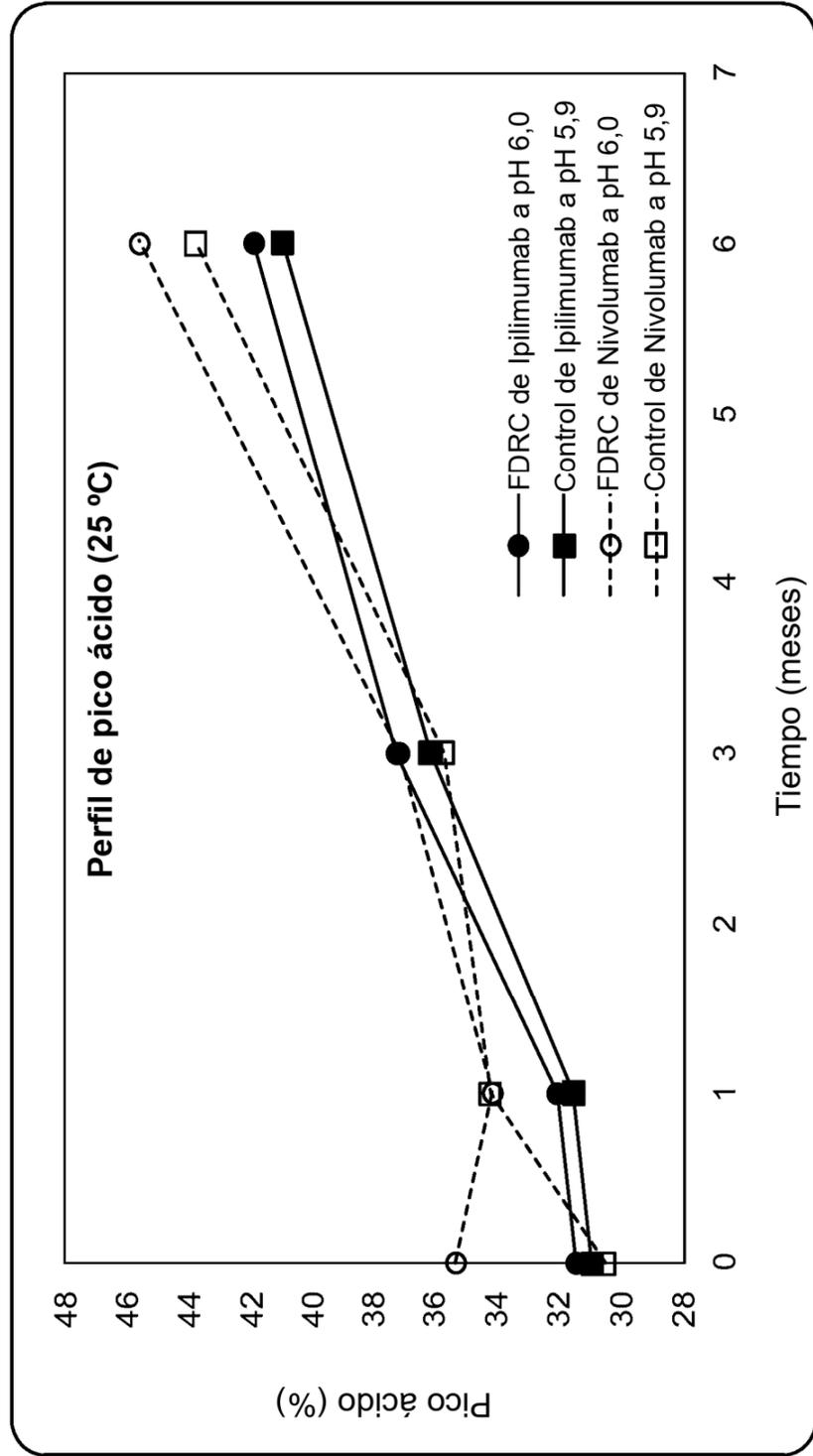


Fig. 13: Perfil de