

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 959 257**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 47/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.01.2017 PCT/EP2017/051486**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.08.2017 WO17129585**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.01.2017 E 17702801 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.07.2023 EP 3408295**

54 Título: **Composición farmacéutica que comprende construcciones de anticuerpo biespecífico**

30 Prioridad:

25.01.2016 US 201662286552 P

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

22.02.2024

73 Titular/es:

**AMGEN RESEARCH (MUNICH) GMBH (50.0%)
Staffelseestrasse 2
81477 München, DE y
AMGEN INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**KANAPURAM, SEKHAR;
LATYPOV, RAMIL;
THANGARAJ, BALAKUMAR y
POMPE, CORNELIUS**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 959 257 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

Composición farmacéutica que comprende construcciones de anticuerpo biespecífico

5 ANTECEDENTES

La aparición de tecnología de ADN recombinante ha permitido el desarrollo de muchos productos farmacéuticos de proteína en las tres últimas décadas. Los productos farmacéuticos basados en proteína están ahora entre las categorías de crecimiento más rápido de agentes terapéuticos en desarrollo (pre)clínico y como productos comerciales. En comparación con fármacos químicos pequeños, los productos farmacéuticos de proteína tienen elevada especificidad y actividad a concentraciones relativamente bajas, y normalmente proporcionan terapia de enfermedades de alto impacto, tales como diversos cánceres, enfermedades autoinmunitarias y trastornos metabólicos (Roberts, Trends Biotechnol. 2014 Jul;32(7):372-80, Wang, Int J Pharm. 1999 Aug 20;185(2):129-88).

Debido a los avances en los procesos de purificación a escala comercial, las proteínas recombinantes se pueden obtener ahora en alta pureza cuando se fabrican por primera vez. Sin embargo, las proteínas solo son marginalmente estables y son altamente susceptibles a la degradación, tanto química como física. La degradación química se refiere a modificaciones que implican a los enlaces covalentes, tales como desamidación, oxidación, escisión o formación de nuevos puentes disulfuro, hidrólisis, isomerización o desglucosilación. La degradación física incluye desplegamiento de proteínas, adsorción no deseable a superficies y agregación. El tratar con estas inestabilidades físicas y químicas es una de las tareas más complicadas en el desarrollo de productos farmacéuticos de proteína (Chi et al., Pharm Res, Vol. 20, No. 9, Sept 2003, pp. 1325-1336, Roberts, Trends Biotechnol. 2014 Jul;32(7):372-80).

La agregación de proteínas representa un acontecimiento importante de la inestabilidad física de proteínas y ocurre debido a la tendencia inherente a minimizar la interacción termodinámicamente desfavorable entre el disolvente y los residuos de proteínas hidrófobas. Es particularmente problemática debido a que se encuentra rutinariamente durante los procesos de replegamiento, purificación, esterilización, transporte y almacenamiento. La agregación puede ocurrir incluso en condiciones de disolución donde el estado nativo de la proteína se favorece altamente termodinámicamente (por ejemplo, pH neutro y 37 °C) y en ausencia de estrés (Chi et al., Pharm Res, Vol. 20, No. 9, Sept 2003, pp. 1325-1336, Roberts, Trends Biotechnol. 2014 Jul;32(7):372-80, Wang, Int J Pharm. 1999 Aug 20;185(2):129-88, Mahler J Pharm Sci. 2009 Sep;98(9):2909-34).

La agregación de proteínas es problemática debido a que puede afectar la actividad biológica de las proteínas terapéuticas. Además, la agregación de proteínas conduce a estética no deseable del medicamento, y disminuye el rendimiento de producto debido a las elaboradas etapas de purificación que se requieren para retirar los agregados del producto final. Más recientemente, también ha existido una preocupación y evidencia cada vez mayor de que la presencia de proteínas agregadas (proteínas incluso humanizadas o completamente humanas) puede aumentar significativamente el riesgo de que un paciente desarrolle una respuesta inmunitaria al monómero de proteína activo, dando como resultado la formación de anticuerpos neutralizantes y la resistencia a fármaco, u otros efectos secundarios adversos (Mahler J Pharm Sci. 2009 Sep;98(9):2909-34).

Se ha informado en la bibliografía de varios esfuerzos para minimizar la agregación de proteínas por diversos mecanismos. Se pueden estabilizar las proteínas y así proteger de la formación de agregados y otros cambios químicos que modifican su estructura primaria, aumentando así la hidrofobia interior y reduciendo la hidrofobia exterior. Sin embargo, la ingeniería genética de proteínas puede dar como resultado funcionalidad alterada y/o elevada inmunogenicidad. Otro enfoque se centra en la disociación de agregados (denominada "desagregación") para recuperar monómeros nativos funcionales usando diversos mecanismos, tales como temperatura, presión, pH y sales. Actualmente, los agregados de proteína se retiran como impurezas principalmente en las etapas de pulido del procesamiento aguas abajo. Sin embargo, en casos de altos niveles de alto peso molecular (HMW), eliminar una cantidad significativa de HMW no solo da como resultado una pérdida de rendimiento sustancial, sino que también hace que el diseño de un proceso robusto aguas abajo sea complicado (Chi et al., Pharm Res, Vol. 20, No. 9, Sept 2003, pp. 1325-1336). Se ha descrito previamente el uso de beta-ciclodextrinas como agente en composiciones que comprenden anticuerpos contra la agregación, en particular se usan HP-beta-CD y sulfobutiléter-beta-ciclodextrina (SBE-beta-CD) en productos parentales autorizados (SERNO T ET AL: "Protein stabilization by cyclodextrins in the liquid and dried state", ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 63, no. 13, 23 de agosto de 2011, páginas 1086-1106.) Sin embargo, SBE-β-CD también se describió con resultados mixtos referentes a la estabilización de composiciones que comprenden anticuerpos (Serno T et al. "Inhibition of Agitation-induced Aggregation of and IgG-Antibody by Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin", JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, VOL. 99, NO. 3, MARZO 2010, páginas 1193-1206).

La conservación de la estabilidad y actividad de las proteínas en aplicaciones biológicas y biotecnológicas plantea graves retos. Existe una necesidad en la técnica de composiciones farmacéuticas optimizadas que proporcionen estabilización potenciada de proteínas terapéuticas y reduzcan la agregación y desnaturalización durante la formulación, envasado, transporte, almacenamiento y administración, previniendo así la pérdida de función y reacciones inmunogénicas adversas. Por lo tanto, es el objeto de la presente invención cumplir esta necesidad. Esto se aplica especialmente a construcciones de anticuerpo monocatenario biespecífico que se unen a un antígeno de

superficie celular diana a través de un primer dominio de unión (por ejemplo, CD33) y al antígeno de superficie de linfocitos T CD3 a través de un segundo dominio de unión que se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, AIGNER M ET AL: "T lymphocytes can be effectively recruited for ex vivo and in vivo lysis of AML blasts by a novel CD33/CD3-bispecific BiTE antibody construct", LEUKEMIA, MACMILLAN PRESS LTD, US, vol. 27, no. 5, 1 de abril de 2013, páginas 1107-1115; documentos de patente WO 2015/036583 A2; WO 2004/106381 A1; WO 2013/072406 A1; y WO 2016/004108 A2).

SUMARIO

La estabilidad de proteínas, y en particular la agregación de proteínas, es un reto cada vez mayor en la industria de la biotecnología, donde la agregación se encuentra durante toda la vida útil de una proteína terapéutica, que incluye durante los procesos de replegamiento, purificación, esterilización, transporte y almacenamiento. Por lo tanto, el objeto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica estable que comprenda una construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico en donde la construcción monocatenaria biespecífica comprende o consiste en un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se representa en SEQ ID NO 100 o 174, que se une a un antígeno de superficie celular diana CD33 o CD19 por un primer dominio de unión y al antígeno de superficie de linfocitos T CD3 a través de un segundo dominio de unión; una β -ciclodextrina; y un tampón.

La β -ciclodextrina es una sal de sodio de sulfobutiléter- β -ciclodextrina. Puede estar presente en una concentración en el intervalo del 0,1 % al 20 % (p/v), preferentemente del 0,5 % al 2 % (p/v) y más preferentemente del 0,8 % al 1,5 % (p/v).

La construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico puede estar presente en un intervalo de concentración de 0,1-5 mg/ml, preferentemente de 0,2-2,5 mg/ml, más preferentemente de 0,25-1,0 mg/ml. Su primer dominio de unión puede unirse a CD33.

El tampón se puede seleccionar del grupo que consiste en fosfato de potasio, ácido acético/acetato sódico, ácido cítrico/citrato sódico, ácido succínico/succinato sódico, ácido tartárico/tartrato sódico, histidina/HCl de histidina, glicina, Tris, glutamato, acetato y mezclas de los mismos, y en particular de fosfato de potasio, ácido cítrico/citrato sódico, ácido succínico, histidina, glutamato, acetato y combinaciones de los mismos.

El pH de la composición farmacéutica puede estar en el intervalo de 4 a 7,5.

Uno o más excipientes pueden estar presentes en la composición farmacéutica proporcionada en el presente documento, que incluyen sacarosa, trehalosa, manitol, sorbitol, arginina, lisina, polisorbato 20, polisorbato 80, poloxámero 188, Pluronic y combinaciones de los mismos.

La composición puede comprender uno o más conservantes, particularmente alcohol bencílico, clorobutanol, fenol, meta-cresol, metilparabeno, fenoxietanol, propilparabeno tiomerosal. La estructura y concentración típica para el uso de estos conservantes se describen en la Tabla 1 de Meyer et al. J Pharm Sci. 96(12), 3155.

En el presente documento también se proporciona una composición farmacéutica libre de conservantes, que comprende una construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 100 y que está en una concentración de aproximadamente 0,5 mg/ml, y además una ciclodextrina que es una sal de sodio de sulfobutiléter- β -ciclodextrina en una concentración de aproximadamente 1 % (p/v), y además un tampón que es fosfato de potasio en concentración de aproximadamente 10 mM, comprendiendo dicha formulación además sacarosa en concentración de aproximadamente 8 % (p/v) y polisorbato 80 en concentración de aproximadamente 0,01 % (p/v) a un pH de aproximadamente 6,0.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Cuantificación de especies de alto peso molecular y confórmero por cromatografía de líquidos de resolución ultra alta de exclusión por tamaño (SE-UPLC) en preparaciones de AMG 330 (SEQ ID NO: 100) que contienen polisorbato 20, 80 o HP- β -CD.

Figura 2: Efecto del polisorbato (PS) 20, 80 y HP- β -CD sobre la cantidad de especies no monoméricas (incluyendo confórmeros, dímeros, agregados) en preparaciones de AMG 330 en función de factores de estrés: sin estrés (A), espumación (B) y 10 ciclos de congelación/descongelación (C). La cuantificación de especies se logró por cromatografía de líquidos de resolución ultra alta de exclusión por tamaño (SE-UPLC). La concentración de proteína se trató por el mismo ensayo (detección a A280).

Figura 3: Efecto dependiente de la concentración de HP- β -CD y SBE- β -CD sobre la tendencia de agregación (medida por densidad óptica a 350 nm; densidades ópticas se refieren a una longitud de trayectoria de 10 mm) de AMG 103 en presencia de 0,9 % (V/V) de alcohol bencílico.

Figura 4: Mediciones de la intensidad de emisión de fluorescencia intrínseca de AMG 103 antes (A) y después de (B) la incubación a 37 °C durante 24 horas en presencia de 0,9 % (V/V) de alcohol bencílico.

Figura 5: Modelos predictivos derivados de estudios de diseño experimental (factorial completo de 2 niveles con 4 factores) que describen el efecto de concentraciones crecientes de HP-β-CD (A) y SBE-β-CD (B) sobre la densidad óptica a 350 nm de preparados de AMG 103 (SEQ ID NO: 174).

Figura 6: Evaluación de especies de alto peso molecular (HMWS) por cromatografía de exclusión por tamaño en diferentes formulaciones que contienen 5 mg/ml de CD33_2-hALB (SEQ ID NO: 175).

Figura 7: Tasa de formación de especies de alto peso molecular a 25 °C y 37 °C para tres formulaciones de MSLN-hALB diferentes (SEQ ID NO: 176) (K60RTrT (A), K60SBESuT (B) y K60RMSuT (C)) determinada por la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)

Figura 8: Formación de variantes de carga ácida a 25 °C y 37 °C para tres formulaciones de MSLN-hALB diferentes determinada por cromatografía líquida de resolución ultra alta con intercambio de catión débil (WCX-UPLC)

Figura 9. Solubilidad de AMG 330 a 40 °C en presencia de 12 % de PEG-3350. Tanto SBE-β-CD (Captisol) como alginato (Protanal) aumentan la solubilidad de AMG 330 agregado y monomérico cuando se usa a mayores concentraciones. Sin embargo, SBE-β-CD solubiliza preferentemente el monómero. El control a la izquierda (1X PBS) se incubó sin SBE-β-CD, mientras que el control a la derecha (1X PBS) se incubó sin PEG y SBE-β-CD.

Figura 10: Datos del mismo experimento que se muestra en la Figura 9 que demuestra el efecto de diferentes concentraciones de SBE-β-CD y alginato sobre el % de monómero y % de agregado en AMG 330. SBE-β-CD a ~ 0,1-1 % es eficaz en aumentar el contenido de monómero a costa de agregados (mostrado por flechas verdes). A diferencia, los datos del alginato muestran una tendencia opuesta de aumentar los agregados (mostrado por la flecha roja). También se mostró que SBE-β-CD reducía el impacto negativo del exceso de concentración en este caso.

Figura 11: Área de pico relativa promedio de SEC de los picos de AMG 330 después del cambio de tampón y concentración de proteína por ultrafiltración/centrifugación.

Figura 12. A: Resumen de concentraciones máximas de AMG 330 logradas por exceso de concentración, calculado por pico principal de SEC + HMW. Las formulaciones SBE-β-CD (indicadas por estrellas) alcanzaron mayores concentraciones y mantuvieron mayor % de monómero. **B:** Datos del mismo experimento como se muestra en la Figura 12A donde AMG 330 se concentró hasta 7-8 mg/ml en presencia de concentraciones crecientes de SBE-β-CD con o sin glicina y sacarosa (ver las estrellas). El control a la izquierda se concentró sin SBE-β-CD. El control a la derecha no se concentró más allá de su concentración inicial de 0,4 mg/ml. Muestra adicional marcada como "2 % glicina, 1 % sacarosa" se concentró sin SBE-β-CD para demostrar la ventaja de uso de SBE-β-CD. **C:** Áreas de pico relativas de CEX de AMG 330 después de 5 días incubación a 4 °C, promedio de dos duplicados. Todas las muestras contienen citrato 20 mM, 0,01 % de PS-80, pH 6,0. **D:** Área de pico principal relativa de AMG 330 después de análisis de SEC. Todas las muestras también incluyen citrato 20 mM, 0,01 % de PS-80, pH 6,0.

Figura 13: Concentración de AMG 330 calculada a partir del pico principal de SEC + HMW.

Figura 14: Área de pico relativa de AMG 330 de partir de SEC después del intercambio y concentración de tampón.

Figura 15: Áreas de pico total de SEC de AMG 330 (pico principal + HMW) después de la incubación con diversas ciclodextrinas

Figura 16: AMG 330 en 13 formulaciones diferentes a 1 mg/ml y almacenado a -20, -30 y -700 °C durante hasta 6 semanas.

Figura 17: A: Aunque SBE-β-CD a 0,5 % puede no ser completamente suficiente para proporcionar una torta liofilizada elegante, es compatible con agentes de carga más comunes, tales como glicina y manitol. Todas estas tortas liofilizadas se reconstituyeron bien y produjeron de poca a ninguna agregación o particulación en presencia de SBE-β-CD. **B:** El uso de SBE-β-CD (cromatograma azul, indicado por la flecha) pero no α-ciclodextrano (cromatograma rosa, indicado por la flecha) reduce el % de pos-reconstitución de agregados. La formulación de control sin ciclodextrina (en la línea negra gruesa) también muestra un elevado nivel de agregados, aunque inferior al α-ciclodextrano. Estos resultados demuestran la ventaja de uso de SBE-β-CD. **C:** SEC analítica de diferentes formulaciones (pre y pos representa pre-liofilización y pos-constitución). **D:** Análisis de MFI para diferentes formulaciones tras la liofilización.

Figura 18. Resumen de concentraciones máximas de Fapa BiTE® (SEQ ID NO: 177) alcanzadas por exceso de concentración. Las formulaciones de SBE-β-CD (indicadas por estrellas) alcanzaron mayores concentraciones de proteína en comparación con α-ciclodextrano y mantuvieron mayor % de monómero. Las formulaciones de α-ciclodextrano perdieron la mayoría de su proteína soluble debido a la precipitación.

Figura 19. Visión general sobre el porcentaje de contenido de especies de alto peso molecular (HMWS) determinadas por cromatografía de rendimiento ultra alto de exclusión por tamaño (SE-UPLC) en función de la formulación de construcción de anticuerpo CD33-scFc BiTE.

Figura 20. Visión general sobre el porcentaje de contenido de especies de alto peso molecular (HMWS) determinadas por cromatografía de rendimiento ultra alto de exclusión por tamaño (SE-UPLC) en función de la formulación de construcción de anticuerpo FLT3-scFc BiTE.

Figura 21. Visión general sobre el porcentaje de contenido de especies de alto peso molecular (HMWS) determinadas por cromatografía de rendimiento ultra alto de exclusión por tamaño (SE-UPLC) en función de la formulación de construcción de anticuerpo BCMA-scFc BiTE.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

A pesar de la alta calidad de los productos biotecnológicos terapéuticos actuales y del parecido de las proteínas y anticuerpos humanos recombinantes con las proteínas humanas endógenas, la inestabilidad de las proteínas sigue siendo un problema importante. Además de las consecuencias relacionadas con la calidad de la agregación de proteínas, tal como posible pérdida de actividad de proteína y estética no deseable del medicamento, se ha informado que los agregados de proteína soluble tienen efectos citotóxicos significativos y, lo que es más importante, son un posible factor de riesgo para el desarrollo de una respuesta inmunitaria a productos de proteína.

La agregación de proteínas puede ocurrir durante diversos puntos a lo largo de la vida útil de una proteína, que incluye fermentación, plegamiento, purificación, envasado, transporte, almacenamiento o administración y es fuertemente dependiente de diversos factores ambientales. Existe una necesidad crítica en la técnica de aumentar la estabilidad y reducir la agregación de proteínas terapéuticas; y formulaciones farmacéuticas optimizadas pueden ayudar a hacerlo. Los presentes inventores investigaron los efectos de diferentes ciclodextrinas sobre la agregación de construcciones de anticuerpo biespecífico (específicamente, acopladores biespecíficos de linfocitos T, BiTE®) cuando se exponen a diversos factores de estrés medioambiental. Sorprendentemente, los inventores descubrieron que las construcciones de anticuerpo de SEQ ID NO: 100 y 174 podrían ser estabilizadas significativamente en presencia de ciclodextrinas, en donde la β-ciclodextrina es una sal de sodio de sulfobutiléter-β-ciclodextrina.

Por lo tanto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica estable que comprende a) una construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico de SEQ ID NO: 100 o 174, que se une a un antígeno de superficie celular diana CD33 o CD19, respectivamente, a través de un primer dominio de unión y al antígeno de superficie de linfocitos T CD3 a través de un segundo dominio de unión, b) sal de sodio de sulfobutiléter-β-ciclodextrina y c) un tampón. Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refieren a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) por terapia

Estabilidad

En la presente invención, el término "estabilidad" o "estabilización" se refiere a la estabilidad de la composición farmacéutica en total y en particular a la estabilidad del principio activo (es decir, la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico) en sí, específicamente durante la formulación, envasado, transporte, almacenamiento y administración. Los términos "estabilidad" o "estable" en el contexto de la composición farmacéutica de la invención y la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico se refieren particularmente a la reducción o prevención de la formación de agregados de proteína (HMWS). Específicamente, el término "estabilidad" también se refiere a la estabilidad coloidal de las construcciones de anticuerpo monocatenario biespecífico comprendidas dentro de la composición farmacéutica descrita en el presente documento. "Estabilidad coloidal" es la capacidad de partículas coloidales (tales como proteínas) a seguir dispersadas en líquidos durante un periodo de tiempo prolongado (días a años).

El término "agregado (de proteína)", como se usa en el presente documento, engloba, en general, una especie de peso molecular más alto, tal como "oligómeros" o "multímeros" en lugar de las especies definidas (por ejemplo, un monómero). El término se usa indistintamente en el presente documento con los términos "especie de alto peso molecular" y "HMWS". Los agregados de proteína se pueden diferenciar, en general, en tamaño (que varía desde pequeños armazones (dímeros) a grandes (partículas subvisibles o incluso visibles) y de intervalo de nanómetros a micrómetros en diámetro), morfología (aproximadamente esféricas a fibrilares), estructura de proteína (native frente a no nativa/desnaturalizada), tipo de unión intermolecular (covalente frente a no covalente), reversibilidad y solubilidad. Los agregados solubles cubren el intervalo de tamaños de aproximadamente 1 a 100 nm, y las partículas de proteína

cubren intervalos subvisibles (~0,1-100 .m) y visibles (>100 .m). Todos los tipos anteriormente mencionados agregados de proteína están, en general, englobados por el término. Por lo tanto, el término "agregado (de proteína)" se refiere a todos los tipos de especies no nativas físicamente asociadas o químicamente unidas de dos o más monómeros de proteína.

5 Por lo tanto, el término "agregación de proteínas" o "agregación no nativa" indica el (los) proceso(s) por los que moléculas de proteínas se ensamblan en complejos compuestos de dos o más proteínas, con las proteínas individuales indicadas como el monómero. Existen múltiples vías que conducen a la agregación de proteínas que se puede inducir por una amplia variedad de condiciones, que incluyen temperatura, estrés mecánico, tal como agitar y remover, bombeo, congelación y/o descongelación, y formulación.

Temperatura

15 Un aumento en la temperatura acelera las reacciones químicas, tales como oxidación y desamidación de proteínas, que puede a su vez promover la agregación. La temperatura más alta también influye directamente en la conformación de proteínas al nivel de estructura cuaternaria, terciaria y secundaria, y puede conducir a un despliegue inducido por la temperatura que puede promover la agregación.

Congelación y descongelación

20 La desnaturalización y agregación de proteínas puede ocurrir durante la congelación/descongelación debido a cambios físicos y químicos complejos, tales como creación de nuevas interfases hielo/disolución, adsorción a superficies de recipientes, crioconcentración de la proteína y solutos, y cambios de pH debido a la cristalización de componentes de tampón.

Concentración de proteína

25 Un aumento en la concentración de proteína también puede potenciar la formación de agregados de proteína. A altas concentraciones de proteína, ocurre la aglomeración macromolecular, un término used para describir el efecto de ocupación total de alto volumen por solutos macromoleculares sobre el comportamiento de cada especie macromolecular en esa disolución. Según esta teoría de volumen excluido, se puede favorecer el auto-ensamblaje y así posiblemente la agregación.

Conservantes

35 Los conservantes antimicrobianos, tales como el alcohol bencílico y el fenol, son frecuentemente necesarios en las formulaciones líquidas de proteína para garantizar la esterilidad durante su estabilidad en almacén, y, además, se requieren en formulaciones multidosis y ciertos sistemas de administración de fármacos, por ejemplo, plumas de inyección, minibombas y administraciones tópicas. Se ha informado de muchos conservantes para inducir la agregación de proteínas, aunque el mecanismo subyacente no es bien entendido. Se ha propuesto que los conservantes se unen a y pueblan los estados de proteína desplegada tienen tendencia a la agregación.

45 Ventajosamente, se prevé que las composiciones farmacéuticas de la invención sean estables, es decir, siguen libres o sustancialmente libres de agregados de proteína incluso cuando se someten a estrés, en particular estrés térmico, almacenamiento, estrés inducido por la superficie (tal como ciclos de congelación/descongelación, espumación), concentración (por ultra- y diafiltración) o se mezclen con compuestos orgánicos, tales como conservantes antimicrobianos. Preferentemente, las composiciones farmacéuticas pueden tener características similares o incluso mejoradas en comparación con las composiciones que comprenden SBE- β -CD o HP β -CD que se han evaluado en los Ejemplos adjuntos. Las composiciones farmacéuticas de la invención son preferentemente disoluciones homogéneas de construcciones de anticuerpo monocatenario biespecífico monomérico dispersadas.

50 El experto apreciará que aún cuando la composición farmacéutica proporcione eficazmente estabilización del principio activo (es decir, reduzca o inhiba la formación de agregados de proteína de la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico), ocasionalmente se pueden formar algunos agregados o confórmeros, sin embargo, sin comprometer sustancialmente la utilizabilidad global de la composición farmacéutica. En este contexto, "sustancialmente libre" de agregados significa que la cantidad de agregados sigue siendo inferior al 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % (p/v), particularmente también cuando se somete a estrés medioambiental, por ejemplo, como se evalúa en los Ejemplos adjuntos.

60 Métodos para determinar la presencia de agregados de proteína soluble e insoluble se han revisado, entre otros, por Mahler et al., J Pharm Sci. 2009 Sep;98(9):2909-34. La formación de agregados de proteína soluble se puede evaluar por cromatografía líquida de resolución ultra alta de exclusión por tamaño (SE-UPLC) como se describe en los Ejemplos adjuntos. SEC es uno de los métodos analíticos más usados para la detección y cuantificación de agregados de proteína. El análisis de SEC permite tanto el dimensionamiento de los agregados, como su cuantificación. SEQ-UPLC permite la separación selectiva y rápida de macromoléculas basándose en su forma y tamaño (radio hidrodinámico) en un intervalo de peso molecular de aproximadamente 5-1000 kDa.

Las disoluciones de proteína muestran una propiedad óptica, denominada opalescencia o turbidez. La propiedad óptica de una disolución es una función de las partículas presentes para dispersar y absorber luz. Las proteínas son coloides naturales y la turbidez de formulaciones acuosas depende de la concentración de proteína, la presencia de partículas no disueltas, el tamaño de partículas y el número de partículas por unidad de volumen. La turbidez se puede medir por espectroscopía de UV-Vis como densidad óptica en el intervalo de 340-360 nm y se usa para detectar tanto agregados solubles como insolubles.

Además, la inspección de muestras por medios visuales es todavía un aspecto importante de la evaluación de agregados de proteína. La evaluación visual de la ausencia o presencia de agregados visibles se realiza preferentemente según el Deutscher Arzneimittel Codex (DAC) Prueba 5.

Como se explica en cualquier parte en el presente documento, se prevé que la composición farmacéutica de la invención -lo más probablemente por la acción de las β -ciclodextrinas comprendidas en su interior- favorezca un aumento de estabilidad coloidal de las construcciones de anticuerpo monocatenario biespecífico, y así presente una separación de fases líquido-líquido (LLPS) reducida o incluso ausente. LLPS es un evento impulsado termodinámicamente, en el que una disolución homogénea de proteína se separa en una fase pobre en proteínas (normalmente la fase superior) y una fase rica en proteína (normalmente la fase inferior) con temperaturas decrecientes. La LLPS es normalmente completamente reversible simplemente mezclando las dos fases y aumentando la temperatura de la disolución. La aparición de LLPS se ha atribuido a interacciones proteína-proteína atractivas de corto intervalo, que hace que sea una medida de la concentración atracción proteína-proteína. Se ha descubierto que las composiciones farmacéuticas que comprenden β -ciclodextrinas según la invención comprenden mayores concentraciones de la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico en la fase pobre en proteína de LLPS, en comparación con composiciones farmacéuticas que no comprenden β -ciclodextrinas. Por consiguiente, se prevé que las composiciones farmacéuticas de la invención presenten LLPS reducida o ninguna LLPS en absoluto cuando se compara con controles, y así se promueve un aumento de la estabilidad coloidal de las construcciones de anticuerpo monocatenario biespecífico de la presente invención. La LLPS se puede inducir y el contenido de proteína de las diferentes fases se puede examinar como se describe en los Ejemplos adjuntos.

El estrés ambiental puede, en particular debido a la desnaturalización térmica y/o química, provocar también cambios conformacionales, que a su vez pueden favorecer la agregación. Sorprendentemente, los presentes inventores descubrieron que las construcciones de anticuerpo monocatenario biespecífico también se estabilizan con respecto a los cambios conformacionales, como se evalúa midiendo la intensidad de emisión de fluorescencia intrínseca de los aminoácidos aromáticos. Por lo tanto, la composición farmacéutica de la presente invención preferiblemente también reduce o inhibe la formación de confómeros (es decir, especies de proteína no nativas, plegadas de forma anormal).

Construcción de anticuerpo

Como se explica previamente, la composición farmacéutica estable de la presente invención comprende una construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico, que se une a un antígeno de superficie celular diana CD33 o CD19 a través de un primer dominio de unión y al antígeno de superficie de linfocitos T CD3 a través de un segundo dominio de unión.

El término "construcción de anticuerpo" se refiere, en general, a una molécula en la que la estructura y/o función se basa/n en la estructura y/o función de un anticuerpo, por ejemplo, de una molécula de inmunoglobulina de longitud completa o completa. Por lo tanto, una construcción de anticuerpo es capaz de unirse a su diana o antígeno específico. Además, una construcción de anticuerpo de acuerdo con la invención comprende los requisitos estructurales mínimos de un anticuerpo que permiten la unión de la diana. Este requisito mínimo se puede definir, por ejemplo, por la presencia de al menos las tres CDR de cadena ligera (es decir, CDR1, CDR2 y CDR3 de la región VL) y/o las tres CDR de cadena pesada (es decir, CDR1, CDR2 y CDR3 de la región VH). Los anticuerpos en los que se basan las construcciones descritas en el presente documento incluyen, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, recombinantes, quiméricos, desimmunizados, humanizados y humanos.

Dentro de la definición de "construcciones de anticuerpo" están los anticuerpos de longitud completa o completos que incluyen anticuerpos de camélido y otros anticuerpos de inmunoglobulina generados por métodos o procesos biotecnológicos o de ingeniería de proteínas. Estos anticuerpos de longitud completa pueden ser, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, recombinantes, quiméricos, desimmunizados, humanizados y humanos. También dentro de la definición de "construcciones de anticuerpos" están los fragmentos de anticuerpos de longitud completa, tales como VH, VHH, VL, (s)dAb, Fv, Fd, Fab, Fab', F(ab')₂ o "r IgG" ("medio anticuerpo"). Las construcciones de anticuerpo también pueden ser fragmentos modificados de anticuerpos, también llamadas variantes de anticuerpo, tales como scFv, di-scFv o bi(s)-scFv, scFv-Fc, scFv-cremallera, scFab, Fab2, Fab3, diacuerpos, diacuerpos monocatenarios, diacuerpos en tándem (tandab), di-scFv en tándem, tri-scFv en tándem, "minicuerpos" ejemplificados por una estructura que es del siguiente modo: (VH-VL-CH₃)₂, (scFv-CH₃)₂ o (scFv-CH₃-scFv)₂, multicuerpos tales como triacuerpos o tetracuerpos, y anticuerpos monocatenarios, tales como nanocuerpos o anticuerpos de un solo dominio variable que comprenden simplemente un dominio variable, que podría ser V_HH, V_{NAR} VH o VL, que se une específicamente al antígeno o epítipo independientemente de otras V regiones o dominios. También están

englobados por el término "construcción de anticuerpo" las construcciones de anticuerpo de un solo dominio compuestas de (al menos) dos anticuerpos monoclonales de un solo dominio que se seleccionan individualmente del grupo que comprende VH, VL, V_HH y V_{NAR}, y un enlazador. El enlazador está preferiblemente en forma de un enlazador peptídico. De forma similar, un "mAb de dominio único scFv" es una construcción de anticuerpo monoclonal compuesto por al menos un anticuerpo de dominio único como se describe arriba y una molécula de scFv como se describe arriba. De nuevo, el enlazador está preferiblemente en forma de un enlazador peptídico.

Además, la definición del término "construcciones de anticuerpo" incluye, en general, construcciones monovalentes, bivalentes y polivalentes/multivalentes y, por lo tanto, construcciones mono-específicas, específicamente que se unen a solo una estructura antigénica, así como construcciones bio-específicas y polio-específicas/multio-específicas, que se unen específicamente a más de una estructura antigénica, por ejemplo, dos, tres o más, a través de distintos dominios de unión. Además, la definición del término "construcciones de anticuerpo" incluye moléculas que consisten en solo una cadena de polipéptidos, así como moléculas que consisten en más de una cadena de polipéptidos, cadenas que pueden ser o idénticas (homodímeros, homotrímeros u homooligómeros) o diferentes (heterodímeros, heterotrímeros o heterooligómeros). En el contexto de la presente invención, se prevén particularmente construcciones de anticuerpo monocatenario bio-específico que se unen a un antígeno de superficie celular diana a través de un primer dominio de unión y al antígeno de superficie de linfocitos T CD3 a través de un segundo dominio de unión.

Dominios de unión

El término "dominio de unión" caracteriza un dominio que se une a/interactúa con/reconoce (específicamente) un epítipo diana dado o un sitio diana dado en las moléculas diana (antígenos). Dominios de unión están preferentemente en forma de polipéptidos. Dichos polipéptidos pueden incluir partes proteicas y partes no proteicas (p. ej., enlazadores químicos o agentes reticulantes químicos tales como glutaraldehído). Las proteínas (incluidos fragmentos de las mismas, preferiblemente fragmentos biológicamente activos, y péptidos, que habitualmente tienen menos de 30 aminoácidos) comprenden dos o más aminoácidos acoplados entre sí mediante un enlace peptídico covalente (dando como resultado una cadena de aminoácidos). El término "polipéptido", tal como se utiliza en esta memoria, describe un grupo de moléculas, que habitualmente consiste en más de 30 aminoácidos. Los polipéptidos pueden formar además multímeros, tales como dímeros, trímeros y oligómeros superiores, es decir, que consisten en más de una molécula de polipéptido. Las moléculas de polipéptido que forman este tipo de dímeros, trímeros, etc. pueden ser idénticas o no idénticas. Las estructuras de orden superior correspondientes de dichos multímeros se denominan, por consiguiente, homo- o heterodímeros, homo- o heterotrímeros etc. Un ejemplo de un heteromultímero es una molécula de anticuerpo, que, en su forma que existe de forma natural, consiste en dos cadenas de polipéptidos ligeras idénticas y dos cadenas de polipéptidos pesadas idénticas. Los términos "péptido", "polipéptido" y "proteína" también se refieren a péptidos / polipéptidos / proteínas modificados de forma natural, en donde la modificación se efectúa, p. ej., mediante modificaciones postraduccionales, tales como glicosilación, acetilación, fosforilación y similares. Un "péptido", "polipéptido" o "proteína" cuando se le alude en esta memoria también puede modificarse químicamente, tal como pegarse. Modificaciones de este tipo son bien conocidas en la técnica y se describen más adelante en esta memoria.

La estructura y función del primer dominio de unión, y preferentemente también la estructura y/o función del segundo dominio de unión, se basa en la estructura y/o función de un anticuerpo, por ejemplo, de una molécula de inmunoglobulina de longitud completa o completa. El primer dominio de unión se caracteriza por la presencia de tres CDR de la cadena ligera (es decir, CDR1, CDR2 y CDR3 de la región ligera variable (VL)) y tres CDR de la cadena pesada (es decir, CDR1, CDR2 y CDR3 de la región pesada variable (VH)). El segundo dominio de unión preferiblemente también comprende los requisitos estructurales mínimos de un anticuerpo que permiten la unión de la diana. Más preferiblemente, el segundo dominio de unión comprende al menos tres CDRs de la cadena ligera (es decir, CDR1, CDR2 y CDR3 de la región VL) y/o tres CDRs de la cadena pesada (es decir, CDR1, CDR2 y CDR3 de la región VH).

