

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 468**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**C07K 16/30** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.11.2013 PCT/EP2013/073024**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.05.2014 WO14072277**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.11.2013 E 13786255 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.04.2018 EP 2916866**

54 Título: **Formulación de acopladores biespecíficos de linfocitos T (BiTE)**

30 Prioridad:

**06.11.2012 EP 12191493**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**19.07.2018**

73 Titular/es:

**BAYER PHARMA AKTIENGESELLSCHAFT  
(100.0%)  
Müllerstrasse 178  
13353 Berlin, DE**

72 Inventor/es:

**OLBRICH, CARSTEN;  
BUNTE, THOMAS;  
WINTER, JONAS;  
PETERS, JÖRG y  
TRILL, THOMAS**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 676 468 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Formulación de acopladores biespecíficos de linfocitos T (BiTE)

5 Introducción

La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas estables que contienen polipéptidos que tienen al menos dos dominios de unión a antígeno y son especialmente adecuadas para administración subcutánea. La invención proporciona composiciones líquidas que minimizan la formación de agregados de polipéptido indeseados (dímeros y/o multímeros). La presente invención proporciona además un procedimiento de minimización de agregación de polipéptidos con dominios de unión a antígeno en composiciones líquidas.

Técnica anterior

15 La necesidad de estabilizar anticuerpos en solución, es decir, para evitar la formación de dímeros y multímeros (conocidos como agregados de alto peso molecular o APM) con el fin de mantener la eficacia terapéutica constante es conocida en la técnica anterior. El documento WO2011061712 divulga formulaciones de anticuerpos estabilizadas que, además de 25-250 mg/ml de anticuerpo, contienen 10-30 mM de un tampón (preferentemente acetato, succinato, fosfato, histidina o combinaciones de los mismos), 1-15 % de un poliol y también 0,001-0,05 % de un agente humectante. El pH de las composiciones se encuentra entre 5-7,5.

El documento WO2010148337 (A1) ("formulación liofilizada para pequeños productos inmunofarmacéuticos") divulga composiciones conocidas como proteínas inmunofarmacéuticas pequeñas (SMIP, por sus siglas en inglés). Estas son construcciones compuestas de múltiples dominios fusionados, por ejemplo, un dominio de unión a antígeno, una región bisagra de inmunoglobulina y una región C<sub>H</sub>2 o C<sub>H</sub>3 de una molécula de Ig o una región derivada de la misma. Los dominios de las SMIP consisten en polipéptidos que son productos de secuencias génicas que pueden tener un origen humano, no humano o artificial (generados al utilizar procedimientos de diseño genético). Si bien las proteínas SMIP son preferentemente monoespecíficas, la solicitud también divulga variantes multiespecíficas, por ejemplo, moléculas Scorpion. Contienen proteínas SMIP que tienen un dominio de unión adicional en el extremo C-terminal. Los dominios de unión de las moléculas Scorpion se unen preferentemente a diferentes estructuras diana y, por lo tanto, son adecuados como productos terapéuticos inmunoespecíficos. El documento WO2010148337 (A1) divulga formulaciones estables de composiciones liofilizadas que contienen una SMIP, estando presente menos del 7 % de la SMIP en forma agregada. Dichas formulaciones pueden comprender además agentes tamponantes, estabilizadores, agentes de carga, agentes humectantes y excipientes adicionales. El documento WO2009070642 A1 divulga varias formulaciones de la molécula BiTE MT103, el primer dominio de unión del cual se une específicamente al receptor de antígeno de linfocitos T asociado a CD3, mientras que el segundo se une específicamente al antígeno de linfocitos B CD19. Las moléculas BiTE son estables en las composiciones divulgadas hasta una concentración máxima de 300 µg/ml, a un pH de 7,0. El tampón utilizado es citrato. Las formulaciones son adecuadas para administración intravenosa y subcutánea. La biodisponibilidad tras la administración subcutánea es 10-50 %.

Los anticuerpos de IgG tienen grandes regiones constantes (regiones C<sub>H</sub>1-3/C<sub>L</sub>), que son responsables de la mayoría de sus propiedades fisicoquímicas. Los anticuerpos de IgG que tienen una especificidad variable difieren principalmente de manera estructural en la región de los sitios de unión al anticuerpo hipervariables (CDR1-CDR3) en las regiones V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub>. Las diferencias estructurales y fisicoquímicas entre las variantes de IgG individuales son relativamente pequeñas debido a las grandes regiones constantes. Similares a los anticuerpos de IgG, las moléculas SMIP descritas en el documento WO2010148337 (A1) contienen partes del dominio de anticuerpo constante.

En cambio, las moléculas BiTE que tienen una especificidad variable difieren notablemente en sus propiedades fisicoquímicas. Como proteína de fusión compuesta de dos fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) de, en general, diferentes inmunoglobulinas, carecen de las regiones constantes C<sub>H</sub>1-3/C<sub>L</sub>, y de este modo, las diferencias en los dominios de unión a antígeno afectan a secciones mucho más grandes de las moléculas BiTE, que es el caso de los anticuerpos de IgG o SMIP. Del mismo modo, la molécula BiTE MT103 y las moléculas BiTE que se utilizan en la presente invención se diferencian fundamentalmente en su estructura molecular. Aunque los dominios en MT103 se disponen en la secuencia V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>-V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>, la disposición para las moléculas BiTE que se utilizan preferentemente en la presente invención es la de forma V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>. Además, las secuencias de ambas moléculas difieren en numerosas posiciones.

Estas propiedades de las moléculas BiTE y su pequeño tamaño dan lugar a distintas diferencias en el comportamiento fisicoquímico de diferentes moléculas BiTE. Esto se traduce en la necesidad de desarrollar formulaciones individuales (para aumentar la estabilidad fisicoquímica) para cada aplicación individual, ya que las formulaciones de BiTE individuales o moléculas similares no pueden utilizarse, o pueden utilizarse únicamente con limitaciones, para aplicaciones alternativas.

65 En una forma de realización, los polipéptidos presentes en las composiciones son aquellos conocidos como *acopladores biespecíficos de linfocitos T* (BiTE, por sus siglas en inglés). En una forma de realización específica, los

BiTE tienen un primer dominio de unión que se une específicamente a la cadena  $\epsilon$  del complejo receptor de linfocitos T CD3 y un segundo dominio de unión que se une específicamente a un antígeno de membrana específico de próstata (PSMA, por sus siglas en inglés). PSMA es una proteína de membrana tipo II esencial que se expresa en las células epiteliales de la próstata con una alta especificidad y, en caso de cáncer de próstata, con mayor intensidad. Además, PSMA se expresa por vasos sanguíneos formados recientemente de tumores sólidos. PSMA-BiTE media, por consiguiente, el contacto directo entre los linfocitos T citotóxicos y estas células diana.

La formación de agregados de proteínas, por ejemplo, las moléculas BiTE, es indeseable en aplicaciones farmacéuticas; por ejemplo, la eficacia o la disponibilidad de un principio activo biológico puede ser alterada por la formación de agregados.

Esto se traduce en el objetivo de proporcionar una formulación que permite que las moléculas BiTE se estabilicen de tal manera que la formación de agregados no deseada sea suprimida.

La solución se establece en la presente solicitud y en las reivindicaciones y comprende una formulación de BiTE que comprende TRIS y fosfato. En su forma de realización preferida, la formulación comprende fosfato 50 mM, TRIS 100 mM, 0,04 % de polisorbato 80 y 4 % de trehalosa a un pH de 6,0 y es capaz de estabilizar formulaciones con moléculas PSMA-BiTE1 con respecto a la formación de agregados. Esto se aplica a bajas concentraciones en el intervalo de unos pocos  $\mu\text{g/ml}$  y a altas concentraciones de  $>2 \text{ mg/ml}$ . El efecto estabilizante es sorprendente para un experto en la materia, ya que, por ejemplo, el citrato utilizado en el documento WO2009070642 A1, incluso como una combinación de citrato 50 mM y TRIS 100 mM a pH 6,0, no exhibe este efecto. Por ejemplo, la fracción de dímero medida en una composición comparable que contenía solo citrato en lugar de fosfato fue de 7,0 %. Por el contrario, la composición de acuerdo con la invención limitó la fracción de dímero a 0,8 % (cf. tablas 6 y 7). El uso combinado de TRIS y fosfato es responsable del efecto de estabilización de las composiciones. Para estabilizar las moléculas BiTE con respecto a las fuerzas de cizallamiento también se requiere un agente humectante tal como polisorbato 80 en una concentración de al menos 0,04 %, ya que la fracción dimérica será de otro modo demasiado grande (aprox. 7,5 %, véase la tabla 15). Para evitar la adsorción de las moléculas PSMA-BiTE1 en la pared del recipiente de las jeringas para inyección, bolsas de infusión, etc., es suficiente tener sólo 0,002 % de polisorbato 80.

### Definiciones

El término "anticuerpo" utilizado en la presente memoria se refiere a moléculas de inmunoglobulina que comprenden cada una dos cadenas polipeptídicas pesadas (H) y dos ligeras (L) que están conectadas entre sí mediante enlaces disulfuro. Cada cadena pesada consiste en una región variable ( $V_H$ ) y una región constante, que a su vez consiste en tres dominios ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  y  $C_{H3}$ ). Cada una de las cadenas ligeras se compone de una región variable ( $V_L$ ) y una región constante ( $C_L$ ). Las regiones variables de ambas cadenas pesadas y ligeras ( $V_H$  y  $V_L$ ) se subdividen adicionalmente, en cada caso, en tres sitios de unión al anticuerpo hipervariables (CDR1-CDR3) y en conjunto cuatro regiones conservadas entre los CDR (FR1-FR4).

La expresión "anticuerpo monoclonal" describe un anticuerpo que se origina a partir de una población de anticuerpos que son idénticos con la excepción de mutaciones relativamente pequeñas de origen natural o modificaciones postraduccionales. En contraste con los anticuerpos policlonales, que aparecen como parte de la respuesta inmunitaria, los anticuerpos monoclonales se dirigen contra un epítipo específico.

Un anticuerpo "biespecífico" o "bifuncional" es un anticuerpo híbrido, artificial que tiene dos pares diferentes de cadenas pesada y ligera y también dos sitios diferentes de unión al antígeno.

El tratamiento de los anticuerpos con papaína conduce a dos fragmentos Fab de unión al antígeno idénticos y al fragmento Fc cristalizante. Un "fragmento Fab" consiste en una cadena  $V_L$  completa y parte de la cadena pesada, *viz.* el dominio  $V_H$  contiene la región variable y el primer dominio constante  $C_{H1}$ . Cada fragmento Fab tiene así un sitio de unión a antígeno individual. El "fragmento Fc" comprende las partes carboxi-terminales de ambas cadenas pesadas, vinculadas a través de enlaces disulfuro. Las partes del fragmento Fc son reconocidas por receptores Fc de otras células y determinan a través de esto las funciones efectoras de los anticuerpos.

La pepsina escinde anticuerpos por debajo de los enlaces disulfuro, y así los dos fragmentos Fab permanecen conectados a través de la región bisagra y se forma un fragmento "F(ab')<sub>2</sub>" único. Tiene ambos sitios de unión a antígeno y es por lo tanto capaz, al igual que el anticuerpo completo, de reticular antígenos.

El término "dominio" describe una región globular de una proteína con una estructura definida e independientemente plegada. Las cadenas ligeras de un anticuerpo de IgG se componen de dos dominios (en cada caso, de un dominio constante y variable); las cadenas pesadas se componen de cuatro dominios (en cada caso, tres dominios constantes y uno variable). Las dos regiones variables están compuestas cada una de un dominio de la cadena pesada y un dominio de la cadena ligera.

El término "epítipo" o "determinante antigénico" describe el área de un antígeno a la cual un anticuerpo (o el fragmento de unión al antígeno del mismo) se une específicamente. Los epítopos pueden consistir en aminoácidos

sucesivos o en aminoácidos no sucesivos que están en proximidad cercana a uno del otro como resultado del plegamiento de la proteína terciaria.

5 Un "antígeno" es una molécula (por ejemplo, una proteína, polipéptido, péptido, carbohidrato) que tiene un "determinante antigénico" al cual puede unirse un anticuerpo.

El término "conformación" se refiere a la estructura terciaria de una proteína o polipéptido, por ejemplo, un anticuerpo, una cadena de anticuerpos, un dominio o una parte de los mismos.

10 Un anticuerpo que "se une específicamente" a un polipéptido particular o a un epítipo en un polipéptido particular, o es "específico para" esta estructura, se une a estructuras alternativas con una eficacia considerablemente menor.

15 La expresión "anticuerpo scFv" en la presente solicitud se refiere a fragmentos de anticuerpo producidos artificialmente que consisten en dominios  $V_H$  y  $V_L$  unidos covalentemente de un anticuerpo. Ambos dominios están presentes en una cadena polipeptídica sencilla y están conectados entre sí a través de un enlazador de polipéptido compuesto de múltiples aminoácidos. Con la excepción de las funciones efectoras mediadas por Fc, los anticuerpos scFv conservan todas las funciones de un anticuerpo, más particularmente su selectividad y afinidad.

20 Las moléculas de "acopladores biespecíficos de linfocitos T" (BiTE) son construcciones proteicas recombinantes compuestas de dos anticuerpos de cadena sencilla (scFv) conectados con flexibilidad. Uno de dichos anticuerpos scFv se une específicamente a un antígeno tumoral expresado por células diana seleccionado, el segundo se une específicamente a CD3, una subunidad del complejo receptor de linfocitos T en los linfocitos T. Los anticuerpos BiTE son capaces de unir linfocitos T de manera transitoria a las células diana y, a la vez, activar la actividad citolítica de los linfocitos T. La activación mediada por BiTE de los linfocitos T no requiere ni receptores específicos de linfocitos T en los linfocitos T, ni moléculas CMH I, antígenos peptídicos o moléculas coestimuladoras en la célula diana.

25 Los términos "estabilidad" y "estable" en el contexto de los compuestos que contienen la molécula BiTE describen la resistencia de los anticuerpos o sus fragmentos con respecto a la agregación, degradación o fragmentación en condiciones dadas relativas a su producción, preparación, almacenamiento, uso o transporte. Las formulaciones "estables" de acuerdo con la presente invención retienen su actividad biológica en las condiciones de producción preparación, transporte, uso y almacenamiento dadas.

30 Las proteínas presentes en solución (por ejemplo, moléculas BiTE) son sensibles al movimiento mecánico, a medida que ocurre durante la producción, relleno del recipiente y transporte. Por encima de una cierta intensidad de movimiento, las moléculas agregan y/o desnaturalizan. Las composiciones líquidas que contienen proteína se exponen de este modo a lo que se conoce como tensión por agitación durante el movimiento mecánico. En un "ensayo de tensión por agitación", la aplicación controlada de fuerzas (agitación) mecánicas en composiciones líquidas que contienen proteína se utiliza para analizar el comportamiento de agregación y desnaturalización de la proteína disuelta en diferentes composiciones.

40 El comportamiento de una proteína en los ensayos de tensión es una indicación de su estabilidad física con respecto a las fuerzas de cizallamiento, puesto que ocurre, por ejemplo, durante la aspiración y la inyección de soluciones con cánulas.

45 "Liofilización" describe un procedimiento de secado que se basa en el principio de la sublimación. La sustancia a secar se enfría en primer lugar a aproximadamente -45 °C antes de que se aplique posteriormente un vacío y la sustancia se calienta a aproximadamente -20 °C. Como resultado, los cristales de hielo se subliman directamente en el estado gaseoso sin pasar a través de una etapa intermedia líquida. La sustancia secada de esta manera contiene, después de una etapa de secado secundario (aún al vacío) a aproximadamente 25 °C, menos del 5 % de su humedad original y se denomina "liofilizado".

50 Antes de su administración al paciente, el liofilizado es "reconstituido", es decir, disuelto en un diluyente farmacéuticamente aceptable. Una "formulación reconstituida" en el contexto de la presente invención es formada disolviendo una formulación de anticuerpos liofilizada en dicho diluyente. El anticuerpo posteriormente se encuentra en una forma diluida y puede ser administrado al paciente.