APM de SEC de prototipos de PF de estudio de resistencia

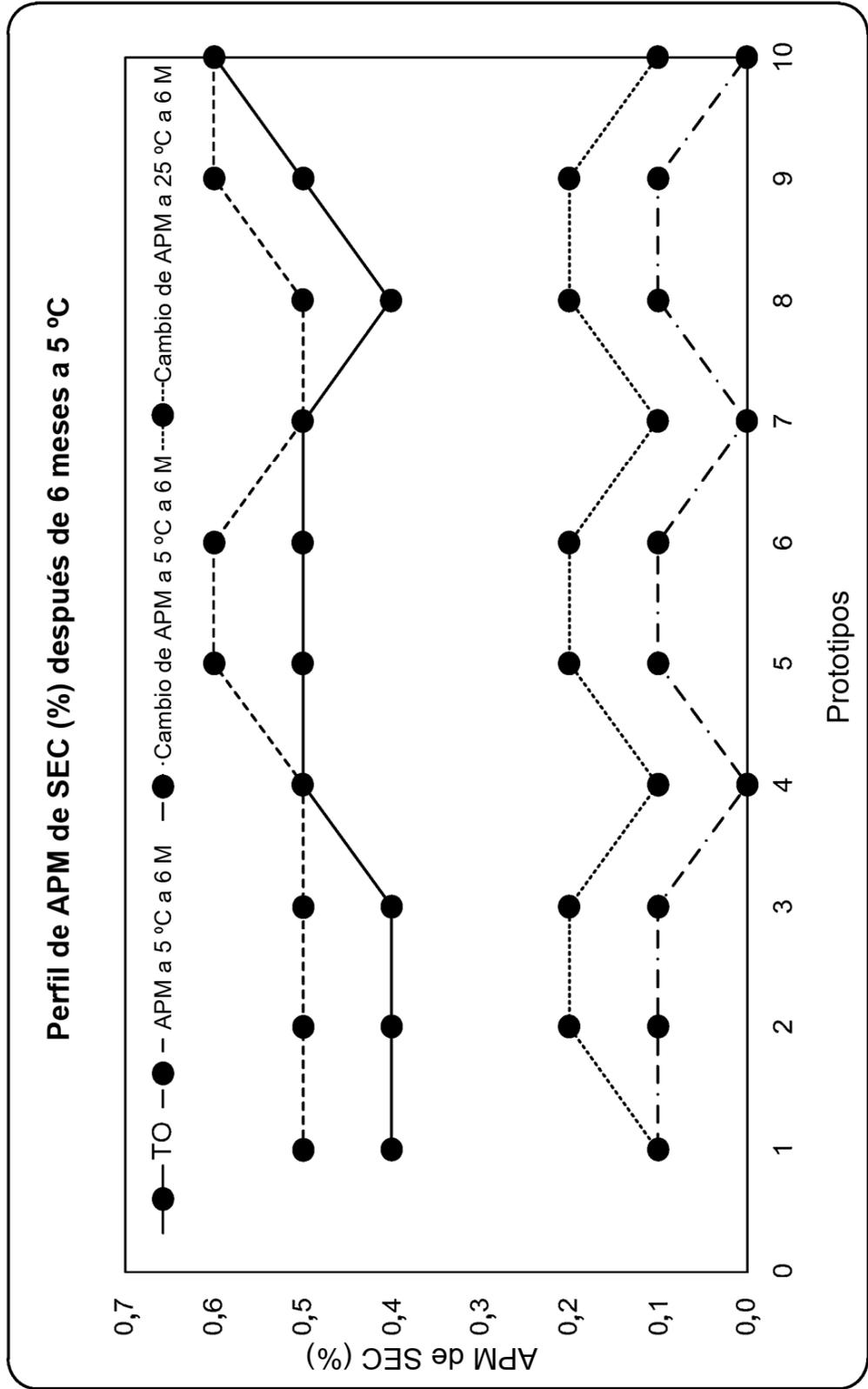
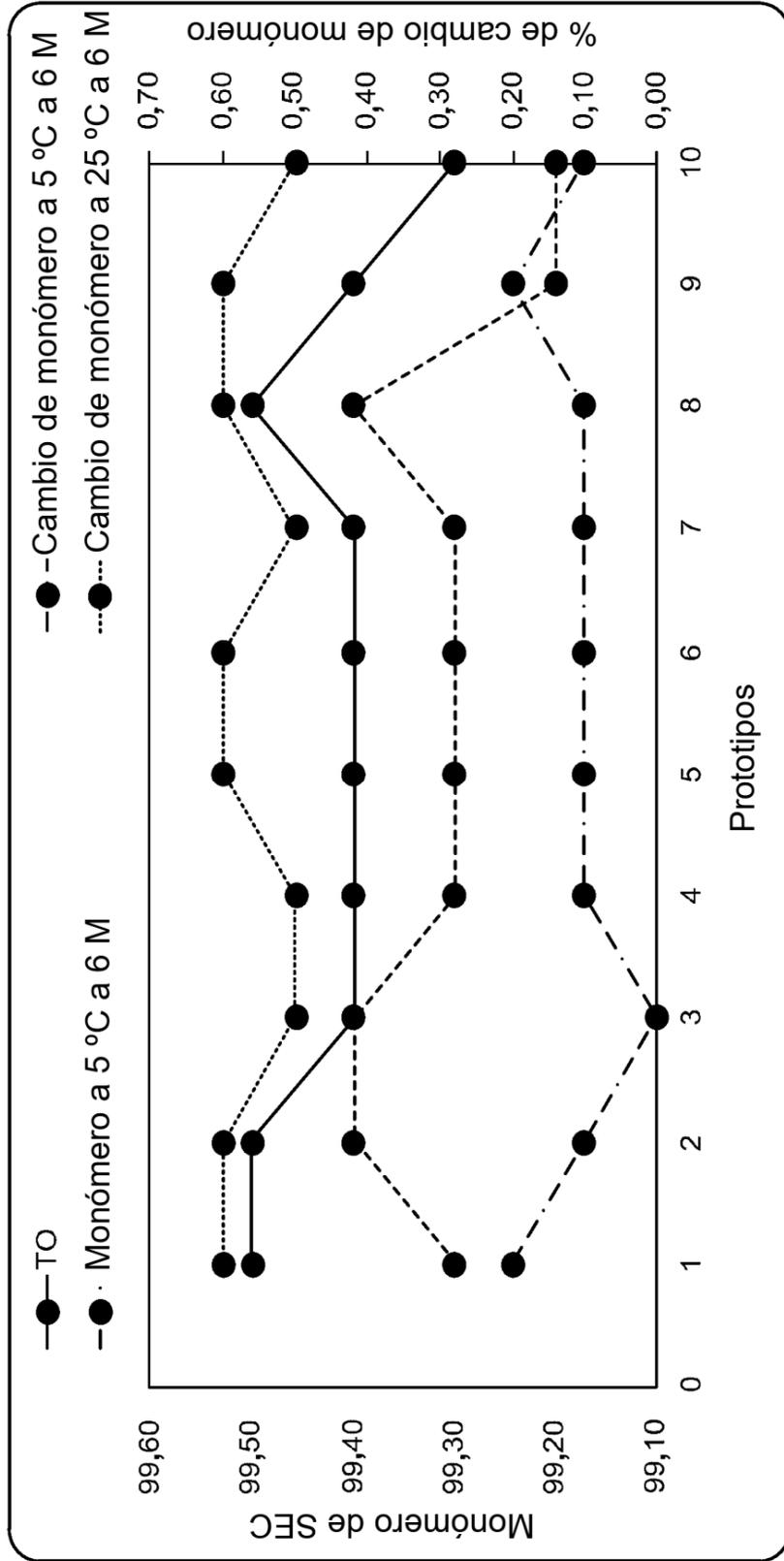