Como se ha mencionado anteriormente, un dominio de unión puede comprender normalmente una cadena ligera de la región variable de anticuerpo (VL) y una región variable de la cadena pesada del anticuerpo (VH); sin embargo, no tiene que comprender ambas. Los fragmentos F_d, por ejemplo, tienen dos regiones VH y a menudo conservan alguna función de unión a antígeno del dominio de unión a antígeno intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo de unión al antígeno (modificados) incluyen (1) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que tiene los dominios VL, VH, CL y CH1; (2) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que tiene dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (3) un fragmento F_d que tiene los dos dominios VH y CH1; (4) un fragmento Fv que tiene los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo, (5) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341 :544-546), que tiene un dominio VH; (6) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada, y (7) un Fv monocatenario (scFv).

Regiones variables

El término "variable" se refiere a las porciones de los dominios de anticuerpo o de inmunoglobulina que exhiben variabilidad en su secuencia y que están implicadas en la determinación de la especificidad y afinidad de unión de un anticuerpo particular (es decir, el "dominio o dominios variables"). El emparejamiento de una cadena pesada variable

(VH) y una cadena ligera variable (VL) juntas forma un único sitio de unión al antígeno. El dominio CH más próximo a VH se designa CH1. Cada una de las cadenas ligeras (L) está enlazada a una cadena pesada (H) por un enlace disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H están enlazadas entre sí por uno o más enlaces disulfuro de acuerdo con el isotipo de la cadena H.

La variabilidad no se distribuye uniformemente a lo largo de los dominios variables de los anticuerpos; se concentra en sub-dominios de cada una de las regiones variables de la cadena pesada y ligera. Estos sub-dominios se denominan "regiones hipervariables" o "regiones determinantes de la complementariedad" (CDRs). Las CDRs contienen la mayoría de los residuos responsables de las interacciones específicas del anticuerpo con el antígeno y, por lo tanto, contribuyen en la actividad funcional de una molécula de anticuerpo: son los principales determinantes de la especificidad del antígeno.

Los límites y las longitudes de la definición exacta de CDR están sujetos a diferentes sistemas de clasificación y numeración. Por lo tanto, Kabat, Chothia, contacto o cualquier otra definición de límites pueden hacer referencia a las CDRs, incluyendo el sistema de numeración descrito en esta memoria. A pesar de los diferentes límites, cada uno de estos sistemas tiene cierto grado de solapamiento en lo que constituye las denominadas "regiones hipervariables" dentro de las secuencias variables. Por tanto, las definiciones de CDR de acuerdo con estos sistemas pueden diferir en longitud y áreas límites con respecto a la región de marco adyacente. Véase, por ejemplo, Kabat (un enfoque basado en la variabilidad de secuencia entre especies), Chothia (un enfoque basado en estudios cristalográficos de complejos antígeno-anticuerpo) y/o MacCallum (Kabat *et al.*, *loc. cit.*; Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 1987, 196: 901-917; y MacCallum *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 1996, 262: 732). Aún otro patrón más para caracterizar el sitio de unión al antígeno es la definición de AbM utilizada por el software de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. Véase, *p. ej.*, Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains. En: Antibody Engineering Lab Manual (Ed.: Duebel, S. y Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg). En la medida en que dos técnicas de identificación de residuos definen regiones de solapamiento, pero no regiones idénticas, se pueden combinar para definir una CDR híbrida. Sin embargo, se prefiere la numeración de acuerdo con el denominado sistema Kabat.

Típicamente, las CDRs forman una estructura de bucle que se puede clasificar como estructura canónica. La expresión "estructura canónica" se refiere a la conformación de la cadena principal que es adoptada por los bucles de unión a antígeno (CDR). A partir de estudios estructurales comparativos, se ha descubierto que cinco de los seis bucles de unión a antígeno tienen solo un repertorio limitado de conformaciones disponibles. Cada una de las estructuras canónicas puede caracterizarse por los ángulos de torsión de la cadena principal polipeptídica. Los bucles correspondientes entre anticuerpos pueden, por lo tanto, tener estructuras tridimensionales muy similares, a pesar de la alta variabilidad de la secuencia de aminoácidos en la mayor parte de los bucles (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.*, 1987, 196: 901; Chothia *et al.*, *Nature*, 1989, 342: 877; Martin y Thornton, *J. Mol. Biol.*, 1996, 263: 800). Además, existe una relación entre la estructura de bucle adoptada y las secuencias de aminoácidos que la rodean. La conformación de una base canónica particular se determina por la longitud del bucle y los residuos de aminoácidos que residen en posiciones clave dentro del bucle, así como dentro de la región estructural conservada (es decir, fuera de del bucle). Por lo tanto, la asignación a una clase canónica particular se puede realizar en función de la presencia de estos residuos de aminoácidos clave.

La expresión "estructura canónica" también puede incluir consideraciones en cuanto a la secuencia lineal del anticuerpo, por ejemplo, según se cataloga por Kabat (Kabat *et al.*, *loc. cit.*). El esquema (sistema) de numeración de Kabat es un patrón ampliamente adoptado para numerar los residuos de aminoácidos de un dominio variable de anticuerpo de una manera consistente y es el esquema preferido aplicado en la presente invención como también se menciona en otra parte de esta memoria. También se pueden utilizar consideraciones estructurales adicionales para determinar la estructura canónica de un anticuerpo. Por ejemplo, aquellas diferencias no completamente reflejadas por la numeración de Kabat se pueden describir por el sistema de numeración de Chothia *et al.* y/o revelar por otras técnicas, por ejemplo, cristalografía y modelado computacional bi- o tridimensional. Por consiguiente, una secuencia de anticuerpo dada puede colocarse en una clase canónica que permite, entre otras cosas, identificar secuencias de chasis apropiadas (*p. ej.*, basándose en el deseo de incluir una diversidad de estructuras canónicas en una colección). Se describe en la bibliografía la numeración de Kabat de secuencias de aminoácidos de anticuerpos y consideraciones estructurales como se describe por Chothia *et al.*, *loc. cit.* y sus implicaciones para interpretar aspectos canónicos de la estructura de anticuerpos. Las estructuras de subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas en la técnica. Para una revisión de la estructura del anticuerpo, véase *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, eds. Harlow *et al.*, 1988.

La CDR3 de la cadena ligera y, en particular, la CDR3 de la cadena pesada pueden constituir los determinantes más importantes en la unión del antígeno dentro de las regiones variables de la cadena ligera y pesada. En algunas construcciones de anticuerpos, la CDR3 de la cadena pesada parece constituir el área principal de contacto entre el antígeno y el anticuerpo. Pueden utilizarse esquemas de selección *in vitro* en los que se varía CDR3 solo para variar las propiedades de unión de un anticuerpo o determinar qué residuos contribuyen a la unión de un antígeno. Por lo tanto, la CDR3 es típicamente la mayor fuente de diversidad molecular dentro del sitio de unión del anticuerpo. H3, por ejemplo, puede ser tan corto como dos residuos de aminoácidos o más de 26 aminoácidos.

Región estructural y regiones constantes

Las porciones más conservadas (es decir, no hipervariables) de los dominios variables se denominan las regiones "estructurales" (FRM) y proporcionan un armazón para las seis CDRs en el espacio tridimensional para formar una superficie de unión al antígeno. Los dominios variables de las cadenas ligeras y pesadas que se producen de forma natural comprenden cada uno cuatro regiones FRM (FR1, FR2, FR3 y FR4), que adoptan en gran medida una configuración de lámina β , conectadas por tres regiones hipervariables, que forman bucles que se conectan y, en algunos casos, forman parte de la estructura de la lámina β . Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las FRM y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno (véase Kabat *et al.*, *loc. cit.*). Los dominios constantes no están directamente implicados en la unión al antígeno, pero exhiben diversas funciones efectoras, tales como, por ejemplo, citotoxicidad mediada por células y dependiente de anticuerpos y activación del complemento.

Especificidad de unión

15 Construcciones de anticuerpo biespecífico

Como se ha explicado previamente, se prevé particularmente que la construcción de anticuerpo comprendida dentro de la composición farmacéutica de la invención es una construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico. El término "biespecífico", como se usa en el presente documento, se refiere a una construcción de anticuerpo que es "al menos biespecífica", es decir, comprende al menos un primer dominio de unión y un segundo dominio de unión, en donde el primer dominio de unión se une a un antígeno o diana, y el segundo dominio de unión se une a otro antígeno o diana. Por consiguiente, las construcciones de anticuerpo englobadas por el término comprenden especificidades por al menos dos antígenos o dianas diferentes. Por lo tanto, el término "construcción de anticuerpo biespecífico" también engloba construcciones de anticuerpo multiespecífico, tales como construcciones de anticuerpo triespecífico, incluyendo las últimas tres dominios de unión, o construcciones que tienen más de tres (por ejemplo, cuatro, cinco...) especificidades. Dado que las construcciones de anticuerpo son (al menos) biespecíficas, no ocurren naturalmente y no son notablemente diferentes de los productos que existen de forma natural. Por lo tanto, una construcción de anticuerpo "biespecífico" es un híbrido de anticuerpo artificial o inmunoglobulina que tiene al menos dos sitios de unión distintos con diferentes especificidades. Los anticuerpos biespecíficos se pueden producir mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, por conjugación química de dos anticuerpos monoclonales (mAb) purificados diferentes o fragmentos de anticuerpos o fusionando dos hibridomas, dando como resultado una estirpe celular de cuadroma que produce, entre otros, moléculas de IgG biespecíficas (véase Kontermann y Brinkmann, *Drug Discov Today*. 2015 Jul;20(7):838-47 para una revisión).

35 Dianas

Como se ha explicado previamente, la composición farmacéutica de la invención comprende una construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico que se une a un antígeno de superficie celular diana a través de un primer dominio de unión CD33 o CD19 y al antígeno de superficie de linfocitos T CD3 a través de un segundo dominio de unión.

Los términos "se une (específicamente) a", "reconoce (específicamente)", "se dirige (específicamente) a" y "reacciona (específicamente) con" significan según la presente invención que un dominio de unión interactúa o interactúa específicamente con uno o más, preferentemente al menos dos, más preferentemente al menos tres y lo más preferentemente al menos cuatro aminoácidos de un epítipo situados en la proteína diana o antígeno.

El término "epítipo" se refiere a un sitio en un antígeno al que se une específicamente un dominio de unión, tal como un anticuerpo o inmunoglobulina o derivado o fragmento de un anticuerpo o de una inmunoglobulina. Un "epítipo" es antigénico y, por lo tanto, al término epítipo se le alude a veces también en esta memoria como "estructura antigénica" o "determinante antigénico". Por lo tanto, el dominio de unión es un "sitio de interacción con el antígeno". También se entiende que dicha unión/interacción define un "reconocimiento específico". Los "epítipos" se pueden formar tanto por aminoácidos contiguos (epítipo lineal) como aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario de una proteína (epítipo conformacional). Los epítipos lineales incluyen normalmente al menos 3 o al menos 4, y más normalmente, al menos 5 o al menos 6 o al menos 7, por ejemplo, aproximadamente 8 a aproximadamente 10 aminoácidos en una secuencia única. Un epítipo conformacional comprende normalmente un aumento del número de aminoácidos con respecto a un epítipo lineal. Métodos para determinar la conformación de epítipos incluyen, pero no se limitan a, cristalografía de rayos X, espectroscopía de resonancia magnética nuclear bidimensional (2D-RMN) y espectroscopía de marcación de espín dirigida al sitio y resonancia paramagnética electrónica (EPR).

La interacción entre el dominio de unión y el epítipo o grupos de epítipos implica que un dominio de unión presenta afinidad apreciable por el epítipo o grupos de epítipos en una proteína o antígeno particular y, en general, no presenta reactividad significativa con proteínas o antígenos no diana. "Afinidad apreciable" incluye la unión con una afinidad de aproximadamente 10^{-6} M (KD) o mayor. Preferentemente, la unión se considera específica cuando la afinidad de unión es aproximadamente 10^{-12} a 10^{-8} M, 10^{-12} a 10^{-9} M, 10^{-12} a 10^{-10} M, 10^{-11} a 10^{-8} M, preferentemente de aproximadamente 10^{-11} a 10^{-9} M. Preferentemente, un dominio de unión de la invención no se une esencialmente o sustancialmente a

proteínas o antígenos distintos de sus proteínas o antígenos diana (es decir, el primer dominio de unión y el segundo dominio de unión no son capaces de unirse a proteínas distintas de su proteína diana respectiva).

5 El término "no se une esencialmente / sustancialmente" o "no es capaz de unirse" significa que un dominio de unión de la presente invención no se une a proteína o antígeno distinto de su proteína o antígeno diana, es decir, no muestra reactividad superior al 30 %, preferentemente no más del 20 %, más preferentemente no más del 10 %, particularmente preferentemente no más del 9 %, 8 %, 7 %, 6 % o 5 % con proteínas o antígenos distintos de su proteína o antígeno diana, por lo cual se establece que la unión a su proteína o antígeno diana respectivo es del 100 %.

10 Como se ha explicado en el presente documento, se prevé que la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico comprenda un primer dominio de unión capaz de unirse a un antígeno de superficie celular diana y un segundo dominio de unión capaz de unirse al antígeno de superficie de linfocitos T CD3. Se prevé en particular que la construcción de anticuerpo, los dominios de unión y en particular el segundo dominio de unión (que se une a CD3 humano sobre la superficie de un linfocito T) tenga el siguiente formato: Los pares de regiones VH y VL están en el formato de un anticuerpo de cadena sencilla (scFv). Las regiones VH y VL están dispuestas en el orden VH-VL o VL-VH. Se prefiere que la región VH esté situada en el extremo N de una secuencia de enlazador y que la región VL esté situada en el extremo C de la secuencia de enlazador.

20 El segundo dominio de unión de la construcción de anticuerpo comprendida dentro de la composición farmacéutica de la invención es capaz de unirse al antígeno de superficie de linfocitos T CD3. Las células T o linfocitos T son un tipo de linfocito (en sí mismo un tipo de glóbulo blanco) que juegan un papel central en la inmunidad mediada por células. Existen subconjuntos de células T, cada uno con una función distinta. Las células T se pueden distinguir de otros linfocitos, tales como células B y células NK, por la presencia de un receptor de células T (TCR, por sus siglas en inglés) en la superficie celular. El TCR es el responsable de reconocer antígenos unidos a las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y está compuesto por dos cadenas de proteínas diferentes. En el 95 % de las células T, el TCR consiste en una cadena alfa (α) y una cadena beta (β). Cuando el TCR interactúa con el péptido antigénico y el MHC (complejo péptido / MHC), el linfocito T se activa a través de una serie de eventos bioquímicos mediados por enzimas asociadas, co-receptores, moléculas adaptadoras especializadas y factores de transcripción activados o liberados.

30 El complejo del receptor CD3 es un complejo proteico y está compuesto por cuatro cadenas. En los mamíferos, el complejo contiene una cadena CD3 γ (gamma), una cadena CD3 δ (delta) y dos cadenas CD3 ϵ (épsilon). Estas cadenas se asocian con el receptor de linfocitos T (TCR) y la denominada cadena ζ (zeta) para formar el complejo receptor de linfocitos T CD3 y generar una señal de activación en los linfocitos T. Las cadenas CD3 γ (gamma), CD3 δ (delta) y CD3 ϵ (épsilon) son proteínas de la superficie celular muy relacionadas de la superfamilia de inmunoglobulinas que contienen un único dominio de inmunoglobulina extracelular. Las colas intracelulares de las moléculas de CD3 contienen un único motivo conservado, conocido como un motivo de activación de inmunorreceptor basado en tirosina o ITAM para abreviar, que es esencial para la capacidad de señalización del TCR. La molécula de CD3 épsilon es un polipéptido que en seres humanos está codificada por el gen *CD3E* que reside en el cromosoma 11.

40 El segundo dominio de unión de la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico comprendida dentro de la composición farmacéutica de la invención es capaz de unirse a un antígeno de superficie celular diana. Dicho antígeno de superficie celular diana puede ser, en general, cualquier antígeno que pueda ser reconocido por y se una al segundo dominio de unión. Se prevé que la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico forme un enlace entre linfocitos T y células diana uniéndose tanto a CD3 como al antígeno de superficie celular diana. Así, se cree que la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico recluta linfocitos T a células diana, y preferentemente para hacer que los linfocitos T ejerzan actividad citotóxica sobre células diana produciendo proteínas pro-apoptósicas como perforina y granzimas, provocando así a la célula diana. Por lo tanto, la célula diana será normalmente una célula prevista como una diana para la citotoxicidad mediada por linfocitos T y, por tanto, citólisis. Por ejemplo, la célula diana puede ser una célula tumoral, tal como un blastocito maligno. Por lo tanto, el antígeno de superficie celular se puede seleccionar de CD33, CD19, FAP α , MSLN, FLT3 o BCMA. Se prevé particularmente que CD33 sea una diana para el primer dominio de unión de la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico de la invención.

55 Construcciones de anticuerpo monocatenario biespecífico específicas de la presente invención incluyen AMG 103 (que comprende un primer dominio de unión que reconoce CD19), AMG 330 (que comprende un primer dominio de unión que reconoce CD33) y como aspectos de la divulgación un HLE específico de CD33 BiTE, un HLE específico de FLT3 BiTE y un HLE específico de BCMA BiTE como se evalúa en los Ejemplos adjuntos.

60 Como un aspecto de la divulgación, la secuencia de aminoácidos del primer dominio de unión de la construcción monocatenaria biespecífica se puede seleccionar del grupo que consiste en SEQ ID 99, 109, 119, 128, 137, 146, 155, 164, 173, 183, 185 y 187 y la secuencia de aminoácidos del segundo dominio de unión de la construcción monocatenaria biespecífica se puede seleccionar del grupo que consiste en SEQ ID NO: 9, 18, 27, 36, 45, 54, 63, 72, 81, 179 y 90.

Por lo tanto, las construcciones de anticuerpo monocatenario biespecífico incluyen construcciones que comprenden o que consisten en el polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se representa en una SEQ ID NO seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:100, y SEQ ID NO:174.

5 Enlazadores peptídicos

Los al menos dos dominios de unión y los dominios variables de la construcción de anticuerpo de la presente invención pueden comprender o no enlazadores peptídicos (péptidos espaciadores). La expresión "enlazador de péptidos" define de acuerdo con la presente invención una secuencia de aminoácidos mediante la cual las secuencias de aminoácidos de un dominio (variable y/o de unión) y otro dominio (variable y/o de unión) de la construcción de anticuerpo de la invención están enlazados entre sí. Una característica técnica esencial de dicho enlazador peptídico es que dicho enlazador peptídico no comprende actividad de polimerización. Entre los enlazadores peptídicos adecuados se encuentran los descritos en las Patentes de EE.UU. 4.751.180 y 4.935.233 o el documento WO 88/09344.

En el caso de que se utilice un enlazador, este enlazador es preferiblemente de una longitud y secuencia suficientes para asegurar que cada uno de los dominios primero y segundo puedan, independientemente uno de otro, conservar sus especificidades de unión diferenciales. Para enlazadores peptídicos que conectan los al menos dos dominios de unión en la construcción de anticuerpo (o dos dominios variables), los enlazadores peptídicos pueden comprender solo algún número de residuos de aminoácidos, por ejemplo 12 residuos de aminoácidos o menos, tales como 11, 10, 9, 8, 7, 6 o 5 residuos de aminoácidos. Un enlazador peptídico previsto con menos de 5 aminoácidos comprende 4, 3, 2 o un aminoácido(s) y pueden ser rico en Gly, es decir, puede consistir en el aminoácido individual Gly. Otro enlazador peptídico útil se caracteriza por la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 178), es decir, Gly₄Ser, o polímeros del mismo, es decir, (Gly₄Ser)_x, donde x es un número entero de 1 o mayor. Preferentemente, se prefieren los enlazadores peptídicos que no promueven estructuras secundarias. Se conocen bien en la técnica los métodos de preparación de construcciones monocatenarias biespecíficas fusionadas y operativamente enlazadas y que los expresan en células de mamífero o bacterias (por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4.^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2012).

Derivados

El término "construcción de anticuerpo" también engloba derivados. El término "derivado" se refiere, en general, a una construcción de anticuerpo que se ha modificado covalentemente para introducir una funcionalidad adicional. Modificaciones covalentes de las construcciones de anticuerpo se pueden introducir postraduccionalmente haciendo reaccionar residuos de aminoácidos específicos de la molécula con un agente derivatizante orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los residuos N- o carboxiterminales. La derivatización de construcciones de anticuerpo se puede usar para unir agentes terapéuticos o de diagnóstico, marcas, grupos que prolongan la semivida en suero de la molécula, o inserción de aminoácidos no naturales. Las modificaciones químicas comúnmente aplicadas incluyen lo siguiente:

Los residuos de cisteinilo se hacen reaccionar más comúnmente con α -haloacetatos (y aminas correspondientes), tales como ácido cloroacético o cloroacetamida, para dar derivados de carboximetilo o carboxiamidometilo. Residuos de cisteinilo también se derivatizan por reacción con bromotrifluoroacetona, ácido α -bromo- β -(5-imidazoil)propiónico, fosfato de cloroacetilo, N-alquilmaleimidadas, disulfuro de 3-nitro-2-piridilo, 2-piridil disulfuro de metilo, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenol o cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol.

Residuos de histidilo se derivatizan por reacción con pirocarbonato de dietilo a pH 5,5-7,0, ya que este agente es relativamente específico para la cadena lateral de histidilo. También es útil bromuro de parabromofenacilo; la reacción se realiza preferiblemente en cacodilato de sodio 0,1 M a pH 6,0. Residuos lisinilo y amino terminales se hacen reaccionar con anhídridos succínicos u otros anhídridos de ácido carboxílico. La derivatización con estos agentes tiene el efecto de invertir la carga de los residuos de lisinilo. Otros reactivos adecuados para derivatizar residuos que contienen alfa-amino incluyen imidoésteres, tales como picolinimidato de metilo; fosfato de piridoxal; piridoxal; cloroborohidruro; ácido trinitrobenzenosulfónico; O-metilisourea; 2,4-pentanodiona; y reacción catalizada por transaminasas con glioxilato.

Residuos de arginilo se modifican por reacción con uno o varios reactivos convencionales, entre ellos fenilglioxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona y ninhidrina. La derivatización de residuos de arginina requiere que la reacción se realice en condiciones alcalinas debido al alto pKa del grupo funcional guanidina. Además, estos reactivos pueden reaccionar con los grupos de lisina, así como con el grupo épsilon-amino de la arginina.

La modificación específica de residuos de tirosilo se puede realizar, con particular interés, en la introducción de marcadores espectrales en residuos de tirosilo mediante reacción con compuestos aromáticos de diazonio o tetranitrometano. Más comúnmente, se utilizan N-acetilimidazol y tetranitrometano para formar especies de O-acetil tirosilo y derivados 3-nitro, respectivamente. Residuos de tirosilo se yodan utilizando ¹²⁵I o ¹³¹I para preparar proteínas marcadas para uso en radioinmunoensayo, siendo adecuado el método de cloramina T arriba descrito.

Grupos laterales de carboxilo (aspartilo o glutamilo) se modifican selectivamente por reacción con carbodiimidas (R¹-N=C=N--R'), donde R and R' son grupos alquilo opcionalmente diferentes, tales como 1-ciclohexilo-3-(2-morfolinil-4-etil) carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil)carbodiimida. Además, los residuos de aspartilo y glutamilo se convierten en residuos de asparaginilo y glutaminilo por reacción con iones amonio.

La derivatización con agentes bifuncionales es útil para reticular las construcciones de anticuerpos de la presente invención con una matriz o superficie de soporte insoluble en agua para uso en una diversidad de métodos. Agentes de reticulación comúnmente utilizados incluyen, *p. ej.*, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo los ésteres de disuccinimidilo tales como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato), y maleimidias bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano. Agentes derivatizantes tales como 3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato de metilo producen compuestos intermedios fotoactivables que son capaces de formar reticulaciones en presencia de luz. Alternativamente, matrices insolubles en agua reactivas, tales como hidratos de carbono activados por bromuro de cianógeno y los sustratos reactivos descritas en las patentes de EE. UU. N^os 3.969.287; 3.691.016; 4.195.128; 4.247.642; 4.229.537; y 4.330.440 se emplean para la inmovilización de proteínas.

Residuos de glutaminilo y asparaginilo se desamidán con frecuencia a los correspondientes residuos de glutamilo y aspartilo, respectivamente. Alternativamente, estos residuos se desamidán en condiciones ligeramente ácidas. Cualquier forma de estos residuos cae dentro del alcance de esta invención.

Otras modificaciones incluyen la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de residuos serilo o treonilo, la metilación de los grupos α-amino de las cadenas laterales de lisina, arginina e histidina (T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1983, pp. 79-86), la acetilación de la amina N-terminal y la amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal.

Glucosilación y desglucosilación

Otro tipo de modificación covalente de las construcciones de anticuerpos incluidas dentro del alcance de esta invención comprende alterar el patrón de glicosilación de la proteína. Como se conoce en la técnica, los patrones de glicosilación pueden depender de tanto la secuencia de la proteína (por ejemplo, la presencia o ausencia de residuos de aminoácidos de glicosilación particular, tratados más adelante), como la célula hospedadora u organismo en el que la proteína se produce. Sistemas de expresión particulares se comentan más adelante.

La glicosilación de polipéptidos está típicamente enlazada a N o a O. Enlazada a N se refiere a la fijación del resto hidrato de carbono a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias de tripéptidos asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la fijación enzimática del resto de hidrato de carbono a la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptidos en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La glicosilación enlazada a O se refiere a la fijación de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa, a un hidroxiaminoácido, lo más comúnmente serina o treonina, aunque también se puede utilizar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glicosilación a la construcción de anticuerpo se logra convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de manera que contenga una o más de las secuencias de tripéptidos arriba descritas (para los sitios de glicosilación enlazados a N). La alteración también puede realizarse mediante la adición o sustitución de uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia de partida (para los sitios de glicosilación enlazados a O). Para mayor facilidad, la secuencia de aminoácidos de una construcción de anticuerpo se altera preferiblemente mediante cambios al nivel de ADN, particularmente mutando el ADN que codifica el polipéptido en bases preseleccionadas de modo que se generen codones que se traducirán en los aminoácidos deseados.

Otro medio de aumentar el número de restos de hidratos de carbono en la construcción del anticuerpo es mediante el acoplamiento químico o enzimático de glicósidos a la proteína. Estos procedimientos son ventajosos porque no requieren la producción de la proteína en una célula huésped que tiene capacidades de glicosilación para la glicosilación enlazada a N y O. Dependiendo del modo de acoplamiento utilizado, el o los azúcares pueden unirse a (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrilo libres tales como los de cisteína, (d) grupos hidroxilo libres tales como los de serina, treonina o hidroxiprolina, (e) residuos aromáticos tales como los de fenilalanina, tirosina o triptófano, o (f) el grupo amida de glutamina. Estos métodos se describen en el documento WO 87/05330 y en Aplin y Wriston, 1981, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306.

La eliminación de restos de hidratos de carbono presentes en la construcción del anticuerpo de partida se puede realizar de forma química o enzimática. La desglucosilación química requiere la exposición de la proteína al compuesto ácido trifluorometanosulfónico o un compuesto equivalente. Este tratamiento da como resultado la escisión de la mayoría o de todos los azúcares excepto el azúcar de enlace (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), mientras que deja intacto el polipéptido. La desglucosilación química está descrita por Hakimuddin et al., 1987, *Arch. Biochem. Biophys.* 259:52 y por Edge et al., 1981, *Anal. Biochem.* 118:131. La escisión enzimática de restos de hidratos de carbono en polipéptidos se puede lograr mediante el uso de una diversidad de endo- y exo-glicosidasas tal como se

describe por Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol. 138:350. La glicosilación en los sitios potenciales de glicosilación puede evitarse mediante el uso del compuesto tunicamicina como se describe por Duskin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:3105. La tunicamicina bloquea la formación de enlaces proteína-N-glicósido.

5 Polímeros no proteínicos

Otras modificaciones de la construcción de anticuerpo se contemplan en el presente documento. Por ejemplo, otro tipo de modificación covalente de la construcción de anticuerpo comprende enlazar la construcción de anticuerpo a diversos polímeros no proteínicos, que incluyen, pero no se limitan a, diversos polioles, tales como diversos polioles, tales como polietilenglicol (PEGilación), polipropilenglicol, polioxialquilenos o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol, o de hidratos de carbono, tales como hidroxietil almidón (por ejemplo, HESilation®) o ácido polisialico (por ejemplo, tecnología PolyXen®). Además, como se conoce en la técnica, se pueden realizar sustituciones de aminoácidos en diversas posiciones dentro de la construcción del anticuerpo, p. ej., con el fin de facilitar la adición de polímeros tales como PEG.

Marcadores

En algunas realizaciones, la modificación covalente de las construcciones de anticuerpos de la invención comprende la adición de uno o más marcadores. El grupo de marcaje se puede acoplar a la construcción de anticuerpo *vía* brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir el impedimento estérico potencial. Se conocen en la técnica diversos métodos para marcar proteínas y se pueden utilizar para realizar la presente invención. El término "marcador" o "grupo de marcaje" se refiere a cualquier marcador detectable. En general, los marcadores se clasifican en una diversidad de clases, dependiendo del ensayo en el que se han de detectar - los siguientes ejemplos incluyen, pero no se limitan a:

- 25 a) marcadores isotópicos, que pueden ser isótopos radiactivos o pesados, tales como radioisótopos o radionúclidos (por ejemplo, ³H, ¹⁴C, ¹⁵N, ³⁵S, ⁸⁹Zr, ⁹⁰Y, ⁹⁹Tc, ¹¹¹In, ¹²⁵I, ¹³¹I)
- b) marcadores magnéticos (*p. ej.*, partículas magnéticas)
- 30 c) restos activos redox
- d) colorante óptico (que incluye, pero no se limita a, cromóforos, fósforos y fluoróforos), tales como grupos fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, fósforos de lantánidos), grupos quimioluminiscentes y fluoróforos que pueden ser o fluoros de "molécula pequeña" o fluoros proteínicos
- 35 e) grupos enzimáticos (*p. ej.*, peroxidasa de rábano picante, β-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina)
- f) grupos biotinilados
- 40 g) epítomos de polipéptidos predeterminados reconocidos por un informador secundario (*p. ej.*, secuencias de pares de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, etiquetas de epítomo, etc.)

45 Por "marca fluorescente" se indica cualquier molécula que se puede detectar por sus propiedades fluorescentes inherentes. Marcadores fluorescentes adecuados incluyen, pero no se limitan a fluoresceína, rodamina, tetrametilrodamina, eosina, eritrosina, cumarina, metilcumarinas, pireno, verde malacita, estilbeno, amarillo lucifer, azul cascada, rojo Texas, IAEDANS, EDANS, BODIPY FL, LC Rojo 640, Cy 5, Cy 5.5, LC Red 705, verde Oregón, los colorantes Alexa-Fluor (Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680), Azul Cascada, Amarillo Cascada y R-ficoeritrina (PE) (Molecular Probes, Eugene, OR), FITC, Rodamina y Rojo Texas (Pierce, Rockford, IL), Cy5, Cy5. 5, Cy7 (Amersham Life Science, Pittsburgh, PA). Colorantes ópticos adecuados, incluyendo los fluoróforos, se describen en Molecular Probes Handbook de Richard P. Haugland.

55 Marcadores fluorescentes proteicos adecuados también incluyen, pero no se limitan a proteína fluorescente verde, que incluye una especie de GFP Renilla, Ptilosarcus o Aequorea (Chalfie et al., 1994, Science 263: 802-805), EGFP (Clontech Laboratories, Inc., Número de Acceso de Genbank U55762), proteína fluorescente azul (BFP, Quantum Biotechnologies, Inc. 1801 de Maisonneuve Blvd. West, 8ª planta, Montreal, Quebec, Canadá H3H 1J9; Stauber, 1998, Biotechniques 24:462-471; Heim et al. al., 1996, Curr. Biol. 6:178-182), proteína fluorescente amarilla potenciada (EYFP, Clontech Laboratories, Inc.), luciferasa (Ichiki et al., 1993, J. Immunol. 150:5408-5417), β galactosidasa (Nolan et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:2603-2607) y Renilla (WO92/15673, WO95/07463, WO98/14605, WO98/26277, WO99/49019, patentes de EE. UU. n.º 5292658, 5418155, 5683888, 5741668, 5777079, 5804387, 5874304, 5876995, 5925558).

65 Los dominios de cremallera de leucina son péptidos que fomentan la oligomerización de las proteínas en las que se encuentran. Las cremalleras de leucina se identificaron originalmente en varias proteínas de unión al ADN (Landschulz et al., 1988, Science 240:1759), y desde entonces se han encontrado en una diversidad de proteínas diferentes. Entre

las cremalleras de leucina conocidas se encuentran péptidos que se producen de forma natural y derivados de los mismos que dimerizan o trimerizan. En la solicitud PCT WO 94/10308 se describen ejemplos de dominios de cremallera de leucina adecuados para producir proteínas oligoméricas solubles, y la cremallera de leucina derivada de la proteína tensoactiva pulmonar D (SPD) descrita en Hoppe et al., 1994, FEBS Letters 344:191. El uso de una cremallera de leucina modificada que permite la trimerización estable de una proteína heteróloga condensada a la misma se describe en Fanslow et al., 1994, Semin. Immunol. 6:267- 78. En un enfoque, las proteínas de fusión recombinantes que comprenden el fragmento o derivado del anticuerpo CDH19 condensado con un péptido de cremallera de leucina se expresan en células huésped adecuadas, y los fragmentos o derivados del anticuerpo CDH19 oligomérico soluble que se forman se recuperan del sobrenadante del cultivo.

La construcción de anticuerpo también puede comprender péptidos o dominios adicional, que son, por ejemplo, útiles en el aislamiento de la molécula o se refieren a un perfil farmacocinético adaptado de la molécula. Dominios de ayuda para el aislamiento de una construcción de anticuerpo pueden seleccionarse de motivos peptídicos o restos introducidos de forma secundaria, que pueden capturarse en un método de aislamiento, p. ej., una columna de aislamiento. Realizaciones no limitantes de dominios adicionales de este tipo comprenden motivos peptídicos conocidos como etiqueta Myc, etiqueta HAT, etiqueta HA, etiqueta TAP, etiqueta GST, dominio de unión a quitina (etiqueta CBD), proteína de unión a maltosa (etiqueta MBP), etiqueta Flag, etiqueta Strep y variantes de las mismas (p. ej., etiqueta StrepII) y etiqueta His. Los dominios de etiqueta His se conocen, en general, como una repetición de residuos de His conservativos en la secuencia de aminoácidos de una molécula, preferentemente de seis residuos His. Los dominios o péptidos útiles para prolongar la semivida en suero (es decir, el tiempo donde el 50 % de un fármaco administrado se elimina a través de procesos biológicos, por ejemplo, metabolismo, excreción, etc.) de las construcciones de anticuerpo incluyen los capaces de unirse a otras proteínas con un perfil farmacocinético preferido en el cuerpo humano, tal como albúmina de suero (por ejemplo, el péptido AB156) o la región constante de inmunoglobulinas (dominios Fc o variantes de los mismos).

Se prevé que la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico esté presentes en la composición farmacéutica de la invención en una concentración de hasta aproximadamente 5 mg/ml, es decir, aproximadamente 4,0 mg/ml, 3,0 mg/ml, 2,0 mg/ml, 1,0 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml o 0,1 mg/ml. Preferentemente, la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico está presente en la composición farmacéutica en una concentración entre 0,1 y 5 mg/ml, preferentemente de 0,2-2,5 mg/ml, más preferentemente de 0,25-1,0 mg/ml.