60 Los "polioles" describen un grupo de compuestos orgánicos que contienen múltiples grupos hidroxilo (-OH) (polialcohol, alcohol polihídrico). Los polioles tales como sacarosa o trehalosa son azúcares que son capaces de estabilizar anticuerpos y/o influir en la osmolaridad de una composición.

65 Para evitar una degradación o agregación no deseada de proteínas durante la liofilización, se añaden los llamados "lioprotectores". Estos son, por ejemplo, azúcares o alcoholes de azúcar tales como sacarosa, manosa, trehalosa, glucosa, sorbitol, manitol. En el contexto de la presente invención, trehalosa es el lioprotector que se utiliza preferentemente.

La expresión "agente humectante" en la presente memoria se refiere a cualquier detergente que tiene una región

hidrófila e hidrófoba e incluye detergentes no iónicos, catiónicos, aniónicos y zwitteriónicos. Los detergentes utilizables comprenden, por ejemplo, monooleato de sorbitán polioxietileno (también conocido como polisorbato 80 o TWEEN 80), monolaurato de sorbitán polioxietileno (también conocido como polisorbato 20 o TWEEN 20), o N-laurilsarcosina. Para las composiciones divulgadas en la presente memoria, se da preferencia a un agente humectante no iónico. Se da particular preferencia al uso de polisorbato 80 para las composiciones de la presente invención. El agente humectante puede ser utilizado en una concentración de 0,002 % a 0,1 %.

El término "tampón" en la presente memoria describe una solución tamponada, cuyo pH cambia solamente de manera leve después de la adición de sustancias ácidas o alcalinas. Las soluciones tamponadas contienen una mezcla de un ácido débil y su correspondiente base o de una base débil y su correspondiente ácido.

El término "paciente" se refiere a individuos (humanos o animales) que reciben un tratamiento preventivo o terapéutico.

El término "tratamiento" se refiere en la presente memoria al uso o administración de una sustancia terapéutica en/a un paciente, o al uso o administración de una sustancia terapéutica en/a un tejido aislado o en/a o una estirpe celular de un paciente, que padece una enfermedad, que muestra un síntoma de una enfermedad, o tiene una predisposición a una enfermedad, con el objetivo de curar, mejorar, influir, detener o aliviar la enfermedad, sus síntomas o la predisposición a la enfermedad.

La "dosis efectiva" en la presente memoria describe la cantidad de principio activo con el que se puede lograr al menos parcialmente el efecto deseado. Una "dosis terapéuticamente efectiva" se define, por lo tanto, como la cantidad de principio activo que es suficiente al menos parcialmente para curar una enfermedad, o para eliminar al menos parcialmente los efectos adversos en el paciente que son causados por la enfermedad. Las cantidades realmente necesarias para este fin son dependientes de la gravedad de la enfermedad y del estado inmunitario general del paciente.

El término "biodisponibilidad", como se utiliza en este caso, describe el porcentaje de un principio activo o de una dosis del producto medicinal que está disponible sin alteraciones en la circulación sistémica. La biodisponibilidad es por lo tanto un valor medido que indica la rapidez y en qué medida el principio activo se absorbe y está disponible en el sitio de acción. Por definición, los productos medicinales administrados por vía intravenosa tienen una biodisponibilidad del 100 %.

La biodisponibilidad absoluta describe la biodisponibilidad de una sustancia administrada en cualquier forma deseada (no intravenosa) en comparación con la administración intravenosa, mientras que los resultados de biodisponibilidad resultan de una comparación de las biodisponibilidades para formas de dosificación particulares (por ejemplo, oral vs. subcutánea).

Un "compuesto isotónico" tiene substancialmente la misma presión osmótica que la sangre humana. Los compuestos isotónicos tienen en general una presión osmótica de aproximadamente 250 a 350 mOsm. El término "hipotónico" describe composiciones que tienen una presión osmótica inferior a la de la sangre humana, mientras que composiciones "hipertónicas" tienen una presión osmótica superior a la de la sangre humana.

La expresión "agregados de alto peso molecular" (sinónimo: "APM") describe agregados que están compuestos de al menos dos monómeros de proteína.

El término "fosfatos" utilizado en la presente memoria se refiere a sales farmacológicamente seguras solubles en agua del ácido ortofosfórico tribásico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), con preferencia dada a fosfatos primarios (hidrógeno-) y secundarios (dihidrógeno-). Las composiciones de acuerdo con la invención contienen preferentemente fosfatos de sodio, en particular preferentemente hidrogenofosfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ).

#### Descripción detallada

La invención se refiere a la formulación farmacéutica de una molécula de acoplador biespecífico de linfocitos T (BiTE), caracterizada porque comprende tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) y fosfato.

Las moléculas BiTE son conocidas en la técnica anterior. Las moléculas BiTE están diseñadas de tal manera que reclutan transitoriamente los linfocitos T para la lisis de células diana particulares (véase Bäuerle *et al.* Curr Opin Mol Ther. 2009 Feb; 11(1):22-30.). Son especialmente adecuadas para la terapia contra el cáncer.

Una molécula BiTE es un polipéptido que comprende dos dominios de unión a anticuerpo scFv, siendo el primer dominio de unión a scFv capaz de unirse a CD3 épsilon humano y el segundo dominio de unión a scFv se une a un segundo antígeno superficial adicional. Se da preferencia a los antígenos de superficie de células cancerosas humanas. Particularmente, los antígenos de superficie preferentes son proteínas de la superficie humanas de las células cancerosas. Los dominios de unión a scFv pueden comprender fragmentos de anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos. Preferentemente, los dominios de unión a scFv comprenden fragmentos de anticuerpos

humanos o humanizados.

Las moléculas BiTE utilizadas en la presente invención difieren de las moléculas BiTE (por ejemplo, MT103) como se describe, por ejemplo, en el documento WO2009070642 A1 en que el primer dominio de unión puede unirse a un epítipo de la cadena CD3 épsilon de ser humano y *Callithrix jacchus*, *Saguinus oedipus* o *Saimiri sciureus*, en que el epítipo forma parte de una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consta de la SEQ ID NO: 1, 2, 3 y 4 y el epítipo comprende al menos la secuencia de aminoácidos Gln-Asp-Gly-Asn-Glu. Esto tiene la ventaja de que las investigaciones preclínicas se facilitan, ya que, por ejemplo, los estudios farmacocinéticos o toxicológicos pueden llevarse a cabo en los animales de ensayo anteriormente mencionados, cuyo sistema inmunitario es similar al de los seres humanos. Las moléculas BiTE que tienen estas características se divulgan, por ejemplo, en el documento WO2008119566 A2 o en el documento WO2008119567 A2.

En una forma de realización, la composición de acuerdo con la invención comprende por lo tanto moléculas BiTE, el primer dominio de unión del cual se puede unir a un epítipo de la cadena CD3 épsilon de ser humano y *Callithrix jacchus*, *Saguinus oedipus* o *Saimiri sciureus*, en que el epítipo forma parte de una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consta de la SEQ ID NO: 1, 2, 3 y 4 y el epítipo comprende al menos la secuencia de aminoácidos Gln-Asp-Gly-Asn-Glu.

La SEQ ID NO: 5 muestra la secuencia de aminoácidos de un dominio de unión a scFv que cumple con los criterios anteriores.

En una forma de realización preferida, el primer dominio de unión del polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos reproducida en la SEQ ID NO: 5.

scFv comprenden los aminoácidos de una cadena ligera variable (VL) y pesada variable (VH) de anticuerpos. Las moléculas BiTE pueden construirse con diferente orientación. La molécula BiTE MT103 tiene, por ejemplo, una disposición de dominio de unión 2 (VH-VL)-dominio de unión 1 (VH-VL) del scFv.

Otras orientaciones también son posibles, por ejemplo, dominio de unión 2 (VH-VL)-dominio de unión 1 (VH-VL).

En una forma de realización preferida, el polipéptido tiene la disposición dominio de unión 2 (VH-VL)-dominio de unión 1 (VH-VL).

En una forma de realización particularmente preferida, el polipéptido tiene la disposición dominio de unión 2 (VH-VL)-dominio de unión 1 (VH-VL), y el dominio de unión 1 (VH-VL) comprende la secuencia de aminoácidos reproducida en la SEQ ID NO: 5.

Una forma de realización de la presente invención es una composición farmacéutica líquida, caracterizada porque el segundo dominio de unión puede unirse a un antígeno de superficie celular. Un antígeno de superficie celular es un antígeno que puede unirse por medio de una proteína de unión, por ejemplo, un anticuerpo o un scFv, sin que la célula tenga que lisarse.

Una forma de realización de la presente invención es una composición farmacéutica líquida, caracterizada porque el segundo dominio de unión del polipéptido puede unirse a un antígeno de superficie de una célula cancerosa.

En una forma de realización adicional, el segundo dominio de unión del polipéptido se une al antígeno de membrana de próstata específico del antígeno de superficie humano (PSMA, SWISS-PROT: FOLH1\_HUMAN, n.º de acceso: Q04609). Dichas moléculas BiTE se describen, por ejemplo, en el documento WO2010037836 A2.

La SEQ ID NO: 6 describe un dominio de unión que se une a PSMA.

En una forma de realización preferida, el segundo dominio de unión del polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos reproducida en la SEQ ID NO: 6.

Una forma de realización de la presente invención es una composición farmacéutica líquida que comprende un polipéptido que comprende un primer y un segundo dominio de unión a scFv, y el primer dominio de unión comprende la secuencia de aminoácidos reproducida en la SEQ ID NO: 5, caracterizada porque la composición comprende además TRIS y fosfato.

Una forma de realización de la presente invención es una composición farmacéutica líquida, caracterizada porque los dominios de unión del polipéptido comprenden fragmentos de anticuerpo a scFv humano o humanizado.

Una forma de realización de la presente invención es una composición farmacéutica líquida, caracterizada porque el segundo dominio de unión que se une a PSMA comprende la secuencia de aminoácidos reproducida en la SEQ ID NO: 6.

En una forma de realización, el polipéptido comprende las secuencias de aminoácidos del primer y segundo dominio de unión codificado por las secuencias reproducidas en la SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6.

Un polipéptido que comprende las secuencias reproducidas en SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 se reproduce en SEQ ID NO: 7 o en SEQ ID NO: 8.

Un polipéptido particularmente preferido es la molécula PSMA-BiTE 1, que es codificada por la secuencia de aminoácidos reproducida en SEQ ID NO: 8.

Se divulga adicionalmente una composición farmacéutica líquida que comprende un polipéptido, TRIS y fosfato, con el polipéptido comprendido en la secuencia de aminoácidos reproducida en SEQ ID NO: 7.

Una forma de realización particularmente preferida de la presente invención es una composición farmacéutica líquida que comprende un polipéptido, TRIS y fosfato, con el polipéptido comprendido en la secuencia de aminoácidos reproducida en SEQ ID NO: 8.

Se divulgan adicionalmente composiciones que comprenden aproximadamente 0,5 µg/ml, aproximadamente 0,7 µg/ml, aproximadamente 1 µg/ml, aproximadamente 2 µg/ml, aproximadamente 5 µg/ml, aproximadamente 6 µg/ml, aproximadamente 10 µg/ml, aproximadamente 15 µg/ml, aproximadamente 18 µg/ml, aproximadamente 20 µg/ml, aproximadamente 25 µg/ml, aproximadamente 30 µg/ml, aproximadamente 30 µg/ml, aproximadamente 35 µg/ml, aproximadamente 40 µg/ml, aproximadamente 45 µg/ml, aproximadamente 50 µg/ml, aproximadamente 55 µg/ml, aproximadamente 60 µg/ml, aproximadamente 70 µg/ml, aproximadamente 80 µg/ml, aproximadamente 90 µg/ml, aproximadamente 100 µg/ml, aproximadamente 110 µg/ml, aproximadamente 120 µg/ml, aproximadamente 130 µg/ml, aproximadamente 140 µg/ml, aproximadamente 150 µg/ml, aproximadamente 160 µg/ml, aproximadamente 170 µg/ml, aproximadamente 180 µg/ml, aproximadamente 190 µg/ml, aproximadamente 200 µg/ml, aproximadamente 225 µg/ml, aproximadamente 275 µg/ml, aproximadamente 300 µg/ml, aproximadamente 325 µg/ml, aproximadamente 350 µg/ml, aproximadamente 375 µg/ml, aproximadamente 400 µg/ml, aproximadamente 500 µg/ml, aproximadamente 700 µg/ml, aproximadamente 900 µg/ml, o aproximadamente 1.000 µg/ml de los polipéptidos mencionados anteriormente.

Se divulgan adicionalmente composiciones que comprenden 0,5 µg/ml, 0,7 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 5 µg/ml, 6 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml, 18 µg/ml, 20 µg/ml, 25 µg/ml, 30 µg/ml, 30 µg/ml, 35 µg/ml, 40 µg/ml, 45 µg/ml, 50 µg/ml, 55 µg/ml, 60 µg/ml, 70 µg/ml, 80 µg/ml, 90 µg/ml, 100 µg/ml, 110 µg/ml, 120 µg/ml, 130 µg/ml, 140 µg/ml, 150 µg/ml, 160 µg/ml, 170 µg/ml, 180 µg/ml, 190 µg/ml, 200 µg/ml, 225 µg/ml, 275 µg/ml, 300 µg/ml, 325 µg/ml, 350 µg/ml, 375 µg/ml, 400 µg/ml, 500 µg/ml, 700 µg/ml, 900 µg/ml, o 1.000 µg/ml de las moléculas BiTE.

Se divulgan adicionalmente composiciones que comprenden aproximadamente 1 mg/ml, aproximadamente 1,3 mg/ml, aproximadamente 1,5 mg/ml, aproximadamente 1,8 mg/ml, aproximadamente 2 mg/ml, aproximadamente 2,3 mg/ml, aproximadamente 2,5 mg/ml, aproximadamente 2,8 mg/ml, o aproximadamente 3 mg/ml de las moléculas BiTE.

Se divulgan adicionalmente composiciones que comprenden aproximadamente 1 mg/ml, 1,3 mg/ml, 1,5 mg/ml, 1,8 mg/ml, 2 mg/ml, 2,3 mg/ml, 2,5 mg/ml, 2,8 mg/ml, o 3 mg/ml de las moléculas BiTE.

Se divulga adicionalmente una composición que comprende aproximadamente 0,5 µg/ml a aproximadamente 1 µg/ml, de aproximadamente 1 µg/ml a aproximadamente 5 µg/ml, de aproximadamente 5 µg/ml a aproximadamente 10 µg/ml, de aproximadamente 10 µg/ml a aproximadamente 20 µg/ml, de aproximadamente 20 µg/ml a aproximadamente 50 µg/ml, de aproximadamente 50 µg/ml a aproximadamente 90 µg/ml, de aproximadamente 90 µg/ml a aproximadamente 120 µg/ml, de aproximadamente 120 µg/ml a aproximadamente 150 µg/ml, de aproximadamente 150 µg/ml a aproximadamente 180 µg/ml, de aproximadamente 180 µg/ml a aproximadamente 200 µg/ml, de aproximadamente 200 µg/ml a aproximadamente 250 µg/ml, de aproximadamente 250 µg/ml a aproximadamente 280 µg/ml, de aproximadamente 280 µg/ml a aproximadamente 300 µg/ml, o de aproximadamente 300 µg/ml a aproximadamente 350 µg/ml de las moléculas BiTE.

Se divulga adicionalmente una composición que comprende de 0,5 µg/ml a 1 µg/ml, de 1 µg/ml a 5 µg/ml, de 5 µg/ml a 10 µg/ml, de 10 µg/ml a 20 µg/ml, de 20 µg/ml a 50 µg/ml, de 50 µg/ml a 90 µg/ml, de 90 µg/ml a 120 µg/ml, de 120 µg/ml a 150 µg/ml, de 150 µg/ml a 180 µg/ml, de 180 µg/ml a 200 µg/ml, de 200 µg/ml a 250 µg/ml, de 250 µg/ml a 280 µg/ml, de 280 µg/ml a 300 µg/ml, o de 300 µg/ml a 350 µg/ml de las moléculas BiTE.