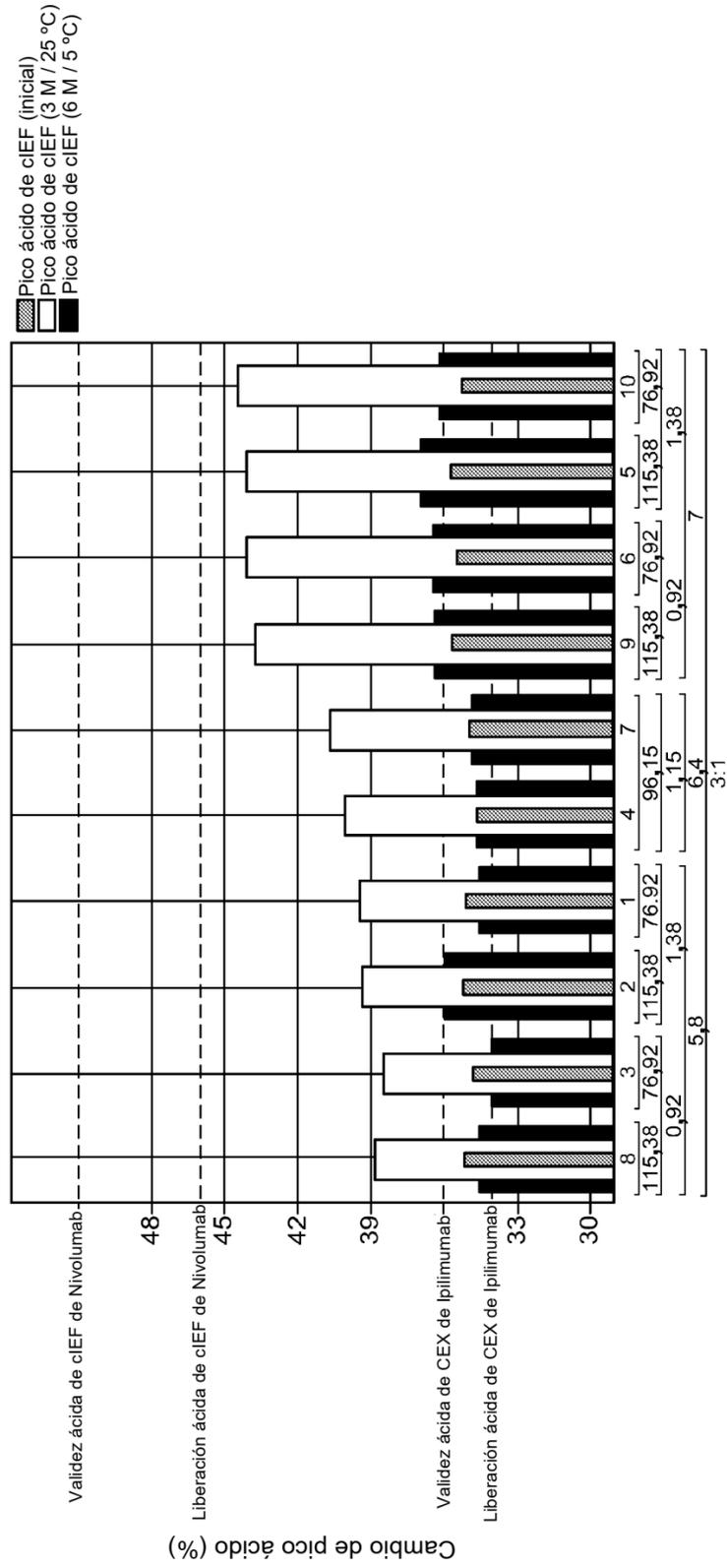