Ciclodextrinas

Además de la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico y el tampón, la composición farmacéutica de la presente invención comprende además sal de sodio de sulfobutiléter- β -ciclodextrina como β -ciclodextrina. En general, el término "ciclodextrina" o "CD" se refiere a un oligosacárido cíclico compuesto de al menos 6 o más unidades de α -D-glucopiranosido unidas 1 \rightarrow 4. La estructura unitaria de las ciclodextrinas se caracteriza por una cavidad hidrófoba con grupos éter en el interior y un exterior polar que se caracteriza por grupos hidroxilo primarios. Muchas ciclodextrinas se conocen en la técnica, que incluyen ciclodextrinas de 6 miembros (α -ciclodextrinas), 7-miembros (β -ciclodextrinas) y 8-miembros (γ -ciclodextrinas). Las β -ciclodextrinas que comprenden 7 unidades de α -D-glucopiranosido son componentes particularmente preferidos de la composición farmacéutica de la invención, ya que se ha mostrado que son capaces de estabilizar eficazmente las construcciones de anticuerpo monocatenario biespecífico en diversas condiciones de estrés.

El término "ciclodextrina" (y en particular " β -ciclodextrina") también engloba derivados de (β -)ciclodextrina químicamente modificados. En general, cualquier modificación química es concebible, en tanto que no reduzca ni suprima las propiedades ventajosas de la composición farmacéutica como se demuestra en los ejemplos adjuntos, y en particular en tanto que las composiciones farmacéuticas retengan su estabilidad. Los derivados de ciclodextrina químicamente modificada resultan normalmente de la eterificación o introducción de otros grupos funcionales en los grupos hidroxilo 2, 3 y 6 de los residuos de glucosa. Por lo tanto, el término incluye ciclodextrinas que comprenden una o más sustituciones de los grupos hidroxilo, por ejemplo, ciclodextrinas alquiladas e hidroxialquiladas.

Con el fin de la invención, el término "ciclodextrina" también incluye sal(es) farmacéuticamente aceptable(s) de la misma. La expresión "sal(es) farmacéuticamente aceptable(s)", como se usa en el presente documento, significa las sales de ciclodextrinas que son seguras y eficaces para la administración. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con aniones, tales como las derivadas de ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y las formadas con cationes, tales como las derivadas de hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína, etc. Por supuesto, cualquier contraión usado en los productos farmacéuticos se debe considerar seguro, y existen varias listas de contraiones farmacéuticamente autorizados, que varían dependiendo de la fuente. Los formadores de sales autorizados se pueden encontrar, por ejemplo, en el Handbook of Pharmaceutical Salts (Stahl PH, Wermuth CG, editores. 2002. Handbook of pharmaceutical salts: Properties, selection and use. Weinheim/Zurich: Wiley-VCH/VHCA).

Como un aspecto de la divulgación, la composición farmacéutica comprende una β -ciclodextrina, particularmente una seleccionada del grupo que consiste en β -ciclodextrina, metil- β -ciclodextrina, hidroxietil- β -ciclodextrina, hidroxipropil- β -ciclodextrina, etil- β -ciclodextrina, butil- β -ciclodextrina, succinil-(2-hidroxipropil)- β -ciclodextrina, heptaquis(2,3,6-tri-

O-metil- β -ciclodextrina, heptaquis(2,3,6-tri-O-benzoil)- β -ciclodextrina, sal de sodio de fosfato de β -ciclodextrina, sal de sodio de sulfato de β -ciclodextrina, triacetil- β -ciclodextrina, sal de heptasodio de heptaquis(6-O-sulfo)- β -ciclodextrina, sal de sodio de carboximetil- β -ciclodextrina, sal de sodio de sulfobutiléter- β -ciclodextrina y 6-O-p-toluenosulfonil- β -ciclodextrina. En particular, la β -ciclodextrina puede ser sal de sodio de sulfobutiléter- β -ciclodextrina ("SBE- β -CD"), hidroxipropil- β -ciclodextrina ("HP- β -CD").

La β -ciclodextrina puede estar presente en la composición farmacéutica en una concentración en el intervalo del 0,1 % al 20 % (p/v), preferentemente del 0,5 % al 2 % (p/v) y más preferentemente del 0,8 % al 1,5 % (p/v). Se prevé en particular que la concentración de β -ciclodextrina químicamente no modificada sea aproximadamente del 1,8 % (p/v) o menos, tal como aproximadamente del 1,6 % (p/v), aproximadamente del 1,5 % (p/v), aproximadamente del 1,4 % (p/v), aproximadamente del 1,3 % (p/v), aproximadamente del 1,2 % (p/v), aproximadamente del 1,1 % (p/v), aproximadamente del 1,0 % (p/v), aproximadamente del 0,9 % (p/v), aproximadamente del 0,8 % (p/v), o menos, hasta una concentración de aproximadamente 0,1 % (p/v).

15 **Tampón**

La composición farmacéutica de la invención comprende además un tampón, que se puede seleccionar del grupo que consiste en fosfato de potasio, ácido acético/acetato sódico, ácido cítrico/citrato sódico, ácido succínico/succinato sódico, ácido tartárico/tartrato sódico, histidina/HCl de histidina, glicina, Tris, glutamato, acetato y mezclas de los mismos, y en particular de fosfato de potasio, ácido cítrico/citrato sódico, ácido succínico, histidina, glutamato, acetato y combinaciones de los mismos.

Concentraciones de tampón adecuadas engloban concentraciones de aproximadamente 200 mM o menos, tales como aproximadamente 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10 o 5 mM. El experto será fácilmente capaz de ajustar las concentraciones de tampón para proporcionar estabilidad de la composición farmacéutica como se describe en el presente documento. Concentraciones de tampón previstas en la composición farmacéutica de la invención oscilan específicamente desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 200 mM, preferentemente desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 100 mM, y más preferentemente desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 50 mM.

30 **pH**

La composición farmacéutica según la invención puede tener un pH en el intervalo desde aproximadamente 4 hasta aproximadamente 7,5, es decir, a pH de 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7 o 7,5. Preferentemente, el pH está en el intervalo desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 7,5, más preferentemente desde aproximadamente 5,5 hasta aproximadamente 7,5.

Composición farmacéutica

40 Como se usa en el presente documento, el término "composición farmacéutica" se refiere a una composición que es adecuada para administración a un sujeto en necesidad de la misma. Los términos "sujeto" o "individuo" o "animal" o "paciente" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a cualquier sujeto, particularmente un sujeto mamífero, para el que se desea la administración de la composición farmacéutica de la invención. Sujetos mamíferos incluyen seres humanos, primates no humanos, perros, gatos, cobayas, conejos, ratas, ratones, caballos, ganado vacuno, vacas y similares, prefiriéndose los seres humanos. La composición farmacéutica de la presente invención es estable y farmacéuticamente aceptable, es decir, capaz de provocar el efecto terapéutico deseado sin causar efectos locales o sistémicos no deseables en el sujeto al que se administra la composición farmacéutica. Las composiciones farmacéuticamente aceptables de la invención pueden ser en particular estériles y/o farmacéuticamente inertes. Específicamente, el término "farmacéuticamente aceptable" pueden significar autorizado por una agencia reguladora u otra farmacopea, en general, reconocida para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos.

La composición farmacéutica de la invención comprende una o una pluralidad de la(s) construcción (construcciones) de anticuerpo monocatenario biespecífico descritas en el presente documento, preferentemente en una cantidad terapéuticamente eficaz, sal de sodio de sulfobutiléter- β -ciclodextrina y un tampón. Por "cantidad terapéuticamente eficaz" se indica una cantidad de dicha construcción que provoca el efecto terapéutico deseado. La eficacia terapéutica y la toxicidad se pueden determinar por procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, DE₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población) y DL₅₀ (la dosis letal para el 50 % de la población). La relación de dosis entre efectos terapéuticos y tóxicos es el índice terapéutico, y se puede expresar como la relación, DE₅₀/DL₅₀. Se prefieren, en general, las composiciones farmacéuticas que presentan grandes índices terapéuticos.

Excipientes

Además de la β -ciclodextrina y el tampón descritos previamente, la composición farmacéutica puede comprender opcionalmente uno o más excipientes adicionales, en tanto que no reduzcan ni supriman sus propiedades ventajosas, como se describen en el presente documento, y en particular su estabilidad.

5 Se pueden usar excipientes en la invención para una amplia variedad de fines, tales como ajuste de propiedades físicas, químicas o biológicas de formulaciones, tales como ajuste de la viscosidad, y o procesos de la invención para mejorar además la eficacia y o para estabilizar aún más dichas formulaciones y procesos contra la degradación y el desperdicio debido a, por ejemplo, estrés que ocurre durante la fabricación, el envasado, el almacenamiento, preparación preuso, administración, y de aquí en adelante. El término "excipiente" incluye, en general, cargas, aglutinantes, disgregantes, recubrimientos, sorbentes, antiadherentes, deslizantes, conservantes, antioxidantes, aromatizantes, colorantes, edulcorantes, disolventes, codisolventes, agentes de tamponamiento, agentes quelantes, agentes que confieren viscosidad, agentes tensioactivos, diluyentes, humectantes, vehículos, diluyentes, conservantes, emulsionantes, estabilizadores y modificadores de la tonicidad.

15 Los excipientes aceptables son preferentemente farmacéuticamente aceptables, es decir, no tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas.

Los excipientes a modo de ejemplo incluyen, sin limitación:

- 20
 - aminoácidos tales como glicina, alanina, glutamina, asparagina, treonina, prolina, 2-fenilalanina, incluyendo aminoácidos cargados, preferiblemente lisina, acetato de lisina, arginina, glutamato y/o histidina;
 - conservantes, que incluye antimicrobianos, tales como antibacterianos y antifúngicos
- 25
 - antioxidantes, tales como ácido ascórbico, metionina, sulfito de sodio o hidrogenosulfito de sodio;
 - tampones, sistemas tampón y agentes tampón que se utilizan para mantener la composición a un pH fisiológico o a un pH ligeramente más bajo, típicamente dentro de un intervalo de pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 8 o 9; ejemplos de tampones son borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos u otros ácidos orgánicos, succinato, fosfato, histidina y acetato; por ejemplo, tampón Tris de aproximadamente pH 7,0-8,5, o tampón acetato de aproximadamente pH 4,0-5,5;
- 30
 - disolventes no acuosos, tales como propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo;
- 35
 - soportes acuosos que incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo medios salinos y tamponados;
 - polímeros biodegradables tales como poliésteres;
- 40
 - agentes espesantes, tales como manitol o glicina;
 - agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA);
- 45
 - agentes isotónicos y retardadores de la absorción;
 - agentes complejantes, tales como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina)
- 50
 - cargas;
 - monosacáridos; disacáridos; y otros hidratos de carbono (tales como glucosa, manosa o dextrinas); los hidratos de carbono pueden ser azúcares no reductores, preferiblemente trehalosa, sacarosa, octasulfato, sorbitol o xilitol;
- 55
 - proteínas (de bajo peso molecular), polipéptidos o soportes proteicos, tales como seroalbúmina humana o bovina, gelatina o inmunoglobulinas, preferiblemente de origen humano;
 - agentes colorantes y aromatizantes;
- 60
 - agentes reductores que contienen azufre, tales como glutatión, ácido tióctico, tioglicolato de sodio, tioglicerol, α -monotioglicerol y tiosulfato de sodio;
 - agentes diluyentes;
- 65

- agentes emulsionantes;
- polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona);
- 5 • contraiones formadores de sales tales como sodio;
- conservantes, tales como agentes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes y similares; ejemplos son: cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenético, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico o peróxido de hidrógeno);
- 10 • complejos metálicos tales como complejos de Zn-proteína;
- disolventes y co-disolventes (tales como glicerol, propilenglicol o polietilenglicol);
- 15 • azúcares y alcoholes de azúcar, que incluyen polioles, trehalosa, sacarosa, octasulfato, manitol, sorbitol o xilitol estaquiosa, manosa, sorbosa, xilosa, ribosa, mioinositosa, galactosa, lactitol, ribitol, mioinisol, galactitol, glicerol, ciclitoles (por ejemplo, inositol), polietilenglicol; y alcoholes de azúcar polihidroxilados;
- agentes de suspensión;
- 20 • tensioactivos o agentes humectantes, tales como pluronics, PEG, ésteres de sorbitán, polisorbatos tal como polisorbato 20, polisorbato, tritón, trometamina, lecitina, colesterol, tiloxapal; los tensioactivos pueden ser detergentes, preferiblemente con un peso molecular > 1,2 KD y/o un poliéter, preferiblemente con un peso molecular > 3 KD; ejemplos no limitantes de detergentes preferidos son Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80 y Tween 85; ejemplos no limitantes de poliéteres preferidos son PEG 3000, PEG 3350, PEG 4000 y PEG 5000;
- 25 • agentes potenciadores de la estabilidad tales como sacarosa o sorbitol;
- 30 • agentes potenciadores de la tonicidad tales como haluros de metales alcalinos, preferiblemente cloruro de sodio o potasio, manitol, sorbitol;
- vehículos de administración parenteral, incluyendo solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, Ringer lactato o aceites fijos;
- 35 • vehículos de administración intravenosa que incluyen reponedores de líquidos y nutrientes, reponedores de electrolitos (tales como los que se basan en la dextrosa de Ringer).

40 Es evidente para los expertos en la técnica que los diferentes excipientes de la composición farmacéutica (por ejemplo, los enumerados anteriormente) pueden tener, por ejemplo, diferentes efectos y el aminoácido puede actuar de tampón, un estabilizador y/o un antioxidante; el manitol puede actuar de un agente de carga y/o un agente potenciador de la tonicidad; el cloruro sódico puede actuar de vehículo de administración y/o agente potenciador de la tonicidad; etc.

45 Los polioles son agentes estabilizantes útiles en tanto formulaciones líquidas como liofilizadas para proteger las proteínas de procesos de degradación físicos y químicos, y también son útiles para ajustar la tonicidad de las formulaciones. Polioles incluyen azúcares, p. ej., manitol, sacarosa y sorbitol y alcoholes polihídricos, tales como, por ejemplo, glicerol y propilenglicol y, para los propósitos de la discusión en esta memoria, polietilenglicol (PEG) y sustancias relacionadas. El manitol se usa comúnmente para garantizar la estabilidad estructural de la torta en formulaciones liofilizadas. Asegura estabilidad estructural a la torta. Generalmente se utiliza con un lioprotector, p. ej., sacarosa. El sorbitol y la sacarosa son agentes comúnmente usados para ajustar la tonicidad y como estabilizadores para proteger contra el estrés pro congelación-descongelación durante el transporte o la preparación de masas durante el proceso de fabricación. El PEG es útil para estabilizar las proteínas y como crioprotector.

55 Los tensioactivos se utilizan de forma rutinaria para prevenir, minimizar o reducir la adsorción superficial. Las moléculas de proteína pueden ser susceptibles a la adsorción sobre superficies y a la desnaturalización y la consiguiente agregación en las interfaces aire-líquido, sólido-líquido y líquido-líquido. Estos efectos se incrementan generalmente a la inversa con la concentración de las proteínas. Estas interacciones deletéreas se incrementan generalmente a la inversa con la concentración de proteína y típicamente son exacerbadas por la agitación física, tales como la generada durante el transporte y la manipulación de un producto. Los tensioactivos comúnmente usados incluyen polisorbato 20, polisorbato 80, otros ésteres de ácidos grasos de polietoxilatos de sorbitano, y poloxámero 188. Los tensioactivos también se utilizan comúnmente para controlar la estabilidad conformacional de las proteínas. El uso de tensioactivos a este respecto es específico para proteínas, ya que cualquier tensioactivo dado estabilizará típicamente algunas proteínas y desestabilizará otras.

Los polisorbatos son susceptibles a la degradación oxidativa y, a menudo, tal como se suministran, contienen cantidades suficientes de peróxidos para provocar la oxidación de las cadenas laterales de residuos de proteínas, especialmente metionina. En consecuencia, los polisorbatos deberían utilizarse con cuidado y, cuando se utilizan, deben emplearse en su concentración efectiva más baja.

5 Los antioxidantes pueden prevenir -de algún modo- la oxidación perjudicial de proteínas en formulaciones farmacéuticas manteniendo niveles apropiados de oxígeno y temperatura ambiente y evitando la exposición a la luz. También se pueden utilizar excipientes antioxidantes para prevenir la degradación oxidativa de proteínas. Entre los antioxidantes útiles a este respecto se encuentran los agentes reductores, los captadores de oxígeno/radicales libres y los agentes quelantes. Los antioxidantes para su uso en formulaciones de proteínas terapéuticas son preferentemente solubles en agua y mantienen su actividad durante toda la estabilidad en almacén de un producto. El EDTA es un ejemplo útil.

15 Los iones metálicos pueden actuar de cofactores de proteína y permitir la formación de complejos de coordinación de proteínas. Los iones metálicos también pueden inhibir algunos procesos que degradan proteínas. Sin embargo, los iones metálicos también catalizan procesos físicos y químicos que degradan proteínas. Se pueden utilizar iones magnesio (10-120 mM) para inhibir la isomerización del ácido aspártico a ácido isoaspártico. Los iones Ca^{+2} (hasta 100 mM) pueden aumentar la estabilidad de la desoxirribonucleasa humana. Sin embargo, Mg^{+2} , Mn^{+2} y Zn^{+2} pueden desestabilizar la rhdNasa. De manera similar, Ca^{+2} y Sr^{+2} pueden estabilizar el Factor VIII, éste puede ser desestabilizado por Mg^{+2} , Mn^{+2} and Zn^{+2} , Cu^{+2} y Fe^{+2} , y su agregación puede incrementarse por los iones Al^{+3} .

25 Los conservantes tienen la función primaria de inhibir el crecimiento microbiano y garantizar la esterilidad del producto durante toda la estabilidad en almacén o término de uso del medicamento, y se necesitan en particular para formulaciones multidosis. Los conservantes de uso común incluyen alcohol bencílico, fenol y m-cresol. Aunque los conservantes tienen una larga historia de uso con parenterales de moléculas pequeñas, el desarrollo de formulaciones de proteínas que incluyan conservantes puede ser un desafío. Los conservantes casi siempre tienen un efecto desestabilizante (agregación) sobre las proteínas, y esto se ha convertido en un factor importante en limitar su uso en formulaciones de proteína. Hasta la fecha, la mayoría de los fármacos proteicos se han formulado para un solo uso. Sin embargo, cuando son posibles formulaciones de dosis múltiples, tienen la ventaja adicional de permitir la conveniencia del paciente y una comerciabilidad incrementada. Un buen ejemplo es el de la hormona del crecimiento humana (hGH), en donde el desarrollo de formulaciones conservadas ha conducido a la comercialización de presentaciones de pluma inyectable multiusos más convenientes.

35 Como era de esperar, el desarrollo de formulaciones líquidas que contienen conservantes es más desafiante que las formulaciones liofilizadas. Productos liofilizados pueden liofilizarse sin el conservante y pueden reconstituirse con un diluyente que contenga conservante en el momento de su uso. Esto acorta el tiempo durante el cual un conservante está en contacto con la proteína, minimizando significativamente los riesgos de estabilidad asociados. Con las formulaciones líquidas, la eficacia y la estabilidad de los conservantes deben mantenerse durante toda la vida útil del producto (aproximadamente de 18 a 24 meses). Un punto importante a tener en cuenta es que la eficacia del conservante debe demostrarse en la formulación final que contiene el fármaco activo y todos los componentes del excipiente.

45 Se pueden usar sales según la invención para ajustar, por ejemplo, la fuerza iónica y/o la isotonicidad de la formulación farmacéutica y/o para mejorar además la solubilidad y/o estabilidad física de la construcción de anticuerpo u otro componente. Como es bien sabido, los iones pueden estabilizar el estado nativo de las proteínas uniéndose a residuos cargados en la superficie de la proteína y protegiendo a los grupos cargados y polares en la proteína y reduciendo la fuerza de sus interacciones electrostáticas, atractivas y repelentes. Los iones también pueden estabilizar el estado desnaturalizado de una proteína uniéndose, en particular, a los enlaces peptídicos desnaturalizados ($-\text{CONH}$) de la proteína. Además, la interacción iónica con grupos cargados y polares en una proteína también puede reducir las interacciones electrostáticas intermoleculares y, con ello, prevenir o reducir la agregación e insolubilidad de las proteínas. Las especies iónicas se diferencian en sus efectos sobre las proteínas. Se ha desarrollado un cierto número de clasificaciones categóricas de iones y sus efectos sobre las proteínas que pueden utilizarse en la formulación de composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención. Un ejemplo es la serie Hofmeister, que clasifica los solutos iónicos y no iónicos polares por su efecto sobre la estabilidad conformacional de las proteínas en solución. Los solutos estabilizantes se denominan "cosmotrópicos". Los solutos desestabilizantes se denominan "caotrópicos". Los cosmótopos se utilizan comúnmente en concentraciones elevadas (p. ej., sulfato de amonio > 1 molar) para precipitar proteínas de la solución ("precipitación salina"). Los caótopos se utilizan comúnmente para dentaduras postizas y/o para solubilizar proteínas ("salazón"). La efectividad relativa de los iones para "salar" y "precipitar" define su posición en la serie de Hofmeister.

60 Se pueden usar aminoácidos libres en la composición farmacéutica como agentes de carga, estabilizadores, y antioxidantes, así como otros usos habituales. Se pueden utilizar lisina, prolina, serina y alanina para estabilizar proteínas en una formulación. La glicina es útil en la liofilización para asegurar la estructura y propiedades correctas de la torta. La arginina puede ser útil para inhibir la agregación de proteínas, tanto en formulaciones líquidas como liofilizadas. La metionina es útil como un antioxidante.

65

Excipientes particularmente útiles para formular la composición farmacéutica incluyen sacarosa, trehalosa, manitol, sorbitol, arginina, lisina, polisorbato 20, polisorbato 80, poloxámero 188, Pluronic y combinaciones de los mismos. Dichos excipientes pueden estar presentes en la composición farmacéutica en diferentes concentraciones, en tanto que la composición presente las propiedades deseables, como se ejemplifica en el presente documento, y en particular promueve la estabilización de las construcciones de anticuerpo monocatenario biespecífico contenidas. Por ejemplo, la sacarosa puede estar presente en la composición farmacéutica en una concentración entre 2 % (p/v) y 12 % (p/v), es decir, en una concentración de 12 % (p/v), 11 % (p/v), 10 % (p/v), 9 % (p/v), 8 % (p/v), 7 % (p/v), 6 % (p/v), 5 % (p/v), 4 % (p/v), 3 % (p/v) o 2 % (p/v). Concentraciones de sacarosa preferidas oscilan entre 4 % (p/v) y 10 % (p/v) y más preferentemente entre 6 % (p/v) y 10 % (p/v). El polisorbato 80 puede estar presente en la composición farmacéutica en una concentración entre 0,001 % (p/v) y 0,5 % (p/v), es decir, en una concentración de 0,5 % (p/v), 0,2 % (p/v), 0,1 % (p/v), 0,08 % (p/v), 0,05 % (p/v), 0,02 % (p/v), 0,01 % (p/v), 0,008 % (p/v), 0,005 % (p/v), 0,002 % (p/v) o 0,001 % (p/v). Las concentraciones de polisorbato 80 preferidas varían entre 0,002 % (p/v) y 0,5 % (p/v), y preferentemente entre 0,005 % (p/v) y 0,02 % (p/v).

La composición farmacéutica proporcionada en el presente documento puede comprender, en particular, uno o más conservantes.

Conservantes útiles para formular composiciones farmacéuticas incluyen, en general, antimicrobianos (por ejemplo, agentes antibacterianos o antifúngicos), antioxidantes, quelantes, gases inertes y similares; ejemplos son: cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenético, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico o peróxido de hidrógeno). Los conservantes antimicrobianos son sustancias que se usan para prologar la estabilidad en almacén de medicinas reduciendo la proliferación microbiana. Los conservantes que son particularmente útiles para formular la composición farmacéutica de la invención incluyen alcohol bencílico, clorobutanol, fenol, meta-cresol, metilparabeno, fenoxietanol, propilparabeno tiomerosal. La estructura y concentración típica para el uso de estos conservantes se describen en la Tabla 1 de Meyer et al. J Pharm Sci. 96(12), 3155.

Los conservantes mencionados anteriormente pueden estar presentes en la composición farmacéutica en diferentes concentraciones. Por ejemplo, el alcohol bencílico puede estar presente en una concentración que varía entre 0,2 y 1,1 % (v/v), clorobutanol en una concentración que varía entre 0,3-0,5 % (v/v), fenol en una concentración que varía entre 0,07 y 0,5 % (v/v), meta-cresol en una concentración que varía entre 0,17 y 0-32 % (v/v) o tiomerosal en una concentración que varía entre 0,003 a 0,01 % (v/v). Las concentraciones preferidas para metilparabeno están en el intervalo de 0,05 y 0,5 % (v/v), para fenoxietanol en el intervalo de 0,1 y 3 % (v/v) y para propilparabeno en el intervalo de 0,05 y 0,5 % (v/v).

Sin embargo, también es concebible que la composición farmacéutica no comprenda ningún conservante. En particular, la presente invención proporciona, entre otras cosas, una composición farmacéutica que está libre de conservantes, que comprende una construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico que tiene una secuencia de aminoácidos como se representa en SEQ ID NO. 100 en una concentración de 0,5 mg/ml, sal de sodio de sulfobutiléter- β -ciclodextrina en una concentración de 1 % (p/v) y fosfato de potasio en concentración de 10 mM, y sacarosa adicional en concentración de 8 % (p/v) y polisorbato 80 en concentración de 0,01 % (p/v) a un pH de 6,0.

Forma

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden formular en diversas formas, por ejemplo, en forma sólida, líquida, congelada, gaseosa o liofilizada y pueden estar, entre otras cosas, en forma de una pomada, una crema, parches transdérmicos, un gel, polvo, un comprimido, disolución, un aerosol, gránulos, píldoras, suspensiones, emulsiones, cápsulas, jarabes, líquidos, elixires, extractos, tintura o extractos líquidos.

Generalmente, son concebibles diversas formas de almacenamiento y/o farmacéuticas para la composición farmacéutica de la invención, dependiendo, entre otras cosas, de la vía de administración prevista, formato de administración y dosis deseada (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 22ª edición, Oslo, A., Ed., (2012)). El experto sabrá que dicha elección de una forma farmacéutica particular puede influir, por ejemplo, en el estado físico, estabilidad, tasa de liberación *in vivo* y tasa de depuración *in vivo* de la construcción de anticuerpo de la invención.

Por ejemplo, el vehículo o soporte primario en una composición farmacéutica puede ser o acuoso o no acuoso en la naturaleza. Un vehículo o soporte adecuado puede ser agua para inyectables, solución salina fisiológica o líquido cefalorraquídeo artificial, posiblemente complementado con otros materiales comunes en las composiciones para administración parenteral. La solución salina tamponada neutra o la solución salina mezclada con albúmina de suero son vehículos ejemplares adicionales.

Cuando se contempla administración parenteral, las composiciones terapéuticas de la invención se pueden proporcionar en forma de una disolución acuosa aceptable por vía parenteral sin pirógenos que comprende la construcción de anticuerpo deseada en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo particularmente adecuado para inyección parenteral es agua destilada estéril en la que la construcción de anticuerpo se formula como una disolución isotónica estéril, apropiadamente conservada. La preparación puede implicar la formulación de la

molécula deseada con un agente, tal como microesferas inyectables, partículas bioerosionables, compuestos poliméricos (tales como ácido poliláctico o ácido poliglicólico), perlas o liposomas, que pueden proporcionar liberación controlada o sostenida del producto que se puede administrar por inyección de liberación lenta. También se puede usar ácido hialurónico, que tiene el efecto de promocionar la duración sostenida en la circulación. Se pueden usar dispositivos de administración de fármaco implantable para introducir la construcción de anticuerpo deseado.

También se prevén en el presente documento formulaciones de administración / liberación sostenida o controlada. Los expertos en la técnica también conocen técnicas para formular una diversidad de otros medios de suministro sostenido o controlado, tales como soportes de liposomas, micropartículas bio-erosionables o perlas porosas e inyecciones de depósito. Véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente Internacional N° PCT/US93/00829, que describe la liberación controlada de micropartículas poliméricas porosas para el suministro de composiciones farmacéuticas. Preparaciones de liberación sostenida pueden incluir matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos moldeados, p. ej., películas o microcápsulas. Matrices de liberación sostenida pueden incluir poliésteres, hidrogeles, polilactidas (tal como se describe en la Pat. de EE.UU. N° 3.773.919 y la Publicación de Patente Europea N° EP 058481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato (Sidman et al., 1983, Biopolymers 2:547-556), poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) (Langer et al., 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277 y Langer, 1982, Chem. Tech. 12:98-105), etileno y acetato de vinilo (Langer et al., 1981, supra) o ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico (Publicación de Solicitud de Patente Europea N° EP 133.988). Composiciones de liberación sostenida también pueden incluir liposomas que pueden prepararse mediante cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica. Véase, p. ej., Epstein et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:3688-3692; Publicaciones de Solicitud de Patente Europea N°s EP 036.676; EP 088.046 y EP 143.949. La construcción de anticuerpo también se puede atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial (por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente), en sistemas de suministro de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Such techniques are disclosed in Remington's Pharmaceutical Sciences, 22nd edition, Oslo, A., Ed., (2012).

Las composiciones farmacéuticas utilizadas para la administración *in vivo* se proporcionan típicamente en forma de preparaciones estériles. La esterilización se puede lograr mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. Cuando la composición se liofiliza, la esterilización utilizando este método puede realizarse antes o después de la liofilización y reconstitución. Composiciones para administración parenteral se pueden almacenar en forma liofilizada o en solución. Composiciones parenterales generalmente se colocan en un recipiente que tiene una lumbrera de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

Las construcciones de anticuerpos descritas en esta memoria también se pueden formular como inmuno-liposomas. Un "liposoma" es una pequeña vesícula compuesta de diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivo que es útil para el suministro de un fármaco a un mamífero. Los componentes del liposoma se disponen comúnmente en una formación de bicapa, similar a la disposición de lípidos de las membranas biológicas. Los liposomas que contienen la construcción de anticuerpo se preparan mediante métodos conocidos en la técnica, como se describe en Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); Pat. de EE.UU. N°s 4.485.045 y 4.544.545; y documento WO 97/38731. Los liposomas con tiempo de circulación potenciado se describen en la Patente de EE.UU. N° 5.013.556. Pueden generarse liposomas particularmente útiles mediante el método de evaporación en fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruden a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Fragmentos Fab' de la construcción de anticuerpo de la presente invención se pueden conjugar con los liposomas como se describe en Martin et al. J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982) mediante una reacción de intercambio de disulfuro. Opcionalmente, el liposoma contiene un agente quimioterapéutico. Véase Gabizon et al. J. National Cancer Inst. 81 (19) 1484 (1989).

Agentes activos adicionales

Se prevé que la composición de la invención pueda comprender, además de la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico definida en el presente documento, agentes biológicamente activos adicionales, dependiendo del uso previsto de la composición. Dichos agentes podrían ser, en particular, fármacos que actúan sobre tumores y/o células malignas, pero otros agentes activos también son concebibles, dependiendo del uso previsto de la composición farmacéutica, que incluye agentes que actúan sobre el sistema gastrointestinal, fármacos que inhiben inmunorreacciones (por ejemplo, corticosteroides), fármacos que modulan la respuesta inflamatoria, fármacos que actúan sobre el aparato circulatorio y/o agentes, tales como citocinas conocidas en la técnica. También se prevé que la composición farmacéutica de la presente invención se aplique en una coterapia, es decir, en combinación con otro medicamento contra el cáncer.

Almacenamiento

Una vez formulada la composición farmacéutica, puede almacenarse en viales estériles en forma de una solución, suspensión, gel, emulsión, sólido, cristal o en forma de un polvo deshidratado o liofilizado. Formulaciones de este tipo

se pueden almacenar en una forma lista para usar o en una forma (p. ej., liofilizada) que se reconstituye antes de la administración. Por ejemplo, se pueden reconstituir composiciones liofilizadas en, por ejemplo, agua bacteriostática para inyección (BWFI), solución salina fisiológica, solución salina tamponada con fosfato (PBS), o la misma formulación en la que la proteína había estado antes de la liofilización.

5

Vía de administración

La composición farmacéutica de la invención se puede formular, en general, para la administración por cualquier vía de administración adecuada. En el contexto de la presente invención, las vías de administración incluyen, pero no se limitan a, vías tópicas (tales como epicutánea, inhalacional, nasal, oftálmica, auricular / aural, vaginal, mucosa); vías enterales (tales como oral, gastrointestinal, sublingual, sublabial, yugal, rectal); y vías parenterales (tales como intravenosa, intrarterial, intraósea, intramuscular, intracerebral, intracerebroventricular, epidural, intratecal, subcutánea, intraperitoneal, extraamniótica, intrarticular, intracardiaca, intradérmica, intralesional, intrauterina, intravesical, intravítrea, transdérmica, intranasal, transmucosa, intrasinovial, intraluminal).

15

Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento son particularmente útiles para administración parenteral, por ejemplo, administración subcutánea o intravenosa, por ejemplo, por inyección, tal como inyección en bolo, o por infusión, tal como infusión continua. Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar utilizando un dispositivo médico. Se describen ejemplos de dispositivos médicos para administrar composiciones farmacéuticas en las Patentes de EE.UU. N°S 4.475.196; 4.439.196; 4.447.224; 4.447.233; 4.486.194; 4.487.603; 4.596.556; 4.790.824; 4.941.880; 5.064.413; 5.312.335; 5.312.335; 5.383.851; y 5.399.163.

20

La composición farmacéutica de la invención también se puede administrar ininterrumpidamente. Como un ejemplo no limitante, la administración ininterrumpida o sustancialmente ininterrumpida, es decir, continua, se puede realizar por un pequeño sistema de bomba llevado por el paciente para dosificar la entrada de la construcción de anticuerpo en el cuerpo del paciente. La composición farmacéutica se puede administrar usando dichos sistemas de bomba. Sistemas de bomba de este tipo son generalmente conocidos en la técnica y comúnmente se basan en el intercambio periódico de cartuchos que contienen el agente terapéutico que se ha de infundir. Cuando se cambia el cartucho en un sistema de bomba de este tipo, puede producirse una interrupción temporal del flujo ininterrumpido de otro modo de agente terapéutico en el cuerpo del paciente. En tal caso, la fase de administración antes del reemplazo del cartucho y la fase de administración después del reemplazo del cartucho aún se considerarían dentro del significado de los medios farmacéuticos y los métodos de la invención juntos constituyen una "administración ininterrumpida" de un agente terapéutico de este tipo.

25

30

La administración continua o ininterrumpida de la composición farmacéutica de la invención puede ser intravenosa o subcutánea a modo de un dispositivo de administración de líquidos o sistema de bomba pequeño que incluye un mecanismo impulsor de líquido para impulsar el líquido de un depósito y un mecanismo de accionamiento para accionar el mecanismo impulsor. Sistemas de bomba para administración subcutánea pueden incluir una aguja o una cánula para penetrar la piel de un paciente y administrar la composición adecuada al cuerpo del paciente. Dichos sistemas de bomba pueden fijarse o adherirse directamente a la piel del paciente independientemente de una vena, arteria o vaso sanguíneo, permitiendo con ello un contacto directo entre el sistema de bomba y la piel del paciente. El sistema de bomba se puede colocar en la piel del paciente durante 24 horas hasta varios días. El sistema de bomba puede ser de pequeño tamaño con un depósito para pequeños volúmenes. Como un ejemplo no limitativo, el volumen del depósito para la composición farmacéutica adecuada a administrar puede estar entre 0,1 y 50 ml.