Se divulga adicionalmente una composición que comprende aproximadamente 350 µg/ml a aproximadamente 1 mg/ml, de aproximadamente 350 µg/ml a aproximadamente 1,3 mg/ml, de aproximadamente 350 µg/ml a aproximadamente 1,5 mg/ml, de aproximadamente 350 µg/ml a aproximadamente 1,8 mg/ml, de aproximadamente 350 µg/ml a aproximadamente 2 mg/ml, de aproximadamente 350 µg/ml a aproximadamente 2,3 mg/ml, de aproximadamente 350 µg/ml a aproximadamente 2,5 mg/ml, de aproximadamente 350 µg/ml a aproximadamente 2,8 mg/ml, o de aproximadamente 350 µg/ml a aproximadamente 3,0 mg/ml de las moléculas BiTE.

Se divulga adicionalmente una composición que comprende de 350 µg/ml a 1 mg/ml, de 350 µg/ml a 1,3 mg/ml, de 350 µg/ml a 1,5 mg/ml, de 350 µg/ml a 1,8 mg/ml, de 350 µg/ml a 2 mg/ml, de 350 µg/ml a 2,3 mg/ml, de 350 µg/ml a 2,5 mg/ml, de 350 µg/ml a 2,8 mg/ml, o de 350 µg/ml a 3,0 mg/ml de las moléculas BiTE.

- 5 En una forma de realización adicional, la composición de acuerdo con la invención comprende de 0,5 µg/ml a 3,0 mg/ml de las moléculas BiTE.

- 10 Se divulga adicionalmente una composición que comprende de aproximadamente 0,5 µg/ml a aproximadamente 3,0 mg/ml, de aproximadamente 0,5 µg/ml a aproximadamente 2,8 mg/ml, de aproximadamente 0,5 µg/ml a aproximadamente 2,5 mg/ml, de aproximadamente 0,5 µg/ml a aproximadamente 2,3 mg/ml, de aproximadamente 0,5 µg/ml a aproximadamente 2,0 mg/ml, de aproximadamente 0,5 µg/ml a aproximadamente 1,8 mg/ml, de aproximadamente 0,5 µg/ml a aproximadamente 1,5 mg/ml, de aproximadamente 0,5 µg/ml a aproximadamente 1,3 mg/ml, de aproximadamente 0,5 µg/ml a aproximadamente 1,0 mg/ml, de aproximadamente 0,5 µg/ml a aproximadamente 350 µg/ml, de aproximadamente 0,5 µg/ml a aproximadamente 300 µg/ml, de aproximadamente 0,5 µg/ml a aproximadamente 250 µg/ml de las moléculas BiTE.

En una forma de realización particularmente preferida, la composición de acuerdo con la invención comprende aproximadamente 2 mg/ml de los polipéptidos de acuerdo con la invención.

- 20 En una forma de realización adicional, la composición de acuerdo con la invención comprende una combinación de tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) y fosfato como agentes de tamponamiento que influyen en el pH.

En una forma de realización preferida, la composición de acuerdo con la invención comprende TRIS en una concentración de aproximadamente 100 mM.

- 25 En una forma de realización preferida, la composición de acuerdo con la invención comprende TRIS en una concentración de 100 mM.

- 30 En una forma de realización preferida, la composición de acuerdo con la invención comprende fosfato en una concentración de aproximadamente 50 mM.

En una forma de realización preferida, la composición de acuerdo con la invención comprende fosfato en una concentración de 50 mM.

- 35 En una forma de realización preferida, la composición de acuerdo con la invención comprende aproximadamente 2 mg/ml de los polipéptidos de acuerdo con la invención y TRIS en una concentración de 100 mM y fosfato en una concentración de 50 mM.

- 40 En una forma de realización preferida, la composición de acuerdo con la invención comprende aproximadamente 2 mg/ml de los polipéptidos de acuerdo con la invención y fosfato en una concentración de aproximadamente 50 mM.

En una forma de realización preferida, la composición de acuerdo con la invención comprende aproximadamente 2 mg/ml de los polipéptidos de acuerdo con la invención y fosfato en una concentración de 50 mM.

- 45 En una forma de realización preferida, la composición de acuerdo con la invención comprende aproximadamente 2 mg/ml de los polipéptidos de acuerdo con la invención y TRIS en una concentración de aproximadamente 100 mM y fosfato en una concentración de aproximadamente 50 mM.

- 50 En una forma de realización preferida, la composición de acuerdo con la invención comprende aproximadamente 2 mg/ml de los polipéptidos de acuerdo con la invención y TRIS en una concentración de aproximadamente 100 mM y fosfato en una concentración de 50 mM.

- 55 En una forma de realización preferida, la composición de acuerdo con la invención comprende aproximadamente 2 mg/ml de los polipéptidos de acuerdo con la invención y fosfato en una concentración de aproximadamente 50 mM y TRIS en una concentración de aproximadamente 100 mM.

En una forma de realización preferida, la composición de acuerdo con la invención comprende aproximadamente 2 mg/ml de los polipéptidos de acuerdo con la invención y fosfato en una concentración de aproximadamente 50 mM y TRIS en una concentración de 100 mM.

- 60 En una forma de realización preferida, el pH de la composición de acuerdo con la invención se encuentra en un intervalo de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 7,0 o en un intervalo de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,5. De manera particular, preferentemente, el pH de la composición de acuerdo con la invención es 6,0. Preferentemente, el pH de la composición de acuerdo con la invención se ajusta utilizando HCl.

- 65 En una forma de realización adicional, la composición de acuerdo con la invención comprende además un agente

- humectante. Ejemplos de agentes humectantes son agentes humectantes no iónicos, tales como polisorbato (por ejemplo, polisorbato 20 u 80); poloxámeros (por ejemplo, poloxámero 188); Triton; glucósido de octilo de sodio; laurilo, miristilo, linoleilo, o estearil sulfobetaina; lauroilsarcosina, miristoilsarcosina, linoleoilsarcosina, o estearoilsarcosina; linoleilo, miristilo, o cetil betaína; lauroamidopropilo, cocamidopropilo, linoleamidopropilo, miristamidopropilo, palmitamidopropilo, o isoestearamidopropil betaína; polietilenglicol; polipropilenglicol; y copolímeros de etilen y propilenglicol (por ejemplo, Pluronic, PF68). En una forma de realización preferida, el agente humectante es polisorbato 80.
- Se divulga adicionalmente una composición que comprende un agente humectante en una concentración de 0,002 % a 0,1 %, preferentemente de 0,04 % a 0,1 %.
- Se divulga adicionalmente una composición que comprende polisorbato 80 en una concentración de 0,002 % a 0,1 %, preferentemente de 0,04 % a 0,1 %. De manera particular, preferentemente, la composición de acuerdo con la invención comprende polisorbato 80 en una concentración de 0,04 %.
- En una forma de realización adicional, la composición de acuerdo con la invención comprende adicionalmente un lioprotector. En una forma de realización adicional, la composición de acuerdo con la invención comprende adicionalmente un azúcar o un alcohol de azúcar como lioprotector. El lioprotector es preferentemente trehalosa. En una forma de realización preferida, la composición de acuerdo con la invención comprende el lioprotector en una concentración de 2 % a 10 %, de manera particular, preferentemente 4 %.
- En una forma de realización preferida, la composición de acuerdo con la invención comprende trehalosa en una concentración de 2 % a 10 %, de manera particular, preferentemente 4 %.
- Se divulgan composiciones que comprenden de aproximadamente 0,5 µg/ml a aproximadamente 2 mg/ml de las moléculas PSMA-BiTE1 y TRIS en una concentración de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 200 mM, fosfato en una concentración de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 100 mM, polisorbato 80 en una concentración de 0,04 % y trehalosa en una concentración de 4 % y que tiene un pH de 6,0.
- Se divulgan adicionalmente composiciones que comprenden de aproximadamente 0,5 µg/ml a aproximadamente 2 mg/ml de las moléculas PSMA-BiTE1 y TRIS en una concentración de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 200 mM, fosfato en una concentración de aproximadamente 50 mM, polisorbato 80 en una concentración de 0,04 % y trehalosa en una concentración de 4 % y que tiene un pH de 6,0.
- Se divulga adicionalmente una composición que comprenden de aproximadamente 0,5 µg/ml a aproximadamente 2 mg/ml de las moléculas PSMA-BiTE1 y TRIS en una concentración de aproximadamente 100 mM, fosfato en una concentración de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 100 mM, polisorbato 80 en una concentración de 0,04 % y trehalosa en una concentración de 4 % y que tiene un pH de 6,0.
- Se divulga adicionalmente una composición de acuerdo con la invención que comprende de aproximadamente 50 µg/ml a aproximadamente 2 mg/ml de las moléculas PSMA-BiTE1 y TRIS en una concentración de aproximadamente 100 mM, fosfato en una concentración de aproximadamente 50 mM, polisorbato 80 en una concentración de 0,04 % y trehalosa en una concentración de 4 % y que tiene un pH de 6,0.
- Se divulga adicionalmente una composición que comprende de aproximadamente 50 µg/ml a aproximadamente 1 mg/ml de las moléculas PSMA-BiTE1 y TRIS en una concentración de aproximadamente 100 mM, fosfato en una concentración de aproximadamente 50 mM, polisorbato 80 en una concentración de 0,04 % y trehalosa en una concentración de 4 % y que tiene un pH de 6,0.
- Se divulga adicionalmente una composición que comprende de aproximadamente 100 µg/ml a 500 µg/ml de las moléculas PSMA-BiTE1 y TRIS en una concentración de aproximadamente 100 mM, fosfato en una concentración de aproximadamente 50 mM, polisorbato 80 en una concentración de 0,04 % y trehalosa en una concentración de 4 % y que tiene un pH de 6,0.
- Preferentemente, la composición de acuerdo con la invención comprende aproximadamente 2 mg/ml de las moléculas PSMA-BiTE1 y TRIS en una concentración de aproximadamente 100 mM, fosfato en una concentración de aproximadamente 50 mM, polisorbato 80 en una concentración de 0,04 % y trehalosa en una concentración de 4 % y que tiene un pH de 6,0.
- Preferentemente, la composición de acuerdo con la invención comprende aproximadamente 2 mg/ml de las moléculas PSMA-BiTE1 y TRIS en una concentración de aproximadamente 100 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> en una concentración de 50 mM, polisorbato 80 en una concentración de 0,04 % y trehalosa en una concentración de 4 % y que tiene un pH de 6,0.
- Las concentraciones indicadas en porcentaje (%) se refieren a la concentración en masa (m/v).

Además, las composiciones de acuerdo con la invención pueden contener aditivos aún más farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences; 18th edition, Mack Publishing Co., Easton, Pa., USA). Dichos aditivos son, por ejemplo, conservantes o antioxidantes. Los antioxidantes que se pueden utilizar son, por ejemplo, ascorbato, metionina, vitamina E, o metabisulfito de sodio. Los conservantes son, por ejemplo, sustancias que suprimen o retardan el crecimiento de microorganismos. Dicha sustancia es, por ejemplo, tiomersal.

Una forma de realización de la presente invención es una mezcla de sólidos que se produce por liofilización de la composición de acuerdo con la invención, o al menos se puede obtener por liofilización de dicha composición.

Una forma de realización preferida de la presente invención en un liofilizado que puede obtenerse por liofilización de una composición de acuerdo con la invención.

Una forma de realización preferida de la presente invención en un liofilizado producido por liofilización de una composición de acuerdo con la invención de conformidad con el protocolo descrito en el ejemplo 16.

En una forma de realización adicional, la composición de acuerdo con la invención se proporciona mediante la reconstitución de la mezcla de sólidos liofilizados por disolución en un medio líquido adecuado.

En una forma de realización preferida, la composición de acuerdo con la invención se proporciona mediante la reconstitución de la mezcla de sólidos liofilizados por disolución en agua, preferentemente en agua estéril.

Un tema adicional de la invención es un producto que contiene una de las composiciones de acuerdo con la invención y preferentemente también instrucciones para su uso. En una forma de realización, el producto comprende un recipiente que contiene una de las composiciones enumeradas anteriormente. Los recipientes útiles son, por ejemplo, botellas, viales, tubos o jeringas. Los recipientes pueden, por ejemplo, estar compuestos de vidrio o plástico. Las jeringas pueden comprender una aguja de inyección compuesta, por ejemplo, de metal.

En una forma de realización, el recipiente es una jeringa. En una forma de realización adicional, la jeringa está contenida en un dispositivo de inyección. En una forma de realización preferida, el dispositivo de inyección es un autoinyector. Un autoinyector puede ser descrito como un instrumento de inyección que, tras la activación, administra sus contenidos sin manipulación adicional por parte del paciente u otra persona. En la presente invención, la administración es preferentemente subcutánea.

Las composiciones de acuerdo con la invención exhiben una estabilidad aumentada y una biodisponibilidad aumentada significativamente en comparación con las formulaciones disponibles en la técnica anterior para las moléculas BITE. Debido a este perfil de la propiedad, las composiciones de acuerdo con la invención son especialmente adecuadas para administración parenteral. La administración parenteral incluye, entre otras cosas, inyección o infusión intravenosa, inyección o infusión intraarterial (en una arteria), inyección intramuscular, inyección intratecal, inyección subcutánea, inyección o infusión intraperitoneal, administración o inyección intraósea en un tejido. Las composiciones de acuerdo con la invención son especialmente adecuadas para la administración subcutánea. Una forma de realización de la composición de acuerdo con la invención se caracteriza porque la biodisponibilidad del polipéptido después de la administración subcutánea de la composición es > 60 %.

Las composiciones de acuerdo con la invención tienen valiosas propiedades farmacológicas y pueden utilizarse para la prevención y el tratamiento de enfermedades en humanos y animales.

Las composiciones de acuerdo con la invención son adecuadas en general para el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas en los seres humanos y en mamíferos. Las enfermedades hiperproliferativas, para el tratamiento de las cuales es posible utilizar las composiciones de acuerdo con la invención, pertenecen en particular al grupo de enfermedades cancerígenas y tumorales. En el contexto de la presente invención, por estas se entienden especialmente las siguientes enfermedades, pero sin ninguna limitación a las mismas: carcinomas mamarios y tumores mamarios (formas ductales y lobulares, también *in situ*), tumores de las vías respiratorias (carcinoma de células pequeñas y de células no pequeñas, carcinoma bronquial), tumores cerebrales (por ejemplo, del tronco encefálico y del hipotálamo, astrocitoma, meduloblastoma, ependimoma y tumores neuro-ectodérmicos y pineales), tumores de los órganos digestivos (esófago, estómago, vesícula biliar, intestino delgado, intestino grueso, recto), tumores del hígado (entre otras cosas, carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma y conlangiocarcinoma hepatocelular combinados), tumores de la región de cabeza y cuello (laringe, hipofaringe, nasofaringe, orofaringe, labios y cavidad oral), tumores de piel (carcinoma de célula escamosas, sarcoma de Kaposi, melanoma maligno, cáncer de piel de células de Merkel y cáncer de piel no melanomatoso), tumores de los tejidos blandos (entre otras cosas, sarcomas de tejidos blandos, osteosarcomas, fibrohistiocitomas malignos, linfosarcomas y rabdomiosarcomas), tumores de los ojos (entre otros, melanoma intraocular y retinoblastoma), tumores de las glándulas endocrinas y exocrinas (por ejemplo, glándulas tiroideas y paratiroides, páncreas y glándulas salivares), tumores del tracto urinario (tumores de la vejiga, pene, riñón, pelvis renal y uréter) y los tumores de los órganos reproductivos (carcinomas de endometrio, cuello uterino, ovario, vaginal, vulva y el útero en mujeres y los carcinomas de la próstata y los testículos en hombres). Estos también incluyen enfermedades proliferativas de la sangre en forma sólida y como células sanguíneas circulantes, tales como linfomas, leucemias y enfermedades

mieloproliferativas, por ejemplo, mielóide aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfocítica crónica, mielógena crónica y de células pilosas, y linfomas relacionados con el SIDA, linfomas de Hodgkin, linfomas no Hodgkin, linfomas cutáneos de linfocitos T, linfomas de Burkitt y los linfomas en el sistema central nervioso.

- 5 Las enfermedades preferidas, para el tratamiento de las cuales es posible utilizar las composiciones de acuerdo con la invención, son carcinomas y/o metástasis que expresan el antígeno PSMA.