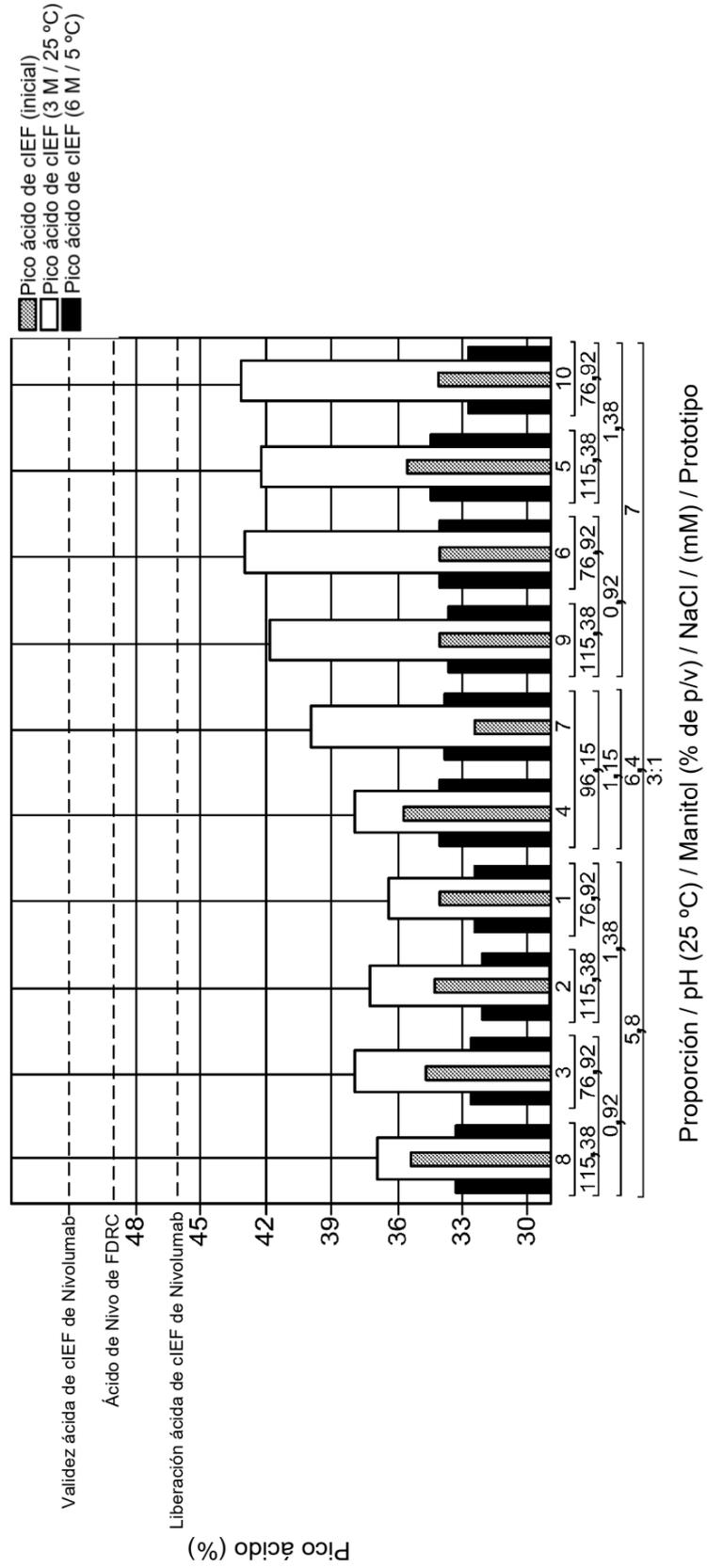
Fig. 14: Perfil de monómero de SEC



**Fig. 15: Perfil de pico ácido de Ipilimumab**



**Fig. 16: Perfil de pico ácido de Nivolumab**



**Fig. 17: Perfil de pico principal de Ipiilimumab**

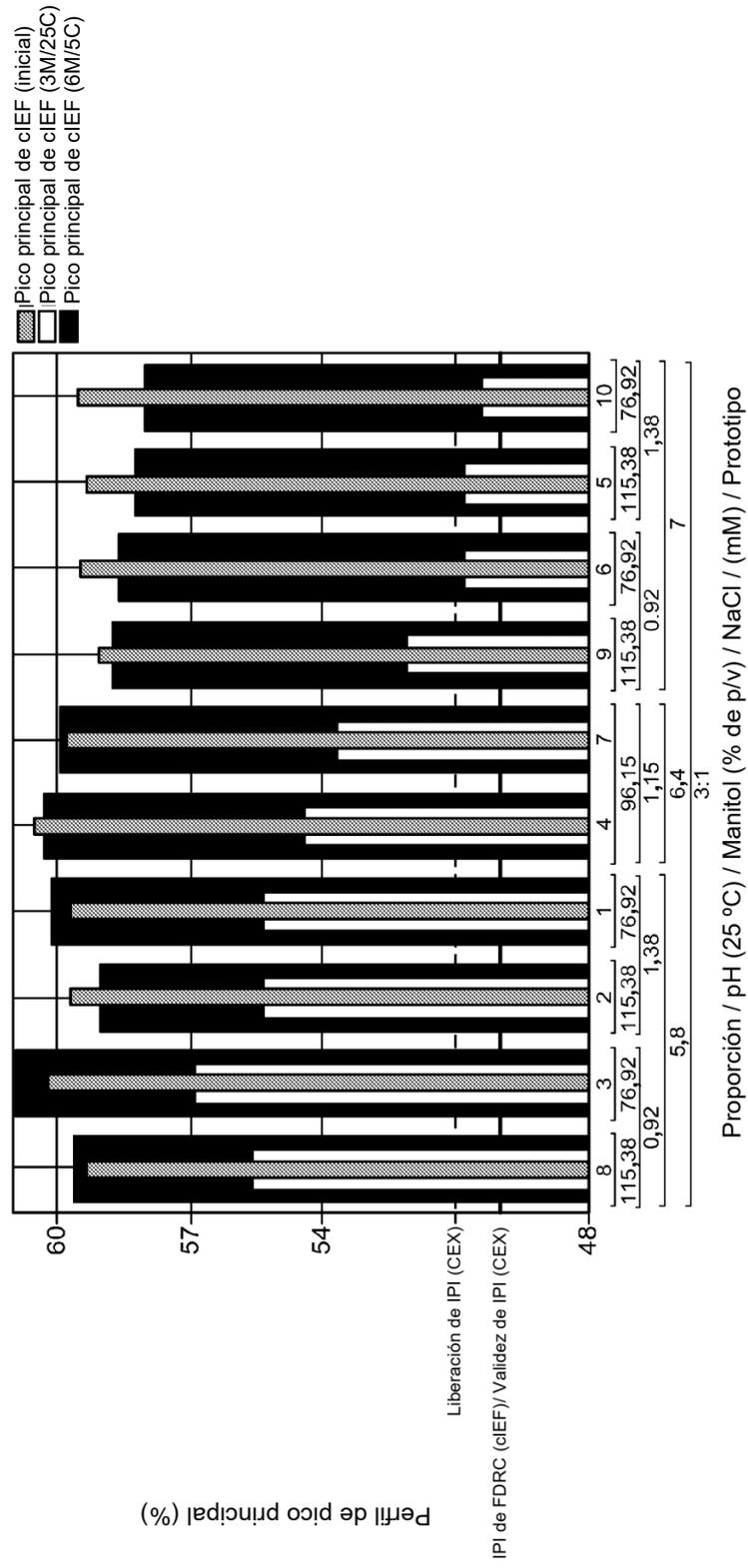


Fig. 18: Perfil de pico principal de Nivelumab

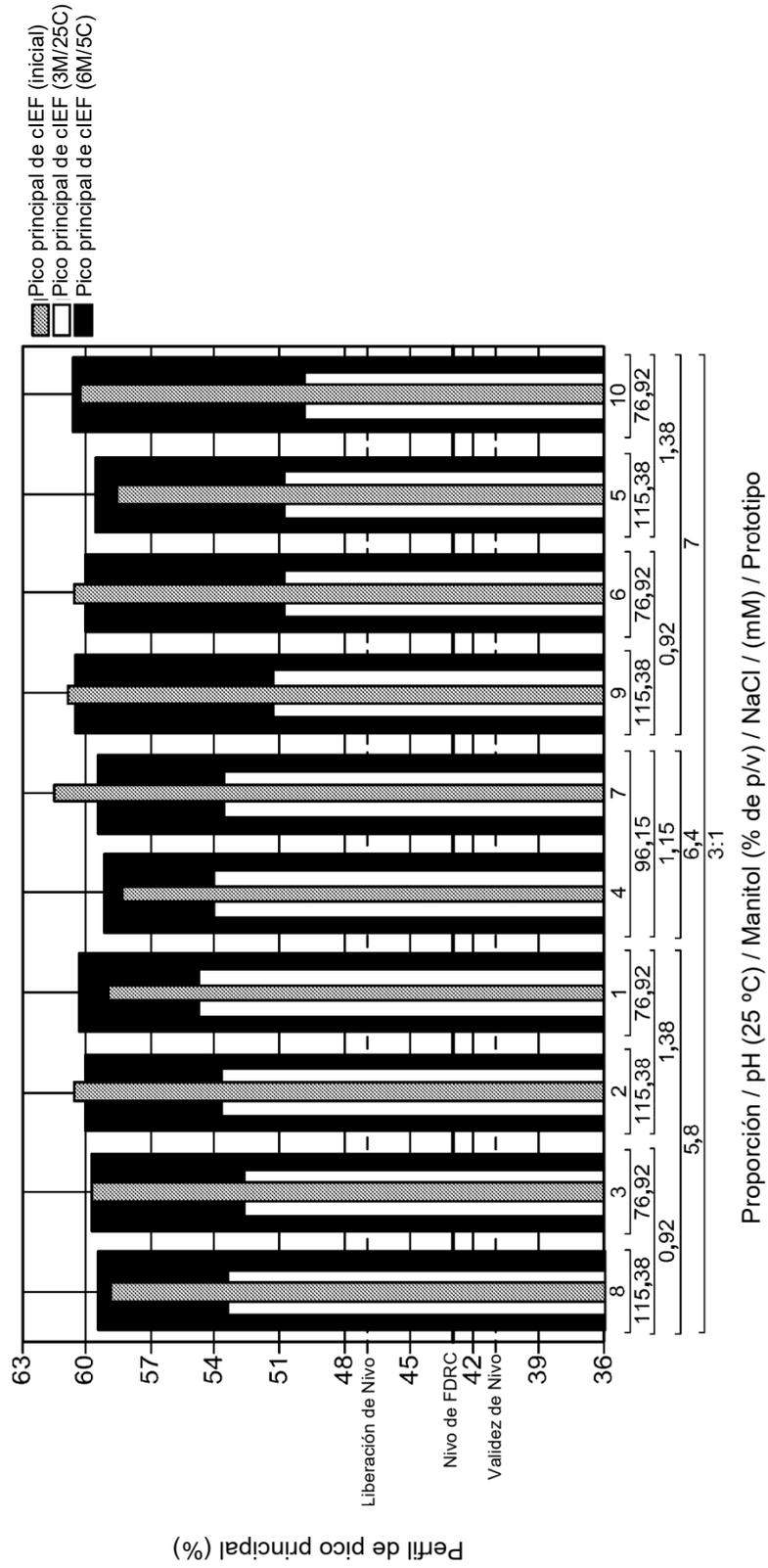
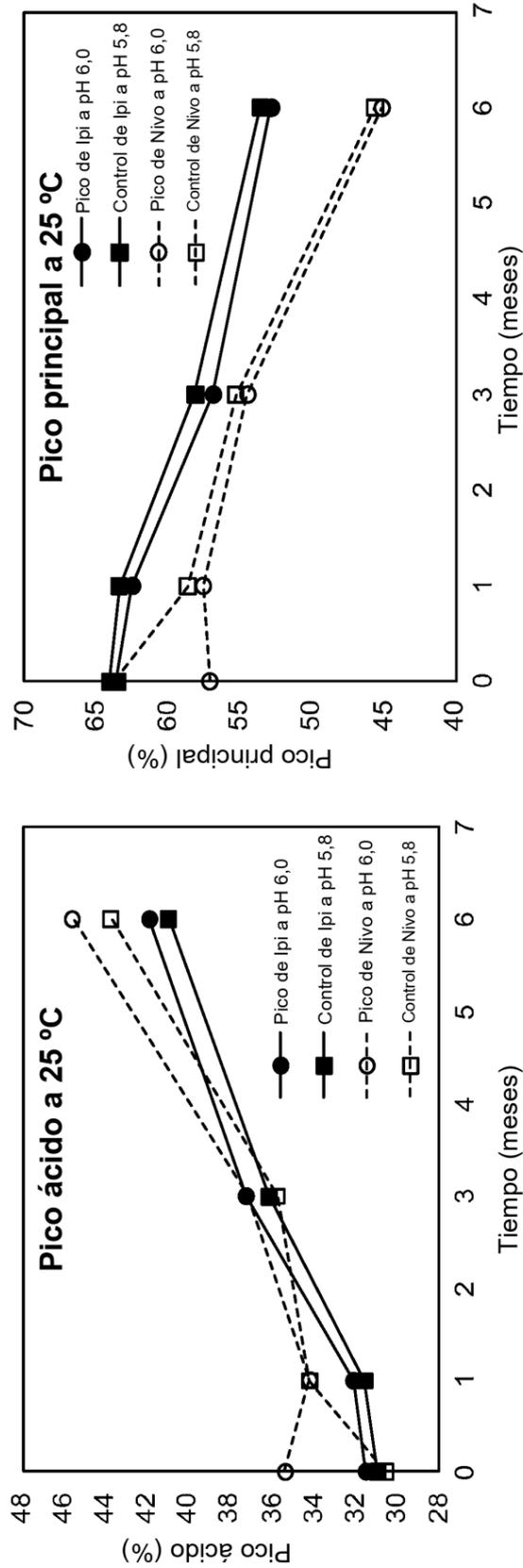


Figura 19. Perfil de pico de cIEF: Impacto del pH



Cambio de pico principal a 5 °C

	pH 5,4	pH 5,7	pH 6,0	pH 6,3	pH 6,6	Controles
Pico de Ipi a 6 M	-1	1,4	0,8	1,5	1,6	0,6
Pico de Nivo a 6 M	-0,4	-1,8	-1,2	-1,6	-0,7	0,9

Cambio de pico ácido a 5 °C

	pH 5,4	pH 5,7	pH 6,0	pH 6,3	pH 6,6	Controles
Pico de Ipi a 6 M	-1	0,6	0,6	0,9	1,1	1
Pico de Nivo a 6 M	-0,3	-3,7	-1,5	-2,3	-1,9	-0,4

Figura 20. Perfil de iCIEF: intervalo de pH de 5,4-6,6

<b>Tasa de cambio/mes de pico ácido y principal de Ipilimumab</b>					
PF	Pico ácido (%/mes)		Pico principal (%/mes)		5 °C
	25 °C	5 °C	25 °C	5 °C	
FDRC (5,4)	1,86	0,3	-2,15	-0,4	
FDRC (5,7)	2,11	0,27	-2,57	-0,4	
FDRC (6,0)	2,03	0,17	-2,32	-0,26	
FDRC (6,3)	2,1	0,1	-2,04	-0,23	
FDRC (6,6)	2,63	0,47	-2,67	-0,7	

Nota: datos de 3 meses para 25 °C y 5 °C

<b>Tasa de cambio/mes de pico ácido y principal de Nivolumab</b>					
PF	Pico ácido (%/mes)		Pico principal (%/mes)		5 °C
	25 °C	5 °C	25 °C	5 °C	
FDRC (5,4)	1,15	-0,33	-2,15	0,33	
FDRC (5,7)	-0,08	-0,6	-0,96	0,36	
FDRC (6,0)	0,72	-0,03	-0,96	0,5	
FDRC (6,3)	0,8	-0,4	-1,16	0,36	
FDRC (6,6)	1,7	-0,07	-1,71	0,1	

Nota: datos de 3 meses para 25 °C y 5 °C