35

40

45

La administración continua también se puede lograr por vía transdérmica a modo de un parche llevado sobre la piel y sustituido en intervalos. Un experto en la técnica conoce los sistemas de parches para el suministro de fármacos adecuados para este propósito. Cabe señalar que la administración transdérmica es especialmente adecuada para la administración ininterrumpida, ya que el intercambio de un primer parche agotado se puede realizar ventajosamente simultáneamente con la colocación de un segundo parche nuevo, por ejemplo, en la superficie de la piel inmediatamente adyacente al primer parche agotado e inmediatamente antes de retirar el primer parche agotado. No surgen problemas de interrupción del flujo o fallo de la celda de energía.

50

Se debe observar que, como se usa en el presente documento, las formas en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen referencias en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, referencia a "un reactivo" incluye uno o más de dichos reactivos diferentes.

55

A menos que se indique lo contrario, la expresión «al menos» que precede a una serie de elementos debe entenderse que se refiere a cada uno de los elementos de la serie.

60

El término "y/o" siempre que se utilice en esta memoria incluye el significado de "y", "o" y "todos o cualquier otra combinación de los elementos conectados por dicho término".

65

El término "alrededor de" o "aproximadamente", como se usa en el presente documento, significa dentro del 20 %, preferentemente dentro del 10 %, y más preferentemente dentro de 5 % de un valor o intervalo dado. Incluye, sin embargo, también el número concreto, por ejemplo, aproximadamente 20 incluye 20.

El término "inferior a" o "superior a" incluye el número concreto. Por ejemplo, menos de 20 significa inferior o igual a . Similarmente, mayor de o superior a significa mayor de o igual a, o superior o igual a, respectivamente.

5 A lo largo de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que la palabra "comprenden" y variaciones tales como "comprende" y "que comprende" implican la inclusión de un número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas establecidos, pero no la exclusión de ningún otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapa. Cuando se utiliza en esta memoria, la expresión "que comprende" puede sustituirse con la expresión "que contiene" o "que incluye" o, a veces, cuando se utiliza en esta memoria, con la expresión "que tiene".

10 Cuando se utiliza en esta memoria, "que consiste en" excluye cualquier elemento, etapa o ingrediente no especificado en el elemento de la reivindicación. Cuando se utiliza en esta memoria, "que consiste esencialmente en" no excluye materiales o etapas que no afecten materialmente a las características básicas y novedosas de la reivindicación.

15 Se debe entender que la presente divulgación no se limita a la metodología particular, protocolos, material, reactivos y sustancias, etc., descritos en el presente documento y como tal puede variar. La terminología usada en el presente documento es con el fin de describir realizaciones particulares solo, y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que se define únicamente por las reivindicaciones.

20 Se obtendrá un mejor entendimiento de la presente invención y de sus ventajas a partir de los siguientes ejemplos, ofrecidos para fines ilustrativos solo.

EJEMPLOS

25 **Ejemplo 1: Efecto del estrés inducido por la temperatura sobre las formulaciones que comprenden AMG330 y HP-β-CD**

30 Se dializó el conjunto de proteína AMG 330 (SEQ ID NO: 100) derivada de cromatografía de hidroxapatita en un tampón de base de formulación compuesto de base tris 100 mM, hidrogenofosfato de sodio 50 mM, 4 % (p/v) de trehalosa dihidratada a pH 5,2. El punto final de la diálisis se verificó por mediciones de osmolalidad. La masa dializada se concentró por ultrafiltración y centrifugación hasta una concentración de 0,96 mg/ml y se filtró de forma estéril por medio de un filtro de PVDF de 0,2 μm. La masa preformulada se dividió en tres fracciones de volumen de igual tamaño. Estas se ajustaron a pH 5,2, 5,6 y 6,0 respectivamente usando hidróxido sódico 5 M y nuevamente se filtraron con un filtro de PVDF de 0,2 μm. Después del ajuste del pH, a las masas preformuladas se añadieron los volúmenes requeridos de disoluciones madre que contenían o 1 % (p/v) de polisorbato 20, 1 % (p/v) de polisorbato 80 o 4 % (p/v) de HP-β-CD. Las concentraciones de polisorbato 20, polisorbato 80 y HP-β-CD en las formulaciones finales se muestran en la Figura 1. La concentración de cada formulación se ajustó a 0,4 mg/ml usando tampón de base compuesto como se ha descrito anteriormente. Todos los excipientes se aplicaron en calidad compendiada. Las formulaciones finales se llenaron hasta 150 μl en tubos de reacción de polipropileno y se incubaron en una vitrina controlada a 30 °C durante 72 horas. El contenido de confórmero y especies de alto peso molecular (HMWS) se determinó con cromatografía líquida de resolución ultra alta de exclusión por tamaño (SE-UPLC). Se realizó SE-UPLC en un sistema Acquity H-Class UPLC (Waters) usando una columna Acquity UPLC BEH200 SEC 150 mm (Waters). La temperatura de la columna se estableció a 25 °C. La separación de variantes de tamaño se logró aplicando un método isocrático con un caudal de 0,4 ml/min. La fase móvil estuvo compuesta de fosfato de sodio 100 mM, NaCl 250 mM pH 6,8. El tiempo de ejecución asciende a 6,0 minutos. Las muestras se mantuvieron a 8 °C dentro del inyector automático hasta el análisis. El volumen de inyección fue 7,5 μl. Para evitar el arrastre, después de cada muestra se realizó una inyección intermedia con 40 % de ACN. La detección se basó en fluorescencia (Ex 280 nm, Em 325 nm). La integración de picos se realizó usando el software Empower®. Se informó el ABC relativa de monómero y las variantes de tamaño. Se podría mostrar que la formación de especie de proteína no monomérica (incluyendo confórmeros y especies de alto peso molecular) durante el estrés térmico (30 °C) se puede inhibir en presencia de HP-β-CD (Figura 1). A diferencia, las formulaciones que contienen polisorbato 20 o 80 presentaron la formación de especies no monoméricas con el tiempo.

55 **Ejemplo 2: Efecto del estrés inducido en la superficie sobre formulaciones que comprenden AMG330 y HP-β-CD**

60 Se realizó un experimento adicional para evaluar si HP-β-CD estabiliza AMG 330 contra las condiciones de estrés inducido en la superficie. El principio activo de AMG 330 formulado en tris clorhidrato 35 mM, fosfato hidrogenofosfato de sodio 17,5 mM, clorhidrato de L-arginina 100 mM y 1,4 % (p/v) de dihidrato de trehalosa, pH 6,0, se complementó con o polisorbato 20, 80 o HP-β-CD en diferentes concentraciones representadas en la Figura 2 (eje x). Todos los excipientes se aplicaron en calidad compendiada. Las formulaciones se llenaron hasta 1,0 ml en viales de vidrio de tipo I previamente lavados y previamente esterilizados. Los viales se taparon con tapones de caucho butílico esterilizados y se sellaron con cápsulas de aluminio. Las formulaciones se sometieron a estrés durante (1) diez ciclos de congelación/descongelación consecutivos y (2) espumación. La congelación y descongelación se realizó en un liofilizador a escala piloto Epsilon 2-6D (Christ, Alemania). Las temperaturas objetivo para la congelación y

descongelación se establecieron a -50 °C y 20 °C, respectivamente. Se usaron tasas de congelación y descongelación de 0,3 K/min. Cada temperatura fue seguida por una meseta isotérmica de 1 hora. La espumación se logró inyectando nitrógeno en la disolución respectiva durante 1 hora a 80 ml por minuto usando una aguja de inyección de 21G. El vial se ventiló usando una segunda aguja de inyección equipada con filtro estéril. Las muestras almacenadas a -70 °C se usaron como controles no estresados. Las muestras se analizaron por SE-UPLC e inspección visible según la prueba 5 del Deutscher Arzneimittel Codex (DAC). Se realizó SE-UPLC como se describe en el Ejemplo 1. Para la evaluación de proteína, la detección de concentración se realizó adicionalmente por absorción a 280 nm. En las muestras de control sin estresar fue evidente que las especies no monoméricas que incluyen confórmero, dímeros y agregados son más abundantes en formulaciones que contienen polisorbato 20 o 80 si en comparación con formulaciones con HP-β-CD. Cuando se estresan por espumación y congelación/descongelación, las especies no monoméricas aumentaron en las formulaciones que contienen polisorbatos (Figura 2). El uso de HP-β-CD redujo la formación de especies no monoméricas. En ausencia de cualquier tensioactivo, se observaron pérdidas de proteína superiores al 80 % mientras que el uso de polisorbato y HP-β-CD produjeron recuperación cuantitativa de proteína. A diferencia de las formulaciones sin tensioactivo, las formulaciones que contienen HP-β-CD estuvieron prácticamente libres de agregados de proteína en el intervalo de tamaño visible (Tabla 1).

Tabla 1: Evaluación de partículas visibles según PhEur 2.9.20. Clasificación de los resultados de la inspección según la prueba 5 del Deutscher Arzneimittel Codex (DAC).

Tratamiento	% de HP-β-CD	Resultado de la inspección	Cumplimiento de los requisitos compendiados (prueba 5 de DAC) ¹
sin estresar	0.1	4	sí
sin estresar	0.5	0	sí
sin estresar	1	1	sí
sin estresar	2	3	sí
sin estresar	sin	22	no
10 × F/T	0.1	4	sí
10 × F/T	0.5	2	sí
10 × F/T	1	2	sí
10 × F/T	2	4	sí
10 × F/T	sin	30	no
Espumación	0.1	6	no
Espumación	0.5	2	sí
Espumación	1	4	sí
Espumación	2	3	sí
Espumación	sin	30	no

¹ Requisito compendiado según la prueba 5 del Deutscher Arzneimittel Codex (DAC): resultado de inspección <4,5

Ejemplo 3: Efecto del alcohol bencilico sobre formulaciones que comprenden AMG103 y HP-β-CD o SBE-β-CD

Se investigó el impacto de HP-β-CD y SBE-β-CD sobre la estabilidad de construcciones de anticuerpo BiTE® en presencia de alcohol bencilico en formulaciones que contenían 0,6 mg/ml de AMG 103 (blinatumomab). Por lo tanto, AMG 103 se formuló en histidina 20 mM, 2 % (p/v) de dihidrato de trehalosa, 0,9 % (p/v) de cloruro sódico a pH 7,0. Esta formulación se complementó con diferentes concentraciones de o HP-β-CD (0,5 y 1,0 % p/v) o SBE-β-CD (0,5, 1,0 y 2,0 % p/v). Una formulación libre de ciclodextrina sirvió de control. La concentración de AMG 103 en todas las formulaciones se ajustó a 0,6 mg/ml. Todos los excipientes se aplicaron en calidad compendiada. A todas las formulaciones se les añadió 0,9 % (V/V) de alcohol bencilico y se envasaron hasta 0,5 ml en tubos de reacción de polipropileno. La incubación se realizó a 37 °C durante 24 horas. Las muestras se analizaron por absorción UV para determinar la densidad óptica a 350 nm como una medida de la agregación de proteínas y por medición de intensidad de emisión de fluorescencia intrínseca para detectar posibles cambios conformacionales. La absorción UV se realizó en un lector de placas Infinite M1000 (Tecan) usando placas de 96 pocillos de media área transparentes (Corning). Cada pocillo se llenó con 100 µl de disolución de muestra. Las mediciones de muestra se realizaron por triplicado. Se registró la absorción UV a 350 nm. Se analizaron las intensidades de emisión de fluorescencia intrínsecas en la misma placa desde el fondo. La excitación se realizó a 278 nm. La intensidad de emisión se registró de 300 a 500 nm usando incrementos de 1 nm. Las ranuras de excitación y emisión se ajustaron a 10 y 5 nm, respectivamente. Durante tanto las mediciones de UV como de fluorescencia, se controló la temperatura de la placa (25 °C).

Las densidades ópticas (OD) a 350 nm indicaron una tendencia reducida a la agregación de AMG 103 en presencia de HP-β-CD o SBE-β-CD. El efecto fue más pronunciado con concentraciones crecientes de ciclodextrina (Figura 3). La agregación de AMG 103 en presencia de alcohol bencílico se traduce en un cambio del entorno local de residuos de triptófano demostrado por la fluorescencia intrínseca. Estos cambios se minimizaron con concentraciones crecientes de las diferentes β-CD (Figura 4).

Ejemplo 4: Efecto del alcohol bencílico sobre formulaciones que comprenden diferentes concentraciones de AMG103 y β-CD

Se trató el efecto de elevadas concentraciones de HP-β-CD y SBE-β-CD sobre la tendencia a la agregación de AMG 103 (blinatumomab) por un diseño experimental factorial completo de 2 niveles con 4 factores. Se formuló AMG 103 como se describe en el Ejemplo 2. Sin embargo, su concentración varió entre 0,2 y 0,6 mg/ml (Tabla 2).

Tabla 2: Diseño experimental factorial completo de 2 niveles con 4 factores para evaluar el efecto de SBE-β-CD y HP-β-CD sobre la tendencia a la agregación de AMG 103 en presencia de alcohol bencílico

Tipo de β-CD	Concentración de β-CD % p/v	Concentración de AMG 103 mg/ml	Concentración de alcohol bencílico % V/V
HP-β-CD	0.2	0.2	0.5
			0.9
		0.6	0.5
	0.9	0.5	
	0.6	0.2	0.5
			0.9
0.6		0.5	
0.9	0.2	0.5	
		0.9	
	0.6	0.5	
SBE-β-CD	0.2	0.2	0.5
			0.9
		0.6	0.5
	0.9	0.5	
	0.6	0.2	0.5
			0.9
0.6		0.5	
0.9	0.2	0.5	
		0.9	
	0.6	0.5	

Todas las muestras se incubaron directamente en placas de 96 pocillos de mitad de área transparentes (Corning) a 37 °C durante 96 horas. La placa se cubrió con una lámina adhesiva para evitar las pérdidas por evaporación. Nuevamente se tomaron las densidades ópticas a 350 nm como una medida de la agregación de AMG 103 (véase el Ejemplo 3). Los datos analíticos se evaluaron por análisis de la varianza (ANOVA) usando el software Statística®. La distribución normal de valores medidos se verificó gráficamente representando los valores normales esperados contra residuales en bruto. Se generaron modelos predictivos (Figura 5) por Statística® basados en la regresión de datos analíticos. Por lo tanto, se tuvieron en cuenta efectos de factores puros, así como interacciones lineales entre factores. A las concentraciones dadas de AMG 103 y alcohol bencílico, la agregación de AMG 103 se podrían reducir aumentando los contenidos de HP-β-CD o SBE-β-CD (Figura 5).

Ejemplo 5: Efecto del estrés inducido por el almacenamiento sobre las formulaciones que comprenden construcciones de anticuerpo biespecífico y β-CD

Se dializó principio activo preformulado que contiene aproximadamente 1 mg/ml de CD33_2-hALB en fosfato de potasio 20 mM, clorhidrato de L-arginina 150 mM y 6 % (p/v) de trehalosa dihidratada a pH 6,0 en ácido cítrico 20 mM, 6 % (p/v) de sacarosa a pH 5,0 y en fosfato de potasio 20 mM, 6 % (p/v) de sacarosa a pH 6,0, respectivamente. El punto final de la diálisis se determinó por mediciones de osmolalidad. La diálisis se realizó usando dispositivos Slide A Lyser®. Después de la diálisis, el material tamponado con citrato se concentró directamente por encima de 7 mg/ml con unidades VivaSpin®. La centrifugación se realizó a aproximadamente 2000 g durante 5 min a 2 a 8 °C. Asimismo se trató el material de tampón fosfato de potasio. Sin embargo, el material se dividió en dos fracciones de volumen de

igual tamaño antes de la etapa de centrifugación. Una fracción se ajustó a pH 7,0. El pH de la segunda fracción se mantuvo a pH 6,0. Después de la filtración estéril a través de un filtro de PVDF de 0,2 μm , los concentrados se formularon finalmente añadiendo disoluciones madre de polisorbato 80 y SBE- β -CD, si procede. La concentración diana de CD33_2-hALB fue 5,0 mg/ml. Las masas finalmente formuladas se envasaron en viales de vidrio de tipo I prelavados y preesterilizados. Los viales se taparon con tapones de caucho butílico esterilizados y se sellaron con cápsulas de aluminio. El volumen de llenado ascendió a 1,0 ml. Una visión general de las formulaciones se proporciona por la Tabla 3. Los viales se almacenaron durante seis días en una vitrina de temperatura controlada a 37 °C. Se cuantificaron especies de alto peso molecular por SE-UPLC usando el método descrito en el Ejemplo 1. La cantidad inyectada de proteína ascendió a 3 μg .

Tabla 3: Visión general sobre las formulaciones de CD33_2-hALB

ID	Ácido cítrico	Fosfato de potasio	Sacarosa	SBE- β -CD	Polisorbato 80	pH
C50SuT	20 mM		6 % p/v		0,01 % p/v	5.0
C50SBESuT	20 mM		6 % p/v	1 % p/v	0,01 % p/v	5.0
K60SuT		20 mM	6 % p/v		0,01 % p/v	6.0
K60SBESuT		20 mM	6 % p/v	1 % p/v	0,01 % p/v	6.0
K70SuT		20 mM	6 % p/v		0,01 % p/v	7.0
K70SBESuT		20 mM	6 % p/v	1 % p/v	0,01 % p/v	7.0

Las formulaciones que contienen SBE- β -CD (F2, F4, F6) mostraron menores cantidades de especie de peso molecular alto (HMWS) después de la incubación en comparación con preparaciones sin ciclodextrina. El efecto fue más pronunciado a pH 6 y 7 que a pH 5 (Figura 6).

Ejemplo 6: Efecto de ultrafiltración y diafiltración sobre formulaciones que comprenden construcciones de anticuerpo biespecífico y β -CD

Se concentró escalonadamente por ultrafiltración (UF) MSLN-hALB purificado (es decir, SEQ ID NO: 176). Se realizó en primer lugar una concentración séptuple usando un casete equipado con una membrana de celulosa regenerada y superficie de 0,11 m^2 . Una concentración séptuple adicional se llevó a cabo con una membrana más pequeña con una superficie de 50 cm^2 . Ambas membranas tuvieron un corte de peso molecular (MWCO) de 10 kDa. Para las etapas de ultrafiltración y diafiltración, la presión transmembrana se limitó a 1,4 bares. El conjunto concentrado se dividió en dos partes. La primera parte se diafiltró en un tampón compuesto de fosfato de potasio 20 mM, clorhidrato de L-arginina 150 mM, 6 % (p/v) de trehalosa dihidratada a pH 6,0. La segunda parte se diafiltró en un tampón compuesto de fosfato de potasio 20 mM, 2 % (p/v) de sacarosa a pH 6,0. Las formulaciones finales enumeradas en la Tabla 4 se ajustaron añadiendo disoluciones madre concentrada a los materiales diafiltrados. Todos los excipientes se aplicaron en calidad compendiada. La concentración de MSLN-hALB objetivo fue 1,0 mg/ml.

Tabla 4: Visión general de formulaciones de MSLN-hALB

ID	Composición de formulación
K60RTrT-bajo	fosfato de potasio 20 mM, HCl de L-arginina 150 mM, 6 % (p/v) trehalosa dihidratada, 0,01 % (p/v) de polisorbato 80, pH 6,0
K60SBESuT- bajo	fosfato de potasio 20 mM, 1 % (p/v) de SBE- β -CD, 8 % (p/v) de sacarosa, 0,01 % (p/v) de polisorbato 80, pH 6,0
K60RMSuT- bajo	fosfato de potasio 20 mM, HCl de L-arginina 150 mM, 4 % (p/v) de manitol, 2 % (p/v) de sacarosa, 0,01 % (p/v) de polisorbato 80, pH 6,0

Finalmente, se esterilizó por filtración el principio activo de MSLN-hALB a través de un filtro de PVDF de 0,2 μm y se envasó en viales de vidrio de tipo I prelavados y preesterilizados. Los viales se taparon con tapones de caucho butílico esterilizados y se sellaron con cápsulas de aluminio. El volumen de llenado ascendió a 1,0 ml. Los viales se almacenaron durante hasta dos semanas en vitrinas de temperatura controlada a 25 °C y 37 °C, respectivamente. Se cuantificaron especies de alto peso molecular por SE-UPLC usando el método descrito en el Ejemplo 1. La cantidad inyectada de proteína ascendió a 3 μg . Se determinaron variantes de carga ácida usando cromatografía líquida de resolución ultra alta de intercambio catiónico débil (WCX-UPLC). WCX-UPLC se realizó en un UPLC H class Aquity (Waters) usando una columna Protein-Pak Hi Res CM 7 μm 4,6 \times 100 mm. La temperatura de la columna se estableció en 30 °C. Para lograr la separación cromatográfica, se aplicó el siguiente gradiente (Tabla 5):

Tabla 5: Visión general del gradiente de WCX-UPLC

Tiempo [min:s]	% de eluyente A	% de eluyente B
0:00	100	0
4:00	100	0
25:00	50	50
25:01	0	100
29:00	0	100
29:01	100	0
33:00	100	0

5 El eluyente A estuvo compuesto por fosfato de sodio 20 mM a pH 6,5. El eluyente B estuvo compuesto por fosfato de sodio 20 mM, cloruro sódico 250 mM, pH 6,5. La cantidad inyectada de proteína ascendió a 3 µg. El caudal fue 0,65 ml/min. Antes de la inyección, las muestras se mantuvieron en el inyector automático a 8 °C. La detección de proteína se basó en la medición de la intensidad de fluorescencia intrínseca. La excitación se realizó a 280 nm y la emisión se tomó a 330 nm. Las variantes de carga ácida se cuantificaron basándose en el área bajo la curva (ABC) relativa. La integración se realizó usando el software Empower®.

10 Se observaron tasas de formación de especies de menor peso molecular (HMWS) para la formulación con SBE-β-CD (Figura 7B). La estabilidad química también fue la más pronunciada para la formulación que contiene SBE-β-CD, indicada por la menor fracción de variantes de carga ácida (Figura 8).

15 **Ejemplo 7: LLPS de AMG 330 con SBE-β-CD y alginato**

20 LLPS: Se provoca la separación de fases líquido-líquido (LLPS) por la atracción neta entre las partículas coloidales (por ejemplo, proteínas) y, por lo tanto, se mide la intensidad de esta atracción. Cuando existe atracción entre proteínas, ocurre una LLPS en las fases ricas en proteína y pobres en proteína existentes, siempre que la temperatura sea suficientemente baja. En LLPS, las fases coexistentes están en un equilibrio termodinámico verdadero y son completamente reversibles y las concentraciones de las fases coexistentes dependen de la temperatura y no de la concentración de proteína inicial. La LLPS se puede inducir mediante la adición de PEG. Cuanto más fuerte sea la atracción entre proteínas, menor será la concentración de PEG que se necesita para que ocurra la LLPS, que a su vez indica que estas proteínas se agregarán fácilmente. A una temperatura y concentración de PEG dada, los excipientes que aumentan la estabilidad coloidal de una proteína dan como resultado una mayor concentración de proteína en la fase pobre en proteína. Este aumento en concentración de proteína se puede medir cromatográficamente con respecto a un control sin un excipiente. En el desarrollo de formulaciones, es conveniente tener en cuenta la LLPS y evaluar la atracción entre moléculas de proteínas.

30 El fin de este experimento es usar LLPS para evaluar el efecto de SBE-β-CD y alginato sobre la estabilidad coloidal de AMG 330.

Tabla 6. Composición y preparación de disoluciones:

ID de disolución	Composición de disoluciones	Preparación de disoluciones	Volumen
A	AMG 330 (1,2 mg/ml)	n/a	Se necesitan 180 µl
B	1X PBS	5 ml 10X PBS + 45 ml de agua milli Q	50 ml
C	50 % de SBE-β-CD en 1X PBS (pH para igualar a 1x PBS)	5 g en 10 g	
D	1 % de SBE-β-CD en 1X PBS	100 µl de C + 4,9 ml de B	5 ml
E	0,1 % de SBE-β-CD en 1X PBS	10 µl + 4,99 ml de B	5 ml
F	1 % de alginato en 1x PBS (pH para igualar a 1x PBS)	0,2 g en 20 g	
G	0,1 % de alginato en 1x PBS	500 µl de F + 4,5 ml B	5 ml
H	24 % de PEG 3350 en 1X PBS	4,8 g en 20 g	

Tabla 7. Composición y preparación de muestras:

ID de muestra	Composición de muestras	Preparación de las muestras	Volumen final (ul)
1-1	AMG 330 + 1X PBS, 0 % de PEG	(10 ul de A + 40 ul de B) + 50 ul de B	100
1-2	AMG 330 + 1X PBS, 0 % de PEG	(10 ul de A + 40 ul de B) + 50 ul de B	100
2-1	AMG 330 + 1X PBS, 12 % de PEG	(10 ul de A + 40 ul de B) + 50 ul de H	100
2-2	AMG 330 + 1X PBS, 12 % de PEG	(10 ul de A + 40 ul de B) + 50 ul de H	100
3-1	AMG 330 + 0,001 % de SBE- β -CD, 12 % de PEG	(10 ul de A + 1 ul E + 39 ul de B) + 50 ul de H	100
3-2	AMG 330 + 0,001 % de SBE- β -CD, 12 % de PEG	(10 ul de A + 1 ul E + 39 ul de B) + 50 ul de H	100
4-1	AMG 330 + 0,01 % de SBE- β -CD, 12 % de PEG	(10 ul de A + 1 ul de D + 39 ul de B) + 50 ul de H	100
4-2	AMG 330 + 0,01 % de SBE- β -CD, 12 % de PEG	(10 ul de A + 1 ul de D + 39 ul de B) + 50 ul de H	100
5-1	AMG 330 + 0,1 % de SBE- β -CD, 12 % de PEG	(10 ul de A + 10 ul de D + 30 ul de B) + 50 ul de H	100
5-2	AMG 330 + 0,1 % de SBE- β -CD, 12 % de PEG	(10 ul de A + 10 ul de D + 30 ul de B) + 50 ul de H	100
6-1	AMG 330 + 1 % de SBE- β -CD, 12 % de PEG	(10 ul de A + 2 ul de C + 38 ul de B) + 50 ul de H	100
6-2	AMG 330 + 1 % de SBE- β -CD, 12 % de PEG	(10 ul de A + 2 ul de C + 38 ul de B) + 50 ul de H	100
7-1	AMG 330 + 0,001 % de alginato, 12 % de PEG	(10 ul de A + 1 ul de G + 39 ul de B) + 50 ul de H	100
7-2	AMG 330 + 0,001 % de alginato, 12 % de PEG	(10 ul de A + 1 ul de G + 39 ul de B) + 50 ul de H	100
8-1	AMG 330 + 0,01 % de alginato, 12 % de PEG	(10 ul de A + 1 ul de F + 39 ul de B) + 50 ul de H	100
8-2	AMG 330 + 0,01 % de alginato, 12 % de PEG	(10 ul de A + 1 ul de F + 39 ul de B) + 50 ul de H	100
9-1	AMG 330 + 0,1 % de alginato, 12 % de PEG	(10 ul de A + 10 ul de F + 30 ul de B) + 50 ul de H	100
9-2	AMG 330 + 0,1 % de alginato, 12 % de PEG	(10 ul de A + 10 ul de F + 30 ul de B) + 50 ul de H	100

5 Se prepararon diferentes composiciones y preparaciones de disolución/muestra como se ha mencionado en la Tabla 6 y 7, anteriormente. Se prepararon muestras (concentración final de AMG 330 de 0,12 mg/ml) y se incubaron a 40 °C durante tres días. Entonces se microcentrifugaron las muestras (Eppendorf Centrifuge 5418, St. Louis, MO, EE. UU.) durante 20 s y se retiraron 80 ul de sobrenadante y se analizaron por CEX analítica (columna ProPac WCX-10, 2 mm de DI) en el sistema de cromatografía de Agilent (Agilent 1200, Santa Clara, CA, EE. UU.).

10 CEX analítica: Se inyectaron 70 μ l de la muestra en la columna CEX que se equilibró con ácido cítrico 20 mM, 0,005 % de azida de sodio, pH 6,0 y se eluyó con ácido cítrico 20 mM, cloruro sódico 1 M, 0,005 % de azida de sodio pH 6,0, con un tiempo de gradiente de 30 min (tiempo total de ejecución: 45 min/inyección) con una concentración máxima de cloruro sódico 500 mM a un caudal de 0,2 ml/min. La temperatura del inyector automático se mantuvo a 40 °C durante la serie. A partir de los cromatogramas, se calcularon las áreas de los picos de las muestras (Figura 9 y 10).

Ejemplo 8: Intercambio de tampón y concentración de proteína de AMG 330 por ultrafiltración/centrifugación en presencia de 4 formulaciones diferentes (incluyendo SBE- β -CD)

20

Tabla 8: Composición y preparación de disoluciones (volumen en ml):

ID de disolución	Composición de disoluciones	Preparación de disoluciones	Vol. a preparar
A	0,4 mg/ml de AMG 330	N/A	17 ml
B	Citrato 10 mM, pH 6,0	"	N/A
C	40 % de Captisol en 1X PBS	"	"
D	Arg 500 mM, Glu 500 mM en B, pH 6,0	"	"
E	Tris 35 mM, fosfato de Na 17,5 mM, Arg 50 mM, 1,4 % de trehalosa, pH 6,0	"	"
F	65 % de sacarosa (p/v) en 8	"	"
G	18 % de manitol (p/v) en B	"	"
H	1 % de polisorbato 80 (p/p) en B	"	"
I	1 % de PEG 4000 (p/p) en E, pH 6,0	"	"
J	Citrato 10 mM pH 6,0, 1 % de Captisol	97,5 ml de B + 2,5 ml de C	100 ml
K	Tris 35 mM, fosfato de Na 17,5 mM, Arg 50 mM, 1,4 % de trehalosa, 0,05 % de PEG 4000, pH 6,0	95 ml de E + 5 ml de I	"
L	Citrato 10 mM, Arg 50 mM, Glu 50 mM, 2 % de sacarosa, 4 % de manitol, 0,01 % de PS-80, pH 6,0	63,8 ml de B + 10 ml de D + 3,1 ml de F + 22,2 ml de G + 1 ml de H	"

Tabla 9: Composición y preparación de muestras:

ID de muestra	Composición de muestras	Preparación de las muestras
1-1	AMG 330 en citrato 10 mM, pH 6,0	2 ml de A, intercambio de tampón en B por centrifugación / filtración
1-2	"	"
2-1	AMG 330 en citrato 10 mM pH 6,0, 1 % de Captisol	2 ml de A, intercambio de tampón en J por centrifugación / filtración
2-2	"	"
3-1	AMG 330 en Tris 35 mM, fosfato de Na 17,5 mM, Arg 50 mM, 1,4 % de trehalosa, 0,05 % de PEG 4000, pH 6,0	2 ml de A, intercambio de tampón en K por centrifugación / filtración
3-2	"	"
4-1	AMG 330 en citrato 10 mM, Arg 50 mM, Glu 50 mM, 2 % de sacarosa, 4 % de manitol, 0,01 % de PS-80, pH 6,0	2 ml de A, intercambio de tampón en C por centrifugación / filtración
4-2	"	"
5-1	AMG 330, sin intercambio de tampón	110 ul de A en viales de HPLC
5-2	"	"

La concentración inicial de proteína fue 0,4 mg/ml. Se dispusieron 2 ml de 0,4 mg/ml de AMG 330 en un filtro de centrífuga Amicon ultra de 15 ml, MWCO 10.000. Se añadieron 10 ml del tampón apropiado a cada tubo y se mezclaron suavemente con proteína y se centrifugaron (Allegra 6R Centrifuge, Beckman Coulter, Brea, CA, EE. UU.) durante 3 h a 2000 rpm a 4 °C. Entonces se mezcló suavemente el concentrado y los tubos se centrifugaron durante 1,5 h a 2500 rpm a 25 °C. Después de un volumen de concentrado de 200-250 µL, se añadieron 10 ml de tampón apropiado a cada uno y se mezclaron suavemente con el concentrado y luego se centrifugaron durante 30 min a 2500 rpm a 25 °C dando un volumen final de 200-250 µl. La concentración de proteína final en 4 formulaciones diferentes varió de 2,9 a 3,7 mg/ml.

SEC analítica: Se analizaron muestras por SEC analítica (TSKgel G3000SWXL, 7,8 mm de DI, PA, EE. UU.) en un sistema de cromatografía Agilent (Agilent 1200, Santa Clara, CA, EE. UU.) con un tampón de electroforesis de fosfato

de sodio 100 mM, cloruro sódico 250 mM, pH 6,8, con un caudal de 0,5 ml/min (tiempo de ejecución total: 35 min/inyección). La temperatura del inyector automático se mantuvo a 4 °C durante la serie.

5 La presencia de SBE- β -CD parece proporcionar protección significativa a AMG 330 contra la formación de HMW durante la concentración de proteína por ultrafiltración con la cantidad relativa más baja de agregados en la formulación que contiene SBE- β -CD. La formulación que contiene arginina, glutamato, sacarosa, manitol y PS-80 tuvo la mayor cantidad de HMW, seguido por la formulación que contiene Tris, fosfato, arginina, trehalosa y PEG 4000 (Figura 11). El análisis de CEX mostró un efecto similar (datos no mostrados).

10 **Ejemplo 9: Estudio de formulaciones a pequeña escala de AMG 330 que incluye SBE- β -CD (LLPS, FT, UFC)**

15 El fin de este experimento es evaluar la estabilidad de AMG 330 después de diversos estreses en 14 formulaciones diferentes. Específicamente, AMG 330 se evaluó después de LLPS, 20 ciclos de congelación/descongelación (F/T) y concentración por ultrafiltración/centrifugación (UFC). Como se muestra en el Ejemplo 8, SBE- β -CD proporciona protección contra la agregación de AMG 330 y se evalúa además en este experimento. Para UFC (Figura 12 A, B), solo se investigaron 5 formulaciones. Para estudios de LLPS y F/T (Figura 12 C, D), se investigaron 14 formulaciones. Se analizaron muestras de LLPS por CEX analítica, mientras que las muestras de UFC y F/T se analizaron por tanto SEC como CEX analítica.

20 **Materiales y métodos:**

Tabla 10. Preparación de disoluciones madre:

ID de disolución	Composición de disoluciones	Preparación de disoluciones	volumen
A	Citrato 20 mM, pH 6,0	Por preparación de medios	20 l
B	~2 mg/ml de AMG 330, intercambio de tampón en A	diálisis de 0,4 mg/ml de AMG 330, luego concentración por ultrafiltración/centrifugación	20 ml, concentrar hasta un ml
C	1 % de polisorbato 80 (p/p) en A	1 g, enrasar hasta 100 g en A	100 ml
D	10 % de SBE- β -CD (p/p) en A, pH 6,0	5 g, enrasar hasta 50 g en A, ajustar a pH hasta 6,0	50 ml
E	15 % de glicina en (p/p) A, pH 6,0	7,5 g, enrasar hasta 50 g en A, ajustar a pH hasta 6,0	"
F	40 % de sacarosa (p/p) en A	10 g, enrasar hasta 25 g en A	25 ml
G	14 % de manitol (p/p) en A	3,5 g, enrasar hasta 25 g en A	"
H	Arg 400 mM en A, pH 6,0	3,484 g de Arg, enrasar hasta 50 ml en A, ajustar a pH hasta 6,0	50 ml
I	Arg 200 mM, Glu 200 mM en A, pH 6,0	1,742 g de Arg + 1,471 g de Glu, enrasar hasta 50 ml en A, ajustar a pH hasta 6,0	"
J	15 % de trehalosa dihidratada (p/p) en A	3,75 g, enrasar hasta 25 g en A	25 ml
K	26 % de PEG 3350 (p/p) en A, pH 6,0	10,4 g, enrasar hasta 40 g en A, ajustar a pH hasta 6,0	40 ml
L	1,93 mg/ml de AMG 330 + 0,074 % de PS80	2100 ul de B + 168 ul de C	2268 ul
M	40 % de SBE- β -CD (p/p) en A, pH 6,0	6 g, enrasar hasta 15 g en A, ajustar a pH hasta 6,0	15 ml
N	55 % de sacarosa (p/p) en A	13,75 g, enrasar hasta 25 g en A	25 ml

25 **Ultrafiltración/centrifugación (UFC):**

Tabla 11. Preparación de composiciones de muestras para UFC (volumen en µl).