Una enfermedad particularmente preferida, para el tratamiento de la cual es posible utilizar las composiciones de acuerdo con la invención, se selecciona de entre el grupo que consiste en carcinoma de próstata, metástasis ósea del carcinoma de próstata y metástasis de tejidos blandos del carcinoma de próstata.

Otra enfermedad particularmente preferida, para el tratamiento de la cual es posible utilizar las composiciones de acuerdo con la invención, es carcinoma de próstata.

- 15 Estas enfermedades bien descritas en los seres humanos también pueden desarrollarse con una etiología comparable en otros mamíferos y pueden ser tratadas con las composiciones de la presente invención. En el contexto de esta invención, el término "tratamiento" o "tratar" se utiliza en el sentido convencional y los medios que se ocupan de, cuidar y atender a un paciente con el objetivo de combatir, reducir, atenuar o aliviar una enfermedad o una anomalía de salud, y mejorar la calidad de vida deteriorada por esta enfermedad, como, por ejemplo, en el caso del cáncer.

Un tema adicional de la presente invención es, por consiguiente, el uso de composiciones de acuerdo con la invención para el tratamiento y/o prevención de enfermedades, más particularmente, las enfermedades antes mencionadas.

25 Un tema adicional de la presente invención es el uso de composiciones de acuerdo con la invención para la producción de un producto medicinal para el tratamiento y/o prevención de enfermedades, más particularmente, las enfermedades antes mencionadas.

30 Un tema adicional de la presente invención es el uso de las composiciones de acuerdo con la invención en un procedimiento de tratamiento y/o prevención de enfermedades, más particularmente, las enfermedades antes mencionadas.

35 Un tema adicional de la presente invención es un procedimiento de tratamiento y/o prevención de enfermedades, más particularmente las enfermedades mencionadas anteriormente, utilizando una cantidad efectiva de una de las composiciones de acuerdo con la invención.

En una forma de realización preferente, el tratamiento y/o la prevención es la administración parenteral de la composición de acuerdo con la invención. Se da particular preferencia a la administración subcutánea.

40 Las composiciones de acuerdo con la invención pueden utilizarse solas o, si es necesario, en combinación con una o más sustancias farmacológicamente activas, siempre que esta combinación no conduzca a efectos secundarios indeseables e inaceptables. Un tema adicional de la presente invención son los productos medicinales que contienen al menos una de las composiciones de acuerdo con la invención y uno o más principios activos, especialmente para el tratamiento o la prevención de las enfermedades antes mencionadas. Por ejemplo, los compuestos de la presente invención se pueden combinar con sustancias conocidas anti-hiperproliferativas, citostáticas o citotóxicas para el tratamiento de enfermedades oncológicas.

50 Un tema adicional de la presente invención es el uso de las composiciones mencionadas anteriormente en un procedimiento terapéutico, siendo la composición adecuada para formas de administración parenteral, tales como inyección o infusión intravenosa, inyección o infusión intraarterial (en una arteria), inyección intramuscular, inyección intratecal, inyección subcutánea, inyección o infusión intraperitoneal, administración intraósea o inyección en un tejido.

55 Un tema adicional de la presente invención es el uso de las composiciones mencionadas anteriormente en un procedimiento para el tratamiento terapéutico de enfermedades proliferativas de células de la próstata.

60 Un tema adicional de la presente invención es el uso de las composiciones mencionadas anteriormente en un procedimiento para el tratamiento terapéutico de enfermedades proliferativas de células de la próstata, al ser adecuada la composición para la administración subcutánea.

Un tema adicional de la presente invención es el uso de las composiciones mencionadas anteriormente en un procedimiento de tratamiento terapéutico de enfermedades de proliferación celular de la próstata, la composición se administra por administración subcutánea.

65 Un tema adicional de la presente invención es un procedimiento de estabilización de polipéptidos, que comprende la producción de una de las composiciones mencionadas anteriormente, que contiene, además de los polipéptidos, al

menos TRIS y fosfato y tiene un pH de 6,0.

Un tema adicional de la presente invención es un kit que comprende las composiciones mencionadas anteriormente.

- 5 Los compuestos preferidos en el contexto de la presente invención son compuestos farmacéuticos.

#### Formas de realización

- 10 Una forma de realización de la presente invención comprende una composición farmacéutica líquida que comprende un polipéptido, TRIS y fosfato, el polipéptido comprende dos dominios de unión al anticuerpo scFv, el primer dominio de unión a scFv es capaz de unirse a un CD3 épsilon humano.

15 En una forma de realización adicional de la composición, el segundo dominio de unión del polipéptido puede unirse a un antígeno de superficie celular.

En una forma de realización adicional de la composición, el polipéptido comprende un segundo dominio de unión que puede unirse a un antígeno de superficie de una célula cancerosa.

20 En una forma de realización adicional, el antígeno de superficie al que se une el segundo dominio de unión del polipéptido es el antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA).

En una forma de realización adicional de la composición, el polipéptido tiene la disposición dominio de unión 2 (VH-VL)-dominio de unión (VH-VL).

25 En una forma de realización adicional de la composición, el primer dominio de unión del polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos reproducida en la SEQ ID NO: 5.

30 En una forma de realización adicional de la composición, el segundo dominio de unión que se une a PSMA del polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos reproducida en la SEQ ID NO: 6.

En una forma de realización adicional, la composición comprende un polipéptido, TRIS y fosfato, el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos reproducida en la SEQ ID NO: 8.

35 En una forma de realización adicional, la composición contiene el polipéptido en una concentración de 0,5 µg/ml a 3,0 mg/ml.

En una forma de realización adicional, la composición contiene el polipéptido en una concentración de aproximadamente 2 mg/ml.

40 En una forma de realización adicional, la composición contiene TRIS 100 mM y fosfato 50 mM.

En una forma de realización adicional, el pH de la composición está dentro de un intervalo de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 7,0.

45 En una forma de realización adicional, el pH de la composición es aproximadamente 6,0.

En una forma de realización adicional, el pH de la composición se ajusta utilizando ácido clorhídrico.

En una forma de realización adicional, la composición contiene adicionalmente un agente humectante.

50 En una forma de realización adicional, el agente humectante es polisorbato 80.

En una forma de realización adicional, la composición contiene adicionalmente 0,04 % de polisorbato 80.

55 En una forma de realización adicional, la composición contiene adicionalmente un lioprotector.

En una forma de realización adicional, la composición contiene trehalosa como lioprotector.

En una forma de realización adicional, la composición contiene adicionalmente de 4 % a 10 % de trehalosa.

60 En una forma de realización adicional, la composición contiene adicionalmente de manera aproximada 4 % de trehalosa.

En una forma de realización de la presente invención comprende una mezcla de sólidos que se puede obtener por liofilización de la composición líquida.

65 En una forma de realización adicional, la composición se reconstituye mediante la disolución de la mezcla de sólidos

lío filizados de acuerdo con la reivindicación 43 en un medio líquido apropiado.

En una forma de realización adicional, la biodisponibilidad del polipéptido tras la administración subcutánea de la composición es > 60 %.

En una forma de realización adicional, la composición se utiliza en un procedimiento terapéutico.

En una forma de realización adicional, la composición se utiliza en un procedimiento terapéutico, comprendiendo dicho procedimiento la administración parenteral de la composición.

En una forma de realización adicional, la composición se utiliza en un procedimiento de tratamiento terapéutico de enfermedades hiperproliferativas.

En una forma de realización adicional, la composición se utiliza en un procedimiento de tratamiento terapéutico de enfermedades hiperproliferativas de la próstata.

En una forma de realización adicional, la composición se utiliza en un procedimiento de tratamiento terapéutico de enfermedades hiperproliferativas de la próstata, comprendiendo el procedimiento la administración subcutánea de la composición.

En una forma de realización adicional, la presente invención comprende un procedimiento de estabilización de polipéptidos, que comprende la producción de una composición que contiene, además de los polipéptidos, al menos TRIS y fosfato y tiene un pH de 6,0.

En una forma de realización adicional, la presente invención comprende un kit que comprende la composición descrita anteriormente.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1: Identificación sistemática por tampón con el fin de mejorar la estabilidad térmica de las moléculas PSMA-BiTE1

La fluorimetría de barrido diferencial (FBD) se utilizó para medir el punto medio de fusión ( $T_{m1}$ ) del dominio de proteína PSMA-BiTE1 con el peso molecular más bajo en diferentes sistemas tampón. Es una medida de la estabilidad de la proteína examinada en los diversos sistemas tampón: cuanto mayor es el valor de  $T_m$ , también, será mayor, la estabilidad térmica de la proteína. Cuanto mayor sea la estabilidad térmica de una proteína, mejor es su idoneidad para la producción de formulaciones farmacéuticas estables.

Para la identificación sistemática por tampón, se utilizaron tampones estándar en un intervalo de pH 5,0 a 8,0. La concentración de PSMA-BiTE1 de las formulaciones producidas fue de aproximadamente 0,2 mg/ml. El punto medio de fusión fue comprobado por el procedimiento FBD.

Tabla 1: PSMA-BiTE1 (0,2 mg/ml) en varios sistemas tampón (50 mM)

| pH  | $Na_2HPO_4$<br>[°C] | $T_{m1}$ | Citrato<br>[°C] | $T_{m1}$ | Histidina<br>[°C] | $T_{m1}$ | Glicina<br>[°C] | $T_{m1}$ | Lisina<br>[°C] | $T_{m1}$ |
|-----|---------------------|----------|-----------------|----------|-------------------|----------|-----------------|----------|----------------|----------|
| 5,0 | 61,2                |          | 63,6            |          | -                 |          | -               |          | -              |          |
| 5,5 | 63,5                |          | 63,1            |          | 60,8              |          | -               |          | -              |          |
| 6,0 | 63,4                |          | 63,5            |          | 61,4              |          | 60,2            |          | 61,6           |          |
| 6,5 | 63,8                |          | 64,6            |          | 60,7              |          | 58,7            |          | 61,5           |          |
| 7,0 | 63,3                |          | -               |          | 60,4              |          | 60,7            |          | 61,4           |          |
| 7,5 | 63,1                |          | -               |          | 57,7              |          | 61,4            |          | 61,4           |          |
| 8,0 | 63,0                |          | -               |          | 59,3              |          | -               |          | -              |          |

Los sistemas tampón basados en citrato y  $Na_2HPO_4$  exhibieron un efecto positivo con respecto al aumento del punto de fusión del dominio de la proteína PSMA-BiTE1. Los efectos positivos de citrato y  $Na_2HPO_4$  se supervisaron en otros experimentos. Los tampones a base de tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) solo no condujeron a un aumento distinto en el punto de fusión de la proteína (tabla 2).

Tabla 2: PSMA-BiTE1 (0,2 mg/ml) en diversos sistemas tampón (50 mM) (continuación de la Tabla 1)

| pH  | HEPES $T_{m1}$ [°C] | TRIS $T_{m1}$ [°C] | MOPS $T_{m1}$ [°C] | Acetato $T_{m1}$ [°C] |
|-----|---------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|
| 6,5 | -                   | 61,7               | 62,5               | 61,9                  |
| 7,0 | 62,2                | 61,4               | 61,8               | -                     |
| 7,5 | 61,4                | -                  | 62,6               | -                     |
| 8,0 | 61,4                | -                  | 62,4               | -                     |

Al igual que la tabla 1, la tabla 2 también muestra el punto medio de fusión ( $T_m$ ), como se confirma por fluorimetría de barrido diferencial, del dominio de la proteína PSMA-BiTEI con el peso molecular más bajo en diferentes sistemas tampón. Los valores de  $T_m$  fueron comprendidos entre 57,7 °C y 64,6 °C. Durante la combinación de varios sistemas tampón, no fue posible alcanzar los valores más altos de  $T_m$ .

Las formulaciones de PSMA-BiTEI en tampón fosfato a pH 5,5-6,5 y en tampón citrato a pH 5,0-6,5 exhibieron los puntos más altos de fusión ( $T_m > 63,0$  °C de acuerdo con el procedimiento de FBD).

#### **Ejemplo 2: La influencia de los tensioactivos no iónicos en la formación de agregados de PSMA-BiTEI**

Las moléculas PSMA-BiTEI formaron agregados después del ensayo de tensión por agitación en todos los sistemas tampón ensayados. La eficiencia con la que se ponen en contacto las moléculas PSMA-BiTEI agregadas en torno a la activación de linfocitos T no es predecible ni controlable, o solo es predecible o controlable hasta cierto punto. En consecuencia, era imperativo encontrar un estabilizador que impidiera la formación de agregados resultantes de la tensión por agitación o la acción de las fuerzas de cizallamiento. En el ensayo de tensión por agitación, resultó aparente que diversos tensioactivos no iónicos (por ejemplo, polisorbato 80 o 20) estabilizan las moléculas PSMA-BiTEI y pueden prevenir la agregación. Las concentraciones de tensioactivos entre 0,01 y 0,04 % (m/v) fueron suficientes para la estabilización (véanse las tablas 3-7).

#### **Ejemplo 3: Formación de dímeros de PSMA-BiTEI en presencia de cationes polivalentes**

Un incremento en la proporción de agregados de PSMA-BiTEI durante la concentración de las formulaciones de PSMA-BiTEI no pudo ser evitado por la adición de tensioactivos no iónicos.

Por lo tanto, fue examinada la estabilización electrostática de las moléculas PSMA-BiTEI en presencia de cationes polivalentes (por ejemplo,  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$ ). Los iones polivalentes tienen una influencia directa en el potencial de la superficie de proteínas disueltas y pueden en consecuencia actuar de una manera estabilizante o incluso desestabilizante.

Las moléculas PSMA-BiTEI podrían ser estabilizadas utilizando cloruro de magnesio. La proporción de dímeros de PSMA-BiTEI se incrementó solamente de modo insignificante tras la concentración y permaneció por debajo <3 % (tabla 3). Las proporciones de los monómeros y dímeros se midieron a través de cromatografía de exclusión por tamaños (CET).

*Tabla 3: Moléculas PSMA-BiTEI después de la concentración (en  $Na_2HPO_4$  50 mM y lisina 50 mM, pH 7,3)*

| Aditivos durante la concentración | Contenido proteico [mg/ml] | Monómero [%] | Dímero [%] |
|-----------------------------------|----------------------------|--------------|------------|
| -                                 | 2,04                       | 95,7         | 4,3        |
| 0,04 % (m/v) de polisorbato 20    | 2,09                       | 91,2         | 8,8        |
| $MgCl_2$ 100 mM                   | 2,13                       | 98,1         | 1,9        |

CET = cromatografía de exclusión por tamaños

Sin embargo, la adición de sales inorgánicas en concentraciones más altas no es farmacéuticamente segura, y/o dichos aditivos representan un desafío en la liofilización. Por esta razón, se llevó a cabo una búsqueda de excipientes alternativos que estabilizan las moléculas PSMA-BiTEI y son, a la vez, farmacéuticamente seguras.

#### **Ejemplo 4 Identificación de excipientes alternativos para estabilizar los monómeros de PSMA-BiTEI**

Bastante al azar, varios aminoácidos y los derivados de los mismos fueron, entre otras cosas, incluidos en los ensayos de estabilización de los monómeros de PSMA-BiTEI en concentraciones más altas. Los aminoácidos y los derivados de los mismos no son sales inorgánicas y por lo tanto se clasifican como farmacéuticamente seguros. Algunas de estas sustancias (por ejemplo, lisina) exhibieron, sorprendentemente, una influencia positiva en la estabilidad de las moléculas PSMA-BiTEI durante y después de la concentración (tabla 4).

*Tabla 4: Moléculas PSMA-BiTEI después de la concentración a pH 7,3*

| Tampón                                                                             | Contenido proteico [mg/ml] | Monómero por CET [%] | Dímero por CET [%] | Media DLD [nm] | Estado después de la tensión por agitación |
|------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|----------------------|--------------------|----------------|--------------------------------------------|
| $Na_2HPO_4$ 50 mM + lisina 50 mM 0,02 % (m/v) de polisorbato 20, 10 % de trehalosa | 1,94                       | 95,1                 | 4,9                | 11             | turbio                                     |
| $Na_2HPO_4$ 50 mM + lisina 100 mM 0,04 % (m/v) de                                  | 1,88                       | 97,5                 | 2,5                | 9              | turbio                                     |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |      |      |     |    |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|------|-----|----|----|
| <i>polisorbato 20, 10 % de trehalosa</i>                                                                                                                                                                                                                                                                |      |      |     |    |    |
| <i>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM + lisina 50 mM + histidina 100 mM 0,04 % (m/v) de polisorbato 20, 10 % de trehalosa</i>                                                                                                                                                                          | 2,15 | 92,4 | 7,6 | 10 | ok |
| CET = cromatografía de exclusión por tamaños; DLD = Dispersión de luz dinámica; una solución turbia después de la tensión por agitación indica una alta proporción de agregados de BiTE, una solución transparente o mínimamente enturbiada (estado "ok") indica un grado insignificante de agregación. |      |      |     |    |    |

Al añadir lisina e histidina en un tampón fosfato, las moléculas PSMA-BiTE1 podrían ser concentradas sin la formación de proporciones inaceptables de dímeros ( $\geq 5\%$ ). Sin embargo, las formulaciones en las que la proporción de dímeros fue baja ( $< 5\%$ ) se desestabilizaron durante el ensayo de tensión por agitación, y esto era reconocible por el enturbiamiento de la solución (volúmenes de ensayo 1 y 2; "turbio" indica agregación, "ok" indica agregación escasa o nula).

#### Ejemplo 5: Influencia del pH sobre la estabilidad de las moléculas PSMA-BiTE1

Para examinar la influencia del pH sobre la formación de dímeros, se produjo una formulación con pH 6,0. Exhibió una proporción de dímeros que era comparable a la de las formulaciones a pH 7,3. Es más, la proporción de dímeros también fue estable durante la tensión por agitación, y esto era evidente por la falta de enturbiamiento (tabla 5). La influencia positiva del pH 6,0 se utilizó para la búsqueda adicional de estabilizadores y formulaciones adecuados.

Tabla 5: Moléculas PSMA-BiTE1 después de la concentración a pH 6,0

| <i>Tampón a pH 6,0</i>                                                                                            | Contenido proteico [mg/ml] | Monómero por CET [%] | Dímero por CET [%] | Media DLD [nm] | Estado después de la tensión por agitación |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|----------------------|--------------------|----------------|--------------------------------------------|
| <i>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM + lisina 50 mM 0,04 % (m/v) de polisorbato 20, 10 % (m/v) de trehalosa</i> | 1,62                       | 95,7                 | 4,3                | 8              | ok                                         |
| CET = cromatografía de exclusión por tamaños; DLD = dispersión de luz dinámica                                    |                            |                      |                    |                |                                            |

La estabilidad de PSMA-BiTE1 en el tampón fosfato a pH 6,0 fue asombrosa. Fue posible concentrar de repente las moléculas a 1,6 mg/ml en una formulación que comprende *Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>* 50 mM, lisina 50 mM, 0,04 % de polisorbato 20 y 10 % de trehalosa a pH 6,0, sin que se produzca agregación como resultado de la acción de tensión por agitación.

#### Ejemplo 6: Examen de las combinaciones de tampón

En un experimento adicional, se examinó un posible efecto sinérgico con respecto a un aumento en la estabilidad de las moléculas PSMA-BiTE1 por aditivos tales como arginina, TEA o TRIS en combinación con fosfato. La proporción más baja de dímeros de PSMA BiTE1 de 0,8 % ocurrió en el caso de la combinación de tampón *Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>* 50 mM, TRIS 100 mM a pH 6,0. La formulación también fue suficientemente estable después de la tensión por agitación, y esto era reconocible por la ausencia de enturbiamiento de la solución (tabla 6). El efecto estabilizador de TRIS fue sorprendente, ya que la adición de arginina o TEA, que son ambos conocidos por su efecto de estabilización (es decir, reducción de la agregación) en el caso de las proteínas, no tuvo ningún efecto estabilizador en el caso de las moléculas PSMA-BiTE.

Tabla 6: Moléculas PSMA-BiTE1 después de la concentración con los diversos aditivos a pH 6,0

| <i>Tampón a pH 6,0</i>                                                                                          | Contenido proteico [mg/ml] | Monómero por CET [%] | Dímero por CET [%] | Media DLD [nm] | Estado después de la tensión por agitación |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|----------------------|--------------------|----------------|--------------------------------------------|
| <i>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM 0,04 % (m/v) de polisorbato 80, 4 % (m/v) de trehalosa</i>               | 1,82                       | 96,4                 | 3,3                | 13             | ok                                         |
| <i>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM + TRIS 100 mM 0,04 % (m/v) de polisorbato 80, 4 % (m/v) de trehalosa</i> | 1,81                       | 99,2                 | 0,8                | 12             | ok                                         |

|                                                                                                                      |      |      |     |    |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|------|-----|----|----|
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 50 mM +<br>arginina 100 mM<br>0.04 % (m/v) de<br>polisorbato 80, 4 %<br>(m/v) de trehalosa | 2,20 | 96,2 | 3,5 | 15 | ok |
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 50 mM + TEA<br>100 mM 0.04 % (m/v)<br>de polisorbato 80, 4 %<br>(m/v) de trehalosa         | 1,88 | 96,2 | 3,4 | 11 | ok |
| CET = cromatografía de exclusión por tamaños; DLD = dispersión de luz dinámica                                       |      |      |     |    |    |

Como se muestra en el ejemplo 1, el uso de un tampón citrato condujo a un aumento en la estabilidad térmica de las moléculas PSMA-BiTEI. Sin embargo, después de la concentración de los volúmenes de ensayo, la proporción de dímeros en los volúmenes de ensayo tamponados con citrato fue sustancialmente superior a la de con tampón fosfato (tabla 7 en comparación con la tabla 6). El tampón fosfato es, en consecuencia, mejor que el tampón citrato para reducir al mínimo la formación de dímeros de PSMA-BiTEI durante la concentración. Asimismo, el citrato en una formulación puede llevar a la delaminación del vidrio y ya no debe de ser utilizado.

Tabla 7: Moléculas PSMA-BiTEI después de la concentración a pH 6,0

| Tampón                                                                             | Contenido proteico [mg/ml] | Monómero por CET [%] | Dímero por CET [%] | Media DLD [nm] | Estado después de la tensión por agitación |
|------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|----------------------|--------------------|----------------|--------------------------------------------|
| citrato 50 mM 0,04 % (m/v) de polisorbato 80, 4 % (m/v) de trehalosa               | 1,90                       | 93,4                 | 6,4                | 11             | ok                                         |
| citrato 50 mM + TRIS 100 mM 0,04 % (m/v) de polisorbato 80, 4 % (m/v) de trehalosa | 1,95                       | 92,9                 | 7,0                | 12             | ok                                         |
| CET = cromatografía de exclusión por tamaños; DLD = dispersión de luz dinámica     |                            |                      |                    |                |                                            |

#### **Ejemplo 7: Estabilidad térmica de las moléculas PSMA-BiTEI en sistemas tampón TRIS-fosfato**

El punto medio de fusión ( $T_{m1}$ ) del dominio de la proteína PSMA-BiTEI con el peso molecular más bajo de la siguiente formulación fue determinado:

0,2 mg/ml de PSMA BiTE en  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM, TRIS 100 mM, 0,04 % de polisorbato 80, 4 % de dihidrato de trehalosa, pH 6,0 (ajustado con HCl). Por medio de CBD, se midió un  $T_{m1}$  de 61,1 °C.

#### **Ejemplo 8: Influencia de la tensión por agitación en las moléculas PSMA-BiTEI en formulaciones de fosfato/TRIS**

En general, las moléculas BiTE son físicamente desestabilizadas por la tensión por agitación, es decir, forman agregados, que pueden ser detectados mediante dispersión de luz dinámica (DLD). La formación de agregados ocurre incluso en bajas concentraciones de BiTE de aproximadamente 0,2 mg/ml. Por el contrario, en el caso de un contenido de proteína por debajo de 0,2 mg/ml, las moléculas BiTE se adsorben cada vez más en la pared del recipiente.

Al añadir un tensioactivo (por ejemplo, polisorbato 20 u 80), fue posible evitar la adsorción de las moléculas PSMA-BiTE1 en la pared del recipiente (por ejemplo, de jeringas de inyección, bolsas de infusión, etc.) en algunos sistemas tampón (por ejemplo, en tampones a base de fosfato y lisina), y ocurrió lo mismo con la formación de agregados en el estado de reposo. El polisorbato 80 ha de estar presente en una concentración de al menos 0,002 % en la composición con el fin de impedir la adsorción de las moléculas PSMA-BiTE1.

Al disolver las moléculas PSMA-BiTEI en un tampón fosfato con un aditivo tensioactivo a pH 6,0, fue posible evitar la formación de agregados tanto en el estado de reposo como durante la acción de tensión por agitación. La formulación anterior (tampón fosfato con aditivo tensioactivo a pH 6,0) fue superior a las formulaciones con lisina con respecto a la minimización de la formación de agregados.

Tabla 8: Formación de agregados de PSMA-BiTE1 tras la tensión por agitación; todas las muestras contienen 0,2 mg/ml de moléculas PSMA-BiTE1 y 0,02 % (m/v) de polisorbato 80

|                                                       | pH  | Visualmente | Contenido [%] | DLD D50 % [nm] |
|-------------------------------------------------------|-----|-------------|---------------|----------------|
| <i>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></i>                  | 6,0 | ok          | 103,2         | 9              |
|                                                       | 6,5 | ok          | 78,6          | 2451*          |
|                                                       | 7,0 | ok          | 52,9          | 1114*          |
|                                                       | 7,5 | ok          | 66,5          | 8              |
| <i>Lisina</i>                                         | 6,5 | ok          | 68,5          | 2945*          |
| <i>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-lisina-histidina</i> | 6,5 | ok          | 119,5         | 11             |
| <i>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-TRIS**</i>           | 6,0 | ok          | 99,0          | 6              |

\*Agregados \*\* monómero 99,6 %; dímero 0,4 %

5

#### Ejemplo 9: Dependencia de agregación de PSMA-BiTE1 en concentración

En sistemas de tampón estándar, la proporción de dímeros y multímeros aumentó con la concentración de moléculas PSMA-BiTE1. Sin embargo, los dímeros y multímeros son aceptables a sólo un grado limitado en formulaciones para uso terapéutico, puesto que pueden influir en la eficacia de la formulación y de la proteína terapéutica y provocar efectos inmunológicos no deseados. Normalmente, los dímeros se limitan a un valor de 5 % máximo y se intenta mantener por debajo de dicho valor tanto como sea posible. Los multímeros y los fragmentos de bajo peso molecular (BPM) deben minimizarse también, o no estar presentes. La relación monómero/dímero, así como la proporción de multímeros y fragmentos de bajo peso molecular, se mide utilizando cromatografía de exclusión por tamaños (CET).

Utilizando el sistema de tampón que comprende *Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>* 50 mM y TRIS 100 mM a pH 6,0, fue posible reducir suficientemente la formación de dímeros y multímeros entre las moléculas PSMA-BiTE1 durante la concentración.

Este sistema tampón hizo posible producir una formulación estable de BiTE que tiene un contenido de >2 mg/ml (tabla 9).

Tabla 9: Moléculas PSMA-BiTE1 en *Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>* 50 mM y TRIS 100 mM a pH 6,0

| Contenido proteico [mg/ml] | 0,321 | 0,333 | 0,530 | 0,883 | 1,308 | 1,330 | 2,138 | 3,228 |
|----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Monómero [%]               | 98,17 | 98,30 | 97,89 | 95,15 | 98,33 | 95,95 | 96,28 | 96,97 |
| Dímero [%]                 | 0,58  | 0,42  | 1,18  | 1,71  | 1,14  | 1,92  | 2,26  | 2,03  |
| Multímero [%]              | <0,05 | <0,05 | <0,05 | <0,05 | <0,05 | <0,05 | <0,05 | <0,05 |
| BPM [%]                    | 1,24  | 1,28  | 0,93  | 3,14  | 0,53  | 2,14  | 1,45  | 1,00  |

BPM = fragmentos de bajo peso molecular

#### Ejemplo 10: Influencia de trehalosa y polisorbato en la estabilidad de PSMA-BiTE1

La adición de trehalosa y polisorbato no condujo a un aumento de la formación de dímeros, multímeros o fragmentos de BPM (tabla 10).

Tabla 10: Moléculas PSMA-BiTE1 en *Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>* 50 mM y TRIS 100 mM a pH 6,0 con/sin trehalosa y polisorbato 80

| Polisorbato 80 (% m/v)     | -     | 0,04 % | -     | 0,04 % |
|----------------------------|-------|--------|-------|--------|
| Trehalosa (% m/v)          | -     | -      | 4 %   | 4 %    |
| Contenido proteico [mg/ml] | 1,209 | 1,235  | 1,191 | 1,217  |
| Monómero por CET [%]       | 98,3  | 98,3   | 98,5  | 98,2   |
| Dímero [%]                 | 1,6   | 1,7    | 1,5   | 1,7    |
| Multímero [%]              | 0,1   | 0,1    | <0,05 | 0,1    |
| BPM [%]                    | <0,05 | <0,05  | <0,05 | <0,05  |

#### Ejemplo 11: Estabilidad en almacenamiento de las moléculas PSMA-BiTE1

La estabilidad durante el almacenamiento de las moléculas PSMA-BiTE1 puede determinarse sobre la base del aumento de la proporción de dímeros y/o multímeros como una función del tiempo de almacenamiento. Cuanto más rápido sea el aumento de la proporción de estos agregados, más baja será la estabilidad de almacenamiento.

Podría mostrarse experimentalmente que las moléculas PSMA-BiTE1 en una concentración de 90 µg/ml, 500 µg/ml y 2 mg/ml son estables durante un periodo de 9 días con respecto a la formación de dímeros y/o multímeros (tabla 11). Las formulaciones se mantienen en jeringas de inyección en aproximadamente 2-8 °C, después de una fase inicial de 4 a 16 horas a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C). Las composiciones contienen, además de las moléculas PSMA-BiTE1, *Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>* 50 mM, TRIS 100 mM, 0,04 % de polisorbato 80 y 4 % de trehalosa. La proporción de monómeros de PSMA-BiTE1 se mide utilizando CET-HPLC y comparándose con la proporción de

- 5 monómeros de PSMA-BiTEI al comienzo de los experimentos (es decir, en el día 0). Después de 9 días en el caso de composiciones que tienen una concentración inicial de PSMA-BiTEI de 90 µg/ml y 500 µg/ml, esta pureza relativa fue del 100 %, es decir, la proporción de los monómeros no había bajado en este tiempo. En el caso de las composiciones con 2 mg/ml de moléculas PSMA-BiTEI, la pureza relativa fue del 97 % después de 9 días, que corresponde absolutamente a una disminución en los monómeros en aproximadamente 3 % (de 97,58 % en el día 0 al 94,81 % en el día 9).