		Cit 20 mM	PS-80	Captisol	Glicina	Sacarosa
ID de muestra	Composición de muestras	A	C	D	E	F
2-1_UFC	control	79.2	0.8			
3-1_UFC	0,5 % de SBE-β-CD	75.2	0.8	4		
4-1_UFC	1 % de SBE-β-CD	71.2	0.9	8		
5-1_UFC	2 % de SBE-β-CD	63.2	0.8	16		
6-1_UFC	2 % de SBE-β-CD, 2 % de glicina, 1 % de sacarosa	58.5	0.8	8	10.7	2
8-1_UFC	2 % de glicina, 1 % de sacarosa	66.5	0.8		10.7	2

5 Para cada muestra, se dispusieron 4 ml de 0,4 mg/ml de AMG 330 en un filtro ultracentrífugo Amicon Ultra de 15 ml de MWCO 10.000. Se añadieron 8 ml del tampón apropiado a cada tubo y se mezclaron suavemente con proteína y se centrifugaron (Allegra 6R Centrifuge, Beckman Coulter, Brea, CA, EE. UU.) a 2000 rpm (4000 rcf) a 20 °C hasta que el volumen concentrado fue 200-250 µl. Este proceso se repitió dos veces más para un total de 3 etapas de concentración. El concentrado se mezcló entonces suavemente con un pipeteador sacado del tubo de filtro, se dispuso en un tubo de Eppendorf y se microcentrifugó (Eppendorf Centrifuge 5418, St.Louis, MO, EE. UU.) a velocidad máxima durante 2 min. Después de esto, se midió la concentración de proteína para el sobrenadante, y se analizó por SEC analítica (mismos detalles que en el Ejemplo 8) inyectando 20 µl. Cada muestra se preparó por duplicado.

LLPS:

15 Se prepararon muestras como se explicó brevemente en la tabla a continuación y se incubaron durante 5 días a 4 °C. El volumen final de todas las muestras fue 240 µl. Después de la incubación, las muestras se microcentrifugaron (Eppendorf Centrifuge 5418, St.Louis, MO, EE. UU.) durante 20 s, entonces se retiraron 200 µl de sobrenadante para CEX analítica (mismos detalles que en el Ejemplo 7), excepto la temperatura del inyector automático se mantuvo a 25 °C.

Tabla 12: Preparación de composición de muestras para LLPS:

Volumen en µl		Citrato 20 mM , pH 6,0	AM G 330 + PS80	40 % de SBE-β-CD	Glicina	55 % de sacarosa	Manitol	Arginina	Arginina + glutamato	Trehalosa	PEG
ID	Composición de muestras	A	L	M	E	N	G	H	I	J	K
1	Control, 0 % de PEG	207.6	32.4								0
2	Control, 13 % de PEG	87.6	32.4								0
3	0,5 % de SBE-β-CD, 13 % de PEG	84.6	32.4	3							120
4	1 % de SBE-β-CD, 13 % de PEG	81.6	32.4	6							120
5	2 % de SBE-β-CD, 13 % de PEG	75.6	32.4	12							120
6	1 % de SBE-β-CD, 1 % de glicina, 1 % Sacarosa, 13 % de PEG	45.2	32.4	6	32	4.4					120

7	4 % de glicina, 13 % de PEG	23.6	32.4	64					120
8	2 % de glicina, 1 % Sacarosa, 13 % de PEG	51.2	32.4	32	4.4				120
9	4 % de manitol, 13 % de PEG	19	32.4			68.6			120
10	Arginina 100 mM, 13 % de PEG	27.6	32.4				60		120
11	Arginina 50 mM, glutamato 50 mM, 13 % de PEG	27.6	32.4					60	120
12	4 % de sacarosa, 13 % de PEG	70.1	32.4		17.5				120
13	4 % de trehalosa dihidratada, 13 % de PEG	23.6	32.4					64	120
14	1 % de SBE- β - CD, 4 % de sacarosa, 13 % de PEG	64.1	32.4	6	17.5				120
15	1 % de SBE- β - CD, 4 % de manitol, 2 % de sacarosa, 13 % de PEG	4.3	32.4	6	8.7	68.6			120

Concentraciones crecientes de SBE- β -CD produjeron un aumento de la recuperación de monómero, mientras se mantenía un nivel relativamente bajo de agregados. SBE- β -CD rindió incluso mejor que en combinación con sacarosa, manitol y sacarosa, y especialmente con glicina y sacarosa. Esto es especialmente llamativo debido a que la glicina sola rindió bastante mal y no mejoró en combinación con sacarosa.

Congelación/descongelación (F/T):

Tabla 13. Preparación de composiciones de muestra para F/T:

Volumen en μ l		Citrato 20 mM, pH 6,0	AMG 330 + PS80	40 % de SBE- β - CD	Glicina	55 % de sacarosa	Manitol	Arginina + glutamato	Trehalosa
ID	Composición de muestras	A	L	M	E	N	G	I	J
1	Control, -70C	207.6	32.4						
2	Control, -30C	207.6	32.4						
3	0,5 % de SBE- β - CD, -70C	204.6	32.4	3					
4	0,5 % de SBE- β - CD, -30C	204.6	32.4	3					
5	1 % de SBE- β -CD, -70C	201.6	32.4	6					
6	1 % de SBE- β -CD, -30C	201.6	32.4	6					
7	2 % de SBE- β -CD, -70C	195.6	32.4	12					

ES 2 959 257 T3

8	2 % de SBE-β-CD, -30C	195.6	32.4	12					
9	1 % de SBE-β-CD, 2 % de glicina, 1 % Sacarosa, -70C	165.2	32.4	6	32	4.4			
10	1 % de SBE-β-CD, 2 % de glicina, 1 % de sacarosa, -30C	165.2	32.4	6	32	4.4			
11	4 % de glicina, -70C	143.6	32.4		64				
12	4 % de glicina, -30C	143.6	32.4		64				
13	2 % de glicina, 1 % Sacarosa, -70C	171.2	32.4		32	4.4			
14	2 % de glicina, 1 % Sacarosa, -30C	171.2	32.4		32	4.4			
15	4 % de manitol, -70C	139	32.4				68.6		
16	4 % de manitol, -30C	139	32.4				68.6		
17	Arginina 50 mM, glutamato 50 mM, -70C	147.6	32.4					60	
18	Arginina 50 mM, glutamato 50 mM, -30C	147.6	32.4					60	
19	4 % de trehalosa dihidrato, -70C	143.6	32.4						64
20	4 % trehalosa dihidrato, -30C	143.6	32.4						64
21	1 % de SBE-β-CD, 4 % de sacarosa, -70C	184.1	32.4	6		17.5			
22	1 % de SBE-β-CD, 4 % de sacarosa, -30C	184.1	32.4	6		17.5			
23	1 % de SBE-β-CD, 4 % de manitol, 2 % Sacarosa, -70C	124.3	32.4	6		8.7	68.6		
24	1 % de SBE-β-CD, 4 % de manitol, 2 % de sacarosa, -30C	124.3	32.4	6		8.7	68.6		

Se prepararon muestras como se tabularon anteriormente. Se realizaron 20 ciclos de F/T, con muestras almacenadas durante al menos una hora a -70 °C o -30 °C durante cada congelación, y a temperatura ambiente durante no más de una hora durante la descongelación. El volumen final de cada muestra fue 240 µl. Las alícuotas se retiraron para el análisis de SEC analítica (mismo que el Ejemplo 8) después de 0 y 20 ciclos.

5

La presencia de SBE-β-CD parece proporcionar beneficio hacia la reducción de la agregación y el aumento de niveles de monómero relativos durante F/T en comparación con otras formulaciones. Las formulaciones en las que SBE-β-CD se usó en combinación con otros excipientes también rindieron bien, particularmente con glicina y sacarosa.

10

Ejemplo 10: Comparación de los efectos de SBE-β-CD y 2-hidroxipropil-beta-ciclodextrina

Se ha mostrado en un experimento de UFC previo que SBE-β-CD proporciona protección significativa a AMG 330 contra la agregación durante la concentración de proteína. En el presente experimento, los efectos sobre AMG 330 durante la concentración de proteína por UFC se comparan en presencia de o SBE-β-CD u otra ciclodextrina, 2-hidroxipropil-beta-ciclodextrina (2-HP-β-CD).

5

Materiales y métodos:

Se concentraron 20 ml de 0,4 mg/ml de AMG 330 hasta ~10 ml en tubo de filtro centrífugo Amicon Ultra de 15 ml de MWCO 10.000. Se combinó el concentrado de los tubos, y la concentración de la proteína se midió entonces por SoloVPE (usando coeficiente de extinción de 2,319 ml/(mg*cm)) y se encontró que era 0,83 mg/ml. Esta proteína se usó entonces para preparar las muestras de UFC.

10

Todas las muestras contuvieron fosfato de calcio 10 mM, 8 % de sacarosa, 0,01 % de polisorbato-80, pH 6,0.

15

Se probaron cinco condiciones de formulación: 1) control con tampón solo, 2) 1 % de SBE-β-CD añadido, 3) 2 % de SBE-β-CD añadido, 4) 1 % de 2-HP-β-CD añadido, y 5) 2 % de 2-HP-β-CD añadido. Se prepararon 50 ml de cada una de las 5 disoluciones de tampón. Se probaron dos muestras duplicadas de cada formulación.

20

Para cada muestra, se dispusieron 0,875 ml de AMG 330 en un tubo de filtro centrífugo Amicon Ultra de 4 ml de MWCO 10.000. Se añadieron 3,125 ml del tampón apropiado a cada tubo y se mezclaron suavemente con la proteína, y los tubos se centrifugaron (Allegra 6R Centrifuge, Beckman Coulter, Brea, CA, EE. UU.) a 4000 rcf a 25 °C hasta que el volumen de concentrado fue ~100 ul. Se añadieron 4 ml de tampón adicional, y las muestras se concentraron nuevamente hasta ~100 ul. El concentrado se mezcló entonces suavemente con un pipeteador y se retiraron 45 ul del tubo de filtro, se dispusieron en un tubo de Eppendorf y se microcentrifugaron (Eppendorf Centrifuge 5418, St. Louis, MO, EE. UU.) a velocidad máxima durante 2 min. El sobrenadante se analizó por SEC analítica (misma que el Ejemplo 8). También se analizó AMG 330 no concentrado (0,4 mg/ml) para fines de comparación.

25

En este experimento, se concentró AMG 330 hasta ~ 10 mg/ml en presencia de 1 y 2 % de SBE-β-CD o 2-HP-β-CD. Las formulaciones que contenían SBE-β-CD se indican por estrellas. El control a la izquierda (marcado como 0,4 mg/ml) no se concentró más allá de su concentración inicial de 0,4 mg/ml. El segundo de la izquierda (marcado como Control en las Fig. 4a y 4b) es la muestra que se concentró sin ciclodextrina. La comparación entre las formulaciones de SBE-β-CD y 2-HP-β-CD demostró la ventaja de uso de SBE-β-CD. La Figura 13 muestra que se alcanzó la mayor concentración; la Figura 14 revela la composición de estas disoluciones concentradas en términos de % de agregado y % de monómero.

30

35

Ejemplo 11: Comparación de los efectos de cuatro ciclodextrinas diferentes para su capacidad para mantener AMG 330 en una forma no agregada soluble

Se ha mostrado que SBE-β-CD reduce la agregación en AMG 330 en experimentos previos. El fin de este experimento es evaluar otras ciclodextrinas en comparación con SBE-β-CD. Los niveles de agregación en AMG 330 se midieron después de 1-4 días de incubación a 4 °C y 25 °C con 4 ciclodextrinas diferentes.

40

Materiales y métodos:

Todas las muestras también contuvieron ~2 mg/ml de AMG 330, citrato 20 mM, y 0,01 % de polisorbato-80, pH 6,0. Las muestras se prepararon y almacenaron en tubos Eppendorf (Tabla 14). Los tubos se envolvieron en plástico y se protegieron de la luz durante la incubación. Se tomaron alícuotas después de 1 y 4 días de incubación a 4 °C y 25 °C (ThermoFisher Scientific, (Newington, NH) Haake A28). Las alícuotas se microcentrifugaron brevemente (Eppendorf Centrifuge 5418, St.Louis, MO, EE. UU.) y los sobrenadantes se analizaron por SEC analítica.

50

Tabla 14. Composición y preparación de disoluciones:

ID de disolución	Composición de disoluciones	Preparación de disoluciones	Volumen
A	2 mg/ml de AMG 330	N/A	500 ul
B	Citrato 20 mM, pH 6,0	N/A	
C	10 % de SBE-β-CD en B	1,0 g, enrasar hasta 10 g en B	
D	10 % de alfa-ciclodextrina (α-CD) en B	1,0 g, enrasar hasta 10 g en B	10 ml

E	10 % de gamma-ciclodextrina (γ -CD) en B	1,0 g, enrasar hasta 10 g en B	10 ml
F	10 % de 2-hidroxipropil-beta-ciclodextrina (2-HP- β -CD) en B	1,0 g, enrasar hasta 10 g en B	10 ml
G	1 % de PS-80 en B	N/A	
H	2 mg/ml de AMG 330 + 0,01 % PS-80	495 ul de A + 5 ul de G	500 ul

Tabla 15. Composición y preparación de muestras:

ID de muestra	Composición de muestras	Preparación de las muestras	Volumen	Volumen de alícuota	Temperatura de almacenamiento (°C)
Control a 4 °C	Control	95 ul de H + 5 ul de B	100 ul	50 ul	4 °C (frigorífico)
Control a 25 °C	Control	95 ul de H + 5 ul de B	100 ul	50 ul	25 °C (estufa de incubación)
0,5 % de SBE- β -CD a 4 °C	0,5 % de SBE- β -CD	95 ul de H + 5 ul de C	100 ul	50 ul	4 °C (frigorífico)
0,5 % de SBE- β -CD a 25 °C	0,5 % de SBE- β -CD	95 ul de H + 5 ul de C	100 ul	50 ul	25 °C (estufa de incubación)
0,5 % de α -CD a 4 °C	0,5 % de α -CD	95 ul de H + 5 ul de D	100 ul	50 ul	4 °C (frigorífico)
0,5 % de α -CD a 25 °C	0,5 % de α -CD	95 ul de H + 5 ul de D	100 ul	50 ul	25 °C (estufa de incubación)
0,5 % de γ -CD a 4 °C	0,5 % de γ -CD	95 ul de H + 5 ul de E	100 ul	50 ul	4 °C (frigorífico)
0,5 % de γ -CD a 25 °C	0,5 % de γ -CD	95 ul de H + 5 ul de E	100 ul	50 ul	25 °C (estufa de incubación)
0,5 % de 2-HP- β -CD a 4 °C	0,5 % de 2-HP- β -CD	95 ul de H + 5 ul de F	100 ul	50 ul	4 °C (frigorífico)
0,5 % de 2-HP- β -CD a 25 °C	0,5 % de 2-HP- β -CD	95 ul de H + 5 ul de F	100 ul	50 ul	25 °C (estufa de incubación)

5 Se probaron cuatro ciclodextrinas diferentes, que incluyen SBE- β -CD, se para su capacidad para mantener AMG 330 en una forma no agregada soluble. La proteína a ~ 2 mg/ml se incubó durante 4 días a 4° y 25° C sin concentración adicional. Todas las muestras también contuvieron citrato 20 mM y 0,01 % de polisorbato-80, pH 6,0.

10 Al final de 4 días a 4° C, la formulación de 0,5 % de SBE- β -CD tuvo una mayor área total de los picos por SEC que indica mayores concentraciones de proteína soluble. Otras formulaciones precipitaron y se agregaron a distintos grados. Este resultado demuestra que SBE- β -CD fue un estabilizador y solubilizante más eficaz de AMG 330 a ambas temperaturas (4° y 25 °C) en comparación con α -ciclodextrina, γ -ciclodextrina o hidroxipropil β -ciclodextrinas que parecían mucho mejores solo a 25 °C (Figura 15).

15 **Ejemplo 12: AMG 330 en 13 formulaciones diferentes a 1 mg/ml y almacenado a ~20, ~30 y -70 °C durante hasta 6 semanas.**

20 El fin de este experimento es desarrollar una formulación congelada y liofilizada estable para AMG 330, SBE- β -CD y Triton X-100 se evaluaron como excipientes de formulación. Se usarán garrafas de policarbonato para simular el almacenamiento congelado de principio activo (DS).

Materiales y métodos:

25 Con una concentración inicial de 0,4 mg/ml para AMG 330, se llevó a cabo el intercambio de tampón por UF/DF (tampones enumerados en la Tabla 16) usando dos sistemas μ Scale TFF convincentes con una presión delta fijada en ~ 23 psi. Se usaron cuatro casetes Millipore Pellicon 3 Ultracel 10 kD 0,11 m² y dos ensamblajes de tubos convincentes. Después del intercambio, el material se concentró en exceso hasta 1,2 mg/ml y se recogió en envases Nalgene estériles.

30

Tabla 16. Composición de formulación:

ID de muestra	Abreviatura de formulación	Composición de formulación
FRM 1	C60CpGSuP	Citrato 10 mM, 1 % de SBE- β -CD, 2 % de glicina, 1 % de sacarosa, 0,01 % de PS80, pH 6,0
FRM 2	C60CpMSuP	Citrato 10 mM, 1 % de SBE- β -CD, 4 % de manitol, 2 % de sacarosa, 0,01 % de PS80, pH 6,0
FRM 3	C60CpSuP	Citrato 10 mM, 1 % de SBE- β -CD, 8 % de sacarosa, 0,01 % de PS80, pH 6,0
FRM 4	H60CpGSuP	Histidina 10 mM, 1 % de SBE- β -CD, 2 % de glicina, 1 % de sacarosa, 0,01 % de PS80, pH 6,0
FRM 5	H60CpMSuP	Histidina 10 mM, 1 % de SBE- β -CD, 4 % de manitol, 2 % de sacarosa, 0,01 % de PS80, pH 6,0
FRM 6	H60CpSuP	Histidina 10 mM, 1 % de SBE- β -CD, 8 % de sacarosa, 0,01 % de PS80, pH 6,0
FRM 7	KP60CpGSuP	Fosfato de potasio 10 mM, 1 % de SBE- β -CD, 2 % de glicina, 1 % de sacarosa, 0,01 % de PS80, pH 6,0
FRM 8	KP60CpMSuP	Fosfato de potasio 10 mM, 1 % de SBE- β -CD, 4 % de manitol, 2 % de sacarosa, 0,01 % de PS80, pH 6,0
FRM 9	KP60CpSuP	Fosfato de potasio 10 mM, 1 % de SBE- β -CD, 8 % de sacarosa, 0,01 % de PS80, pH 6,0
FRM 10	KP60CpGSuT	Fosfato de potasio 10 mM, 1 % de SBE- β -CD, 2 % de glicina, 1 % de sacarosa, 0,004 % Triton X-100, pH 6,0
FRM 11	KP60CpMSuT	Fosfato de potasio 10 mM, 1 % de SBE- β -CD, 4 % de manitol, 2 % de sacarosa, 0,004 % Triton X-100, pH 6,0
FRM 12	KP60CpSuT	Fosfato de potasio 10 mM, 1 % de SBE- β -CD, 8 % de sacarosa, 0,004 % Triton X-100, pH 6,0
FRM 13	PEG 4000	Tris 35 mM, fosfato de sodio 17,5 mM, arginina 50 mM, 1,4 % de trehalosa, 0,05 % de PEG 4000 a pH 6,0

5 Se prepararon disoluciones madre de tampón de formulación, PEG y tensioactivo y se añadieron para producir el material formulado final. Las muestras se llenaron a un volumen de 15 ml en garrafas de PC de 30 ml (Nalgene) para este experimento). Todas las muestras se filtraron en una campana estéril usando unidades de filtración Sterivex (0,22 μ m) antes del llenado. La concentración de proteína final en las garrafas de PC es 1 mg/ml.

10 Para experimentos estáticos, se midieron muestras por SEC analítica (misma que el Ejemplo 8) a t = 0 y t = 6 semanas.

Resultados:

15 Se incluyó SBE- β -CD en formulaciones de AMG 330 que se incubaron a diversas temperaturas. Los resultados después de 6 semanas de almacenamiento mostraron que todas las formulaciones que contenían SBE- β -CD fueron estables, a diferencia de una formulación basada en el uso de PEG-4000 y sin SBE- β -CD.

La comparación entre la formulación basada en SBE- β -CD y PEG demuestra la ventaja de uso de SBE- β -CD. La formulación basada en PEG se agregó y particuló fuertemente después del almacenamiento a -20 °C (Figura 16).

20 Ejemplo 13: Evaluación de dos ciclodextranos (SBE- β -CD y α -cidodextrina) como excipientes para la formulación liofilizada para AMG 330.

25 Este experimento se realizó para determinar una formulación liofilizada en plataforma que se puede desarrollar para moléculas BiTE[®]. Se usó AMG 330 BiTE[®] como una proteína modelo. Se evaluaron dos ciclodextrinas (SBE- β -CD y α -cidodextrano) como excipientes de formulación.

Materiales y métodos:

30 La concentración de principio activo AMG 330 es 0,4 mg/ml. Se intercambié de tampón AMG 330 en tampones respectivos (listados en la Tabla 17) usando Centriprep de Millipore (30K NMWL, 15 ml):

ES 2 959 257 T3

1. Se dividieron alícuotas de 30 ml de AMG 330 DS en dos recipientes de muestra Centriprep (2 x 15 ml) por formulación
- 5 2. Se añadieron 4,4 ml de tampón de formulación correspondiente a cada colector de filtrado Centriprep (para prevenir el exceso de concentración de DS)
- 10 3. Se centrifugó (Allegra 6R Centrifuge, Beckman Coulter, Brea, CA, EE. UU.) a 1500 x g durante 20 min a 25 °C (se centrifugó hasta el equilibrio); ~ 5 ml de proteína restante en cada recipiente de muestra, 3 veces concentración hasta 1,2 mg/ml de objetivo
4. Se decantó el filtrado en cada colector de filtrado y se sustituyó con 4,4 ml de tampón de formulación nueva; se añadieron 10 ml de tampón de formulación nueva a cada recipiente de muestra
- 15 5. Se centrifugó por la etapa 3
6. Se repitieron las etapas 4-5 cuatro más veces (cinco intercambios de tampón totales; dilución total de ~243 veces)
- 20 7. Se almacenó en material cambiado de tampón durante la noche a 4 °C

Tabla 17: Componentes de formulación para liofilización:

ID de muestra	Concentración de formulación (mg/mL)	Tampón	Excipiente	Tensioactivo	pH
C60SuT	0,85	Citrato 20 nM	4 % (p/v) de sacarosa	0,01 % (p/v) de polisorbato 80	6
C60GSuT	0,85	Citrato 20 nM	2 % (p/v) de glicina, 1 % (p/v) de sacarosa	0,01 % (p/v) de polisorbato 80	6
C60MSuT	0,85	Citrato 20 nM	4 % de manitol, 2 % (p/v) de sacarosa	0,01 % (p/v) de polisorbato 80	6
C60RSuT	0,85	Citrato 20 nM	Arginina 75 mM, 4 % (p/v) de sacarosa	0,01 % (p/v) de polisorbato 80	6
C60CpT	0,85	Citrato 20 nM	0,5 % (p/v) de SBE- β -CD	0,01 % (p/v) de polisorbato 80	6
C60CpSuT	0,85	Citrato 20 nM	0,5 % (p/v) de SBE- β -CD, 4 % (p/v) de sacarosa	0,01 % (p/v) de polisorbato 80	6
C60CpGSuT	0,85	Citrato 20 nM	0,5 % (p/v) de SBE- β -CD, 2 % (p/v) de glicina, 1 % (p/v) de sacarosa	0,01 % (p/v) de polisorbato 80	6
C60CpMSuT	0,85	Citrato 20 nM	0,5 % (p/v) de SBE- β -CD, 4 % (p/v) de manitol, 2 % (p/v) de sacarosa	0,01 % (p/v) de polisorbato 80	6
C60AcL	0,85	Citrato 20 nM	0,5 % (p/v) de α -ciclodextrina	0,01 % (p/v) de Lutrol F68	6
C60AcSuL	0,85	Citrato 20 nM	0,5 % (p/v) de α -ciclodextrina, 4 % (p/v) de sacarosa	0,01 % (p/v) de Lutrol F68	6
C60AcGSuL	0,85	Citrato 20 nM	0,5 % (p/v) de α -ciclodextrina, 2 % (p/v) de glicina, 1 % (p/v) de sacarosa	0,01 % (p/v) de Lutrol F68	6
C60AcMSuL	0,85	Citrato 20 nM	0,5 % (p/v) de α -ciclodextrina, 4 % (p/v) de manitol, 2 % (p/v) de sacarosa	0,01 % (p/v) de Lutrol F68	6

Se añadieron las disoluciones madre de formulación tampón y tensioactivo para producir el material formulado final. Las muestras se llenaron a un volumen de 2 ml en viales de vidrio de 5 cm³ (Schott Tipo 1A) con un total de 4 viales por formulación. Todas las muestras se filtraron en una cama estéril usando unidades de filtración Sterivex (0,22 µm) antes del llenado. Después de llenar los viales, se taparon sin apretar con tapones de goma para la liofilización (Figura 17A).

Se liofilizaron tres viales por formulación usando un ciclo de liofilización conservativa modificada (temperatura de hibridación -17 °C, tiempo de ciclo total 66 h). El vial restante por formulación se reservó para análisis a t=0 (pre-liofilización). Antes de la reconstitución, las tortas liofilizadas se inspeccionaron visualmente para la integridad y elegancia estructural. Las muestras liofilizadas se reconstituyeron con 1,96 ml de agua Milli-Q y se removieron suavemente hasta que se disolvieron completamente para el análisis adicional. Las muestras de pre-liofilización y pos-constitución se analizaron por SEC analítica y obtención de imágenes de microflujo (MFI).

Los resultados de SEC revelaron que las formulaciones que contienen SBE-β-CD generaron menores niveles de especies de HMW pre- y pos-liofilización en comparación con las formulaciones con α-ciclodextrano o en absoluto sin ciclodextrano. Otros excipientes de formulación (sacarosa, glicina, manitol) no parecieron afectar los niveles de especies de HMW significativamente (Figuras 17B, C).

La IFM reveló un aumento moderado en las partículas subvisibles (mayoría en el intervalo de 1-2 µm) para la mayoría de las formulaciones después de la liofilización. Se observó un espectacular aumento para una de las formulaciones de α-ciclodextrano, C60AcL. Dos formulaciones que contenían SBE-β-CD (Captisol), C60CpT y C60CpMSuT, contuvieron el menor número de partículas subvisibles después de la liofilización (Figura 17D).

Ejemplo 14: Estudio de formulación a pequeña escala de Fap alfa BiTE[®] que incluye SBE-β-CD y α-ciclodextrano (UFC, LLPS y F/T).

El fin de este experimento es evaluar la estabilidad de Fap alfa BiTE[®] después de diversos estreses en diversas formulaciones. Específicamente, se evaluó FAP alfa BiTE[®] (SEQ ID NO: 177) después de LLPS, 20 ciclos de congelación/descongelación (F/T) y concentración por ultrafiltración/centrifugación (UFC). Los resultados de los estudios previos con formulaciones similares han mostrado que SBE-β-CD tiene un efecto positivo sobre la estabilidad de AMG 330 BiTE[®] y en este estudio, se investigó el efecto de SBE-β-CD sobre FAP BiTE[®].

Materiales y métodos:

Se prepararon 30 ml de tampón para cada formulación probada.

Tabla 18: Composición y preparación de muestras. El control (FRM1) se formula en fosfato de potasio 10 mM, arginina 161 mM pH 7,6 + 4 % de trehalosa a 2,65 mg/ml.

			1 %	1 %	40 %	10 %	15 %	55 %	18 %
Volumen en ml		Citrato 20 mM	PS-80	F-68	SBE-β-CD	α-CD	Glicina	Sacarosa	Manitol
ID de muestra	Composición de muestras								
FRM1	Control	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
FRM2	Control, 0,01 % de PS-80	29.7	0.3						
FRM3	0,5 % de SBE-β-CD, 0,01 % de PS-80	29.325	0.3		0.375				
FRM4	0,5 % de SBE-β-CD, 2 % de glicina, 1 % de sacarosa, 0,01 % PS-80	24.78	0.3		0.375		4	0.545	
FRM5	0,5 % de SBE-β-CD, 4 % de manitol, 2 % de sacarosa, 0,01 % de PS-80	21.565	0.3		0.375			1.09	6.67

FRM6	0,5 % de α -CD, 0,1 % de F-68	25.5	3	1.5			
FRM7	0,5 % de α -CD, 2 % de glicina, 1 % de sacarosa, 0,1 % de F-68	20.955	3	1.5	4	0.545	
FRM8	0,5 % de α -CD, 4 % de manitol, 2 % de sacarosa, 0,1 % de F-68	17.74	3	1.5		1.09	6.67

Para cada muestra, se dispusieron 375 μ l de 2,65 mg/ml de FAP alfa BiTE[®] (formulado en fosfato de potasio 10 mM, arginina 161 mM a pH 7,6 + 4 % de trehalosa) en un tubo de filtración centrífuga Amicon Ultra de 4 ml de MWCO 10.000. Se añadieron 3,5 ml de tampón apropiado a cada tubo y se mezclaron suavemente con la proteína, y los tubos se centrifugaron (Allegra 6R Centrifuge, Beckman Coulter, Brea, CA, EE. UU.) a 4000 rcf a 25 °C hasta que el volumen de concentrado fuera ~50 μ l. La adición de tampón y las etapas de centrifugación se repitieron dos veces más para un total de 3 etapas de concentración. El concentrado se mezcló entonces suavemente con un pipeteador, se sacó del tubo de filtración, se dispuso en un tubo Eppendorf tubo y se microcentrifugó (Eppendorf Centrifuge 5418, St.Louis, MO, EE. UU.) a velocidad máxima durante 2 min. El sobrenadante se analizó entonces por SEC. Cada muestra se preparó por duplicado. También se analizó FAP alfa BiTE[®] no concentrado (2,65 mg/ml) para fines de comparación.

La presencia de SBE- β -CD pareció aumentar el pico principal relativo de SEC suprimiendo la formación de especies de HMW durante la concentración de proteína. La presencia de α -ciclodextrano produjo recuperación de proteína muy baja y altos niveles relativos de especies de HMW.

Resultados de LLPS de Fap alfa: Resultados de LLPS con Fap α BiTE[®] y SBE- β -CD son comparables a los resultados de LLPS con AMG 330. El α -ciclodextrano no mostró ningún efecto positivo ni negativo sobre la estabilidad coloidal de esta molécula (Figura 18).

Ejemplo 15: Estudio de formulación para la construcción de anticuerpo CD33-scFc BiTE

Se purificó la construcción de anticuerpo CD33-scFc BiTE usando proteína A y cromatografía de intercambio catiónico (CEX). El eluato de CEX se dializó en un tampón ácido L-glutámico 10 mM a pH 4,2 usando casetes de diálisis que contenían membranas con un corte de peso molecular (MWCO) de 10 kDa. La diálisis se realizó a 2-8 °C. La concentración del material de conjunto dializado ascendió a 2,3 mg/ml. El material se concentró adicionalmente por ultrafiltración-centrifugación (UFC) usando tubos de concentrador que contienen membranas con MWCO de 10 kDa. El material concentrado se filtró a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,22 μ m. La concentración pos-filtración ascendió a 2,7 mg/ml. El material se formuló completamente en las formulaciones enumeradas en la Tabla 19 añadiendo disolución madre concentrada. La concentración final de proteína asciende a 1,0 mg/ml.

Tabla 19: Visión general de formulaciones probadas; HPBCD: hidroxipropil-beta-ciclodextrina; PS 80: polisorbato 80.

Designación	Ácido L-glutámico [mM]	Manitol [% (p/v)]	Sacarosa [% (p/v)]	Trehalosa dihidrato [% (p/v)]	HPBCD [% (p/v)]	PS 80 [% (p/v)]
G42MSuT	10	4.0	2.0	0.0	0.0	0.01
G42MTrT	10	4.0	0.0	2.0	0.0	0.01
G42SuT	10	0.0	8.0	0.0	0.0	0.01
G42TrT	10	0.0	0.0	8.0	0.0	0.01
G42HP12SuT	10	0.0	4.0	0.0	12.0	0.01
G42HP12TrT	10	0.0	0.0	4.0	12.0	0.01
G42HP6MT	10	4.0	0.0	0.0	6.0	0.01
G42HP6SuT	10	0.0	6.0	0.0	6.0	0.01
G42HP6TrT	10	0.0	0.0	6.0	6.0	0.01

Se llenaron las formulaciones a 1,0 ml en viales de vidrio de tipo I 2R que se cerraron con tapones de caucho butílico y cápsulas de cierre extraíble de aluminio. Los viales se almacenaron a -20 y -70 °C. Se sacaron muestras en momentos de tiempo designados. Después del muestreo, los viales se descongelaron a temperatura ambiente y se

analizaron por cromatografía de resolución ultra alta de exclusión por tamaño (SE-UPLC) para cuantificar el porcentaje de contenido de especies de alto peso molecular. Se realizó SE-UPLC en un sistema Acquity H-Class UPLC (Waters) usando una columna Acquity UPLC BEH200 SEC 150 mm (Waters). La temperatura de la columna se estableció a 25 °C. La separación de variantes de tamaño se logró aplicando un método isocrático con un caudal de 0,4 ml/min. La fase móvil estuvo compuesta de fosfato de sodio 100 mM, NaCl 250 mM pH 6,8. El tiempo de ejecución asciende a 6,0 minutos. Las muestras se mantuvieron a 8 °C dentro del inyector automático hasta el análisis. Se inyectó una cantidad total de 3 µg de proteína. Para evitar el arrastre, después de cada muestra se realizó una inyección intermedia con 40 % de ACN. La detección se basó en fluorescencia (excitación a 280 nm, emisión a 325 nm). La integración de picos se realizó usando el software Empower®. Se informó el área bajo la curva relativa de HMWS (**Figura 18**).

El almacenamiento de la construcción de anticuerpo CD33-scFc BiTE formulada a -70 °C o por debajo inhibió la formación de HMWS. Sin embargo, HMWS aumentó significativamente durante el almacenamiento a -20 °C para las formulaciones que no contuvieron HPBCD. A diferencia, se previno que la proteína formara HMWS a -20 °C en presencia de HPBCD independientemente de su concentración (6 o 12 %). La presencia de manitol afectó perjudicialmente la estabilidad a -20 °C indicada por un aumento en HMWS.

Ejemplo 16: Estudio de formulación para construcciones de anticuerpo FLT3-scFc BiTE

Se purificaron dos construcciones de anticuerpo FLT3-scFc BiTE (FL1-scFc y FL2-scFc) diferentes usando cromatografía en proteína A y CEX. Después de CEX, todas las construcciones se diafiltraron en un tampón compuesto de ácido L- glutámico 10 mM, 4 % (p/v) de sacarosa a pH 4,2. El MWCO de la membrana usada fue 10 kDa. El conjunto diafiltrado (concentración de proteína de 1,7 mg/ml) se concentró por ultrafiltración (MWCO de 10 kDa) hasta que se logró una concentración de 7,6 mg/ml. El material se filtró entonces a través de un filtro de 0,2 µm y se formuló completamente mediante la adición de disoluciones madre de excipiente. Una visión general de las formulaciones se proporciona por la **Tabla 20**.