Tabla 11/1: Determinación de la pureza (es decir, la proporción de monómeros) de las moléculas PSMA-BiTE por medio de CET-HPLC durante un periodo de 9 días

| Día | Concentración de PSMA-BiTE1 [µg/ml] | Pureza, proporción de monómeros [%] |          |          |       |                         | Pureza relativa (proporción de monómeros) en comparación con el valor Tc |          |          |          |
|-----|-------------------------------------|-------------------------------------|----------|----------|-------|-------------------------|--------------------------------------------------------------------------|----------|----------|----------|
|     |                                     | Ensayo 1                            | Ensayo 2 | Ensayo 3 | Media | Desviación estándar [%] | VK [%]                                                                   | Ensayo 1 | Ensayo 2 | Ensayo 3 |
| 0   | 90                                  | 98,30                               | 98,21    | 98,20    | 98,24 | 0,06                    | 0,1                                                                      | -        | -        | -        |
| 2   |                                     | 98,35                               | 98,39    | 98,37    | 98,37 | 0,02                    | 0,0                                                                      | 100      | 100      | 100      |
| 7   |                                     | 98,59                               | 98,53    | 98,40    | 98,51 | 0,10                    | 0,1                                                                      | 100      | 100      | 100      |
| 9   |                                     | 98,37                               | 98,36    | 98,39    | 98,37 | 0,02                    | 0,0                                                                      | 100      | 100      | 100      |
| 0   | 500                                 | 97,93                               | 97,95    | 98,08    | 97,96 | 0,04                    | 0,0                                                                      | -        | -        | -        |
| 2   |                                     | 98,03                               | 98,07    | 97,77    | 97,96 | 0,16                    | 0,2                                                                      | 100      | 100      | 100      |
| 7   |                                     | 97,90                               | 97,67    | 97,91    | 97,83 | 0,14                    | 0,1                                                                      | 100      | 100      | 100      |
| 9   |                                     | 97,71                               | 97,66    | 97,87    | 97,75 | 0,11                    | 0,1                                                                      | 100      | 100      | 100      |
| 0   | 2.000                               | 97,45                               | 97,54    | 97,75    | 97,58 | 0,15                    | 0,2                                                                      | -        | -        | -        |
| 2   |                                     | 96,61                               | 96,69    | 96,57    | 96,62 | 0,06                    | 0,1                                                                      | 99       | 99       | 99       |
| 7   |                                     | 94,79                               | 95,34    | 95,04    | 95,06 | 0,28                    | 0,3                                                                      | 97       | 98       | 97       |
| 9   |                                     | 94,71                               | 94,88    | 94,84    | 94,81 | 0,09                    | 0,1                                                                      | 97       | 97       | 97       |

En otros experimentos, en la formulación líquida con una concentración de PSMA-BiTE1 de 2 mg/ml a 2-8 °C en el transcurso de una semana, hubo un incremento moderado en la proporción de dímeros del 2,5 % (de 3 % a 5,5 %), junto con una proporción estable de multímeros (tabla 12). En esta concentración, las moléculas PSMA-BiTE1 son por lo tanto estables durante un tiempo suficientemente largo para asegurar el llenado del recipiente prácticamente sin pérdidas y el uso prácticamente sin pérdidas.

Para un almacenamiento a largo plazo (es decir, durante un periodo considerablemente más largo que una semana), las soluciones de PSMA-BiTE1 pueden, no obstante, congelarse (-80 °C) o liofilizarse para asegurar su estabilidad.

La liofilización de las formulaciones que contienen PSMA-BITE1 con la preservación de bioactividad fue posible, como se muestra en el ejemplo 17.

Tabla 12: Estabilidad durante el almacenamiento de la formulación de BiTE a 2-8 °C (concentración de 2 mg/ml de PSMA-BiTE1)

| Tiempo de almacenamiento [días] | Monómero por CET [%] | Dímero por CET [%] | Multímero por CET [%] |
|---------------------------------|----------------------|--------------------|-----------------------|
| Inicio                          | 96,4                 | 3,0                | 0,6                   |
| 0,25                            | 96,2                 | 3,2                | 0,6                   |
| 0,5                             | 96,0                 | 3,4                | 0,6                   |
| 0,75                            | 95,9                 | 3,6                | 0,5                   |
| 1                               | 95,8                 | 3,7                | 0,5                   |
| 3                               | 95,7                 | 4,0                | 0,4                   |
| 7                               | 94,2                 | 5,5                | 0,4                   |
| 15                              | 93,7                 | 6,1                | 0,2                   |
| 28                              | 92,6                 | 7,2                | 0,2                   |
| 65                              | 90,7                 | 9,2                | 0,2                   |
| 94                              | 90,3                 | 9,5                | 0,2                   |
| 161                             | 88,2                 | 11,3               | 0,5                   |
| 251                             | 87,8                 | 11,7               | 0,5                   |

#### Ejemplo 12: Influencia del pH en la estabilidad de PSMA-BITE1

En principio, las moléculas PSMA-BiTE1 son estables en la formulación seleccionada que contiene TRIS, fosfato (en este caso:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), trehalosa y polisorbato en un intervalo de pH comprendido entre un pH de 5,0 y 7,5. Sin embargo, a un pH por encima de pH 6, la proporción de dímeros (>2 %) aumenta después de la tensión por cizallamiento (tabla 13).

Tabla 13: 2 mg de moléculas PSMA-BiTE1 por ml en  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM, TRIS 100 mM, pH [variable]; 4 % (m/v) de trehalosa, 0,04 % (m/v) de polisorbato 80

| pH                                             | 5,0   | 5,5   | 6,0   | 6,5   | 7,0   | 7,5   |
|------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <b>Después de la producción</b>                |       |       |       |       |       |       |
| Contenido proteico [mg/ml]                     | 2,01  | 2,02  | 2,11  | 1,90  | 2,13  | 2,20  |
| DLD (D50 %) [nm]                               | 10    | 11    | 15    | 11    | 12    | 10    |
| Monómero por CET [%]                           | 98,62 | 97,88 | 98,48 | 97,74 | 98,58 | 98,53 |
| Dímero [%]                                     | 1,22  | 1,81  | 1,36  | 1,96  | 1,42  | 1,47  |
| Multímero [%]                                  | <0,05 | <0,05 | <0,05 | <0,05 | <0,05 | <0,05 |
| BPM [%]                                        | 0,15  | 0,31  | 0,16  | 0,30  | <0,05 | <0,05 |
| <b>Después de la tensión por cizallamiento</b> |       |       |       |       |       |       |
| Contenido proteico [mg/ml]                     | 2,00  | 2,01  | 2,11  | 1,90  | 2,13  | 2,20  |
| Contenido proteico [%]                         | 99,5  | 99,6  | 99,8  | 100,1 | 99,9  | 100,1 |
| DLD (D50 %) [nm]                               | 10    | 15    | 12    | 10    | -     | -     |
| Monómero por CET [%]                           | 98,37 | 98,21 | 98,23 | 97,83 | 97,42 | 97,53 |
| Dímero [%]                                     | 1,63  | 1,79  | 1,77  | 2,17  | 2,58  | 2,47  |
| Multímero [%]                                  | <0,05 | <0,05 | <0,05 | <0,05 | <0,05 | <0,05 |
| BPM [%]                                        | <0,05 | <0,05 | <0,05 | <0,05 | <0,05 | <0,05 |

#### Ejemplo 13: Influencia de TRIS y fosfato en la estabilidad de PSMA-BITE1

Las investigaciones con respecto a diferentes resistencias de tampón en la formulación mostraron que las resistencias de tampón pueden variar:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  de 20 a 100 mM y TRIS de 50 a 100 mM a pH 6,0 son útiles con respecto a minimizar la formación de dímeros de PSMA-BiTE1. Todas las combinaciones permiten la concentración y la acción de la tensión por cizallamiento.

En ausencia de TRIS, no fue posible concentrar las moléculas PSMA-BiTE1, y en ausencia de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , la proporción de dímeros se elevó a más de >2 % tras la acción de la tensión por cizallamiento. Asimismo, el tampón fosfato exhibió una buena acción tamponante a pH 6,0 y soporta la estabilidad térmica de las moléculas PSMA-BiTE1.

Tabla 14: 2 mg/ml de moléculas PSMA-BiTE1 en  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  [variable], TRIS [variable], pH 6,0, 4 % (m/v) de trehalosa, 0,04 % (m/v) de polisorbato 80

|                                 |     |     |     |    |     |     |
|---------------------------------|-----|-----|-----|----|-----|-----|
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ [mM]  | -   | 20  | 50  | 50 | 50  | 100 |
| TRIS [mM]                       | 100 | 100 | 100 | 50 | 200 | 100 |
| <b>Después de la producción</b> |     |     |     |    |     |     |

|                                                |       |       |       |       |       |       |
|------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Contenido proteico [mg/ml]                     | 2,23  | 2,08  | 2,11  | 2,19  | 2,17  | 2,07  |
| DLD (D50 %) [nm]                               | 11    | 9     | 15    | 12    | 15    | 12    |
| Monómero por CET [%]                           | 98,11 | 98,78 | 98,48 | 99,22 | 99,01 | 99,19 |
| Dímero [%]                                     | 1,57  | 1,22  | 1,36  | 0,78  | 0,99  | 0,81  |
| Multímero [%]                                  | <0,05 | <0,05 | <0,05 | <0,05 | <0,05 | <0,05 |
| BPM [%]                                        | 0,31  | <0,05 | 0,16  | <0,05 | <0,05 | 0,30  |
| <b>Después de la tensión por cizallamiento</b> |       |       |       |       |       |       |
| Contenido proteico [mg/ml]                     | 2,22  | 2,08  | 2,11  | 2,20  | 2,16  | 2,08  |
| Contenido proteico [%]                         | 99,9  | 100,0 | 99,8  | 100,4 | 99,9  | 100,1 |
| DLD (D50 %) [nm]                               | -     | -     | 12    | 13    | 13    | 12    |
| Monómero por CET [%]                           | 97,90 | 98,26 | 98,23 | 98,55 | 98,32 | 98,60 |
| Dímero [%]                                     | 2,10  | 1,73  | 1,77  | 1,45  | 1,68  | 1,40  |
| Multímero [%]                                  | <0,05 | <0,05 | <0,05 | <0,05 | <0,05 | <0,05 |
| BPM [%]                                        | <0,05 | <0,05 | <0,05 | <0,05 | <0,05 | <0,05 |

#### Ejemplo 14: Influencia de diversos agentes humectantes en la estabilidad de PSMA-BiTEI

- 5 Los diversos polisorbatos pueden estabilizar las moléculas PSMA-BiTEI en la formulación contra la tensión por cizallamiento. Sin embargo, los mejores resultados se lograron con polisorbato 80. Otros estabilizadores tales como, por ejemplo, Synperonic F68 asimismo tenían efectos positivos.

- 10 De 0,04 % a 0,10 % (m/v) de polisorbato 80 tuvo un buen efecto estabilizador en las moléculas PSMA-BiTE1 durante la tensión por cizallamiento. 0,004 % (m/v) de polisorbato no fue suficiente en este caso para evitar un incremento en la formación de dímeros después de la acción de tensión por cizallamiento.

Tabla 15: 2 mg/ml de moléculas PSMA-BiTEI en Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM, TRIS 100 mM, pH 6,0, 4 % (m/v) de trehalosa, agente humectante [variable]

| Agente humectante                              | Polisorbato 80 | Polisorbato 20 | Synperonic F68 | Polisorbato 80 | Polisorbato 80 |
|------------------------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Agente humectante [% (m/v)]                    | 0,04           | 0,04           | 0,04           | 0,004          | 0,10           |
| <b>Después de la producción</b>                |                |                |                |                |                |
| Contenido proteico [mg/ml]                     | 2,11           | 2,13           | 2,10           | 2,13           | 2,08           |
| DLD (D50 %) [nm]                               | 15             | 12             | 10             | 13             | 14             |
| Monómero por CET [%]                           | 98,48          | 97,92          | 98,59          | 98,47          | 98,36          |
| Dímero [%]                                     | 1,36           | 2,08           | 1,24           | 1,36           | 1,46           |
| Multímero [%]                                  | <0,05          | <0,05          | <0,05          | <0,05          | <0,05          |
| BPM [%]                                        | 0,16           | <0,05          | 0,16           | 0,17           | 0,17           |
| <b>Después de la tensión por cizallamiento</b> |                |                |                |                |                |
| Contenido proteico [mg/ml]                     | 2,11           | 2,11           | 2,10           | 1,98           | 2,07           |
| Contenido proteico [%]                         | 99,8           | 99,2           | 99,9           | 93,3           | 99,5           |
| DLD (D50 %) [nm]                               | 12             | 14             | 10             | 3139           | 15             |
| Monómero por CET [%]                           | 98,23          | 96,54          | -              | 92,54          | 98,09          |
| Dímero [%]                                     | 1,77           | 3,46           | -              | 7,46           | 1,91           |
| Multímero [%]                                  | <0,05          | <0,05          | -              | <0,05          | <0,05          |
| BPM [%]                                        | <0,05          | <0,05          | -              | <0,05          | <0,05          |

**Ejemplo 15: Influencia de la concentración de PSMA-BiTE1 en la estabilidad de la formulación**

Utilizando la formulación con Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM, TRIS 100 mM, pH 6,0, 4 % (m/v) de trehalosa, 0,04 % (m/v) de polisorbato 80, fue posible producir concentraciones de PSMA-BiTE1 hasta 2 mg/ml. En concentraciones más altas de PSMA-BiTE1, la proporción de dímeros aumentó claramente. Sin embargo, se midieron valores inaceptables solo en concentraciones de PSMA-BiTE mayores a 4 mg/ml y después de la acción de las fuerzas de cizallamiento (9,25 % de dímeros en una concentración de PSMA-BiTE de aproximadamente 11,2 mg/ml).

Tabla 16 mg/ml de moléculas PSMA-BiTE1 [variable] en Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM, TRIS 100 mM, pH 6,0, 4 % (m/v) de trehalosa, 0,04 % (m/v) de polisorbato 80

| Conc. de PSMA-BiTE1 [mg/ml]                    | 0,4   | 2     | 4     | 11    |
|------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| <b>Después de la producción</b>                |       |       |       |       |
| Contenido proteico [mg/ml]                     | 0,44  | 2,11  | 4,42  | 11,17 |
| DLD (D50 %) [nm]                               | 12    | 15    | 17    | 18    |
| Monómero por CET [%]                           | 98,67 | 98,48 | 96,62 | 95,63 |
| Dímero [%]                                     | 1,16  | 1,36  | 2,82  | 3,73  |
| Multímero [%]                                  | <0,05 | <0,05 | <0,05 | <0,05 |
| BPM [%]                                        | 0,16  | 0,16  | 0,56  | 0,63  |
| <b>Después de la tensión por cizallamiento</b> |       |       |       |       |
| Contenido proteico [mg/ml]                     | 0,44  | 2,11  | 4,39  | 11,32 |
| Contenido proteico [%]                         | 99,8  | 99,8  | 99,2  | 101,3 |
| DLD (D50 %) [nm]                               | 10    | 12    | 12    | 16    |
| Monómero por CET [%]                           | 99,53 | 98,23 | 96,32 | 90,75 |
| Dímero [%]                                     | 0,47  | 1,77  | 3,68  | 9,25  |
| Multímero [%]                                  | <0,05 | <0,05 | <0,05 | <0,05 |
| BPM [%]                                        | <0,05 | <0,05 | <0,05 | <0,05 |

**Ejemplo 16: Liofilización**

Después de finalizar la composición de PSMA-BiTEI, ésta se liofilizó. Numerosas unidades de secado por congelación están disponibles para este fin, por ejemplo, el Genesis Super XL de SP Scientific. El secado por congelación se consigue por el congelado de una sustancia y la posterior sublimación del hielo sin pasar por una fase líquida.

Tabla 17: Programa para secado por congelación de formulaciones de **PSMA-BiTE** (tiempo total: 42 h).

|                            | Ts [°C]        | t [min] | Vacío [μbar] | Rampa/mantenida |
|----------------------------|----------------|---------|--------------|-----------------|
| <b>Fase de congelación</b> |                |         |              |                 |
| 1                          | Temp. ambiente | 0       | -            | Mantenida       |
| 2                          | -45            | 30      | -            | Rampa           |
| 3                          | -45            | 240     | -            | Mantenida       |
| <b>Secado primario</b>     |                |         |              |                 |
| 1                          | -20            | 60      | 100          | Rampa           |
| 2                          | -20            | 1000    | 100          | Mantenida       |
| <b>Secado secundario</b>   |                |         |              |                 |
| 1                          | 25             | 60      | 10           | Rampa           |
| 2                          | 25             | 1140    | 10           | Mantenida       |

"Rampa" = aumento o disminución continuos de la temperatura

En la fase de congelación, el producto se enfrió en una "rampa", es decir, continuamente, en un plazo de 30 min de temperatura ambiente a -45 °C. Para congelar completamente la solución del producto, esta temperatura se mantuvo durante 240 min.

Esto fue seguido por la fase de secado primario. En una cámara de vacío de 100 μbar, la composición se calentó en un plazo de 60 min a -20 °C. Esta temperatura se mantiene durante 1.000 min; así se completó el secado primario. Para el secado secundario posterior, la composición fue calentada en un vacío de 10 μbar a 25 °C. Estas condiciones se mantuvieron durante 1.140 min con el fin de eliminar el agua residual hasta un ≤2 % (detección por medio de la titulación de Karl Fischer).

Al final del proceso de secado, la unidad se venteó y los recipientes se sellaron por liofilización.

**Ejemplo 17: Bioactividad de los liofilizados de PSMA-BiTEI después del almacenamiento y de la reconstitución a largo plazo**

Las composiciones que contienen moléculas PSMA-BiTEI se almacenaron como un liofilizado hasta durante 12 meses a 2-8 °C y a 25 °C/60 % de humedad relativa. Después de 6 y 12 meses, la solución se reconstituyó a partir de un liofilizado en cada caso y se analizó en un ensayo de actividad basada en células. Las mediciones (por medio del ensayo de citotoxicidad CytoTox-Glo de Promega) revelaron bioactividad sin cambios, después de un almacenamiento de 6 y 12 meses en las condiciones mencionadas anteriormente.

Además, se analizó la estabilidad de almacenamiento de la solución de PSMA-BiTE1 reconstituida. Después de la reconstitución, la solución se almacena primero durante 7 días en un refrigerador (2-8 °C) y luego durante 16 horas a temperatura ambiente (+20 ± 5 °C). Posteriormente, la bioactividad de las moléculas PSMA-BiTEI también fue comprobada en este caso por medio de un ensayo de actividad basada en células. Se obtuvo un 96 % de solución reconstituida después del almacenamiento mencionado anteriormente.

La bioactividad de las moléculas PSMA-BiTEI en la formulación liofilizada fue por lo tanto estable después del almacenamiento durante 6-12 meses bajo las condiciones de almacenamiento mencionadas anteriormente. Lo mismo se aplica a la solución reconstituida de este liofilizado después de un almacenamiento durante 7 días a 2-8 °C, y durante 16 horas a temperatura ambiente.

#### **Ejemplo 18: Influencia de la tensión por cizallamiento en la administración mediante jeringa de inyección y una cánula en la formación de dímeros de PSMA-BiTEI**

Composición: 2,17 mg/ml de moléculas PSMA-BiTEI, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM, TRIS 100 mM, pH 6,0, 4 % de trehalosa, 0,04 % de polisorbato 80.

**Material:** Jeringas desechables (BD 2 ml), cánulas (Braun Sterican 0,70 x 30 mm, tamaño 12; 22G) y viales de vidrio marrón (6R) y criotubos.

#### **Procedimiento:**

30 viales fueron descongelados. 6 viales se utilizaron como valores de partida. Para cada experimento, se utilizaron 6 viales, es decir, se retiraron utilizando la jeringa/cánula y se inyectó todo en un vidrio marrón o un criotubo.

#### **Experimentos:**

1. Inyección lenta de la composición de PSMA-BiTEI en un criotubo (SpL Cryo)
2. Inyección lenta de la composición de PSMA-BiTEI en un vidrio marrón (SpL Glass)
3. Inyección rápida de la composición de PSMA-BiTEI en un criotubo (SpL Cryo)
4. Inyección rápida de la composición de PSMA-BiTEI en un vidrio marrón (SpL Glass)

Tabla 18: Formación de dímeros de PSMA-BiTEI tras la acción de la tensión por cizallamiento debido a la inyección

|                      | Inicio | SpL Cryo | SpL Glass | SpS Cryo | SpS Glass |
|----------------------|--------|----------|-----------|----------|-----------|
| PSMA-BiTEI-          | 2,17   | 2,21     | 2,16      | 2,19     | 2,16      |
| Monómero por CET [%] | 96,6   | 96,5     | 96,4      | 96,4     | 96,4      |
| Dímero por CET [%]   | 3,3    | 3,4      | 3,5       | 3,4      | 3,4       |
| Multímeros por CET   | 0,1    | 0,1      | 0,1       | 0,1      | 0,1       |

La formación de dímeros se midió mediante fluorimetría de barrido diferencial (FBD). No fue posible notificar un incremento significativo en la proporción de dímeros después de la inyección de la composición por medio de jeringas de inyección y cánulas. Este resultado muestra que la formulación de acuerdo con la invención es, en todos los casos, estable con respecto a la acción de fuerzas de cizallamiento generadas.

#### **Ejemplo 19: Biodisponibilidad de PSMA-BiTEI tras la administración subcutánea**

Utilizando la formulación de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM, TRIS 100 mM, pH 6,0, 4 % de trehalosa, 0,04 % de polisorbato 80, fue posible alcanzar el 66 % de biodisponibilidad tras la administración subcutánea. La biodisponibilidad s.c. de las moléculas BiTE1-PSMA se examinó en 4 monos cangrejeros hembra. La dosificación fue de 45 µg/kg para la administración s.c. y se comparó con la administración i.v. de 5 y 15 µg/kg del peso corporal (PC). La solución madre de 2 mg/ml se diluyó con solución salina fisiológica. El tiempo de infusión de la administración i.v fue 1 hora y la velocidad de infusión fue de 1 ml/kg PC. El sitio seleccionado de inyección fue de una vena superficial (V. *saphena parva*). Para la administración s.c. la solución de ensayo se inyectó en la región lateral del tórax a 0,15 ml/kg PC. Los niveles en sangre se examinaron utilizando un ensayo ELISA. A tal fin, se utilizó la tecnología ECL. El límite inferior de cuantificación (LLOQ) del procedimiento fue 4 µg/l.

#### **Procedimientos**

#### **Producción de las moléculas PSMA-BiTE**

Los procedimientos de producción de moléculas BiTE, más particularmente moléculas PSMA-BiTE, se describen en el documento WO2010037836 A2, por ejemplo.

En primer lugar, la construcción de ADN de BiTE recombinante que codifica PSMA-BiTE1 se integró en un vector de expresión adecuado y se introdujo de forma estable en el mismo en células CHO (ovario de hámster chino) eucariotas. Las células CHO transfectadas se cultivaron en un biorreactor con un medio de cultivo adecuado y la proteína secretada se aisló por la filtración de las células. La purificación de las moléculas BiTE comprendió el reemplazo de las sustancias tampón TRIS y fosfato por medio de cromatografía de exclusión por tamaños (CET) y posterior concentración por ultrafiltración y diafiltración. Además, se añadió un poliol (preferentemente trehalosa) y un agente humectante (preferentemente polisorbato 80). La composición se almacenó por debajo de -60 °C.

#### **Fluorimetría de barrido diferencial (FBD)**

Las mediciones sobre la estabilidad de las moléculas PSMA-BiTEI (por ejemplo, tras las tensiones por cizallamiento) se llevaron a cabo utilizando un sistema de PCR en tiempo real 750 Fast (Applied Biosystems). Las diferentes concentraciones de PSMA-BiTEI (entre 0,15 y 0,005 mg/ml) se mezclaron con un colorante fluorescente (por ejemplo, "Sypro® Orange 5000") en placas de 96 pocillos (placas de microtitulación) y se midieron en un sistema de PCR (750 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems). La temperatura se incrementó de 20 °C a 90 °C. Los puntos de fusión de las proteínas fueron comprobados a través de la detección de la fluorescencia, que se produce de una manera dependiente de la temperatura cuando el colorante fluorescente reacciona con las regiones hidrófobas de la proteína.

#### **Calorimetría de barrido diferencial (CBD)**

La temperatura de desplegamiento térmico ( $T_m$ ) de las moléculas PSMA-BiTEI se determinó por medio de CBD. Para este fin, las muestras se calentaron de 20 °C a 105 °C y el punto de fusión de los polipéptidos se determinó utilizando un calorímetro. Se utilizó un instrumento VP-DSC de GE Healthcare.

#### **Tensión por agitación**

Las muestras se tensionaron por agitación en un agitador de laboratorio (IKA, HS 260) en una cámara controlada por temperatura (MMM, FrioCell 200). El parámetro crítico de calidad de la agregación se comprobó después de 24 horas a 300 rpm y 20 °C.

#### **Control visual**

La estabilidad de las soluciones de PSMA-BiTE se controló visualmente después de la tensión por cizallamiento al mantener las soluciones contra un fondo oscuro y la comprobación de partículas visibles o turbidez. Una solución transparente después del ensayo de tensión por agitación indica una formación de dímeros y/o multímeros escasa o nula, mientras que la turbidez visible de la solución se correlaciona con una alta proporción de dímeros y/o multímeros.

#### **Dispersión de luz dinámica (DLD)**

La dispersión de luz dinámica es un procedimiento de análisis de la luz dispersada de un láser sobre una muestra disuelta o suspendida. Lo que se mide es el radio hidrodinámico, que a su vez permite inferir el estado de agregación de las moléculas PSMA-BiTEI. El radio hidrodinámico se midió utilizando un Horiba LB 550 (Retsch Technology).

#### **Determinación del contenido en proteínas**

El contenido de proteína se midió espectrométricamente a 280 nm utilizando un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Todas las muestras se midieron contra el placebo correspondiente o las soluciones tampón.

Cada solución de muestra se pipeteó (2 µl) 3 × en el área de medición del instrumento Nanodrop y se midió por duplicado en cada caso; posteriormente, estos valores medidos (n=6) se promediaron. El contenido proteico [mg/ml] se calculó a partir de los valores medidos promediados a través de una función de calibración de proteínas (dependiendo de la absorción en el contenido de proteína) creada previamente.

#### **Medición por electroquimioluminiscencia (ensayo de ECL)**

Para este procedimiento, se hizo uso de etiquetas SULFO-TAG™, que emitieron luz después de una estimulación electroquímica. La estimulación se llevó a cabo en las superficies de los electrodos de las llamadas microplacas de múltiples matrices. La luz emitida se midió a aprox. 620 nm utilizando un detector.

La medición se basó en el procedimiento "sándwich", en el que las moléculas PSMA-BiTEI en solución han sido

inmovilizadas en una microplaca por medio de los anticuerpos policlonales de cabra anti-PSMA-BiTEI. Penta-His-biotina se unió acto seguido a las moléculas BiTE inmovilizadas y se detectó por medio de estreptavidina conjugada con SULFO-TAG™. Las muestras se leyeron en un Sector Imager 2400.

## 5 Cromatografía de exclusión por tamaños (CET)

Para determinar las proporciones de los monómeros y dímeros y también las fracciones de bajo peso molecular (BPM) y alto peso molecular (APM), se llevó a cabo cromatografía de exclusión por tamaños utilizando un sistema HPLC. La medición se llevó a cabo utilizando un detector de fluorescencia y el cálculo se llevó a cabo por medio del procedimiento de área por ciento. La columna utilizada fue una columna estándar para la CET de las proteínas, por ejemplo, un Tosoh Biosep TSK gel G3000 SWXL 5 µm, 300 mm de longitud x diámetro interior de 7,8 mm o un material equivalente.

## Determinación de las concentraciones de PSMA-BITEI en suero tras administración i.v y s.c.

La concentración de PSMA-BITE1 en el suero de monos cangrejeros se midió por medio de ELISA. La detección se realizó mediante electroquimioluminiscencia. El límite de detección (LLOQ) fue 0,98 µg/l, con una precisión de 3 a 28 % y una precisión del 70 al 100 %.

## 20 Ensayo de actividad basado en células

El ensayo de citotoxicidad basado en células se utiliza como un ensayo rutinario para determinar la actividad relativa de las muestras PSMA-BiTEI. Debido a la unión bioespecífica de PSMA-BiTE1 a células positivas a CD3 humanas/cangrejas y positivas a PSMA humanas/cangrejas, la lisis mediada por linfocitos T de las células diana tiene lugar tras la activación de los linfocitos T (células efectoras).

La citotoxicidad es detectada por medio del ensayo de citotoxicidad luminiscente CytoTox-Glo de Promega. El valor medido utilizado en este caso es la cantidad de señal luminosa liberada, que se correlaciona con el número de células moribundas. Los ensayos de actividad adicionales están descritos en el documento WO2010037836 A2.

## 30 Ensayo de citotoxicidad basado en células para determinar la actividad relativa de las muestras de PSMA-BiTEI

### Instrumentos y material

1. Cabina de flujo laminar
2. Incubadora de cultivo celular
3. Microscopio
4. Contador celular, por ejemplo, hemocitómetro
5. Placas de 96 pocillos de fondo en U, transparentes (por ejemplo, Greiner Bio-One)
6. Placas de 96 pocillos de fondo plano, blancas (por ejemplo, Nunc, 3058078),
7. Matrices de cultivo celular
8. Instrumento de medición de múltiples placas

### 45 Reactivos

1. Células efectoras, por ejemplo, MC15
2. Células diana, por ejemplo, C4-2
3. 0,4 % de azul de tripano
4. Penicilina-estreptomicina
5. L-glutamina (200 mM)
6. Interleucina-2
7. Medio-MC15: RPMI 1640 avanzado
8. Suero bovino fetal (SBF), por ejemplo, Gibco 10270106
9. TFS, por ejemplo, Gibco 20012
10. Medio-C4-2: RPMI 1640 con L-glutamina, por ejemplo, Gibco 11835063
11. Reactivo de detección, por ejemplo, CytoTox Glo, Promega G9291

### Medios de crecimiento

- Medio para las células MC15, por ejemplo
- 900 ml de RPMI 1640 avanzado
- +100 ml de SBF
- +10 de penicilina-estreptomicina
- +10 de L-glutamina (200 mM)
- +10-20 µl de [100-200 U/ml] de interleucina 2

Medio para las células C4-2, por ejemplo  
900 ml de RPMI 1640 con L-glutamina  
+100 ml de SBF  
+10 de penicilina-estreptomicina

5

Medio de ensayo  
Medio de ensayo, por ejemplo  
900 ml de RPMI 1640 con L-glutamina  
+100 ml de SBF

10

Inicio del cultivo celular MC15

Las células para el ensayo se mantuvieron en nitrógeno líquido. Las células se descongelaron rápidamente a 37 °C. Acto seguido las células fueron resuspendidas en 15 ml de medio frío e incubadas durante 10 min. Las células se centrifugaron a continuación durante, por ejemplo, 7 minutos a 700 g, el sobrenadante se descartó, y el sedimento se volvió a suspender en 10 ml de medio de crecimiento. Las células se incubaron a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> durante aprox. 3-4 días.

15

Subcultivo de MC15

20

Las alícuotas de células vivas del cultivo se contaron. Centrifugación durante 7 minutos a 170 g. Desechar el sobrenadante y ajustar el sedimento con medio de crecimiento a una concentración de 0,5 x 10<sup>6</sup> a 1,5 x 10<sup>6</sup> células/ml. Las células deben ser pasadas 2-3 veces por semana.

25

Inicio del cultivo celular C4-2

Las células para el ensayo se mantienen en nitrógeno líquido. Las células se descongelan rápidamente a 37 °C. Las células se resuspenden luego en 20 ml de medio. Acto seguido se centrifugan durante, por ejemplo, 7 minutos a 700 g. Descartar el sobrenadante y resuspender el sedimento en 10 ml de medio de crecimiento. Las células se incuban a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> durante aprox. 3-4 días.

30

Subcultivo de C4-2

Retirar el medio del matraz y desechar. Enjuagar cuidadosamente la capa celular con 10 ml de TFS. Añadir 2-3 ml de tripsina e incubar a 37 °C hasta que la capa celular se separe (aprox. 5-15 min)

35

Añadir 10 ml de medio y disolver las células. Centrifugar durante, por ejemplo, 7 minutos a 170 g. Desechar el sobrenadante y resuspender el sedimento en 10 ml de medio de crecimiento, contar las células y ajustar las células con medio a una densidad adecuada. Las células se incuban a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> durante aprox. 3-5 días y deben ser pasadas 1-2 veces por semana.

40

Preparación de las células para el ensayo

Separar las células como se describe anteriormente. Ajustar las células efectoras (MC15) en medio de ensayo a una concentración de 2 x 10<sup>6</sup> células/ml. Ajustar las células diana (C4-2) en el medio de ensayo a una concentración de 4 x 10<sup>5</sup> células/ml.

45

Mezclar volúmenes iguales de células diana y efectoras 1:1 (mezcla de células).