Tabla 20: Visión general de las formulaciones probadas; el pH se ajustó a 4,2 para todas las formulaciones; HPBCD: hidroxipropil-beta-ciclodextrina; PS 80: polisorbato 80.

Designación	Proteína [mg/ml]	Ácido L-glutámico [mM]	Sacarosa [% (p/v)]	HPBCD [% (p/v)]	PS 80 [% (p/v)]
G42SuT	5.0	10	9.0	0.0	0.01
G42HP12SuT	5.0	10	4.0	12.0	0.01

Ambas formulaciones se llenaron hasta 1,3 ml en viales de vidrio de tipo I 2R que se cerraron con tapones de caucho butílico y cápsulas de cierre extraíble de aluminio. Los viales se almacenaron a -20 °C. Se sacaron muestras en momentos de tiempo designados. Después del muestreo, los viales se descongelaron a temperatura ambiente y se analizaron por cromatografía de resolución ultra alta de exclusión por tamaño (SE-UPLC) para cuantificar el porcentaje de contenido de especies de alto peso molecular. Se realizó SE-UPLC en un sistema Acquity H-Class UPLC (Waters) usando una columna Acquity UPLC BEH200 SEC 150 mm (Waters). La temperatura de la columna se estableció a 25 °C. La separación de variantes de tamaño se logró aplicando un método isocrático con un caudal de 0,4 ml/min. La fase móvil estuvo compuesta de fosfato de sodio 100 mM, NaCl 250 mM pH 6,8. El tiempo de ejecución asciende a 6,0 minutos. Las muestras se mantuvieron a 8 °C dentro del inyector automático hasta el análisis. Se inyectó una cantidad total de 3 µg de proteína. Para evitar el arrastre, después de cada muestra se realizó una inyección intermedia con 40 % de ACN. La detección se basó en fluorescencia (excitación a 280 nm, emisión a 325 nm). La integración de picos se realizó usando el software Empower®. Se informó el área bajo la curva relativa de HMWS (**Figura 19**).

Ejemplo 17: Estudio de formulación para construcciones de anticuerpo BCMA-scFc BiTE

Se purificaron dos construcciones de anticuerpo BCMA-scFc BiTE (BC1-scFc y BC2-scFc), se formularon, se almacenaron y se analizaron como se describe en el **Ejemplo 16**. Una visión general de formulaciones se proporciona por la **Tabla 21**.

Tabla 21: Visión general de las formulaciones probadas; el pH se ajustó a 4,2 para todas las formulaciones; HPBCD: hidroxipropil-beta-ciclodextrina; PS 80: polisorbato 80.

Designación	Proteína [mg/ml]	Ácido L-glutámico [mM]	Sacarosa [% (p/v)]	HPBCD [% (p/v)]	PS 80 [% (p/v)]
G42SuT	5.0	10	9.0	0.0	0.01
G42HP12SuT	5.0	10	6.0	6.0	0.01

La **Figura 20** muestra el porcentaje de contenido de HMWS en función de la formulación para ambas construcciones de anticuerpo. El porcentaje de contenido de HMWS aumentó en 1,6 % (BC1-scFc) y 1,9 % (BC-scFc), respectivamente, en formulaciones sin HPBCD después de cuatro semanas. A diferencia, la formación de HMWS se inhibió en formulaciones que contenían 6 % de HPBCD.

5

ES 2 959 257 T3

SEQ ID NO:	Descripción		SECUENCIA
1.	CD3_1	VL CDR1	GSSTGAVTSGYYPN
2.	CD3_1	VL CDR2	GTKFLAP
3.	CD3_1	VL CDR3	ALWYSNRWV
4.	CD3_1	VH CDR1	IYAMN
5.	CD3_1	VH CDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKS
6.	CD3_1	VH CDR3	HGNFGNSYVSFFAY
7.	CD3_1	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNIYAMNWVRQAPGKLEWVARIIRSKYNNYATYYADSVKSRFTISRDDS KNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSFFAYWGQGLTVTVSS
8.	CD3_1	VL	QTVVTQEPSTLTVSPGGTTLTLCGSSTGAVTSGYYPNWWQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTL SGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGKTLTVL
9.	CD3_1	scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNIYAMNWVRQAPGKLEWVARIIRSKYNNYATYYADSVKSRFTISRDDS KNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSFFAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGQTVVTQEPSTLTVSP GGTTLTLCGSSTGAVTSGYYPNWWQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTL SGVQPEDEAEYYCA LWYSNRWVFGGKTLTVL
10.	CD3_2	VL CDR1	GSSTGAVTSGYYPN
11.	CD3_2	VL CDR2	GTKFLAP
12.	CD3_2	VL CDR3	ALWYSNRWV
13.	CD3_2	VH CDR1	KYAMN
14.	CD3_2	VH CDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKD
15.	CD3_2	VH CDR3	HGNFGNSYISYWAY
16.	CD3_2	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARIIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSS
17.	CD3_2	VL	QTVVTQEPSTLTVSPGGTTLTLCGSSTGAVTSGYYPNWWQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTL SGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGKTLTVL
18.	CD3_2	scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARIIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGQTVVTQEPSTLTVSP GGTTLTLCGSSTGAVTSGYYPNWWQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTL SGVQPEDEAEYYCA LWYSNRWVFGGKTLTVL
19.	CD3_3	VL CDR1	GSSTGAVTSGYYPN
20.	CD3_3	VL CDR2	GTKFLAP
21.	CD3_3	VL CDR3	ALWYSNRWV

ES 2 959 257 T3

22.	CD3_3	VH CDR1	SYAMN
23.	CD3_3	VH CDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKG
24.	CD3_3	VH CDR3	HGNFGNSYLSFWAY
25.	CD3_3	VH	EVQLVESGGGLEQPGGSLKLSCAASGFTFNSYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDS KNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYLSFWAYWGQGLVTVSS
26.	CD3_3	VL	QTVVTQEPSTLVSPGGTTLTCGSSTGAVTSGYYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTL SGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGKTLTVL
27.	CD3_3	scFv	EVQLVESGGGLEQPGGSLKLSCAASGFTFNSYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDS KNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYLSFWAYWGQGLVTVSSGGGSGGGSGGGGSGTQVVTQEPSTLVSP GGTTLTCGSSTGAVTSGYYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTL SGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGKTLTVL
28.	CD3_4	VL CDR1	GSSTGAVTSGYYPN
29.	CD3_4	VL CDR2	GTKFLAP
30.	CD3_4	VL CDR3	ALWYSNRWV
31.	CD3_4	VH CDR1	RYAMN
32.	CD3_4	VH CDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKG
33.	CD3_4	VH CDR3	HGNFGNSYLSYFAY
34.	CD3_4	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNRYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDS KNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYLSYFAYWGQGLVTVSS
35.	CD3_4	VL	QTVVTQEPSTLVSPGGTTLTCGSSTGAVTSGYYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTL SGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGKTLTVL
36.	CD3_4	scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNRYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDS KNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYLSYFAYWGQGLVTVSSGGGSGGGSGGGGSGTQVVTQEPSTLVSP GGTTLTCGSSTGAVTSGYYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTL SGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGKTLTVL
37.	CD3_5	VL CDR1	RSSTGAVTSGYYPN
38.	CD3_5	VL CDR2	ATDMRPS
39.	CD3_5	VL CDR3	ALWYSNRWV
40.	CD3_5	VH CDR1	VYAMN
41.	CD3_5	VH CDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKK
42.	CD3_5	VH CDR3	HGNFGNSYLSWWAY

ES 2 959 257 T3

43.	CD3_5	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNVYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKRRFTISRDDS KNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYLSWWAYWGQGLVTVSS
44.	CD3_5	VL	QTVVTQEPPLTVSPGGTTLTCRSSTCAVTSGYYPNWVQKPGQAPRGLIGATDMRPSGTPARFSGSLGGKAALTL SGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGKTLTVL
45.	CD3_5	scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNVYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKRRFTISRDDS KNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYLSWWAYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQTVVTQEPPLTVSP GGTTLTCRSSTCAVTSGYYPNWVQKPGQAPRGLIGATDMRPSGTPARFSGSLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCA LWYSNRWVFGGKTLTVL
46.	CD3_6	VL CDR1	GSSTGAVTSGYYPN
47.	CD3_6	VL CDR2	GTKFLAP
48.	CD3_6	VL CDR3	ALWYSNRWV
49.	CD3_6	VH CDR1	KYAMN
50.	CD3_6	VH CDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKS
51.	CD3_6	VH CDR3	HGNFGNSYTSYYAY
52.	CD3_6	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKSRFTISRDDS KNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYTSYYAYWGQGLVTVSS
53.	CD3_6	VL	QTVVTQEPPLTVSPGGTTLTCGSSTCAVTSGYYPNWVQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTL SGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGKTLTVL
54.	CD3_6	scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKSRFTISRDDS KNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYTSYYAYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQTVVTQEPPLTVSP GGTTLTCGSSTCAVTSGYYPNWVQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCA LWYSNRWVFGGKTLTVL
55.	CD3_7	VL CDR1	RSSTGAVTSGYYPN
56.	CD3_7	VL CDR2	ATDMRPS
57.	CD3_7	VL CDR3	ALWYSNRWV
58.	CD3_7	VH CDR1	GYAMN
59.	CD3_7	VH CDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKE
60.	CD3_7	VH CDR3	HRNFGNSYLSWFAY
61.	CD3_7	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNGYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKERFTISRDDS KNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHRNFGNSYLSWFAYWGQGLVTVSS

ES 2 959 257 T3

62.	CD3_7	VL	QTVVVTQEPESLTVSPGGTIVTLTCRSSTGAVTSGYYPNWWVQKPGQAPRGLIGATDMRPSGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGGTKLTVL
63.	CD3_7	scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNGYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKERFTISRDDS KNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHRNFGNSYLSWFAYWGQGTIVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQTVVVTQEPESLTVSP GGTIVTLTCRSSTGAVTSGYYPNWWVQKPGQAPRGLIGATDMRPSGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCA LWYSNRWVFGGGTKLTVL
64.	CD3_8	VL CDR1	GSSTGAVTSGYYPN
65.	CD3_8	VL CDR2	GTKFLAP
66.	CD3_8	VL CDR3	ALWYSNRWV
67.	CD3_8	VH CDR1	VYAMN
68.	CD3_8	VH CDR2	RIRSKYNNYATYYADSVK
69.	CD3_8	VH CDR3	HGNFGNSYISWWAY
70.	CD3_8	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNVYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKRRFTISRDDS KNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISWWAYWGQGTIVTVSS QTVVVTQEPESLTVSPGGTIVTLTCGSSTGAVTSGYYPNWWVQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALT
71.	CD3_8	VL	QTVVVTQEPESLTVSPGGTIVTLTCGSSTGAVTSGYYPNWWVQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGS SGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGGTKLTVL
72.	CD3_8	scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNVYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKRRFTISRDDS KNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISWWAYWGQGTIVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQTVVVTQEPESLTVSP GGTIVTLTCGSSTGAVTSGYYPNWWVQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCA LWYSNRWVFGGGTKLTVL
73.	CD3_9	VL CDR1	GSSTGAVTSGNYPN
74.	CD3_9	VL CDR2	GTKFLAP
75.	CD3_9	VL CDR3	VLWYSNRWV
76.	CD3_9	VH CDR1	SYAMN
77.	CD3_9	VH CDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKG
78.	CD3_9	VH CDR3	HGNFGNSYVSWWAY
79.	CD3_9	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNSYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKRRFTISRDDS KNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQGTIVTVSS

ES 2 959 257 T3

80.	CD3_9	VL	QTVVTQEPPLTVSPGGTTLTTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALT SGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGTKLTVL
81.	CD3_9	scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNSYAMNWRQAPGKLEWVARI RSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDS KNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWAYWGQGLVTVVSSGGGSGGGGSGGGGQTVVTQEPPLTVSP GGTTLTTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCV LWYSNRWVFGGTKLTVL
82.	CD3_10	VL CDR1	GSSTGAVTSGNYPN
83.	CD3_10	VL CDR2	GTKFLAP
84.	CD3_10	VL CDR3	VLWYSNRWV
85.	CD3_10	VH CDR1	KYAMN
86.	CD3_10	VH CDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKD
87.	CD3_10	VH CDR3	HGNFGNSYISYWAY
88.	CD3_10	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKLEWVARI RSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLVTVVSS
89.	CD3_10	VL	QTVVTQEPPLTVSPGGTTLTTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALT SGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGTKLTVL
90.	CD3_10	scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKLEWVARI RSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLVTVVSSGGGSGGGGSGGGGQTVVTQEPPLTVSP GGTTLTTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCV LWYSNRWVFGGTKLTVL
91.	CD33_1	VH CDR1	NYGMN
92.	CD33_1	VH CDR2	WINTYTGEPTYADKFQG
93.	CD33_1	VH CDR3	WSWSDGYVYVFDY
94.	CD33_1	VL CDR1	KSSQSVLDSSTNKNSLA
95.	CD33_1	VL CDR2	WASTRES
96.	CD33_1	VL CDR3	QQSAHFPIIT
97.	CD33_1	VH	QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSKASGYTFTNIGMNVWRQAPGKLEWVARI RSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDS TAYMEIRNLGGDDTAVYYCARWSWSDGYVYVFDYWGQGLVTVVSS
98.	CD33_1	VL	DIVMTQSPDLSLTSLGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNSLAWYQKPGQPPKLLLSWASTRESGIPDRFSGSGSTDF TLTIDSPQPEDSATYYCQQSAHFPIITFGQCTRLK

ES 2 959 257 T3

99.	CD33_1	scFv	QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSKASGYTFTNYGMNWKQAPGQGLEWMGWINTYTGEPYADKFQGRVTMTTDTSTSTAYMEIRNLGGDDTAVYYCARWSWSDGYVYVFDYWGQGTSVTVSSGGGGSGGGGGGGGGSDIVMTQSPDSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNLSLAWYQQKPGQPPKLLLSWASTRESGIPDRFSGSGSGTDFTLTIDSPQPEDSATYYCQSSAHFPITFGQGRLEIK
100.	CD33_1	bispecific molecule	QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSKASGYTFTNYGMNWKQAPGQGLEWMGWINTYTGEPYADKFQGRVTMTTDTSTSTAYMEIRNLGGDDTAVYYCARWSWSDGYVYVFDYWGQGTSVTVSSGGGGSGGGGGGGGGSDIVMTQSPDSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNLSLAWYQQKPGQPPKLLLSWASTRESGIPDRFSGSGSGTDFTLTIDSPQPEDSATYYCQSSAHFPITFGQGRLEIKSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTSLVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGQTVVTVQEPVSLTVSPGGTTLTLCGSSSTGAVTSGNYPNWKQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLISGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
101.	CD33_2	VH CDR1	NYGMN
102.	CD33_2	VH CDR2	WINTYTGEPYADKFQG
103.	CD33_2	VH CDR3	WSWSDGYVYVFDY
104.	CD33_2	VL CDR1	KSSQSVLDSSTNKNLSLA
105.	CD33_2	VL CDR2	WASTRES
106.	CD33_2	VL CDR3	QSSAHFPIT
107.	CD33_2	VH	QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSKASGYTFTNYGMNWKQAPGQGLEWMGWINTYTGEPYADKFQGRVTMTTDTSTSTAYMEIRNLGGDDTAVYYCARWSWSDGYVYVFDYWGQGTSVTVSS
108.	CD33_2	VL	DIVMTQSPDSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNLSLAWYQQKPGQPPKLLLSWASTRESGIPDRFSGSGSGTDFTLTIDSPQPEDSATYYCQSSAHFPITFGQGRLEIK
109.	CD33_2	scFv	QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSKASGYTFTNYGMNWKQAPGQGLEWMGWINTYTGEPYADKFQGRVTMTTDTSTSTAYMEIRNLGGDDTAVYYCARWSWSDGYVYVFDYWGQGTSVTVSSGGGGSGGGGGGGGGSDIVMTQSPDSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNLSLAWYQQKPGQPPKLLLSWASTRESGIPDRFSGSGSGTDFTLTIDSPQPEDSATYYCQSSAHFPITFGQGRLEIK
110.	CD33_2	bispecific molecule	QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSKASGYTFTNYGMNWKQAPGQGLEWMGWINTYTGEPYADKFQGRVTMTTDTSTSTAYMEIRNLGGDDTAVYYCARWSWSDGYVYVFDYWGQGTSVTVSSGGGGSGGGGGGGGGSDIVMTQSPDSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNLSLAWYQQKPGQPPKLLLSWASTRESGIPDRFSGSGSGTDFTLTIDSPQPEDSATYYCQSSAHFPITFGQGRLEIKSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTSLVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGQTVVTVQEPVSLTVSPGGTTLTLCGSSSTGAVTSGNYPNWKQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLISGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
111.	CD33_3	VH CDR1	NYGMN
112.	CD33_3	VH CDR2	WINTYTGEPYADDFKG
113.	CD33_3	VH CDR3	WSWSDGYVYVFDY
114.	CD33_3	VL CDR1	KSSQSVLDSSTNKNLSLA
115.	CD33_3	VL CDR2	WASTRES
116.	CD33_3	VL CDR3	QSSAHFPIT

ES 2 959 257 T3

117.	CD33_3	VH	--- QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSKASGYTFFTNYGMNWRQAPQGQGLEWMGWINTYTGEPTYADDFKGRVT SSDTSTSTAYLEINSLRSDDTAIYYCARWSWSDGYVYFDYWGQGTITVTVSS
118.	CD33_3	VL	DIVMTQSPDSTVSLGERTTINCKSSQSVLDSSKNKNSLAWYQQKPGQPPKLLLSWASTRESGIPDRFSG SGSGTDFTLTIDSLQPEDSATYYCQSAHFPITFGQGTTRLEIK
119.	CD33_3	scFv	QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSKASGYTFFTNYGMNWRQAPQGQGLEWMGWINTYTGEPTYADDFKGRVTM SSDTSTSTAYLEINSLRSDDTAIYYCARWSWSDGYVYFDYWGQGTITVTVSSGGGGSGGGGGGGSDIV MTQSPDSTVSLGERTTINCKSSQSVLDSSKNKNSLAWYQQKPGQPPKLLLSWASTRESGIPDRFSGSGS GTDFTLTIDSLQPEDSATYYCQSAHFPITFGQGTTRLEIK
120.	CD33_4	VH CDR1	NYGMN
121.	CD33_4	VH CDR2	WINTYTGEPTYADDFKG
122.	CD33_4	VH CDR3	WSWSDGYVYFDY
123.	CD33_4	VL CDR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFFTNYGMNWRQAPQGLKWMGWINTYTGEPTYADDFKGRVTM TSDTSTSTAYLELHNLRSDDTAIYYCARWSWSDGYVYFDYWGQGTITVTVSS
124.	CD33_4	VL CDR2	KSSQSVLDSSKNKNSLA
125.	CD33_4	VL CDR3	WASTRES
126.	CD33_4	VH	QSAHFPIT
127.	CD33_4	VL	DIVMTQSPDSTVSLGERTTINCKSSQSVLDSSKNKNSLAWYQQKPGQPPKLLLSWASTRESGIPDRFSG SGSGTDFTLTIDSLQPEDSATYYCQSAHFPITFGQGTTRLEIK
128.	CD33_4	scFv	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFFTNYGMNWRQAPQGLKWMGWINTYTGEPTYADDFKGRVTM TSDTSTSTAYLELHNLRSDDTAIYYCARWSWSDGYVYFDYWGQGTITVTVSSGGGGSGGGGGGGSDIV MTQSPDSTVSLGERTTINCKSSQSVLDSSKNKNSLAWYQQKPGQPPKLLLSWASTRESGIPDRFSGSGS GTDFTLTIDSLQPEDSATYYCQSAHFPITFGQGTTRLEIK
129.	CD33_5	VH CDR1	NYGMN
130.	CD33_5	VH CDR2	WINTYTGEPTYADDFKG
131.	CD33_5	VH CDR3	WSWSDGYVYFDY
132.	CD33_5	VL CDR1	KSSQSVLDSSKNKNSLA
133.	CD33_5	VL CDR2	WASTRES
134.	CD33_5	VL CDR3	QSAHFPIT
135.	CD33_5	VH	QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSKASGYTFFTNYGMNWRQAPQGLKWMGWINTYTGEPTYADDFKGRVTM

ES 2 959 257 T3

			TTDTSTSTAYMEIRNLRNDDTAVYYCARWSWSGDYVYVFDYWGQGTTVTVSS
136.	CD33_5	VL	DIVMTQSPDSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSKKNKNSLAWYQQKPGQPPKLLLSWASTRESGIPDRFS SGSGTDFTLTIDSLQPEDSATYYCQQAHPFITFGQGRLEIK
137.	CD33_5	scFv	QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSKASGYFTFTNYGMNWKQAPGQGLKWMGWINTYTGEPTYADDFKGRVTM TTDTSTSTAYMEIRNLRNDDTAVYYCARWSWSGDYVYVFDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGSDIV MTQSPDSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSKKNKNSLAWYQQKPGQPPKLLLSWASTRESGIPDRFSGSGS GTDFTLTIDSLQPEDSATYYCQQAHPFITFGQGRLEIK
138.	CD33_6	VH CDR1	NYGMN
139.	CD33_6	VH CDR2	WINTYTGEPTYADDFKG
140.	CD33_6	VH CDR3	WSWSGDYVYVFDY
141.	CD33_6	VL CDR1	KSSQSVLDSKKNKNSLA
142.	CD33_6	VL CDR2	WASTRES
143.	CD33_6	VL CDR3	QQAHPFIT
144.	CD33_6	VH	QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSKASGYFTFTNYGMNWKQAPGQGLKWMGWINTYTGEPTYADDFKGRVTM TSDTSTSTAYMEIRNLRNDDTAVYYCARWSWSGDYVYVFDYWGQGTTVTVSS
145.	CD33_6	VL	DIVMTQSPDSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSKKNKNSLAWYQQKPGQPPKLLLSWASTRESGIPDRFSG SGSGTDFTLTIDSLQPEDSATYYCQQAHPFITFGQGRLEIK
146.	CD33_6	scFv	QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSKASGYFTFTNYGMNWKQAPGQGLKWMGWINTYTGEPTYADDFKGRVTM TSDTSTSTAYMEIRNLRNDDTAVYYCARWSWSGDYVYVFDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGSDIV MTQSPDSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSKKNKNSLAWYQQKPGQPPKLLLSWASTRESGIPDRFSGSGS GTDFTLTIDSLQPEDSATYYCQQAHPFITFGQGRLEIK
147.	CD33_7	VH CDR1	NYGMN
148.	CD33_7	VH CDR2	WINTYTGETNYADKFQG
149.	CD33_7	VH CDR3	WSWSGDYVYVFDY
150.	CD33_7	VL CDR1	KSSQSVLDSSTNKNSLA
151.	CD33_7	VL CDR2	WASTRE
152.	CD33_7	VL CDR3	QQAHPFIT
153.	CD33_7	VH	QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSKASGYFTFTNYGMNWKQAPGQGLKWMGWINTYTGETNYADKFQGRVTF TSDTSTSTAYMELRNLRNDDTAVYYCARWSWSGDYVYVFDYWGQGTTVTVSS

ES 2 959 257 T3

154.	CD33_7	VL	DIVMTQSPDSMTVSLGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNNSLAWYQQKPGQPPKLLLSWASTRESGIPDRFSGSGSGTDFTLTIDSLQPEDSATYYCQQSAHFPITFGQGTRLDIK
155.	CD33_7	scFv	QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSKASGYTFNYGMNWKQAPGQGLEWMGWINTYTGENTYADKFQGRVTF TSDTSTSTAYMELRNKSDDTAVYYCARWSWSDGYVYFDYWGQGTITVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIV MTQSPDSMTVSLGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNNSLAWYQQKPGQPPKLLLSWASTRESGIPDRFSGSGS GTDFTLTIDSLQPEDSATYYCQQSAHFPITFGQGTRLDIK
156.	CD33_8	VH CDR1	NYGMN
157.	CD33_8	VH CDR2	WINTYTGENTYADKFQG
158.	CD33_8	VH CDR3	WSWSDGYVYFDY
159.	CD33_8	VL CDR1	KSSQSVLDSSTNKNNSLA
160.	CD33_8	VL CDR2	WASTRES
161.	CD33_8	VL CDR3	QQSAHFPIT
162.	CD33_8	VH	QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSKASGYTFNYGMNWKQAPGQGLEWMGWINTYTGENTYADKFQGRVTF TSDTSTSTAYMELRNKSDDTAVYYCARWSWSDGYVYFDYWGQGTITVTVSS
163.	CD33_8	VL	DIVMTQSPDSLVS LGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNNSLAWYQQKPGQPPKLLLSWASTRESGIPDRFSG SGSGTDFTLTIDSLQPEDSATYYCQQSAHFPITFGQGTRLEIK
164.	CD33_8	scFv	QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSKASGYTFNYGMNWKQAPGQGLEWMGWINTYTGENTYADKFQGRVTF TSDTSTSTAYMELRNKSDDTAVYYCARWSWSDGYVYFDYWGQGTITVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIV MTQSPDSLVS LGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNNSLAWYQQKPGQPPKLLLSWASTRESGIPDRFSGSGS GTDFTLTIDSLQPEDSATYYCQQSAHFPITFGQGTRLEIK
165.	CD33_9	VH CDR1	NYGMN
166.	CD33_9	VH CDR2	WINTYTGEPYADKFQG
167.	CD33_9	VH CDR3	WSWSDGYVYFDY
168.	CD33_9	VL CDR1	KSSQSVLDSNNKNNSLA
169.	CD33_9	VL CDR2	WASTRES
170.	CD33_9	VL CDR3	QQSAHFPIT
171.	CD33_9	VH	QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSKASGYTFNYGMNWKQAPGQGLEWMGWINTYTGEPYADKFQGRVTM TSDTSTSTAYMEIRNLRSDDTAVYYCARWSWSDGYVYFDYWGQGTITVTVSS
172.	CD33_9	VL	DIVMTQSPDSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSNNKNNSLAWYQQKPGQPPKLLLSWASTRESGIPDRFSG SGSGTDFTLTIDSLQPEDSATYYCQQSAHFPITFGQGTRLEIK

173.	CD33_9	scFv	<p>QVQLVQSGAEVKKPGESEVKVSKCASGYTFTNYGMNWKQAPGGQLEWGMWINTYTGPEPTYADKFKQGRVTMTDTSTSTAYMEIRNLRSDDTAVYYCARWSWSGDYVYFDYWGQGTITVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPDLSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSNNKNSLAWYQQKPGQPPKLLLSWASTRESGIPDRFSGSGSGTDFTLTIIDGLQPEDSATYYCQQSAHFPITFGQGTRELEIK</p>
174.	CD19	molécula bienespecífica	<p>DIQLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGDSYLNWYQQIFGQPPKLLIYDASNLVSGLPPRFSGSGSGTDFTLNHPVEKVDAAITYHCQQSTEDPWTFGGGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGQVQLQQSGAELVLRPSSVKISCKASGYAFSSYWMNWKQRPQGLEWIGQIWPGDGDTNYNGKFKGKATLTADESSSTAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETTVGRYYAMDYWGQGTITVTVSSCCCSQDIKQQSGAELARPCASVKNSCKTSCYTPTRYTMHWVQRQPCQGLEWICLYINP SRGYTNYNQKFKDKATLTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYCYARYYDDHYCLDYWGQGTITVTVSSVEGGSGSGSGSGGGVDDIQLTQSPAIMASAPGEKVTMTCRASSSVSYMNYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPIRFSGSGSGTSLTISSEAEADAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELKHKHHHHH</p>
175.	CD33_2	molécula bienespecífica +hALB	<p>QVQLVQSGAEVKKPGESEVKVSKCASGYTFTNYGMNWKQAPGGQCLEWGMWINTYTGPEPTYADKFKQGRVTMTDTSTSTAYMEIRNLRSDDTAVYYCARWSWSGDYVYFDYWGQGTITVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPDLSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNLSLAWYQQKPGQPPKLLLSWASTRESGIPDRFSGSGSGTDFTLTIIDSPQPEDSATYYCQQSAHFPITFGQGTRELEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTITVTVSSGGGGSGGGGSGGGGQTVVTVQEPSSLTVSPGGTTLTCCSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAAALTLGSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLPGGGSDAHKSEVAHRFKDLGEEFKALVLIAPFQYLQCCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDSLHFLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOKQKDDNPNIPLRVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLEFAKRYKAAFTTECCQAADKAAACLLPKIDELRDEGRASSAKQRLKCAASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTQVHTECCFGDLLECADDRALAKYICENQDSISSKLEKCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVSRKDVCKNYAEAKDVFGLMFLYEAFAIRHPDYSVVLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAKVDFEFPKLVVEEPQNLIKQNCLEFQLEGEYKFNQALLVRYTKVPQVSTPLVEVSRNLGKVGSKCKKHPFAKRMPCAEEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDYETVYVKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQATLVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFABEGKLLVAASQAALGLDYHHHHHH</p>
176.	MS_4	molécula bienespecífica +hALB	<p>QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMTWIRQAPGKGLEWLSYISSSGSTIYADSVKGRFTISRDNAKNSLFLQMNLSRAEDTAVYICARDRNSHFDYWGQGTITVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQTQSPSSVASVGDRTVITCRASQGINTLAWYQQKPKAPKLLIYGASGLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIISLQPEDFATYYCQQAQKSPFRTEFGQGTKVEIKSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTITVTVSSGGGGSGGGGSGGGGQTVVTVQEPSSLTVSPGGTTLTCCSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAAALTLGSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLPGGGSDAIKSEVAIRFKDLGEEFKALVLIAPFQYLQCCPFEDIHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDSLHFLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOKQKDDNPNIPLRVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLEFAKRYKAAFTTECCQAADKAAACLLPKIDELRDEGRASSAKQRLKCAASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTQVHTECCFGDLLECADDRALAKYICENQDSISSKLEKCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVSRKDVCKNYAEAKDVFGLMFLYEAFAIRHPDYSVVLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAKVDFEFPKLVVEEPQNLIKQNCLEFQLEGEYKFNQALLVRYTKVPQVSTPLVEVSRNLGKVGSKCKKHPFAKRMPCAEEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDYETVYVKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQATLVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFABEGKLLVAASQAALGLDYHHHHHH</p>
177.	FAPa	molécula bienespecífica	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKCASGYTFTNYGMNWKQAPGGQLEWGMWINTYTGPEPTYADKFKQGRVTMTDTSTSTAYMEIRNLRSDDTAVYYCARWSWSGDYVYFDYWGQGTITVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPDLSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSNNKNSLAWYQQKPGQPPKLLIYDASNLVSGLPPRFSGSGSGTDFTLTIIDGLQPEDSATYYCQQSAHFPITFGQGTRELEIK</p>
178.	G4S	enlazador	GGGS

179.	F12q	scFv	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNYSAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDS KNTAYLQMNLSKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWWAYWQQGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQVVTQEP SLTVSP GGTVTLTCSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLGKKAALTLGSGVQPEDEAEY YCV LWYSNRWVFGGGLTKLTVL</p>
180.	Construcción de anticuerpo CD33-scFc BiTE CD33_2- scFc	molécula bienespecifica HLE	<p>QVQLVQSGAEVVKKPGESVKVSKASGYTFNNGMNVKQAPGQCLEMGMWINTYTGTEPTADKFKQGRVMTTDTST S TAYMEIRNLGGDDTAVYYCARWSWSDGYVYFDYWGQGTSTVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIVMTQSPDLSLTVSLGE RTTINCKSSQSVLDSSTNKNLSAWYQQKPGQPPKLLLSWASTRESGI PDRFSGSGSTDFTLTIDSQPEDSATYYC QSSAHPITFGCGTRLRLEIKSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARIR SKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDS KNTAYLQMNLSKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWQQGTLVTVSSGGGG SGGGSGGGGSQVVTQEP SLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSG SLGKKAALTLGSGVQPEDEAEYCVLWYSNRWVFCCTKLTVLGCGGDKTHTCPDPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP LPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGTFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSYR CVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGTFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK</p>
181.	FL1	scFv	<p>QVTLKESGPTLVKPTETLTLTCTLSGFSLNNARMGVSWIRQPPGKCLEWLAHIFSNDEKSYSTSLKNRLTISKDSSK TQVVLMTNNDPVDIATYYCARIVGYGSGWYGFDDYWGQGTSTVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIQTQSPSSLSASV GDRVTITCRASQGI RNDLAWYQQKPGKAPKRLIYAASLQSGVPSRFSGSGSTETTLTISLQPEDFATYYCLOHN SYPLTFGCGTKVEIK</p>
182.	Construcción de anticuerpo FLT3-scFc BiTE FL1-scFc	molécula bienespecifica HLE	<p>QVTLKESGPTLVKPTETLTLTCTLSGFSLNNARMGVSWIRQPPGKCLEWLAHIFSNDEKSYSTSLKNRLTISKDSSK TQVVLMTNNDPVDIATYYCARIVGYGSGWYGFDDYWGQGTSTVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIQTQSPSSLSASV GDRVTITCRASQGI RNDLAWYQQKPGKAPKRLIYAASLQSGVPSRFSGSGSTETTLTISLQPEDFATYYCLOHN SYPLTFGCGTKVEIKSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNLSKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWQQGTLVTVSSGGGGSGGG GSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSYR CVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGTFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSYR CVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGTFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK</p>
183.	FL2	scFv	<p>QVTLKESGPALVKPTETLTLTCTLSGFSLNNARMAVSWIRQPPGKCLEWLAHIFSNDEKSYSTSLKSRRLTISKDTSK SQVVLMTNNDPEDIATYYCARIVGYGSGWYGFDDYWGQGITVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIQTQSPSSLSASV GDRVTITCRASQGI RNDLAWYQQKPGKAPKRLIYAASLQSGVPSRFSGSGSTETTLTISLQPEDFATYYCLOHN SYPLTFGCGTKVEIK</p>
184.	Construcción de anticuerpo FLT3-scFc BiTE FL2-scFc	molécula bienespecifica HLE	<p>QVTLKESGPALVKPTETLTLTCTLSGFSLNNARMAVSWIRQPPGKCLEWLAHIFSNDEKSYSTSLKSRRLTISKDTSK SQVVLMTNNDPEDIATYYCARIVGYGSGWYGFDDYWGQGITVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIQTQSPSSLSASV GDRVTITCRASQGI RNDLAWYQQKPGKAPKRLIYAASLQSGVPSRFSGSGSTETTLTISLQPEDFATYYCLOHN SYPLTFGCGTKVEIKSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNLSKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWQQGTLVTVSSGGGGSGGG GSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSYR CVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGTFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSYR CVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGTFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK</p>

185.	BC1	scFv	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFNTHIIHWVRQAPGQCLEWMGYINPYPGYHAYNEKFQGRATMTSDTSTS TVYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYRDTDVLVDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGD VTITCQASQDISNYLNWYQQKPKAPKLLIYYTSRLHTGVPSPRFSGSGSDTDFTTISSLEPEDIATYYCQQGNTLP WTFGGGTKLEIK</p>
186.	Construcción de anticuerpo BCMA-scFc BiTE 1 BC1-scFc	molécula biespecífica HLE	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFNTHIIHWVRQAPGQCLEWMGYINPYPGYHAYNEKFQGRATMTSDTSTS TVYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYRDTDVLVDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGD VTITCQASQDISNYLNWYQQKPKAPKLLIYYTSRLHTGVPSPRFSGSGSDTDFTTISSLEPEDIATYYCQQGNTLP WTFGGGTKLEIKSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLLEWVARIRSKYNNYA TYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSG GGGQTVVTVQEPSTLIVSPGGTVLTCGSSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLGGKA ALTLGSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTCLTVLGGGGDKTHTCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSYRCVSVLTVLHQLDNLGKEYKCKVSNKALP APIEKTISSKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDK THTCPPEPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSYRCVSVLTVLHQLDNLGKEYKCKVSNKALP APIEKTISSKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK</p>
187.	BC2	scFv	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFNTHIIHWVRQAPGQGLEWMGYINPYPGYHAYNEKFQGRATMTSDTSTS TVYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYRDTDVLVDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGD VTITCQASQDISNYLNWYQQKPKAPKLLIYYTSRLHTGVPSPRFSGSGSDTDFTTISSLEPEDIATYYCQQGNTLP WTFGGGTKLEIK</p>
188.	Construcción de anticuerpo BCMA-scFc BiTE 2 BC2-scFc	molécula biespecífica HLE	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFNTHIIHWVRQAPGQGLEWMGYINPYPGYHAYNEKFQGRATMTSDTSTS TVYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYRDTDVLVDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGD VTITCQASQDISNYLNWYQQKPKAPKLLIYYTSRLHTGVPSPRFSGSGSDTDFTTISSLEPEDIATYYCQQGNTLP WTFGGGTKLEIKSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLLEWVARIRSKYNNYA TYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSG GGGQTVVTVQEPSTLIVSPGGTVLTCGSSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLGGKA ALTLGSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTCLTVLGGGGDKTHTCPPEPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSYRCVSVLTVLHQLDNLGKEYKCKVSNKALP APIEKTISSKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDK THTCPPEPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSYRCVSVLTVLHQLDNLGKEYKCKVSNKALP APIEKTISSKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK</p>
			<p>GGGQTVVTVQEPSTLIVSPGGTVLTCGSSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLGGKA ALTLGSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTCLTVLGGGGDKTHTCPPEPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSYRCVSVLTVLHQLDNLGKEYKCKVSNKALP APIEKTISSKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDK THTCPPEPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSYRCVSVLTVLHQLDNLGKEYKCKVSNKALP APIEKTISSKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK</p>

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica que comprende una construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico, que se une a un antígeno de superficie celular diana CD19 o CD33 a través de un primer dominio de unión y al antígeno de superficie de linfocitos T CD3 a través de un segundo dominio de unión, en donde la construcción monocatenaria biespecífica comprende o consiste en un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se representa en SEQ ID NO 100 o 174, una β -ciclodextrina y un tampón, en donde la composición reduce o previene la formación de agregados de proteína (especies de alto peso molecular HMWS), y en donde la β -ciclodextrina es la sal de sodio de sulfobutiléter- β -ciclodextrina.
- 10 2. La composición según la reivindicación 1, en donde la β -ciclodextrina está presente en una concentración en el intervalo del 0,1 % al 20 % (p/v), preferentemente del 0,5 % al 2 % (p/v) y más preferentemente del 0,8 % al 1,5 % (p/v).
- 15 3. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico está presente en un intervalo de concentración de 0,1-5 mg/ml, preferentemente de 0,2-2,5 mg/ml, más preferentemente de 0,25-1,0 mg/ml.
- 20 4. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el tampón se selecciona del grupo que consiste en fosfato de potasio, ácido acético/acetato sódico, ácido cítrico/citrato sódico, ácido succínico/succinato sódico, ácido tartárico/tartrato sódico, histidina/HCl de histidina, glicina, Tris, glutamato, acetato y mezclas de los mismos.
- 25 5. La composición según la reivindicación 4, en donde el tampón se selecciona del grupo que consiste en fosfato de potasio, ácido cítrico/citrato sódico, ácido succínico, histidina, glutamato, acetato y combinaciones de los mismos.
- 30 6. La composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el pH de la composición está en el intervalo de 4-7,5.
- 35 7. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además uno o más excipientes seleccionados del grupo que consiste en sacarosa, trehalosa, manitol, sorbitol, arginina, lisina, polisorbato 20, polisorbato 80, poloxámero 188, Pluronic y combinaciones de los mismos.
- 40 8. La composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende uno o más conservantes.
- 45 9. La composición según la reivindicación 8, en donde el uno o más conservantes se selecciona del grupo que consiste en alcohol bencílico, clorobutanol, fenol, meta-cresol, metilparabeno, fenoxietanol, propilparabeno y tiomerosal.
- 50 10. La composición según la reivindicación 1, en donde la formulación está libre de conservantes, la secuencia de aminoácidos de la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico es SEQ ID NO 100 y la construcción está en una concentración de 0,5 mg/ml, la ciclodextrina es la sal de sodio de sulfobutiléter- β -ciclodextrina en una concentración de 1 % (p/v), el tampón es fosfato de potasio en concentración de 10 mM y la formulación comprende además sacarosa en concentración de 8 % (p/v) y polisorbato 80 en concentración de 0,01 % (p/v) a un pH de 6,0.
11. La composición según la reivindicación 1, en donde la secuencia de aminoácidos de la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico es SEQ ID NO 100, en donde la ciclodextrina es la sal de sodio de sulfobutiléter- β -ciclodextrina en una concentración del 1 %, el tampón es fosfato de potasio en concentración de 10 mM y la formulación comprende además manitol en una concentración de 2 %, sacarosa en concentración de 2 % y polisorbato 80 en concentración de 0,01 % a un pH de 6.

Figura 1

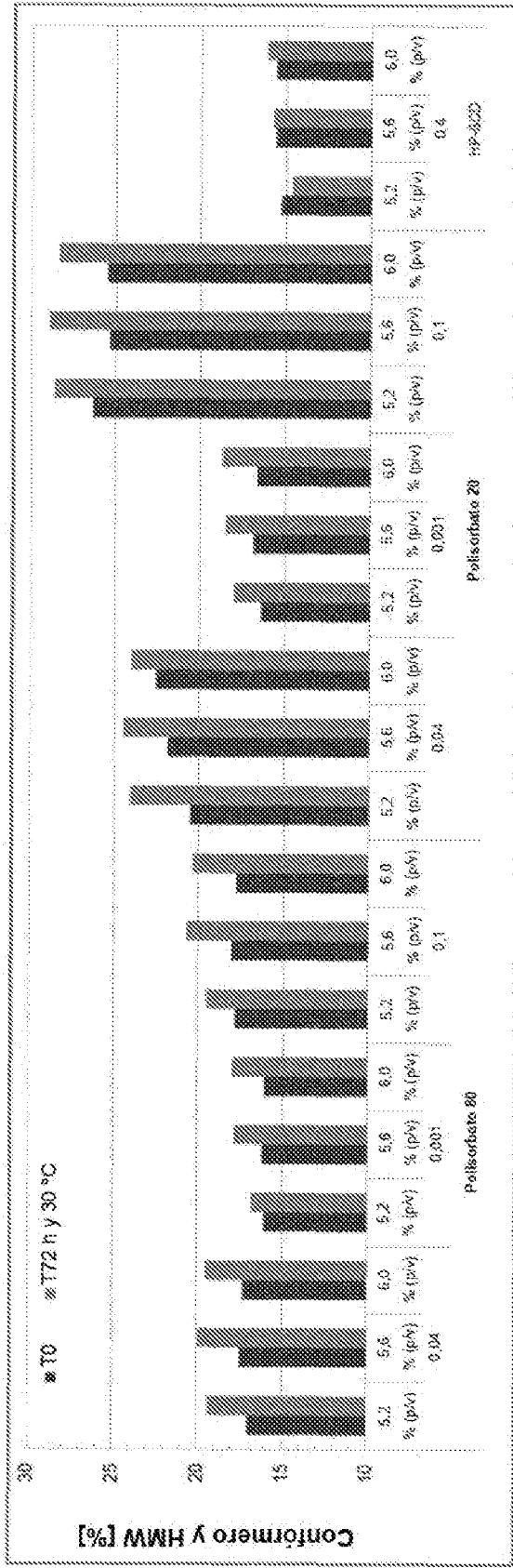
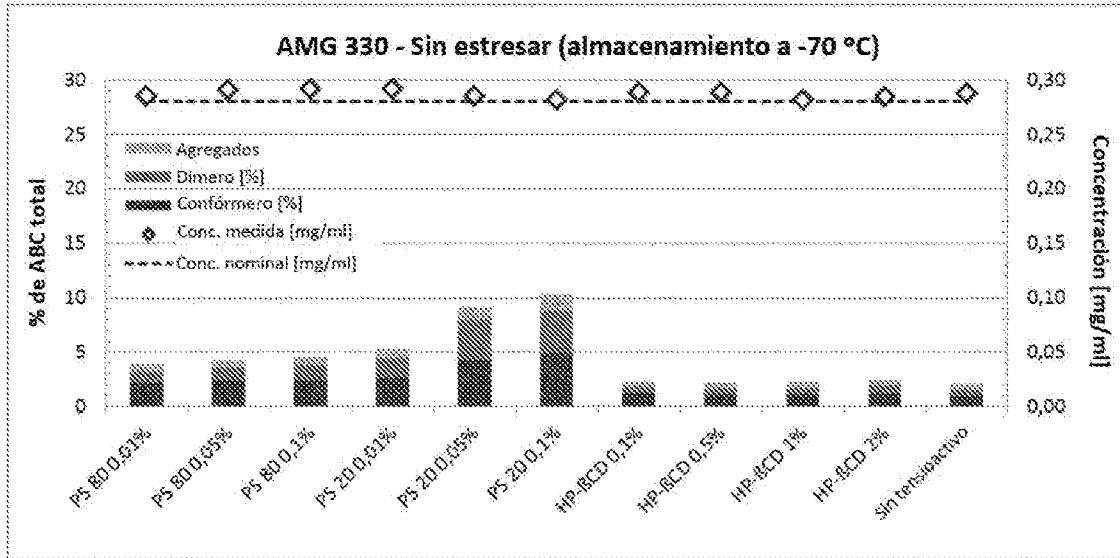


Figura 2

A



B

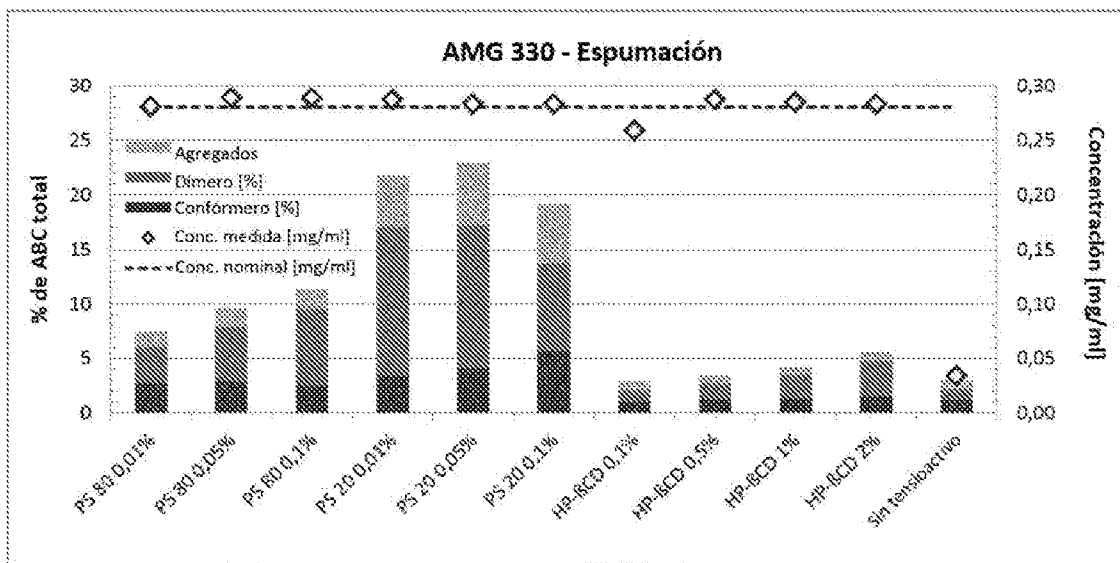


Figura 2 (continuación)

C

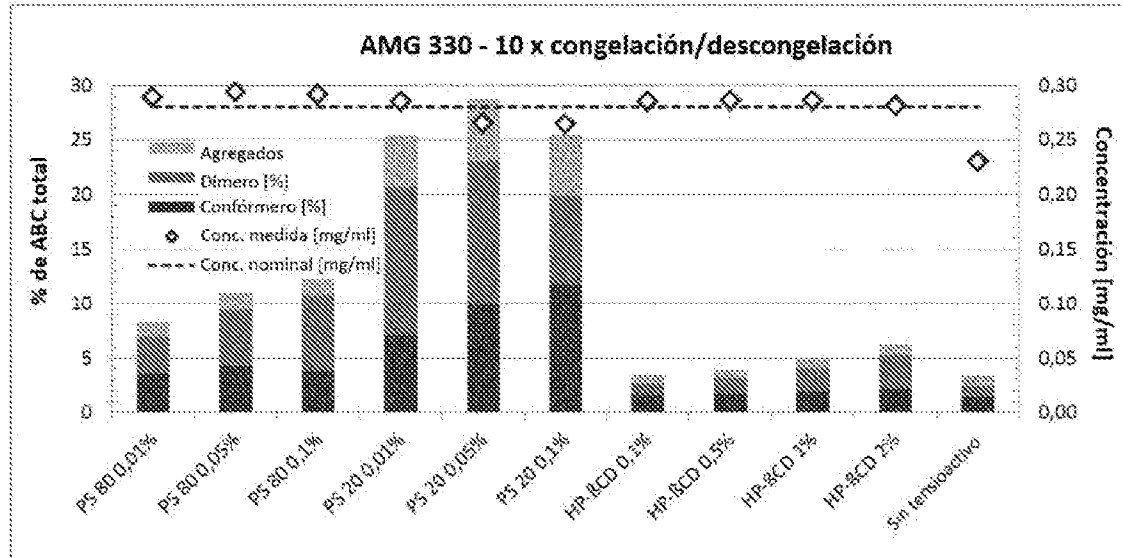


Figura 3

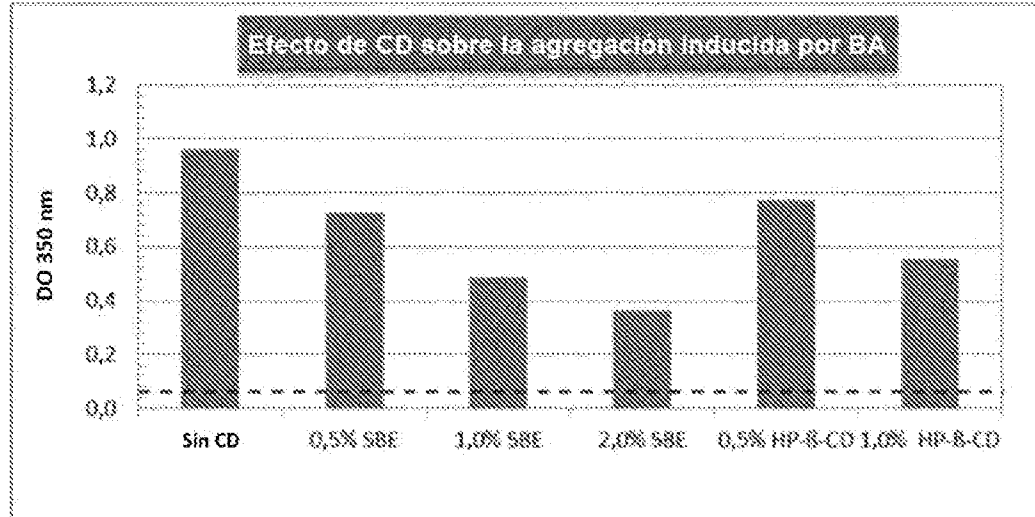


Figura 4A

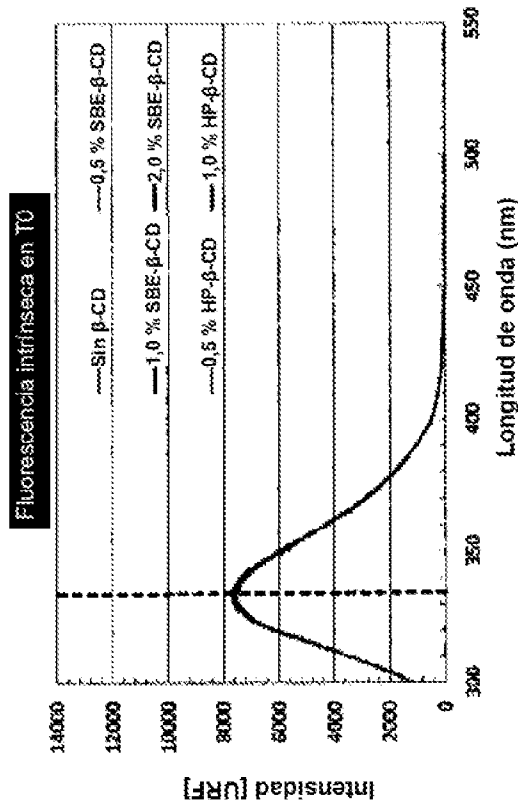


Figura 4B

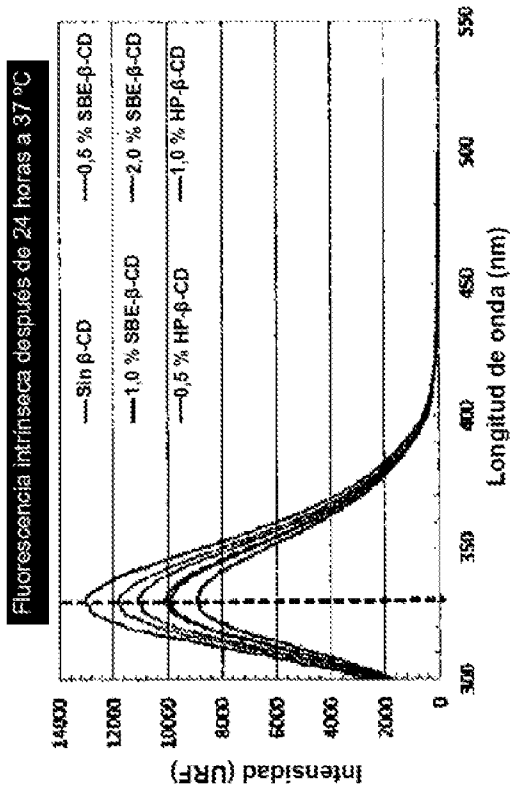
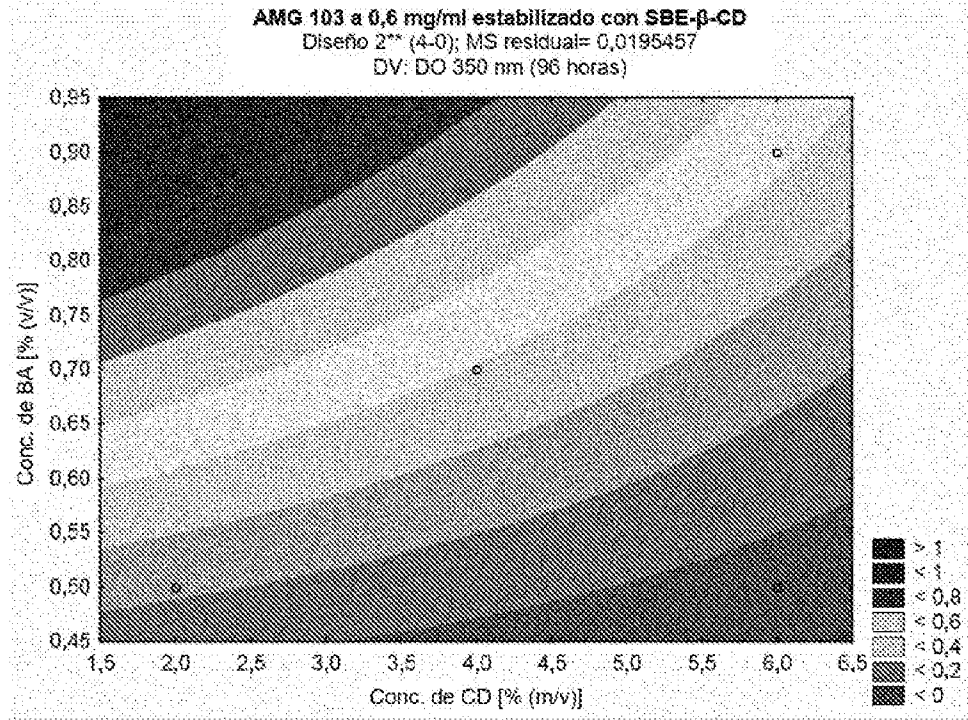


Figura 5

A



B

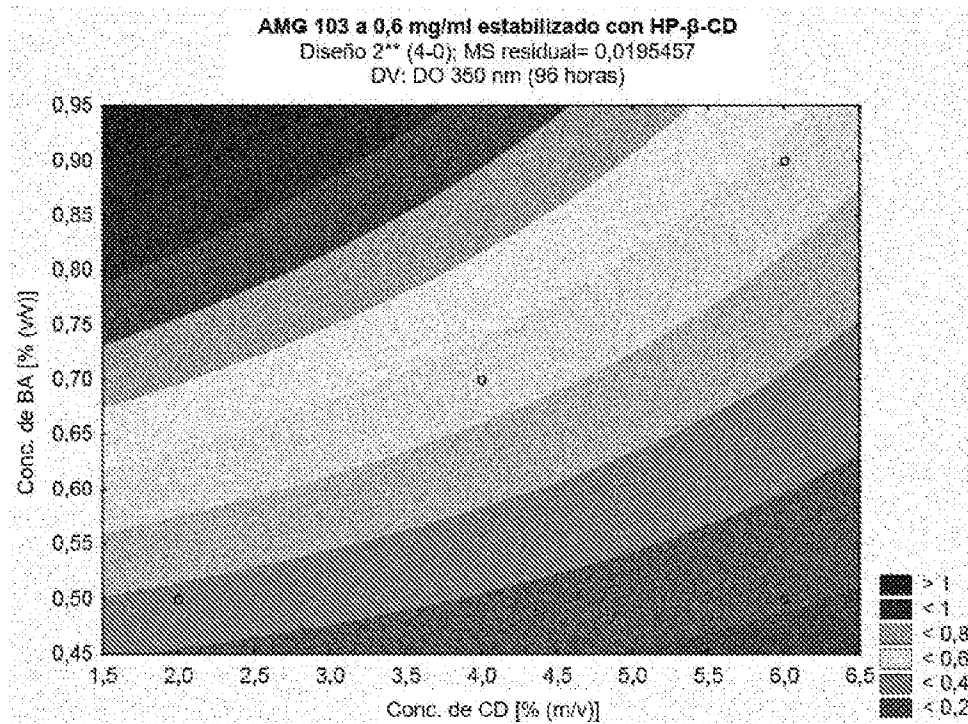


Figura 6

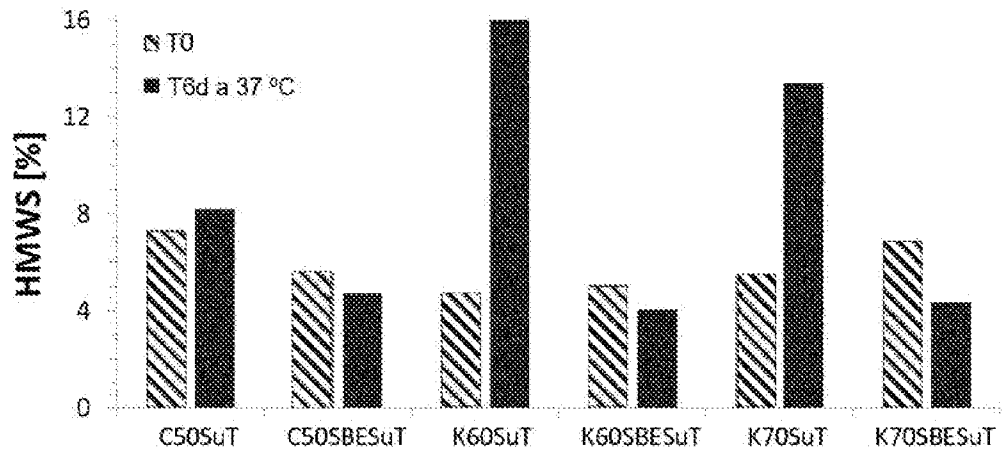
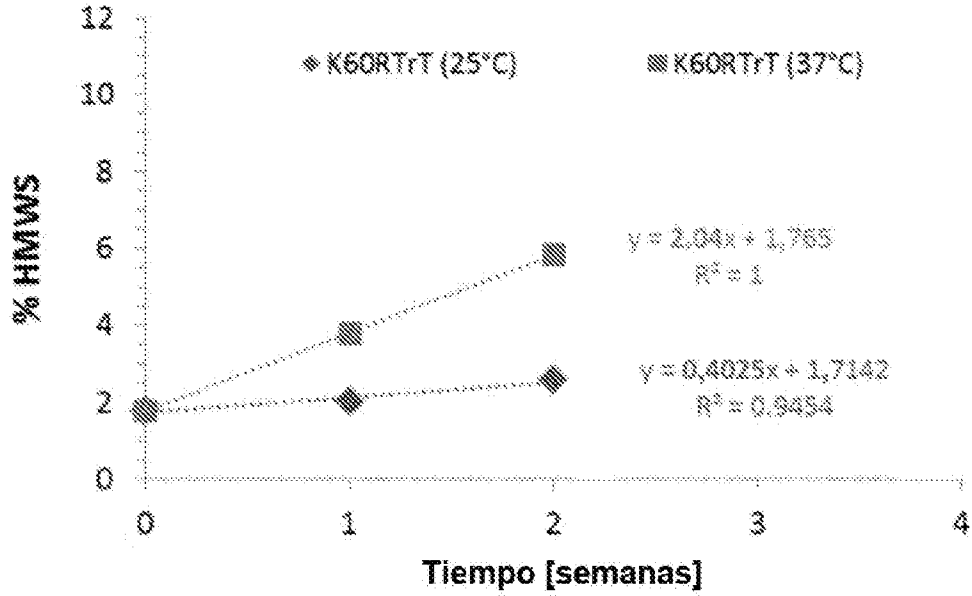


Figura 7

A



B

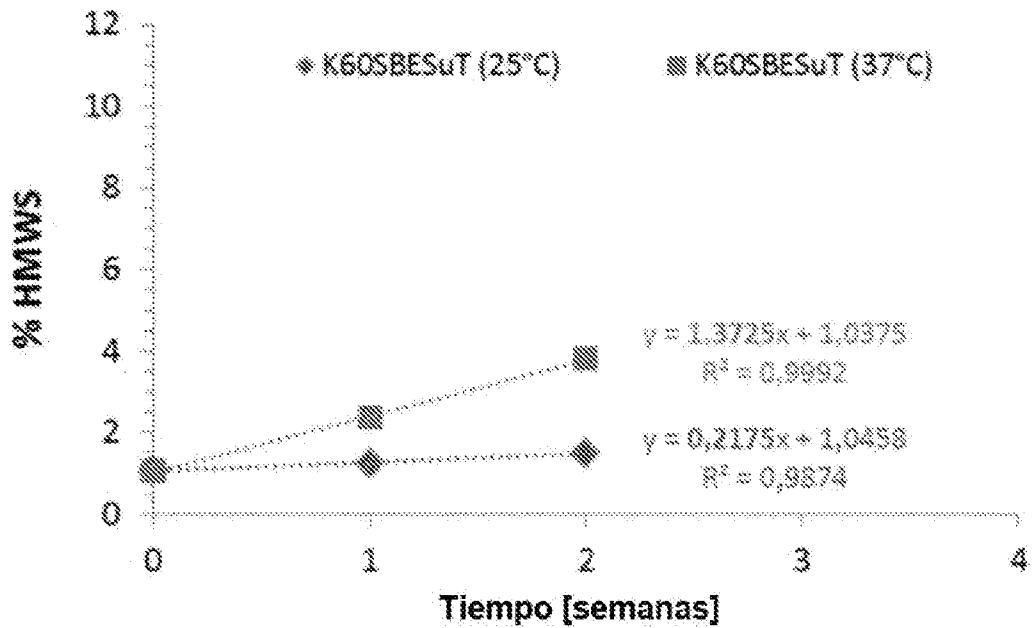


Figura 7 (continuación)

c

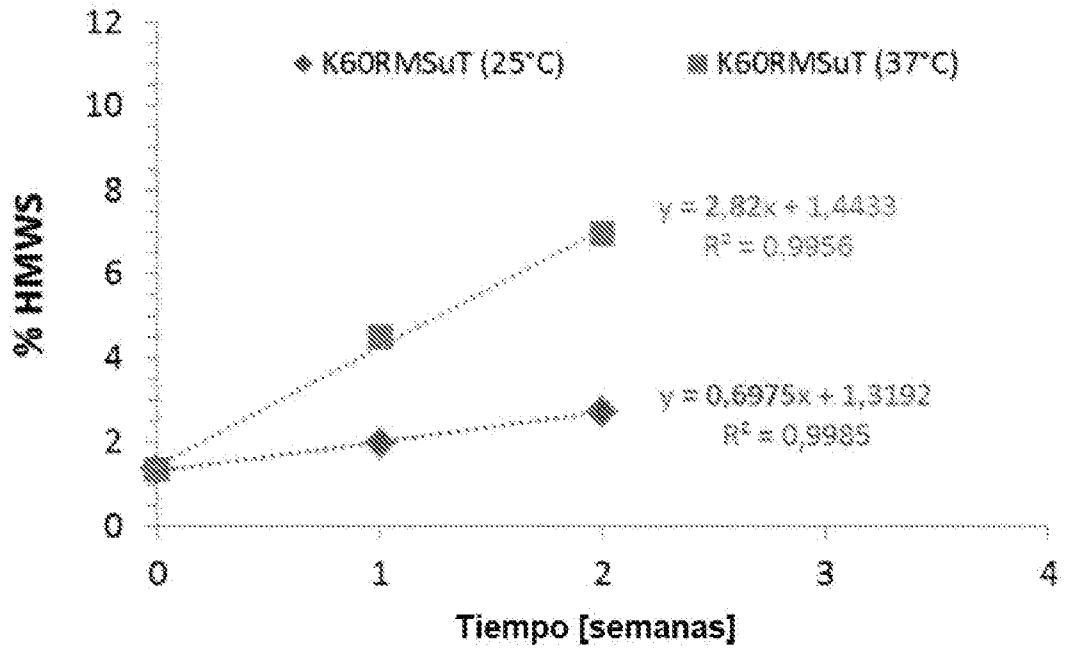


Figura 8

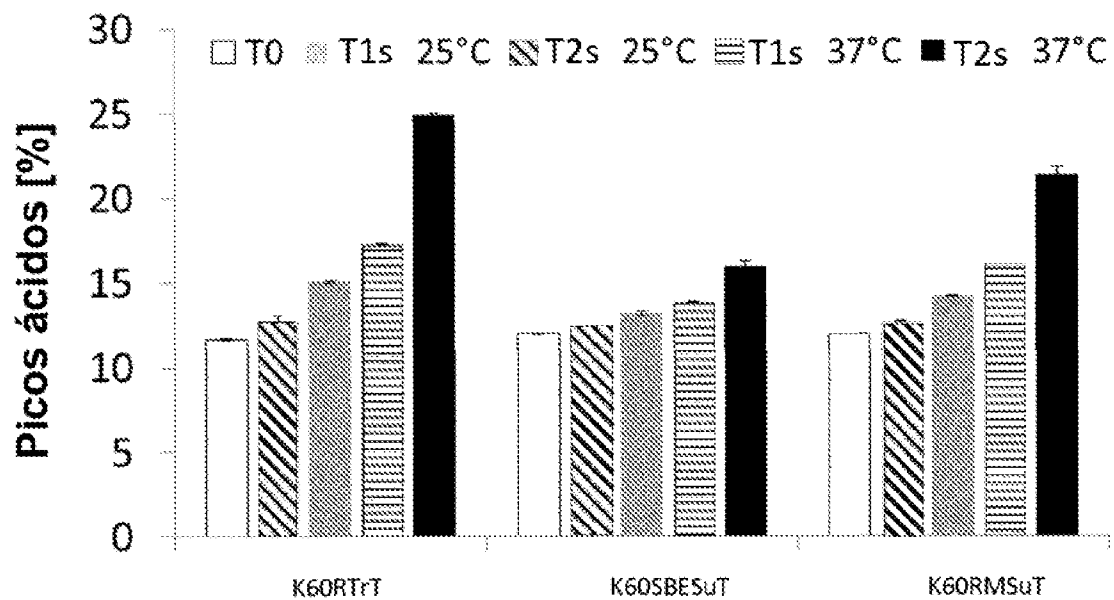


Figura 9

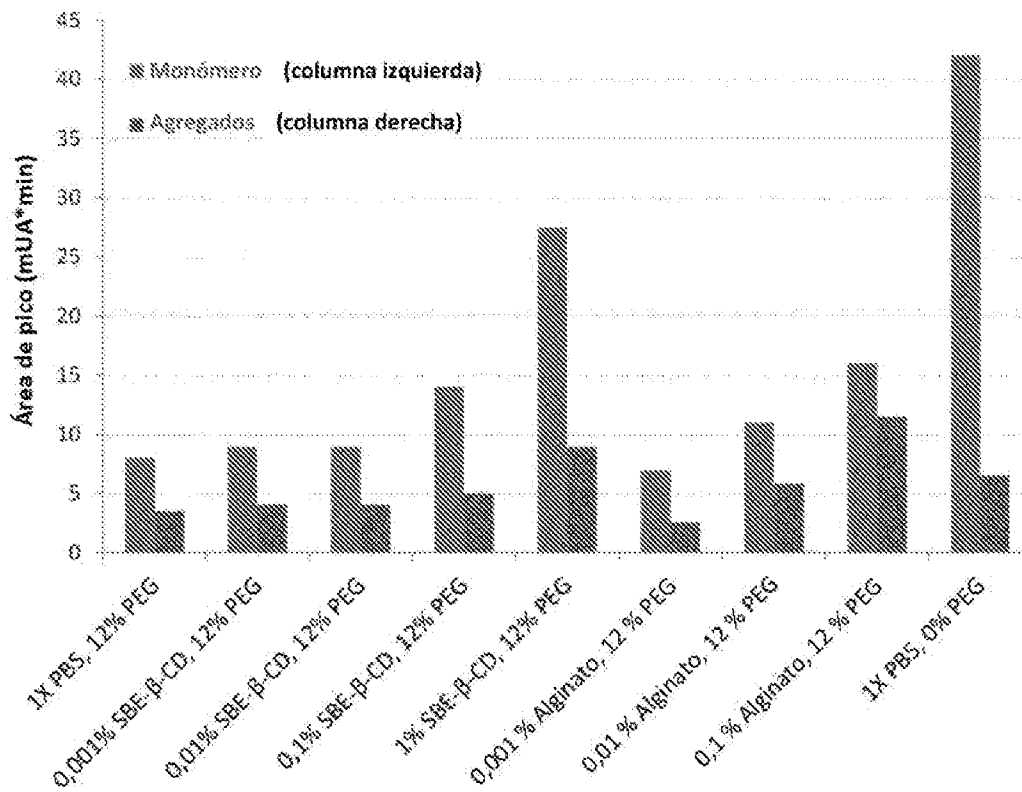


Figura 10

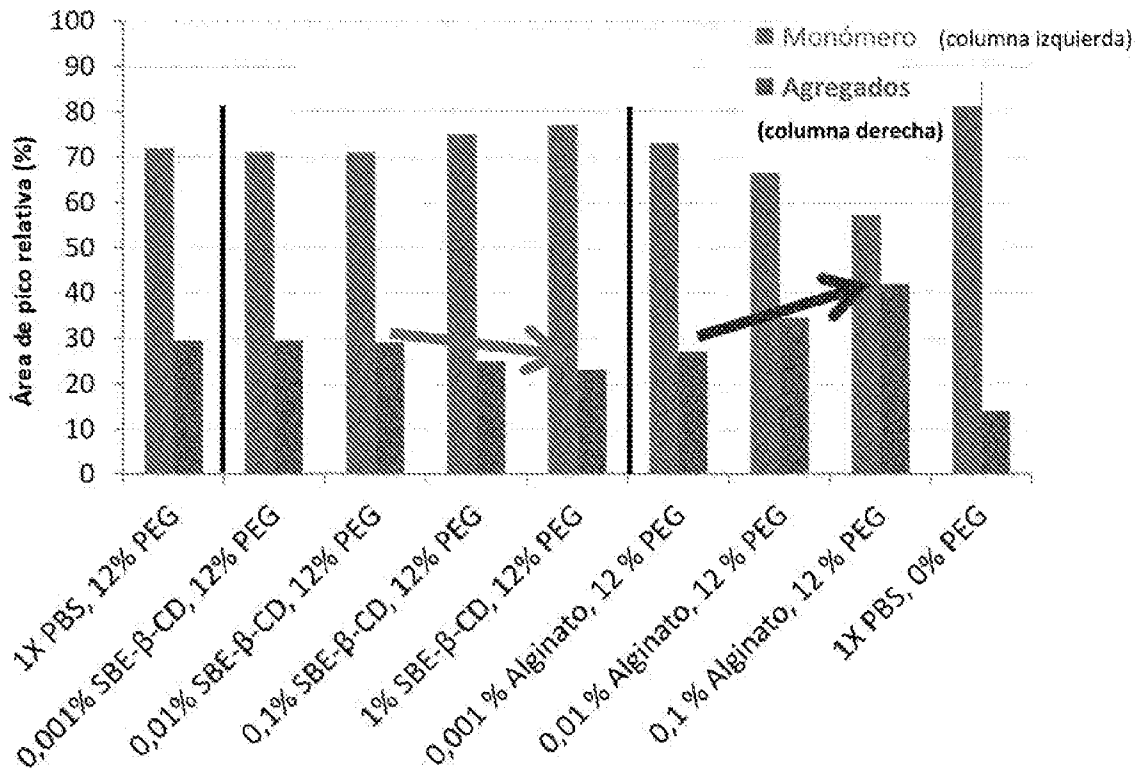


Figura 11

Área de pico relativa de SCE promedio de AMG 330 después del cambio de tampón y concentración de proteína por untrafiltración / centrifugación (todas las inyecciones)

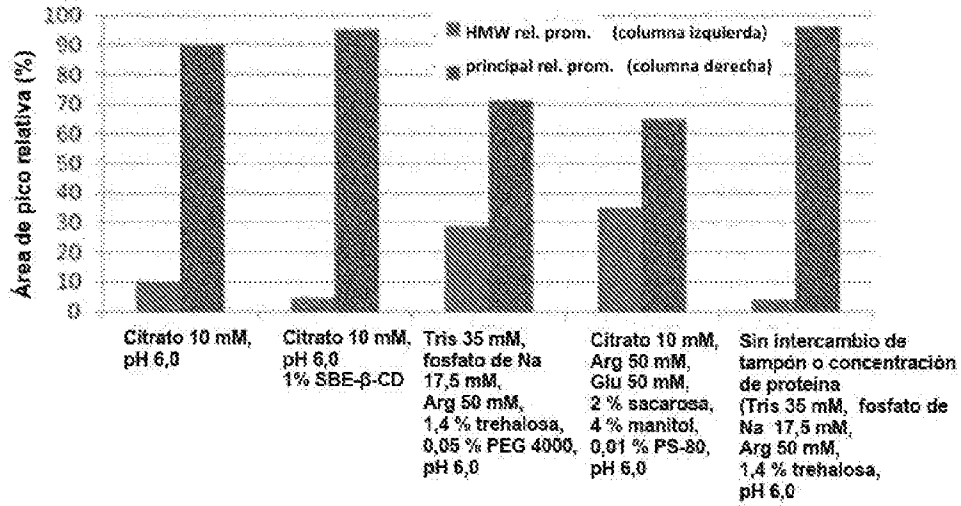
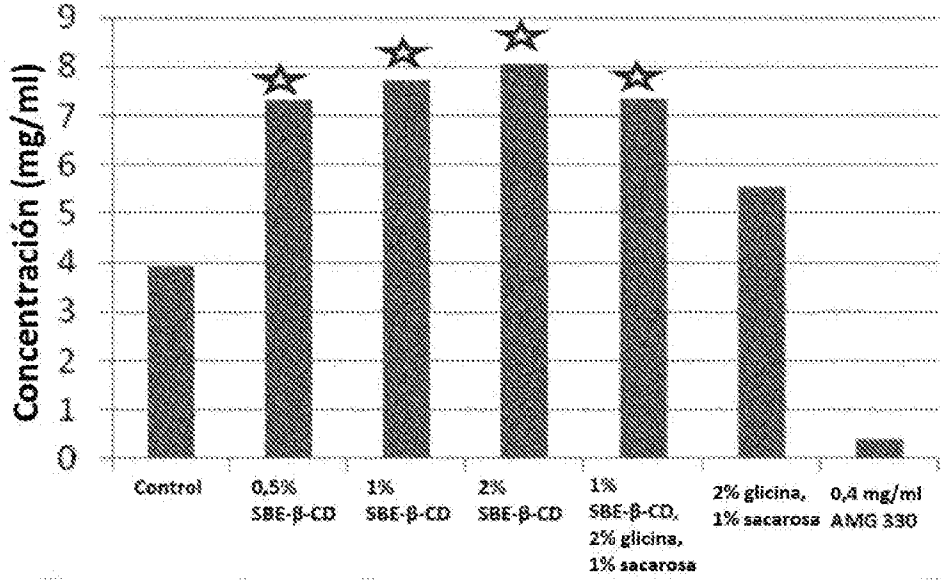
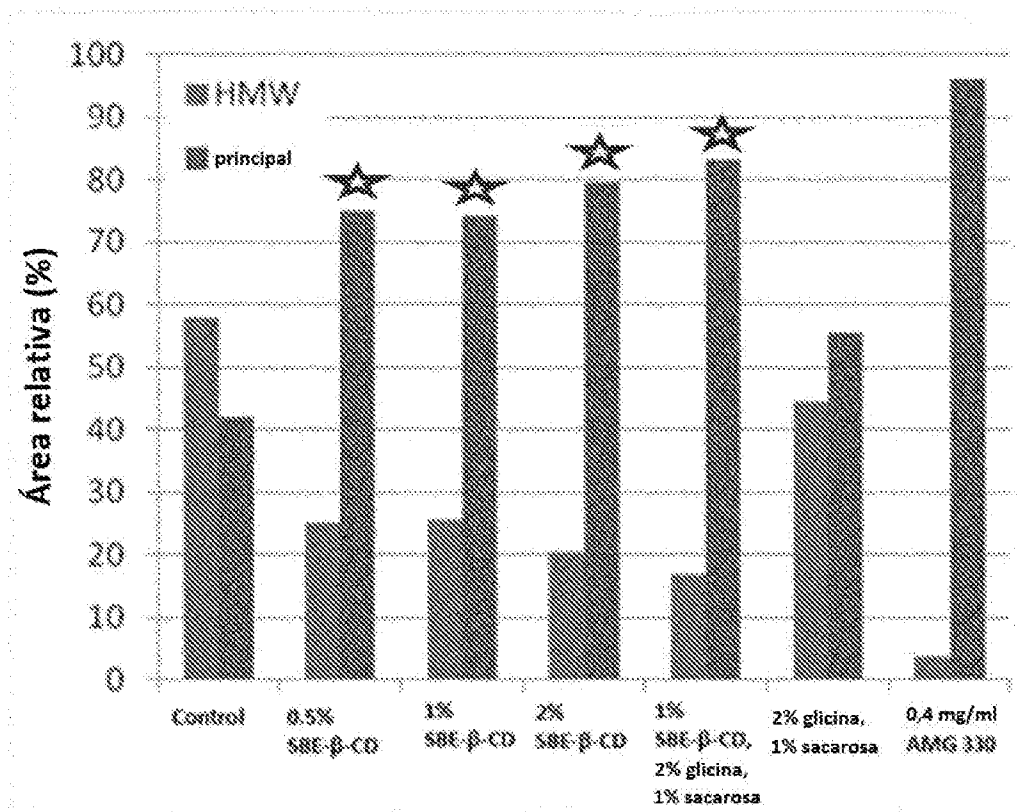


Figura 12

A



B



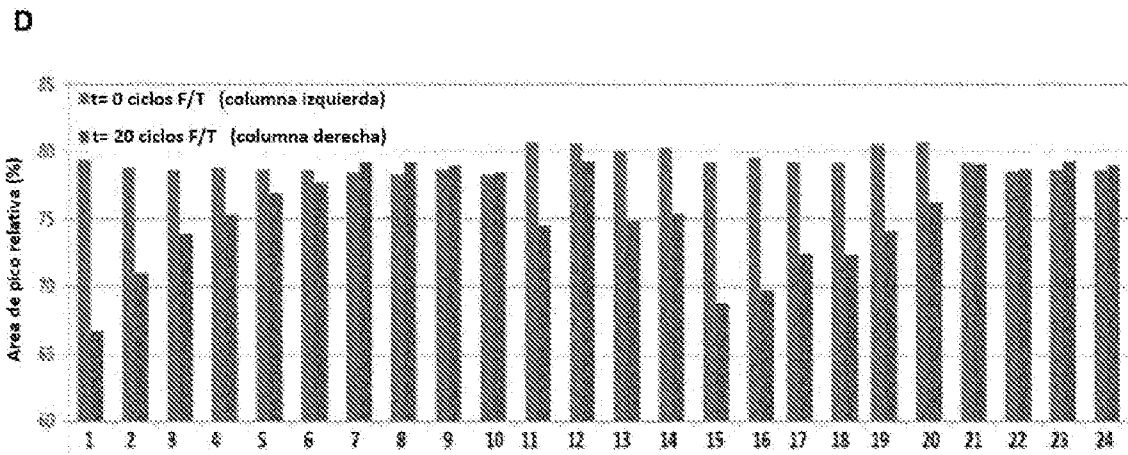
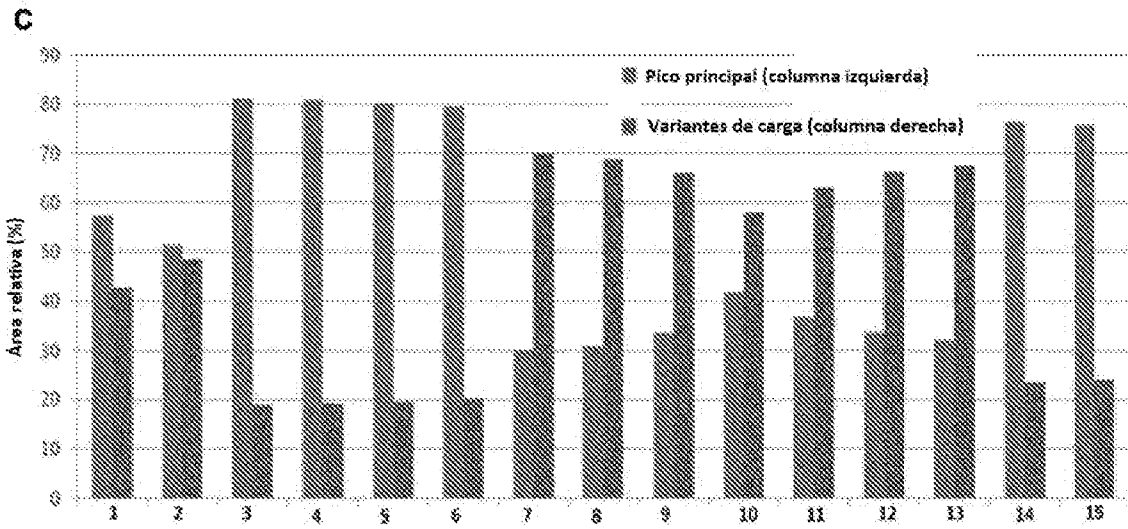


Figura 13

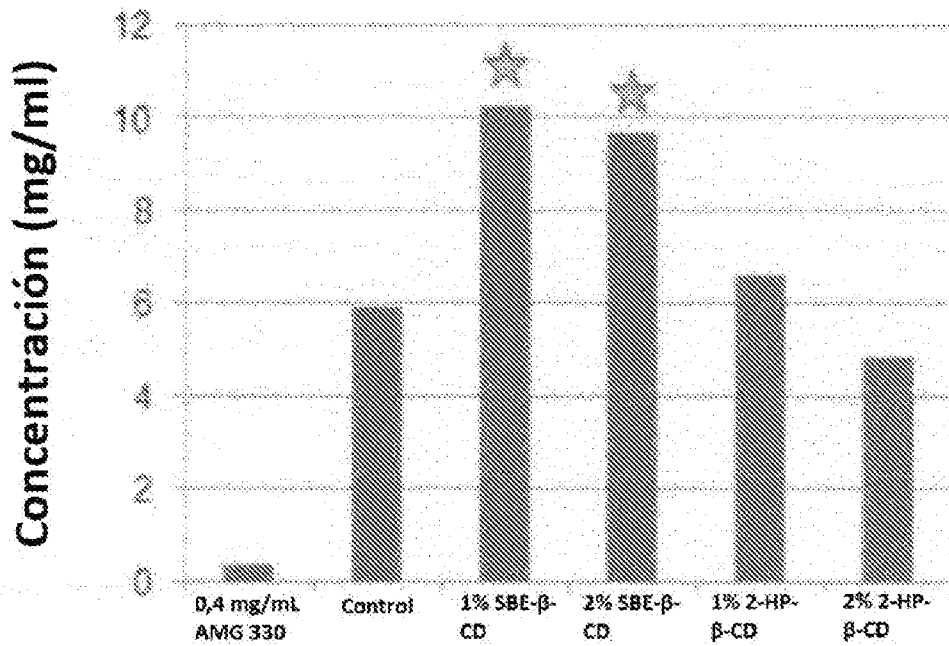


Figura 14

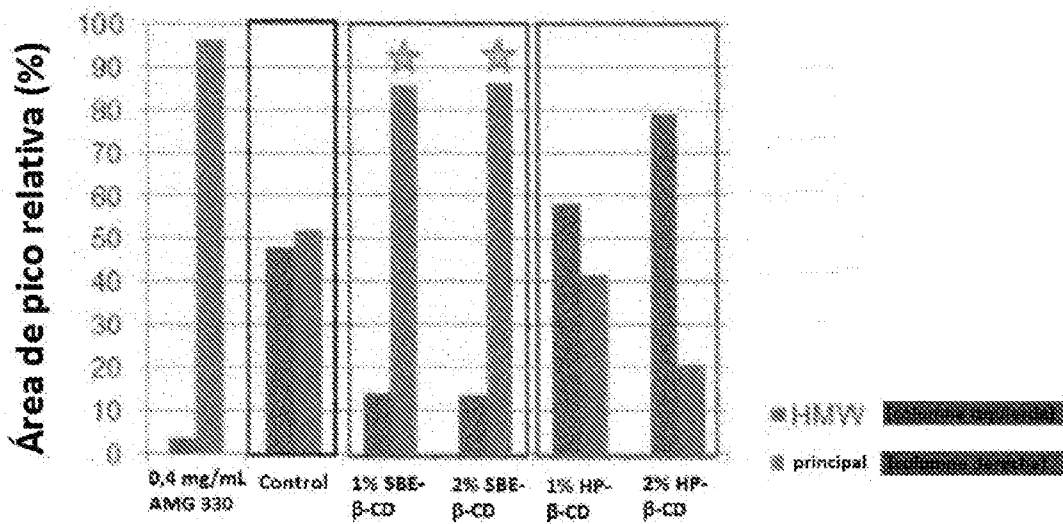


Figura 15

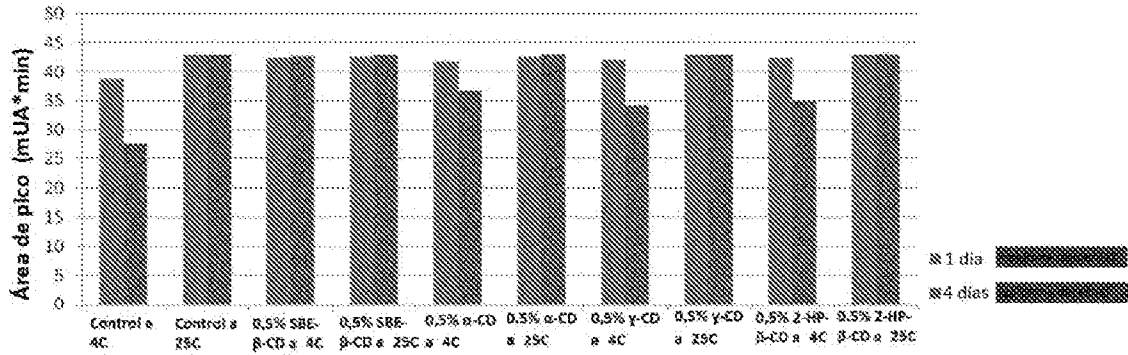


Figura 16

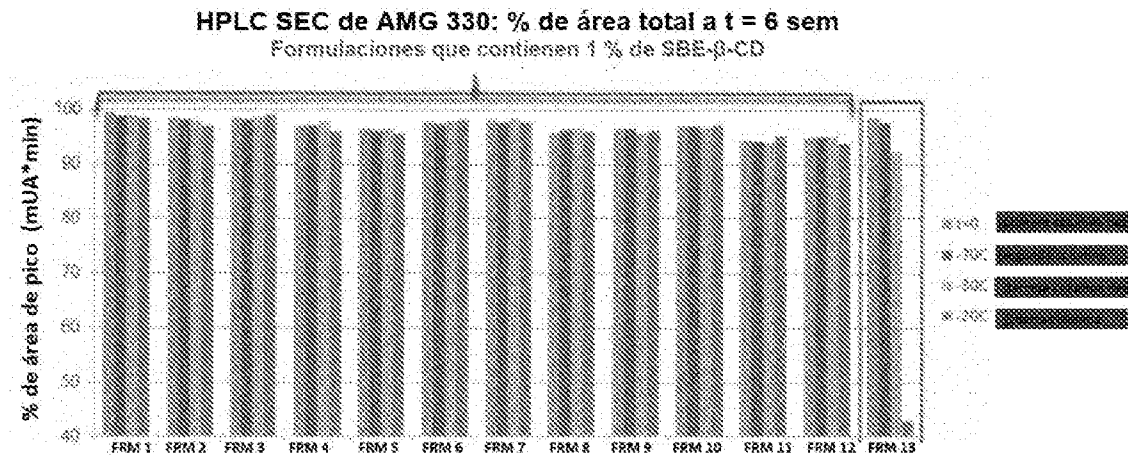
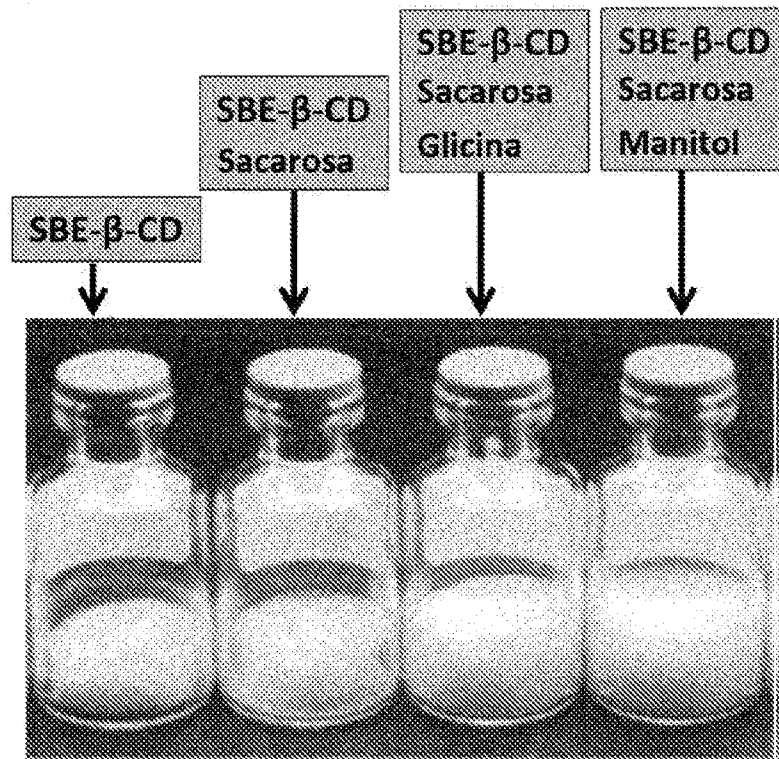


Figura 17

A



B

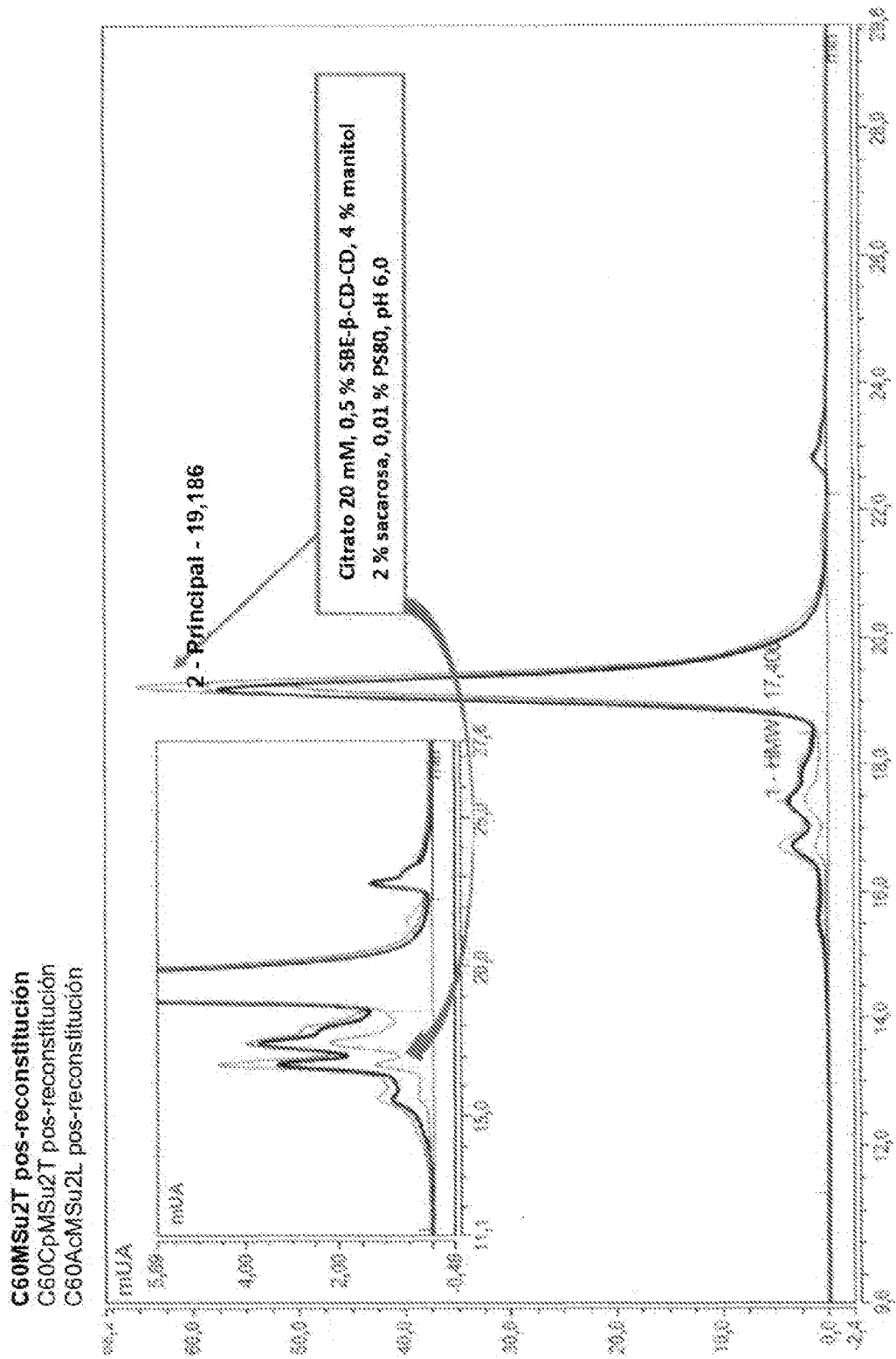
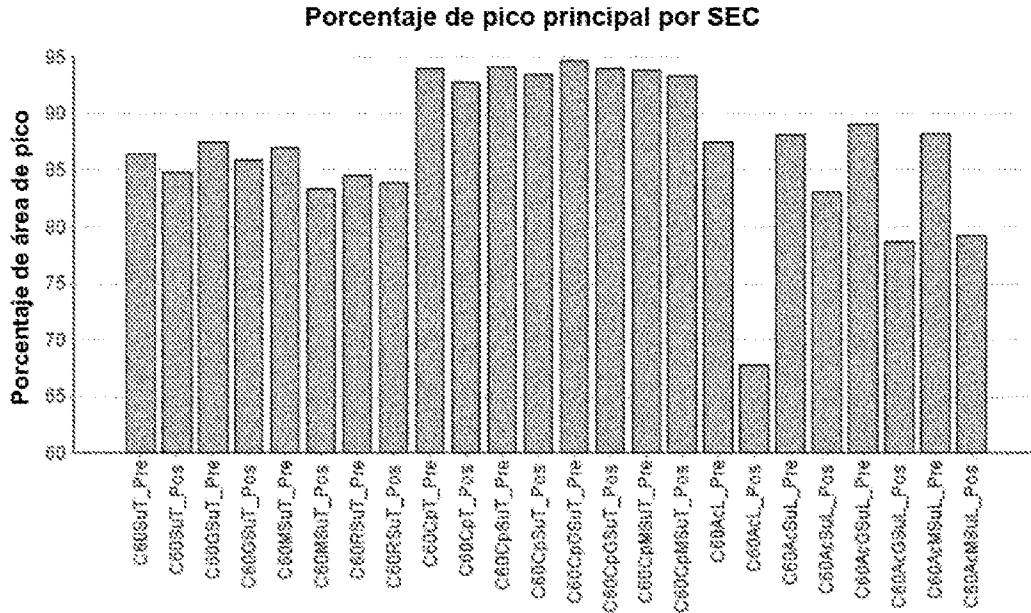


Figura 17 (continuación)

Figura 17 (continuación)

C



D

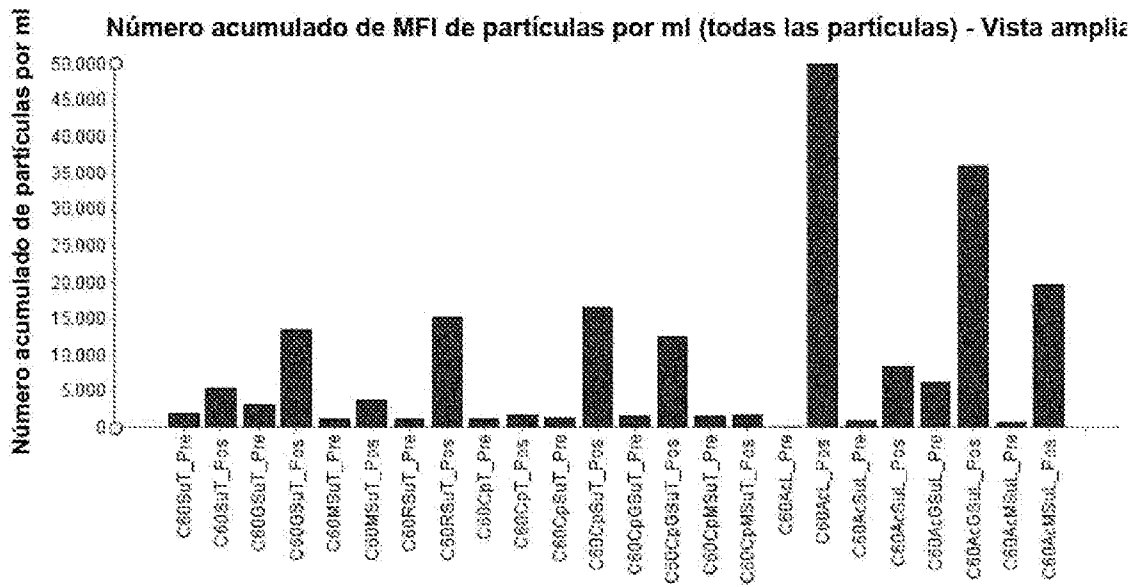


Figura 18

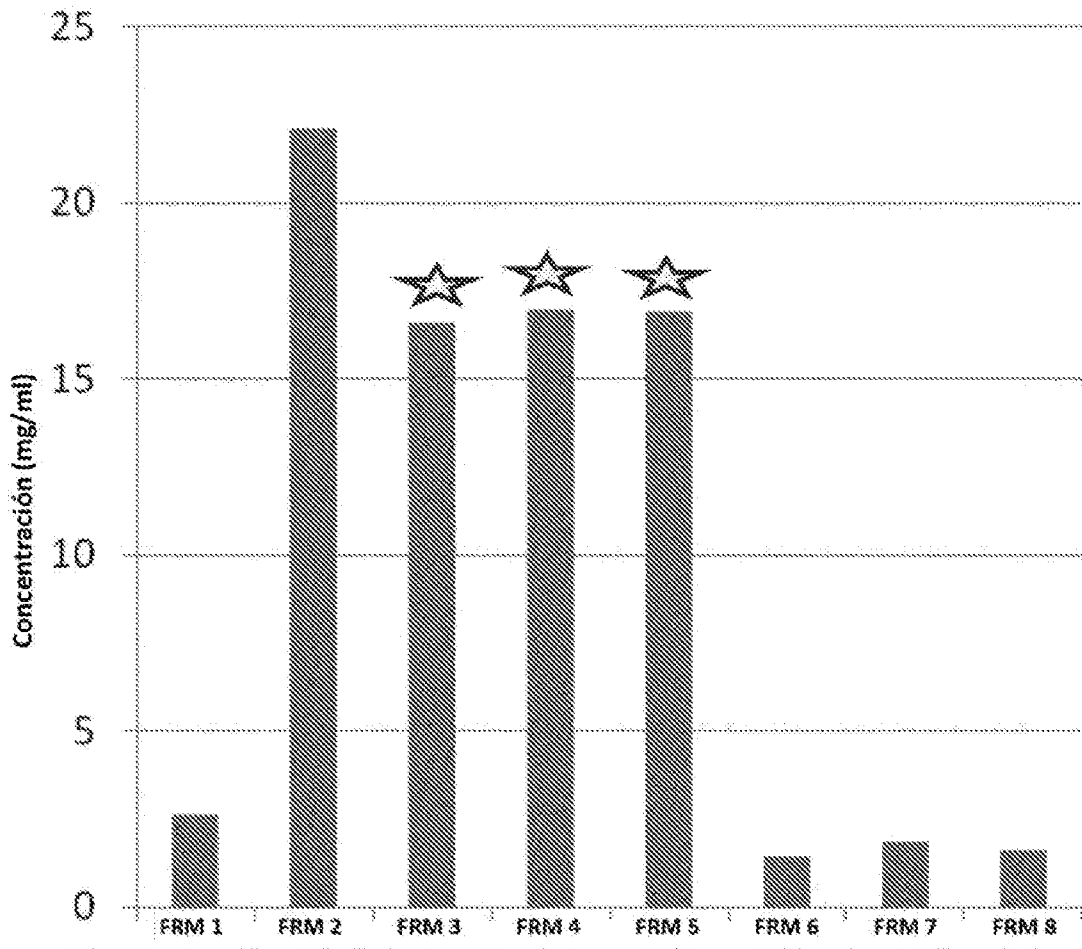


Figura 19

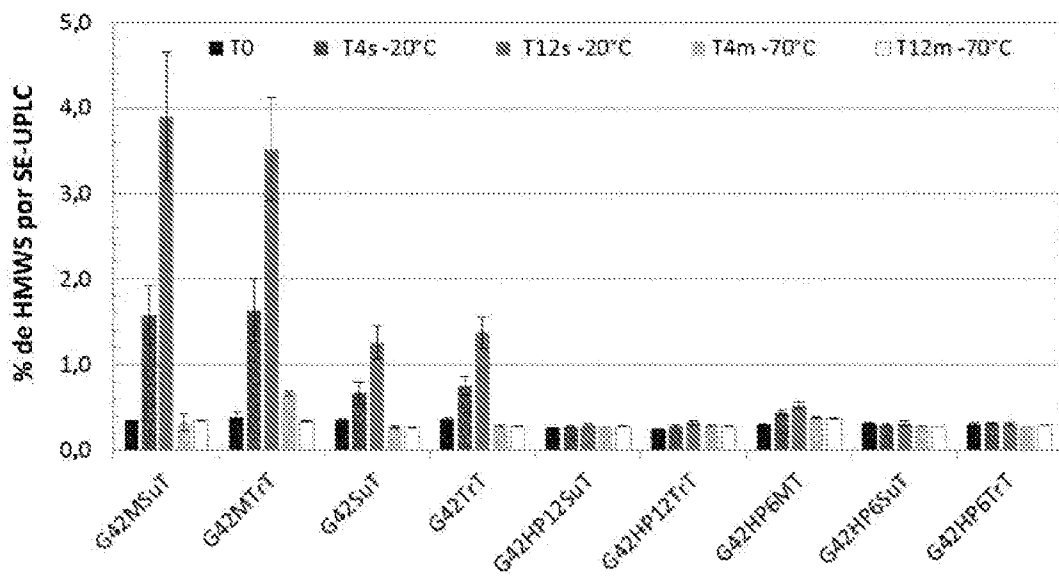


Figura 20

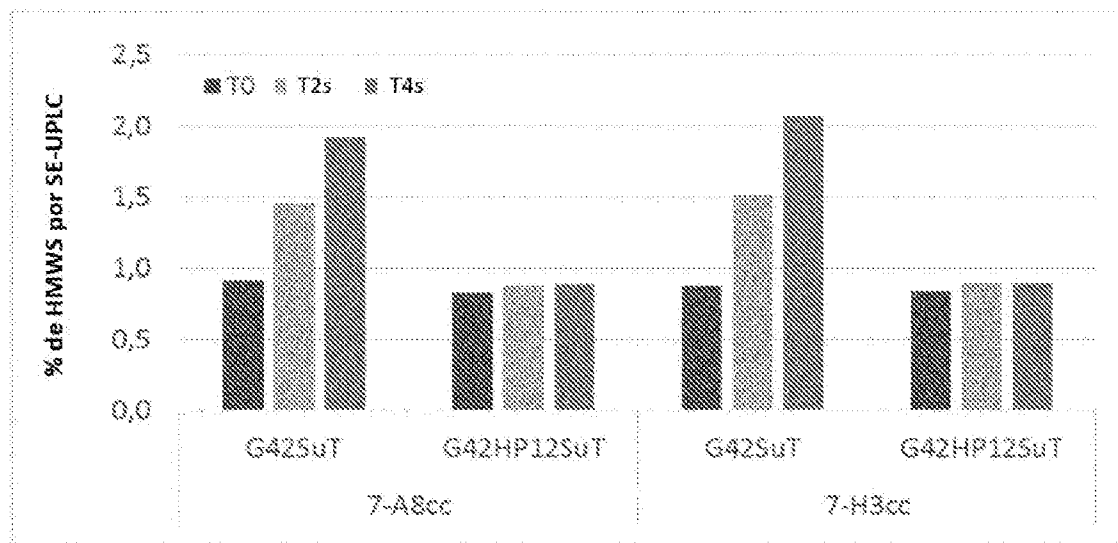


Figura 21