Preparación de las muestras, control de ensayo y material de referencia

Equilibrar la(s) muestra(s), el control de ensayo y el material de referencia (RF) a temperatura ambiente, mezclar bien y ajustar todo con el medio de ensayo en la primera concentración (V1; por ejemplo: 500 ng/ml). Luego llevar a cabo una dilución en serie (por ejemplo 1:6, n=7 utilizando un medio de ensayo para obtener curvas de dosis-respuesta con mejor ajuste.

50

Procedimiento de ensayo

55

Adición de las muestras, control de ensayo y material de referencia

Transferir alícuotas de muestras, control de ensayo y material de referencia (por ejemplo, 25 µl) a los pocillos correspondientes de una placa de 96 pozos de fondo plano. Transferir la mezcla celular (por ejemplo, 50 µl) en cada pocillo de una placa de fondo plano.

60

Agitar la placa durante, por ejemplo, 1 min a 400 rpm. Incubar la placa durante 16-24 h a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>.

Determinación de la citotoxicidad y actividad relativa

Adición del reactivo de detección y medición

65

La dilución y adición de los reactivos y también la medición posterior se llevan a cabo conforme las instrucciones del

fabricante, por ejemplo, CytoTox-Glo, Promega.

Añadir 15 µl de reactivo por pocillo.

Agitar la placa durante, por ejemplo, 1 min a 400 rpm.

Incubar a temperatura ambiente durante aprox. 15 min.

- 5 La luminiscencia se mide con un instrumento de medición de múltiples placas.

Evaluación

Curva de mejor ajuste

- 10 Determinar los valores medios medidos en cada concentración para los replicados de las muestras, control de ensayo y material de referencia.

- 15 Dibujar una curva de dosis-respuesta para cada serie de muestras, control de ensayo y material de referencia. Para este fin, los valores medios medidos se representaron frente a las concentraciones finales de BAY2010112 (por ejemplo, 500.000 pg/ml a 1,79 pg/ml).

- 20 Ajustar una curva de mejor ajuste adecuada a través de los valores medios medidos de los niveles de concentración de las muestras, control de ensayo y material de referencia.

Actividad relativa (determinación)

La relación de actividad entre el material de muestra y el material de referencia se determina y documenta. Puede utilizarse un *software* estadístico.

- 25 Evaluación

La actividad relativa de la muestra en comparación con el material de referencia se debe corresponder con la memoria descriptiva.

#### **Determinación de la concentración de los polipéptidos de PSMA-BiTEI (espectroscopia UV/VIS)**

- 30 El procedimiento se lleva a cabo de acuerdo con la Farmacopea Europea (Ph. Eur., 2.2.25, espectroscopia UV-VIS a 280 nm) y también es adecuado para determinar la concentración de otras moléculas.

- 35 En primer lugar, el coeficiente de extinción de las moléculas PSMA-BiTEI se determinó experimentalmente. A tal fin, se determinó la absorbancia de soluciones de concentración de PSMA-BiTEI conocida, con concentraciones (en mol/l) establecidas sobre la base de la masa molar de las moléculas PSMA-BiTEI ( $1,8673 \times 10^5$  g/mol). Sobre la base de la absorbancia, la longitud de la trayectoria y la concentración fue posible calcular el coeficiente de extinción de las moléculas PSMA-BiTEI, de acuerdo con

- 40 
$$e = A / c \times d,$$

donde

- 45 A = absorbancia (o absorción, sin tener en cuenta la dispersión de luz) a una longitud de onda adecuada (en este caso, 280 nm)  
c = concentración (mol/l)  
d = longitud de la trayectoria (mm)

- 50 Los valores de absorbancia se representaron después en el eje y contra las concentraciones asociadas en el eje x para obtener una curva estándar. Utilizando estas curvas estándar, luego fue posible leer directamente la concentración de la solución de PSMA-BiTEI sobre la base de la absorbancia.

- 55 Para crear las curvas estándar mencionadas anteriormente, la ley de Beer-Lambert ha de ser aplicable a la solución medida, es decir, entre otras cosas, la sustancia absorbente ha de ser distribuida homogéneamente en la solución, la variación de los coeficientes de absorción dentro del intervalo espectral medida ha de ser insignificante y la solución medida ha de concentrarse en un nivel suficientemente bajo de modo que no se produzcan desviaciones relacionadas con la interacción.

- 60 Utilizando el coeficiente de extinción de una molécula, la concentración de proteína (en mol/l) también puede calcularse de manera inversa sobre la base de la absorbancia medida (o absorción a 280 nm), de acuerdo con:

$$\text{Concentración proteica [mol/l]} = A \times V / e \times d,$$

donde

- 65 A = absorción a 280 nm

d = longitud celular en cm (célula estándar, 1,00 cm)

V = dilución de la solución de ensayo

e = coeficiente de extinción de PSMA-BITE1 a 280 nm =  $111315 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ .

## 5 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Bayer Pharma AG

<120> Formulación de polipéptidos

<130> BHC 11 1 057

10 <160> 8

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 27

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 1

Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr Gln Thr Pro Tyr Lys  
1 5 10 15

Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr  
20 25

20 <210> 2

<211> 27

<212> PRT

<213> Callithrix jacchus

<400> 2

25

Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Asp Thr Thr Gln Asn Pro Tyr Lys  
1 5 10 15

Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr  
20 25

<210> 3

<211> 27

30 <212> PRT

<213> Saguinus oedipus

<400> 3

Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Asp Thr Thr Gln Asn Pro Tyr Lys  
1 5 10 15

Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr  
20 25

35

<210> 4

<211> 27

<212> PRT

<213> Saimiri sciureus

40 <400> 4

Gln Asp Gly Asn Glu Glu Ile Gly Asp Thr Thr Gln Asn Pro Tyr Lys  
1 5 10 15

Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr  
20 25

45

<210> 5

<211> 249

<212> PRT

<213> Secuencial artificial

<220>

# ES 2 676 468 T3

<223> Dominio de unión a scFv CD3

<400> 5

```

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Lys Tyr
20          25          30

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

Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50          55          60

Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65          70          75          80

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85          90          95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Ile Ser Tyr Trp
100         105         110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
115         120         125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Thr Val Val
130         135         140

Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu
145         150         155         160

Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Ser Gly Asn Tyr Pro Asn
165         170         175

Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly Leu Ile Gly Gly
180         185         190

Thr Lys Phe Leu Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu
195         200         205

Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val Gln Pro Glu Asp
210         215         220

Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Val Leu Trp Tyr Ser Asn Arg Trp Val Phe
225         230         235         240

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
245

```

<210> 6

<211> 243

<212> PRT

<213> Secuencial artificial

<220>

<223> Dominio de unión a scFv PSMA

<400> 6

```

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

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

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

Ala Ile Ile Ser Asp Gly Gly Tyr Tyr Thr Tyr Tyr Ser Asp Ile Ile
50          55          60

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

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

Ala Arg Gly Phe Pro Leu Leu Arg His Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly
          100          105          110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
          115          120          125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro
          130          135          140

Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys
145          150          155          160

Ala Ser Gln Asn Val Asp Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
          165          170          175

Gly Gln Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
          180          185          190

Asp Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Ala Ser Gly Thr Asp Phe Thr
          195          200          205

Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ser Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
210          215          220

Gln Gln Tyr Asp Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
225          230          235          240

```

Glu Ile Lys

5

<210> 7

<211> 498

<212> PRT

<213> Secuencial artificial

10

<220>

<223> PSMA-BiTE

<400> 7

# ES 2 676 468 T3

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

ES 2 676 468 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| Ala | Arg | Gly | Phe | Pro | Leu | Leu | Arg | His | Gly | Ala | Met | Asp | Tyr | Trp | Gly |  |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |  |
| Gln | Gly | Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly |  |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |  |
| Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Asp | Ile | Gln | Met | Thr | Gln | Ser | Pro |  |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |  |
| Ser | Ser | Leu | Ser | Ala | Ser | Val | Gly | Asp | Arg | Val | Thr | Ile | Thr | Cys | Lys |  |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |  |
| Ala | Ser | Gln | Asn | Val | Asp | Thr | Asn | Val | Ala | Trp | Tyr | Gln | Gln | Lys | Pro |  |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |  |
| Gly | Gln | Ala | Pro | Lys | Ser | Leu | Ile | Tyr | Ser | Ala | Ser | Tyr | Arg | Tyr | Ser |  |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |  |
| Asp | Val | Pro | Ser | Arg | Phe | Ser | Gly | Ser | Ala | Ser | Gly | Thr | Asp | Phe | Thr |  |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |  |
| Leu | Thr | Ile | Ser | Ser | Val | Gln | Ser | Glu | Asp | Phe | Ala | Thr | Tyr | Tyr | Cys |  |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     |     | 220 |     |     |     |  |
| Gln | Gln | Tyr | Asp | Ser | Tyr | Pro | Tyr | Thr | Phe | Gly | Gly | Gly | Thr | Lys | Leu |  |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |  |
| Glu | Ile | Lys | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Glu | Val | Gln | Leu | Val | Glu | Ser |  |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |  |
| Gly | Gly | Gly | Leu | Val | Gln | Pro | Gly | Gly | Ser | Leu | Lys | Leu | Ser | Cys | Ala |  |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |  |
| Ala | Ser | Gly | Phe | Thr | Phe | Asn | Lys | Tyr | Ala | Met | Asn | Trp | Val | Arg | Gln |  |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |  |
| Ala | Pro | Gly | Lys | Gly | Leu | Glu | Trp | Val | Ala | Arg | Ile | Arg | Ser | Lys | Tyr |  |
|     |     | 290 |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |  |
| Asn | Asn | Tyr | Ala | Thr | Tyr | Tyr | Ala | Asp | Ser | Val | Lys | Asp | Arg | Phe | Thr |  |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |  |
| Ile | Ser | Arg | Asp | Asp | Ser | Lys | Asn | Thr | Ala | Tyr | Leu | Gln | Met | Asn | Asn |  |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |  |
| Leu | Lys | Thr | Glu | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | Val | Arg | His | Gly | Asn |  |

# ES 2 676 468 T3

340 345 350  
 Phe Gly Asn Ser Tyr Ile Ser Tyr Trp Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 355 360 365  
 Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 370 375 380  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr  
 385 390 395 400  
 Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly  
 405 410 415  
 Ala Val Thr Ser Gly Asn Tyr Pro Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly  
 420 425 430  
 Gln Ala Pro Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Lys Phe Leu Ala Pro Gly  
 435 440 445  
 Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu  
 450 455 460  
 Thr Leu Ser Gly Val Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Val  
 465 470 475 480  
 Leu Trp Tyr Ser Asn Arg Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr  
 485 490 495

Val Leu

<210> 8

<211> 504

<212> PRT

5 <213> Secuencial artificial

<220>

<223> Secuencia de PSMA-BiTE1

<400> 8

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Glu  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr  
 20 25 30  
 Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

10

# ES 2 676 468 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Ile | Ile | Ser | Asp | Gly | Gly | Tyr | Tyr | Thr | Tyr | Tyr | Ser | Asp | Ile | Ile | 50  | 55  | 60  |     |
| Lys | Gly | Arg | Phe | Thr | Ile | Ser | Arg | Asp | Asn | Ala | Lys | Asn | Ser | Leu | Tyr | 65  | 70  | 75  | 80  |
| Leu | Gln | Met | Asn | Ser | Leu | Lys | Ala | Glu | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | 85  | 90  | 95  |     |
| Ala | Arg | Gly | Phe | Pro | Leu | Leu | Arg | His | Gly | Ala | Met | Asp | Tyr | Trp | Gly | 100 | 105 | 110 |     |
| Gln | Gly | Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | 115 | 120 | 125 |     |
| Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Asp | Ile | Gln | Met | Thr | Gln | Ser | Pro | 130 | 135 | 140 |     |
| Ser | Ser | Leu | Ser | Ala | Ser | Val | Gly | Asp | Arg | Val | Thr | Ile | Thr | Cys | Lys | 145 | 150 | 155 | 160 |
| Ala | Ser | Gln | Asn | Val | Asp | Thr | Asn | Val | Ala | Trp | Tyr | Gln | Gln | Lys | Pro | 165 | 170 | 175 |     |
| Gly | Gln | Ala | Pro | Lys | Ser | Leu | Ile | Tyr | Ser | Ala | Ser | Tyr | Arg | Tyr | Ser | 180 | 185 | 190 |     |
| Asp | Val | Pro | Ser | Arg | Phe | Ser | Gly | Ser | Ala | Ser | Gly | Thr | Asp | Phe | Thr | 195 | 200 | 205 |     |
| Leu | Thr | Ile | Ser | Ser | Val | Gln | Ser | Glu | Asp | Phe | Ala | Thr | Tyr | Tyr | Cys | 210 | 215 | 220 |     |
| Gln | Gln | Tyr | Asp | Ser | Tyr | Pro | Tyr | Thr | Phe | Gly | Gly | Gly | Thr | Lys | Leu | 225 | 230 | 235 | 240 |
| Glu | Ile | Lys | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Glu | Val | Gln | Leu | Val | Glu | Ser | 245 | 250 | 255 |     |
| Gly | Gly | Gly | Leu | Val | Gln | Pro | Gly | Gly | Ser | Leu | Lys | Leu | Ser | Cys | Ala | 260 | 265 | 270 |     |
| Ala | Ser | Gly | Phe | Thr | Phe | Asn | Lys | Tyr | Ala | Met | Asn | Trp | Val | Arg | Gln | 275 | 280 | 285 |     |
| Ala | Pro | Gly | Lys | Gly | Leu | Glu | Trp | Val | Ala | Arg | Ile | Arg | Ser | Lys | Tyr |     |     |     |     |

# ES 2 676 468 T3

| 290                                                                                | 295 | 300 |
|------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr<br>305 310 315 320 |     |     |
| Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Asn<br>325 330 335     |     |     |
| Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn<br>340 345 350     |     |     |
| Phe Gly Asn Ser Tyr Ile Ser Tyr Trp Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr<br>355 360 365     |     |     |
| Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser<br>370 375 380     |     |     |
| Gly Gly Gly Gly Ser Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr<br>385 390 395 400 |     |     |
| Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly<br>405 410 415     |     |     |
| Ala Val Thr Ser Gly Asn Tyr Pro Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly<br>420 425 430     |     |     |
| Gln Ala Pro Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Lys Phe Leu Ala Pro Gly<br>435 440 445     |     |     |
| Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu<br>450 455 460     |     |     |
| Thr Leu Ser Gly Val Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Val<br>465 470 475 480 |     |     |
| Leu Trp Tyr Ser Asn Arg Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr<br>485 490 495     |     |     |
| Val Leu His His His His His His<br>500                                             |     |     |

# REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica líquida que comprende un polipéptido, TRIS y fosfato, el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos reproducida en la SEQ ID NO: 8, caracterizada porque  
5 la composición contiene el polipéptido en una concentración de 0,5 µg/ml a 3,0 mg/ml, la composición contiene TRIS 100 mM y fosfato 50 mM, el pH de la composición está comprendido entre 5,0 y 7,5, la composición contiene 0,04 % (m/v) de polisorbato 80 y  
10 la composición contiene adicionalmente un lioprotector.
2. Composición de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque la composición contiene 2-10 % (m/v) de un lioprotector.
- 15 3. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2, caracterizada porque el lioprotector es trehalosa o dihidrato de trehalosa.
4. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque la composición contiene el polipéptido en una concentración de 2 mg/ml.  
20
5. Mezcla de sólidos que se puede obtener por liofilización de una composición líquida de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
6. Composición farmacéutica líquida, caracterizada porque la composición se reconstituye mediante la  
25 disolución de una mezcla de sólidos liofilizados de acuerdo con la reivindicación 5 en un medio líquido apropiado.
7. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque la biodisponibilidad del polipéptido después de la administración subcutánea de la composición es > 60 %.
- 30 8. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en un procedimiento terapéutico.
9. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en un  
35 procedimiento terapéutico, comprendiendo dicho procedimiento la administración parenteral de la composición.
10. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en un procedimiento para el tratamiento terapéutico de enfermedades hiperproliferativas de la próstata.
- 40 11. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en un procedimiento para el tratamiento terapéutico de enfermedades hiperproliferativas de la próstata, comprendiendo el procedimiento la administración subcutánea de la composición.
12. Jeringa que contiene una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores.