

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 981 791**

(51) Int. Cl.:

**A61K 9/16** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61K 9/50** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2016 E 22172044 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2024 EP 4059492**

---

(54) Título: **Composiciones y métodos para fabricar micropartículas de proteína**

(30) Prioridad:

**16.12.2015 US 201562268259 P**

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

**10.10.2024**

(73) Titular/es:

**REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.**  
(100.0%)

**777 Old Saw Mill River Road  
Tarrytown, NY 10591, US**

(72) Inventor/es:

**BRUDNICKI, PHILIP y  
CHEN, HUNTER**

(74) Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 981 791 T3

---

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

## DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para fabricar micropartículas de proteína

5 Campo

La invención generalmente se refiere a composiciones y métodos para formular proteínas estables durante un período de tiempo prolongado. La invención se refiere específicamente a composiciones y métodos para preparar formulaciones de proteínas terapéuticas que permanecen estables y biológicamente activas a temperaturas ambiente y fisiológica, durante un período de tiempo prolongado.

10 Antecedentes

15 Las macromoléculas terapéuticas, como los anticuerpos y las proteínas de fusión del receptor Fc, deben formularse de manera que no solo hagan que las moléculas sean adecuadas para la administración a los pacientes, sino que también mantengan su estabilidad durante el almacenamiento y en el sitio de administración. Por ejemplo, las proteínas terapéuticas (por ejemplo, anticuerpos) en solución líquida son propensas a la degradación, agregación y/o modificaciones químicas no deseadas a menos que la solución se formule adecuadamente. También deben tenerse en cuenta consideraciones aparte de la estabilidad cuando se prepara una formulación de proteína terapéutica. Los ejemplos de tales consideraciones adicionales incluyen la viscosidad de la solución y la concentración de anticuerpo que puede acomodar una formulación determinada. Al formular una proteína terapéutica de liberación prolongada, debe tenerse mucho cuidado para llegar a una formulación que permanezca estable en el tiempo y a la temperatura fisiológica y de almacenamiento, que contenga una concentración adecuada de anticuerpo u otro biológico terapéutico, y que posea otras propiedades que permitan que la formulación se administre convenientemente a los pacientes.

20

25

30

35

30

35

40

45

40

45

50

55

60

55

60

Las formulaciones líquidas de moléculas biológicas generalmente están diseñadas para proporcionar estabilidad a largo plazo cuando se congelan o refrigeran, pero a menudo no logran proporcionar estabilidad a largo plazo a temperatura ambiente. Una solución conocida en la técnica para conservar la estabilidad y la actividad biológica/terapéutica de una molécula biológica es liofilizar o liofilizar de cualquier otra manera la molécula. La liofilización puede proporcionar una "torta" seca que permanece relativamente estable a temperatura ambiente durante un período de tiempo relativamente largo. La estabilidad a temperatura ambiente puede ser especialmente importante en el almacenamiento y distribución de productos bioterapéuticos en todo el mundo, especialmente en lugares donde la electricidad y la refrigeración no son confiables.

Otro tema emergente en las técnicas de formulación farmacéutica es la necesidad de concentraciones aumentadas de la proteína terapéutica para facilitar el suministro de grandes cantidades de fármaco en una pequeña cantidad de espacio. El problema de maximizar la cantidad de fármaco proteico por unidad de volumen se exacerba por la necesidad recíproca de reducir la cantidad de excipientes que ayudan a estabilizar la proteína. A medida que aumenta la relación molar de fármaco proteico a estabilizador, la cantidad de proteína se maximiza con el riesgo de desestabilizar la proteína.

La solicitud de publicación de patente de Estados Unidos núm. 2016/0176986 A1 describe una formulación de IgG1 de alta concentración ( $\geq 200$  mg/ml) en un solvente no acuoso. Esta formulación contiene partículas de IgG1 secadas por aspersión, suspendidas en una solución no acuosa diseñada para un suministro subcutáneo. Las partículas secadas por aspersión contienen trehalosa como estabilizador y la molécula IgG1 en una relación peso a peso de 1:2.

Shire y otros (J. Pharm. Sci., vol. 93, núm. 6, junio de 2004, 1390-1402) describen el desarrollo de formulaciones de proteína de alta concentración por liofilización. Shire describe la relación molar óptima de lioprotector a proteína como 300:1 o mayor. Se describió que una formulación de anticuerpo con una relación molar de 500:1 de lioprotector a anticuerpo tenía una estabilidad significativa a temperatura ambiente, pero con una hipertonicia no deseable. Ese mismo anticuerpo formulado con menos lioprotector (250:1 de lioprotector a anticuerpo por mol) mostró una tonicidad mejorada y útil, pero con una estabilidad muy reducida. La formulación que comprende 250:1 requiere almacenamiento a 2-8 °C para mantener una estabilidad razonable.

Ajmera y Scherliesz (Int. J. Pharm., vol. 463, 2014, 98-107) describen el uso de aminoácidos densos en nitrógeno, arginina e histidina, para estabilizar la catalasa durante el secado por aspersión. El efecto estabilizador se atribuyó al enlace de hidrógeno mediado por nitrógeno. La relación peso a peso de aminoácido a catalasa para una estabilización efectiva fue de 1:1 o 2:1. En el documento de patente US 6,284,282 se describe un método para preparar una composición liofilizada por atomización para administración pulmonar que comprende partículas de una proteína terapéutica.

## Resumen

En un aspecto, la invención proporciona un método de fabricación de un polvo farmacéutico formulado de acuerdo con la reivindicación 1. De acuerdo con este aspecto, se atomiza una solución acuosa que contiene un estabilizador térmico y una glicoproteína con una relación de masa de, o entre, 1:5-2:5. Luego se aplica calor a la solución acuosa atomizada para evaporar el agua de las gotas en aerosol y formar una proteína en polvo. En una modalidad, las partículas individuales que comprenden la proteína en polvo se recubren subsecuentemente con un polímero biodegradable.

En un aspecto, la invención proporciona un método para fabricar un polvo farmacéutico formulado de acuerdo con la reivindicación 6. De acuerdo con este aspecto, se atomiza una solución acuosa que contiene un estabilizador térmico y una glicoproteína con una relación molar inferior a 300:1. Luego se aplica calor a la solución acuosa atomizada para evaporar el agua de las gotas en aerosol y formar una proteína en polvo. En una modalidad, las partículas individuales que comprenden la proteína en polvo se recubren subsecuentemente con un polímero biodegradable.

Se describe, pero no se reivindica, un método para fabricar un polvo farmacéutico formulado. De acuerdo con este aspecto, se atomiza una solución acuosa que contiene una glicoproteína sin un estabilizador térmico. Luego se aplica calor a la solución acuosa atomizada para evaporar el agua de las gotas en aerosol y formar una proteína en polvo. En una modalidad, las partículas individuales que comprenden la proteína en polvo se recubren subsecuentemente con un polímero biodegradable.

En un aspecto, la invención proporciona un polvo farmacéutico formulado de acuerdo con la reivindicación 11, que contiene 60 %-97 % (p/p) de una glicoproteína y 3 %-40 % (p/p) de un estabilizador térmico. De acuerdo con este aspecto, el polvo farmacéutico formulado no está completamente seco, y el cambio porcentual en la cantidad de especies de alto peso molecular de la glicoproteína es inferior al 5 %. En un aspecto, las partículas de proteína individuales del polvo tienen un recubrimiento de polímero biodegradable.

## Figuras

La Figura 1 es un diagrama de líneas que representa la distribución de tamaño de partículas en Diámetro Circular Equivalente (ECD) por volumen de partículas secadas por aspersión suspendidas en etanol según lo medido mediante formación de imágenes de microflujo (MFI). Las partículas se secaron por aspersión a diferentes temperaturas de entrada: 100 °C (línea de puntos y rayas); 110 °C (línea discontinua); 120 °C (línea punteada); y 130 °C (línea continua).

La Figura 2 es un diagrama de líneas que representa la distribución de tamaño en Diámetro Circular Equivalente (ECD) por volumen de partículas secadas por aspersión suspendidas en etanol según lo medido mediante formación de imágenes de microflujo (MFI). La formulación preseccada por aspersión contenía 0 % (línea de puntos y rayas), 0,03 % (línea discontinua) y 0,1 % (línea continua) p/v de polisorbato 20 (PS20).

La Figura 3 es un histograma que representa la distribución del número de partículas secadas por aspersión por relación de aspecto suspendidas en etanol según lo medido mediante formación de imágenes de microflujo (MFI). Una relación de aspecto igual a 1 representa una morfología de partículas esféricas. La formulación preseccada por aspersión contenía 0 % (histograma lleno de puntos), 0,03 % (histograma lleno de rayas diagonales) y 0,1 % (histograma lleno sólido) p/v de polisorbato 20 (PS20).

La Figura 4 es un gráfico que representa la distribución de tamaño en Diámetro Circular Equivalente (ECD) por volumen de partículas secadas por aspersión suspendidas en etanol según lo medido mediante formación de imágenes de microflujo (MFI). El proceso bajo en soluto (representado por la línea discontinua) usó una concentración de soluto aproximadamente 10 veces menor que el proceso estándar (representado por la línea continua).

La Figura 5 es un gráfico de líneas que representa la distribución de tamaño en Diámetro Circular Equivalente (ECD) por volumen de partículas secadas por aspersión (micropartículas de proteína sin recubrimiento de polímero; línea discontinua) y partículas recubiertas por aspersión (micropartículas de proteína recubiertas con polímero; línea continua) según lo medido mediante formación de imágenes de microflujo (MFI).

En la Figura 6, los paneles A y B son diagramas de puntos que representan la tasa de formación de especies de alto peso molecular (HMW) en función de la raíz cuadrada del tiempo a 50 °C medida mediante SEC-UPLC. Las tasas se representan de acuerdo con su estabilizador térmico: relación en peso de proteína (6A) y relaciones molares (6B). Las formulaciones indicadas por los cuadrados rellenos sólidos contienen solo sacarosa. Las formulaciones que contienen otros estabilizadores térmicos se representan con círculos abiertos.

## Descripción detallada

Aunque en la práctica o ensayo de la presente invención puede utilizarse cualquiera de los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente, a continuación se describen los métodos y materiales preferidos.

Un problema emergente en la industria biofarmacéutica es el suministro de formulaciones de proteínas estables a concentraciones suficientemente altas para permitir el suministro de una dosis efectiva en un volumen pequeño. Para ayudar a mantener la estabilidad de la proteína, se incluyen varios estabilizadores y otros excipientes en la

formulación. Esto presenta una compensación entre la estabilidad de la proteína y la concentración de proteína. La invención proporciona una formulación mejorada que contiene una proteína que permanece estable a alta densidad. La cantidad de proteína estable administrada por unidad de volumen aumenta sin sacrificar la estabilidad de la proteína.

5 En un aspecto, la invención proporciona un polvo farmacéutico formulado que contiene aproximadamente 60 %-97 % (p/p) de una glicoproteína y aproximadamente 3 %-40 % (p/p) de un estabilizador térmico. En otro aspecto, la invención proporciona un polvo farmacéutico formulado que contiene aproximadamente 85 %-97 % (p/p) de una glicoproteína sin un estabilizador térmico. En una modalidad de ese aspecto, el agua residual que permanece en el polvo estabiliza la proteína.

10 En algunas modalidades, el polvo farmacéutico formulado contiene 60-70 % (p/p) de glicoproteína, 60-70 % (p/p) de glicoproteína, 65-75 % (p/p) de glicoproteína, 70-80 % (p/p) de glicoproteína, 75-85 % (p/p) de glicoproteína, 80-90 % (p/p) de glicoproteína, 85-95 % (p/p) de glicoproteína, aproximadamente 60 % (p/p) de glicoproteína, 15 aproximadamente 62 % (p/p) de glicoproteína, aproximadamente 64 % (p/p) de glicoproteína, aproximadamente 66 % (p/p) de glicoproteína, aproximadamente 68 % (p/p) de glicoproteína, aproximadamente 70 % (p/p) de glicoproteína, 20 aproximadamente 72 % (p/p) de glicoproteína, aproximadamente 74 % (p/p) de glicoproteína, aproximadamente 76 % (p/p) de glicoproteína, aproximadamente 78 % (p/p) de glicoproteína, aproximadamente 80 % (p/p) de glicoproteína, aproximadamente 82 % (p/p) de glicoproteína, aproximadamente 84 % (p/p) de glicoproteína, 25 aproximadamente 86 % (p/p) de glicoproteína, aproximadamente 88 % (p/p) de glicoproteína, aproximadamente 90 % (p/p) de glicoproteína, aproximadamente 92 % (p/p) de glicoproteína, aproximadamente 94 % (p/p) de glicoproteína, aproximadamente 96 % (p/p) de glicoproteína o aproximadamente 98 % (p/p) de glicoproteína.

20 En algunas modalidades, el polvo farmacéutico formulado contiene 3-6 % (p/p) de estabilizador térmico, 5-7 % (p/p) de estabilizador térmico, 6-8 % (p/p) de estabilizador térmico, 7-9 % (p/p) p/p) de estabilizador térmico, 8-10 % (p/p) de estabilizador térmico, 9-11 % (p/p) de estabilizador térmico, 10-12 % (p/p) de estabilizador térmico, 11-13 % (p/p) de estabilizador térmico, 12-14 % (p/p) de estabilizador térmico, 13-15 % (p/p) de estabilizador térmico, 14-16 % (p/p) de estabilizador térmico, 15-17 % (p/p) de estabilizador térmico, 16-18 % (p/p) de estabilizador térmico, 17-30 19 % (p/p) de estabilizador térmico, 18-20 % (p/p) de estabilizador térmico, 19-21 % (p/p) de estabilizador térmico, 20-22 % (p/p) de estabilizador térmico, 21-23 % (p/p) de estabilizador térmico, 22-24 % (p/p) de estabilizador térmico, 23-25 % (p/p) de estabilizador térmico, 24-26 % (p/p) de estabilizador térmico, 25-27 % (p/p) de estabilizador térmico, 22-24 % (p/p) de estabilizador térmico, 23-25 % (p/p) de estabilizador térmico, 25-27 % (p/p) de estabilizador térmico, 22-24 % (p/p) de estabilizador térmico, 23-25 % (p/p) de estabilizador térmico, 24-26 % (p/p) de estabilizador térmico, 25-27 % (p/p) de estabilizador térmico, 26-35 28 % (p/p) de estabilizador térmico, 27-29 % (p/p) de estabilizador térmico, 28-30 % (p/p) de estabilizador térmico, 29-31 % (p/p) de estabilizador térmico, 30-32 % (p/p) de estabilizador térmico, 31-33 % (p/p) de estabilizador térmico, 32-34 % (p/p) de estabilizador térmico, 33-35 % (p/p) de estabilizador térmico, 34-36 % (p/p) de estabilizador térmico, 35-37 % (p/p) de estabilizador térmico, 36-38 % (p/p) de estabilizador térmico, 37-39 % (p/p) 40 de estabilizador térmico, 38-40 % (p/p) de estabilizador térmico o 39-41 % (p/p) de estabilizador térmico.

45 En algunas modalidades, el polvo farmacéutico formulado de la invención contiene una población de partículas de proteína a escala micrométrica. Las partículas de proteína a escala micrométrica que constituyen el polvo pueden denominarse en la presente descripción como "partículas que contienen proteína micronizada", "partículas de proteína", "micropartículas de proteína", "micropartículas", "población de partículas que contienen proteína micronizada", "población de partículas de proteínas", "población de micropartículas de proteínas", "población de micropartículas", "micropartículas de proteínas constituyentes en polvo" o "micropartículas de proteínas constituyentes".

50 En algunas modalidades, el polvo formulado en cuestión fluye libremente en condiciones de almacenamiento de rutina y durante las operaciones de llenado farmacéutico. En algunas modalidades, el polvo en cuestión tiene una relación de Hausner (es decir, la relación entre la densidad del polvo roscado y la densidad en masa aparente del polvo) en condiciones de operación de llenado o condiciones de almacenamiento de < 1,5, < 1,45, < 1,4, < 1,35, < 1,3, < 1,25, < 1,2, < 1,15 o < 1,1.

55 En algunas modalidades, el método preferido para determinar la fluidez del polvo es mediante un ensayo de vial giratorio. Un vial de vidrio transparente se llena parcialmente con el polvo farmacéutico formulado, luego el vial se gira sobre su eje vertical. Un polvo que es capaz de girar libremente mientras gira el vial es fluido. Un polvo que tiene cierta cantidad de carga estática que hace que se adhiera a las paredes del vial o que requiera un ligero golpeteo o eliminación de estática para hacerlo girar mientras gira el vial se considera fluido en algunas modalidades. En algunas modalidades, el polvo puede fluir donde < 30 %, < 25 %, < 20 %, < 15 %, < 10 % o < 5 % de la superficie interna del vial se cubre con polvo después de la rotación del vial. En algunas modalidades, el polvo es fluido donde las partículas constituyentes que se adhirieron a las paredes del vial después de la rotación se eliminan de las paredes del vial cuando el vial se golpea contra una superficie dura o con un dedo 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces o 10 veces. En algunas modalidades, el polvo puede fluir donde las partículas constituyentes que se adhirieron a las paredes del vial después de la rotación se eliminan

de las paredes del vial cuando el vial se golpea con una fuerza acumulativa de  $\leq$  25 micronewtons ( $\mu$ N), aproximadamente 25  $\mu$ N, aproximadamente 20  $\mu$ N, aproximadamente 15  $\mu$ N, aproximadamente 10  $\mu$ N, aproximadamente 9  $\mu$ N, aproximadamente 8  $\mu$ N, aproximadamente 7  $\mu$ N, aproximadamente 6  $\mu$ N, aproximadamente 5  $\mu$ N, aproximadamente 4  $\mu$ N, aproximadamente 3  $\mu$ N, aproximadamente 2  $\mu$ N, aproximadamente 1  $\mu$ N o  $< 1 \mu$ N. En algunas modalidades, un polvo en el que la gran mayoría de las partículas constituyentes se adhieren a las paredes de los viales debido a las fuerzas estáticas y no se volcarán, no puede fluir. En algunas modalidades, un polvo de referencia preferido que representa un polvo fluido consta de perlas de vidrio de 50-150  $\mu$ m (estándar Malvern QA, parte # CRM0016, producido por Whitehouse Scientific, Chester, Reino Unido).

10 En algunas modalidades, la fluidez del polvo se mide por ángulo de reposo, compresibilidad (por ejemplo, la relación de Hausner), flujo en un tambor giratorio, flujo a través de un orificio, análisis de células de cizallamiento, reometría o tasa de dispensación. En algunas modalidades, la fluidez se mide con un Analizador de Polvo REVOLUTION (Mercury Scientific Inc., Newtown, CT), un Probador de Polvo EVOLUTION (Mercury), un Probador de Flujo de Polvo VOLUTIÓN (Mercury) o un Probador de Fluidez FT 300 (Sotax AG, Aesch, CH.) Rao y otros, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, volumen 74, número 2, febrero de 2010, páginas 388-396, mencionado en la  
15 presente con respecto a la determinación del régimen de flujo por rotación del tambor y avalanchas.

En algunas modalidades, la fluidez se determina mediante el flujo a través de un orificio. En algunas modalidades donde la cantidad de polvo es limitante (por ejemplo, 1-2 gramos o menos), el flujo a través de un orificio se realiza mediante la ruptura iterativa de las estructuras de la bóveda seguida del flujo del polvo a través de un orificio (por ejemplo, 3 mm) y las mediciones del peso del polvo que pasa por el orificio en función del tiempo. El régimen de flujo se informa en miligramos por segundo. En algunas modalidades, el polvo farmacéutico formulado puede fluir cuando el régimen de flujo a través de un orificio de 3 mm es  $\geq 10$  mg/seg,  $\geq 15$  mg/seg,  $\geq 20$  mg/seg,  $\geq 25$  mg/seg,  $\geq 30$  mg/seg,  $\geq 35$  mg/seg,  $\geq 40$  mg/seg,  $\geq 45$  mg/seg,  $\geq 50$  mg/seg,  $\geq 55$  mg/seg,  $\geq 60$  mg/seg,  $\geq 65$  mg/seg,  $\geq 70$  mg/seg,  $\geq 75$  mg/seg,  $\geq 80$  mg/seg,  $\geq 85$  mg/seg,  $\geq 90$  mg/seg,  $\geq 95$  mg/seg o  $\geq 100$  mg/seg. Seppälä y otros, AAPS PharmSciTech, Vol. 11, Núm. 1, marzo de 2010, páginas 402-408, mencionado en la presente con respecto a la caracterización de la fluidez de la mezcla de fármaco y excipiente mediante el régimen de flujo a través de un orificio.

30 La micropartícula de proteína componente del polvo farmacéutico formulado en cuestión puede tener una forma  
aproximadamente esférica. Algunas micropartículas de proteína se acercan a la esfericidad, mientras que otras  
micropartículas de proteína tienen una forma más irregular. La forma de las micropartículas de proteína puede  
determinarse, entre otras cosas, mediante dispersión de luz estática (DLS), formación de imágenes de microflujo  
(MFI) o difracción láser. La DLS se basa en medir la intensidad de la luz dispersada en varios ángulos diferentes  
como resultado de la luz intensa dirigida a una suspensión de partículas. Luego se aplica la ecuación de Fraunhofer  
a los datos de dispersión para determinar el tamaño y la forma de las micropartículas de proteína. El documento US  
5,104,221 A se menciona en la presente con respecto a la aplicación de la ecuación de Fraunhofer para determinar  
el tamaño y la forma de partículas a escala micrométrica. La DLS generalmente se aplica a objetos de 1 micra o  
menos. La MFI se basa en una serie de imágenes de campo claro de partículas obtenidas de una corriente de  
muestra que pasa a través de una celda de flujo. Las imágenes se analizan para determinar el tamaño de las  
partículas y la circularidad o relación de aspecto. La circularidad se refiere a cuán redonda o esférica es la  
micropartícula de proteína, y se expresa en una escala de 0-1, donde 1 es perfectamente esférica. El término  
"relación de aspecto", que generalmente connota el largo por el ancho de un objeto, se usa indistintamente con  
"circularidad". La relación de aspecto puede expresarse como la relación entre la longitud del eje menor y la longitud  
del eje mayor. Por lo tanto, una partícula más esférica tiene una "relación de aspecto" más cercana a 1 (por ejemplo,  
0,98).

La difracción láser es otro método basado en la difracción de Fraunhofer que se usa para determinar la forma y el tamaño de las partículas en el intervalo de 1-100 micras. La luz láser pasa a través de la suspensión de partículas y una lente intermedia enfoca la luz difractada en un sensor. De Boer y otros, Int. J. Pharmaceutics, 249 (1-2): 219-231 (2002) se menciona en la presente con respecto al tamaño de partículas mediante la difracción láser. En una modalidad, la distribución de tamaño de la micropartícula de proteína constituyente en polvo se determina mediante difracción láser mediante el uso de un analizador de tamaño de partículas láser Malvern MASTERSIZER 3000 (Malvern, Reino Unido).

55 En algunas modalidades, la forma de la micropartícula de proteína es aproximadamente esférica. En una  
modalidad, la relación de aspecto de la micropartícula de proteína es  $\geq 0,80$ . En otra modalidad, la relación de  
aspecto de la micropartícula de proteína es de aproximadamente 0,90 a aproximadamente 0,98. La forma de la  
micropartícula de proteína puede determinarse, entre otras cosas, mediante formación de imágenes de microflujo  
60 (MFI).

Como se usa en la presente, el término "diámetro" de una micropartícula de componente de polvo incluye el significado de cualquiera de los siguientes: (a) el diámetro de una esfera que circunscribe la micropartícula, (b) el diámetro de la esfera más grande que cabe dentro de los límites de la micropartícula o el núcleo de la proteína, (c) cualquier medida entre la esfera circunscrita de (a) y la esfera confinada de (b), que incluye la media entre los dos, (d) la longitud del eje más largo de la micropartícula, (e) la longitud del eje más corto de la micropartícula, (f)

cualquier medida entre la longitud de la eje largo (d) y la longitud del eje corto (e), que incluye la media entre los dos, y/o (g) diámetro circular equivalente ("ECD"), según lo determinado mediante MFI, métodos de oscurecimiento de la luz como la DLS, o similar. La MFI y la DLS se describen generalmente en Sharma y otros, "Micro-flow imaging: flow microscopy applied to subvisible particulate analysis in protein formulations", 12(3) AAPS J. 455-64 (2010); y B.J. Frisken, "Revisiting the Method of Cumulants for the Analysis of Dynamic Light-Scattering Data", 40(24) Applied Optics 4087-91 (2001) mencionados en la presente con respecto a las imágenes de microflujo y a la dispersión dinámica de la luz. El diámetro generalmente se expresa en micrómetros ( $\mu\text{m}$  o micras).

La micropartícula de proteína del polvo farmacéutico formulado en cuestión puede tener una forma aproximadamente esférica y tener un diámetro que oscila entre 2 micras a aproximadamente 45 micras. En una modalidad, la mayoría de las micropartículas de proteína del polvo tienen un diámetro inferior a 10 micras según lo determinado mediante MFI. En algunas modalidades, el tamaño de micropartícula de proteína modal del polvo farmacéutico formulado en cuestión es de 1-10  $\mu\text{m}$ , 2-10  $\mu\text{m}$ , 3-10  $\mu\text{m}$ , 4-10  $\mu\text{m}$ , 5-10  $\mu\text{m}$ , 6-10  $\mu\text{m}$ , 7-10  $\mu\text{m}$ , 8-10  $\mu\text{m}$ , 9-10  $\mu\text{m}$ , 1-9  $\mu\text{m}$ , 1-8  $\mu\text{m}$ , 1-7  $\mu\text{m}$ , 1-6  $\mu\text{m}$ , 1-5  $\mu\text{m}$ , 1-4  $\mu\text{m}$ , 1-3  $\mu\text{m}$ , 1-2  $\mu\text{m}$ , 2-9  $\mu\text{m}$ , 2-8  $\mu\text{m}$ , 2-7  $\mu\text{m}$ , 2-6  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 1  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 1,5  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 2  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 2,5  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 3  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 3,5  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 4  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 4,5  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 5,5  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 6  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 6,5  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 7  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 7,5  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 8  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 8,5  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 9  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 9,5  $\mu\text{m}$  o aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ .

En algunas modalidades, el diámetro de la micropartícula de proteína es < 50  $\mu\text{m}$ . En una modalidad, el diámetro de la micropartícula de proteína es < 12  $\mu\text{m}$ . En otra modalidad, el diámetro de la micropartícula de proteína es < 10  $\mu\text{m}$ . En aún otra modalidad, el diámetro de la micropartícula de proteína es de aproximadamente 0,5  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 7,0  $\mu\text{m}$ . En una modalidad específica, el diámetro de la micropartícula de proteína es de aproximadamente 5,0  $\mu\text{m}$ . En otra modalidad específica, el diámetro de la micropartícula de proteína es de aproximadamente 2,5  $\mu\text{m}$ . El diámetro de las micropartículas de proteína puede determinarse, entre otras cosas, mediante MFI o dispersión de luz estática.

El diámetro de la micropartícula de proteína se correlaciona positivamente con el volumen de la micropartícula de proteína. Por ejemplo, una esfera perfecta de 10 micras mide aproximadamente  $5 \times 10^{-4}$  nanolitros, y una esfera perfecta de 5 micras mide aproximadamente  $7 \times 10^{-5}$  nanolitros. En algunas modalidades, el volumen de micropartículas de proteína modal del polvo farmacéutico formulado en cuestión es  $5 \times 10^{-7}$  -  $5 \times 10^{-4}$  nl,  $10^{-6}$  -  $5 \times 10^{-4}$  nl,  $5 \times 10^{-6}$  -  $5 \times 10^{-4}$  nl,  $10^{-5}$  -  $5 \times 10^{-4}$  nl,  $5 \times 10^{-5}$  -  $5 \times 10^{-4}$  nl,  $10^{-4}$  -  $5 \times 10^{-4}$  nl, alrededor de  $5 \times 10^{-7}$  nl, alrededor de  $6 \times 10^{-7}$  nl, alrededor de  $7 \times 10^{-7}$  nl, alrededor de  $8 \times 10^{-7}$  nl, alrededor de  $9 \times 10^{-7}$  nl, alrededor de  $10^{-6}$  nl, alrededor de  $2 \times 10^{-6}$  nl o alrededor de  $3 \times 10^{-6}$  nl, alrededor de  $4 \times 10^{-6}$  nl, alrededor de  $5 \times 10^{-6}$  nl o alrededor de  $6 \times 10^{-6}$  nl, alrededor de  $7 \times 10^{-6}$  nl, alrededor de  $8 \times 10^{-6}$  nl o alrededor de  $9 \times 10^{-6}$  nl, alrededor de  $10^{-5}$  nl, alrededor de  $2 \times 10^{-5}$  nl o alrededor de  $3 \times 10^{-5}$  nl, alrededor de  $4 \times 10^{-5}$  nl, alrededor de  $5 \times 10^{-5}$  nl o alrededor de  $6 \times 10^{-5}$  nl, alrededor de  $7 \times 10^{-5}$  nl, alrededor de  $8 \times 10^{-5}$  nl o alrededor de  $9 \times 10^{-5}$  nl, alrededor de  $10^{-4}$  nl, alrededor de  $2 \times 10^{-4}$  nl o alrededor de  $3 \times 10^{-4}$  nl, alrededor de  $4 \times 10^{-4}$  nl, alrededor de  $5 \times 10^{-4}$  nl o alrededor de  $6 \times 10^{-4}$  nl, alrededor de  $7 \times 10^{-4}$  nl, alrededor de  $8 \times 10^{-4}$  nl o alrededor de  $9 \times 10^{-4}$  nl o  $10^{-3}$  nl.

S describe, pero no se reivindica, que el polvo farmacéutico formulado está "completamente seco". Un polvo que está completamente seco puede contener hasta un 3 % (p/p) de agua. En algunas modalidades, un polvo completamente seco contiene ≤ 3 % (p/p) de agua, ≤ 2,9 % (p/p) de agua, ≤ 2,8 % (p/p) de agua, ≤ 2,7 % (p/p) de agua, ≤ 2,6 % (p/p) de agua, ≤ 2,5 % (p/p) de agua, ≤ 2,4 % (p/p) de agua, ≤ 2,3 % (p/p) de agua, ≤ 2,2 % (p/p) de agua, ≤ 2,1 % (p/p) de agua, ≤ 2,0 % (p/p) de agua, ≤ 1,9 % (p/p) de agua, ≤ 1,8 % (p/p) de agua, ≤ 1,7 % (p/p) de agua, ≤ 1,6 % (p/p) de agua, ≤ 1,5 % (p/p) de agua, ≤ 1,4 % (p/p) de agua, ≤ 1,3 % (p/p) de agua, ≤ 1,2 % (p/p) de agua, ≤ 1,1 % (p/p) de agua, ≤ 1,0 % (p/p) de agua, ≤ 0,9 % (p/p) de agua, ≤ 0,8 % (p/p) de agua, ≤ 0,7 % (p/p) de agua, ≤ 0,6 % (p/p) de agua, ≤ 0,5 % (p/p) de agua, ≤ 0,4 % (p/p) de agua, ≤ 0,3 % (p/p) de agua, ≤ 0,2 % (p/p) de agua o ≤ 0,1 % (p/p) de agua. En algunas modalidades, un polvo completamente seco contiene aproximadamente 3 % (p/p) de agua, aproximadamente 2,5 % (p/p) de agua, aproximadamente 2 % (p/p) de agua, aproximadamente 1,5 % (p/p) de agua, aproximadamente 1 % (p/p) de agua, aproximadamente 0,5 % (p/p) de agua o aproximadamente 0 % (p/p) de agua. En algunas modalidades, un polvo completamente seco contiene 0 %-3 % (p/p) de agua, 0,05 %-3 % (p/p) de agua, 0,5 %-3 % (p/p) de agua, 1 %-3 % (p/p) de agua, 2 %-3 % (p/p) de agua, 0 %-2 % (p/p) de agua, 0,05 %-2 % (p/p) de agua, 0,5 %-2 % (p/p) de agua, 1 %-2 % (p/p) de agua, 0 %-1 % (p/p) de agua, 0,05 %-1 % (p/p) de agua o 0,5 %-1 % (p/p) de agua.

En otra modalidad, el polvo farmacéutico formulado proporcionado no está completamente seco. En algunas modalidades, el polvo farmacéutico formulado proporcionado que no está totalmente seco no contiene más del 10% (p/p) de agua. En algunas modalidades, el polvo farmacéutico formulado proporcionado que no está totalmente seco contiene más del 3% (p/p) de agua y no más del 10% (p/p) de agua, 3,5%-10% (p/p) de agua, 4%-10% (p/p) de agua, 4,5%-10% (p/p) de agua, 5%-10% (p/p) de agua, 5,5%-10% (p/p) de agua, 6%-10% (p/p) de agua, 6,5%-10% (p/p) de agua, 7%-10% (p/p) de agua, 7%-10% (p/p) de agua, 7%-10% (p/p) de agua, 5%-10% (p/p) de agua, 7%-10% (p/p) de agua, 8%-10% (p/p) de agua, 8,5%-10% (p/p) de agua, 9%-10% (p/p) de agua, 9,5%-10% (p/p) de agua. 5%-10% (p/p) agua, >3%-9% (p/p) agua, >3%-9% (p/p) agua, >3%-8,5% (p/p) agua, >3%-8% (p/p) agua, >3%-7,5% (p/p) agua, >3%-7% (p/p) agua, >3%-6,5% (p/p) agua, > 3 %-6 % (p/p) de agua, >

5        3 %-5,5 % (p/p) de agua, > 3 %-5 % (p/p) agua, > 3 %-4,5 % (p/p) agua, > 3 %-4 % (p/p) agua, > 3 %-3,5 % (p/p) agua, aproximadamente 3,1 % (p/p) agua, aproximadamente 3,5 % (p/p) de agua, aproximadamente 4 % (p/p) de agua, aproximadamente 4,5 % (p/p) de agua, aproximadamente 5 % (p/p) de agua, aproximadamente 5,5 % (p/p) de agua, aproximadamente 6 % (p/p) de agua, aproximadamente 6,5% (p/p) de agua, aproximadamente 7% (p/p) de agua, aproximadamente 7,5% (p/p) de agua, aproximadamente 8% (p/p) de agua, aproximadamente 8,5% (p/p) de agua, aproximadamente 9% (p/p) de agua, aproximadamente 9,5% (p/p) de agua o aproximadamente 10% (p/p) de agua.

10      En algunas modalidades, el polvo farmacéutico formulado proporcionado puede contener hasta un 10% (p/p) de agua. En algunas modalidades, el polvo contiene ≤ 10% (p/p) de agua, ≤ 9,5% (p/p) de agua, ≤ 9% (p/p) de agua, ≤ 8,5% (p/p) de agua, ≤ 8% (p/p) de agua, ≤ 7,5% (p/p) de agua, ≤ 7% (p/p) de agua, ≤ 6,5% (p/p) de agua, ≤ 6% (p/p) de agua, ≤ 5,5% (p/p) de agua, ≤ 5% (p/p) de agua, ≤ 4,5% (p/p) de agua, ≤ 4% (p/p) de agua, ≤ 3,5% (p/p) de agua, ≤ 3% (p/p) de agua., ≤ 2,5% (p/p) de agua, ≤ 2% (p/p) de agua, ≤ 1,5% (p/p) de agua, ≤ 1% (p/p) de agua o ≤ 0,5 % (p/p) de agua. En algunas modalidades, el polvo contiene aproximadamente 10% (p/p de agua), aproximadamente 9,5% (p/p) de agua, aproximadamente 9% (p/p) de agua, aproximadamente 8,5% (p/p) de agua, aproximadamente 8% (p/p) de agua, aproximadamente 7,5% (p/p) de agua, aproximadamente 7% (p/p) de agua, aproximadamente 6,5% (p/p) de agua, aproximadamente 6 % (p/p) de agua, aproximadamente 5,5 % (p/p) de agua, aproximadamente 5 % (p/p) de agua, aproximadamente 4,5 % (p/p) de agua, aproximadamente 4 % (p/p) de agua, aproximadamente 3,5 % (p/p) de agua, aproximadamente 3 % (p/p) de agua, aproximadamente 2,5% (p/p) de agua, aproximadamente 2% (p/p) de agua, aproximadamente 1,5% (p/p) de agua, aproximadamente 1% (p/p) de agua, aproximadamente 0,5% (p/p) de agua o aproximadamente 0% (p/p) de agua. En algunas modalidades, el polvo contiene 0,01%-10% (p/p) de agua, 0,01%-3% (p/p) de agua, 0,5%-4% (p/p) de agua, 3%-10% (p/p) de agua, 0%-3% (p/p) de agua, 0,5%-3,5% (p/p) de agua, 1%-4% (p/p) de agua, 1,5%-4,5% (p/p) de agua, 2%-5% (p/p) de agua, 2,5%-5,5% (p/p) de agua, 3%-6% (p/p) de agua, 3,5%-6,5% (p/p) de agua, 4%-7% (p/p) de agua, 4,5%-7,5% (p/p) de agua, 5%-8% (p/p) de agua, 5,5%-8,5% (p/p) de agua, 6%-9% (p/p) de agua, 6,5%-9,5% (p/p) de agua o 7%-10% (p/p) de agua.

30      El contenido de agua de las micropartículas puede determinarse mediante uno cualquiera o más métodos conocidos en la técnica. Esos métodos incluyen métodos gravimétricos, que incluyen termogravimetría, cromatografía de gases, espectroscopía de infrarrojo cercano, culombimetría y el método de Karl Fischer. Estos métodos se revisan en J.K. Townes, "Moisture content in proteins: its effects and measurement", 705 J. Chromatography A 115-127, 1995, y las referencias citadas en este. Por ejemplo, puede usarse el método de Pérdida por Secado (LOD) (gravimétrico) en el que las micropartículas se pesan, se someten a calentamiento para eliminar el agua y otros volátiles y luego se pesan nuevamente. La pérdida de masa se atribuye al agua (y otros volátiles) contenida dentro del material de partida. La espectroscopia de infrarrojo cercano mide la reflectancia de 1100 nm a 2500 nm a través de un vial de vidrio (superficie de vidrio) que contiene la proteína para determinar el contenido de humedad sin destruir la muestra. Ver Farmacopea de los Estados Unidos, XXIII Revisión, Convención USP, Rockville, MD 1995, págs. 1801-1802; y Salvaje y otros, "Determination of Adequate Moisture Content for Efficient Dry-Heat Viral Inactivation in Lyophilized Factor VIII by Loss on Drying and by Near Infrared Spectroscopy", 26 Biologicals 119-124, 1998. Un método preferido para determinar el contenido de agua es el método de Karl Fischer (volumétrico o culombimétrico), que determina la cantidad de H<sub>2</sub>O al medir la oxidación de SO<sub>2</sub> por I<sub>2</sub>, en donde un mol de I<sub>2</sub> se consume por cada mol de H<sub>2</sub>O.

40      El agua puede estabilizar o contribuir de cualquier otra manera a la estabilidad de la proteína del polvo farmacéutico formulado en cuestión y, en algunas modalidades, reemplazar el estabilizador térmico.

45      45 En una modalidad, la glicoproteína proporcionada en el polvo farmacéutico formulado es estable. El término "estable" o "estabilidad" se refiere a la retención de un grado aceptable de estructura física y química o función biológica de la glicoproteína después del almacenamiento en condiciones definidas, o después de la deposición en un entorno fisiológicamente relevante. La proteína puede ser estable aunque no mantenga el 100 % de su estructura química o función biológica después del almacenamiento o depósito durante un período de tiempo definido. En determinadas circunstancias, el mantenimiento de aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 % o aproximadamente 99 % de la estructura o función de la proteína después del almacenamiento o deposición durante un período de tiempo definido puede considerarse como "estable".

55      55 La estabilidad puede medirse entre otras cosas mediante la determinación del porcentaje de molécula nativa que permanece en la formulación después del almacenamiento o deposición en un paciente durante un período de tiempo definido a una temperatura definida. El porcentaje de proteína que conserva su conformación nativa puede determinarse, entre otras cosas, mediante cromatografía de exclusión por tamaño (por ejemplo, cromatografía líquida de alta resolución de exclusión por tamaño [SE-HPLC]). Para determinar la estabilidad de la proteína, en una modalidad, el polvo farmacéutico formulado en cuestión se solubiliza y luego la proteína se somete a prueba. La proteína nativa incluye la proteína que no está agregada ni degradada. En algunas modalidades, al menos aproximadamente el 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de la forma nativa de la proteína puede detectarse en el polvo farmacéutico formulado proporcionado después del almacenamiento durante un período de

tiempo definido a una temperatura definida o en condiciones fisiológicas después de la deposición dentro del paciente (por ejemplo, implantación).

La proteína agregada puede detectarse como especies que migran como especies de alto peso molecular en un gel o tamiz cromatográfico. El término especie o proteína de "alto peso molecular" o "HMW" puede usarse indistintamente con "agregado", "agregados" o "proteína agregada". Una proteína estable del polvo farmacéutico formulado en cuestión experimenta un aumento en la tasa de formación de especies de HMW (también conocida como tasa de agregación) de < 10 % por mes<sup>1/2</sup>, < 9 % por mes<sup>1/2</sup>, < 8 % por mes<sup>1/2</sup>, < 7 % por mes<sup>1/2</sup>, < 6 % por mes<sup>1/2</sup>, < 5 % por mes<sup>1/2</sup>, < 4 % por mes<sup>1/2</sup>, < 3 % por mes<sup>1/2</sup>, < 2 % por mes<sup>1/2</sup> o < 1 % por mes<sup>1/2</sup>. En una modalidad preferida, la tasa de agregación de la proteína proporcionada en el polvo farmacéutico formulado es < 5 % por mes<sup>1/2</sup>.

El período de tiempo definido después del cual se mide la estabilidad puede ser de al menos 14 días, al menos 28 días, al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 5 meses, al menos 6 meses, al menos 7 meses, al menos 8 meses, al menos 9 meses, al menos 10 meses, al menos 11 meses, al menos 12 meses, al menos 18 meses, al menos 24 meses o más. La temperatura a la que pueden mantenerse las micropartículas al evaluar la estabilidad puede ser cualquier temperatura de aproximadamente -80 °C hasta aproximadamente 50 °C, por ejemplo, almacenamiento a aproximadamente -80 °C, aproximadamente -30 °C, aproximadamente -20 °C, aproximadamente 0 °C, aproximadamente 4 °C-8 °C, aproximadamente 5 °C, aproximadamente 25 °C u otras temperaturas ambientales, aproximadamente 35 °C, alrededor de 37 °C u otras temperaturas fisiológicas, alrededor de 45 °C o alrededor de 50 °C.

La estabilidad puede medirse mediante la determinación del porcentaje de proteína que forma un agregado (es decir, especies de alto peso molecular) después de un período de tiempo definido a una temperatura definida, en donde la estabilidad es inversamente proporcional al por ciento de especies de alto peso molecular (HMW) que se forman. El porcentaje de especies de HMW de la proteína puede determinarse mediante cromatografía de exclusión por tamaño después de la solubilización, como se describió anteriormente. Una micropartícula de proteína también puede considerarse estable si después de tres meses a temperatura ambiente es inferior al 25 %, 24 %, 23 %, 22 %, 21 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 % o 0,1 % de la proteína se detecta en una forma de HMW. Preferentemente, < 10 %, < 5 % o < 2 % de la proteína proporcionada en el polvo farmacéutico formulado está presente como una especie HMW.

La estabilidad puede medirse mediante la determinación del porcentaje de proteína que se degrada o se encuentra de cualquier otra manera como una especie de bajo peso molecular (LMW) dentro de la micropartícula después de un período de tiempo definido a una temperatura definida, en donde la estabilidad es inversamente proporcional al por ciento de especies de LMW que se detecta en la micropartícula solubilizada. El porcentaje de especies de LMW de la proteína puede determinarse mediante cromatografía de exclusión por tamaño, como se describió anteriormente. Una micropartícula de proteína también puede considerarse estable si después de tres meses a temperatura ambiente menos de 25 %, 24 %, 23 %, 22 %, 21 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 % o 0,1 % de la primera molécula se detecta en una forma de LMW.

En algunas modalidades, el polvo farmacéutico formulado en cuestión contiene un tampón. Los tampones son bien conocidos en la técnica. En general, se incluye un tampón en la materia prima de la solución de proteína acuosa usada para preparar el polvo en cuestión. En algunas modalidades, el tampón se incluye en la materia prima a una concentración de 1 mM a 100 mM. En algunas modalidades particulares, el tampón se incluye en la materia prima a aproximadamente 10 mM. En determinadas modalidades, el tampón está presente en la materia prima a una concentración de 5 mM ± 0,75 mM a 15 mM ± 2,25 mM; 6 mM ± 0,9 mM a 14 mM ± 2,1 mM; 7 mM ± 1,05 mM a 13 mM ± 1,95 mM; 8 mM ± 1,2 mM a 12 mM ± 1,8 mM; 9 mM ± 1,35 mM a 11 mM ± 1,65 mM; 10 mM ± 1,5 mM o alrededor de 10 mM. En algunas modalidades, el sistema tampón de la materia prima comprende histidina, fosfato y/o acetato a 10 mM ± 1,5 mM.

En algunas modalidades, el tampón está presente en el polvo farmacéutico formulado en cuestión a una concentración de ≤ 10 % (p/p), ≤ 9,5 % (p/p), ≤ 9 % (p/p), ≤ 8,5 % (p/p), ≤ 8 % (p/p), ≤ 7,5 % (p/p), ≤ 7 % (p/p), ≤ 6,5 % (p/p), ≤ 6 % (p/p), ≤ 5,5 % (p/p), ≤ 5 % (p/p), ≤ 4,5 % (p/p), ≤ 4 % (p/p), ≤ 3,5 % (p/p), ≤ 3 % (p/p) p, ≤ 2,5 % (p/p), ≤ 2 % (p/p), ≤ 1,5 % (p/p), ≤ 1 % (p/p) o ≤ 0,5 % (p/p). En algunas modalidades, el tampón está presente en el polvo farmacéutico formulado en cuestión a una concentración de 0,1-0,5 % (p/p), 0,5-1 % (p/p), 0,5-1,5 % (p/p), 1-2 % (p/p), 1,5-2,5 % (p/p), 2-3 % (p/p), 2,5-3,5 % (p/p), 3-4 % (p/p), 3,5-4,5 % (p/p), 4-5 % (p/p), 4,5-5,5 % (p/p), 5-6 % (p/p), 5,5-6,5 % (p/p), 6-7 % (p/p), 6,5-7,5 % (p/p), 8-9 % (p/p), 8,5-9,5 % (p/p) o 9-10 % (p/p).

En algunas modalidades, el tampón se selecciona de tampones que se encuentran incluidos dentro del intervalo de pH de aproximadamente 3 a aproximadamente 9, o dentro del intervalo de pH de aproximadamente 3,7 a aproximadamente 8,0. Por ejemplo, la materia prima de solución acuosa que contiene proteína puede tener un pH de aproximadamente 3,4, aproximadamente 3,6, aproximadamente 3,8, aproximadamente 4,0, aproximadamente 4,2, aproximadamente 4,4, aproximadamente 4,6, aproximadamente 4,8, aproximadamente 5,0, aproximadamente 5,2, aproximadamente 5,4, aproximadamente 5,6, aproximadamente 5,8, aproximadamente 6,0, aproximadamente

6,2, aproximadamente 6,4, aproximadamente 6,6, aproximadamente 6,8, aproximadamente 7,0, aproximadamente 7,2, aproximadamente 7,4, aproximadamente 7,6, aproximadamente 7,8 o aproximadamente 8,0.

El amortiguador puede ser una combinación de amortiguadores individuales, tal como, por ejemplo, la combinación de histidina y acetato (tampón his-acetato). En una modalidad, el tampón tiene un intervalo de tamponamiento de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 6, o de aproximadamente 3,7 a aproximadamente 5,6, tal como el intervalo tamponado por acetato. En una modalidad, el tampón tiene un intervalo de tamponamiento de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 8,5, o de aproximadamente 5,8 a aproximadamente 8,0, tal como el intervalo tamponado por fosfato. En una modalidad, el tampón tiene un intervalo de tamponamiento de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 8,0, o de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 7,4, tal como el intervalo tamponado por histidina.

En una modalidad, el producto farmacéutico formulado en cuestión no contiene un tampón adicional. En este caso, la proteína incluida, el estabilizador térmico, si está presente, o el agua proporcionan cualquier capacidad de amortiguación del material de alimentación acuoso, en polvo o líquido.

También puede incluirse un surfactante (uno o más) en la materia prima acuosa que contiene proteína en premicropartículas. Como se usa en la presente, el término "surfactante" significa una sustancia que reduce la tensión superficial de un fluido en el que se disuelve y/o reduce la tensión interfacial entre el aceite y el agua. Los surfactantes pueden ser iónicos o no iónicos. Los surfactantes no iónicos ilustrativos que pueden incluirse en la materia prima (y subsecuentemente en el polvo farmacéutico formulado) incluyen, por ejemplo, alquil polí(óxido de etileno), alquil poliglucósidos (por ejemplo, octil glucósido y decil maltósido), alcoholes grasos tales como alcohol cetílico y alcohol olefílico, cocamida MEA, cocamida DEA y cocamida TEA. Los surfactantes no iónicos específicos que pueden incluirse en la materia prima incluyen, por ejemplo, ésteres de polioxietilensorbitán (también conocidos como polisorbatos) como polisorbato 20, polisorbato 28, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 65, polisorbato 80, polisorbato 81 y polisorbato 85; poloxámeros tales como poloxámero 188, poloxámero 407; polietilenopolipropilenglicol; o polietilenglicol (PEG). El polisorbato 20 también se conoce como TWEEN 20, monolaurato de sorbitán y monolaurato de polioxietilensorbitán. Se reivindican surfactantes no iónicos seleccionados del grupo que consiste en óxido de alquil polietileno, alquil poliglucósidos, alcoholes grasos, cocamida MEA, cocamida DEA, cocamida TEA, ésteres de sorbitán polioxietilenados; poloxámeros, poloxámero 188, poloxámero 407, polietileno-polipropilenglicol y polietilenglicol.

La cantidad de surfactante contenido dentro de la solución de materia prima puede variar en dependencia de las propiedades específicas y los propósitos deseados del polvo. Las propiedades a granel del polvo, como la fluidez, pueden afectarse por la regulación del contenido de surfactante. Sin pretender limitarse a la teoría, el surfactante afecta a la interfaz aire-superficie de las goticas de proteína acuosa (precursor del polvo en cuestión) al reducir la tensión superficial. Las concentraciones más altas de surfactante producen micropartículas de proteína más redondas y suaves, lo que puede mejorar la fluidez. Las concentraciones más bajas de surfactante producen micropartículas de proteína menos redondas y con más hoyuelos.

En determinadas modalidades, la solución acuosa precursora que contiene la proteína en cuestión puede contener aproximadamente un 0,015 % (p/v) a aproximadamente un 0,1 % (p/v) de surfactante (por ejemplo, polisorbato 20 o polisorbato 80). Por ejemplo, la materia prima puede contener alrededor de 0,015%; aproximadamente 0,016%; aproximadamente 0,017%; aproximadamente 0,018%; aproximadamente 0,019%; aproximadamente 0,02%; aproximadamente 0,021%; aproximadamente 0,022%; aproximadamente 0,023%; aproximadamente 0,024%; aproximadamente 0,025%; aproximadamente 0,026%; aproximadamente 0,027%; aproximadamente 0,028%; aproximadamente 0,029%; aproximadamente 0,03%; aproximadamente 0,031%; aproximadamente 0,032%; aproximadamente 0,033%; aproximadamente 0,034%; aproximadamente 0,035%; aproximadamente 0,036%; aproximadamente 0,037%; aproximadamente 0,038%; aproximadamente 0,039%; aproximadamente 0,04%; aproximadamente 0,041%; aproximadamente 0,042%; aproximadamente 0,043%; aproximadamente 0,044%; aproximadamente 0,045%; aproximadamente 0,046%; aproximadamente 0,047%; aproximadamente 0,048%; aproximadamente 0,049%; aproximadamente 0,05%; aproximadamente 0,051%; aproximadamente 0,052%; aproximadamente 0,053%; aproximadamente 0,054%; aproximadamente 0,055%; aproximadamente 0,056%; aproximadamente 0,057%; aproximadamente 0,058%; aproximadamente 0,059%; aproximadamente 0,06%; aproximadamente 0,061%; aproximadamente 0,062%; aproximadamente 0,063%; aproximadamente 0,064%; aproximadamente 0,065%; aproximadamente 0,066%; aproximadamente 0,067%; aproximadamente 0,068%; aproximadamente 0,069%; aproximadamente 0,07%; aproximadamente 0,071%; aproximadamente 0,072%; aproximadamente 0,073%; aproximadamente 0,074%; aproximadamente 0,075%; aproximadamente 0,076%; aproximadamente 0,077%; aproximadamente 0,078%; aproximadamente 0,079%; aproximadamente 0,08%; aproximadamente 0,081%; aproximadamente 0,082%; aproximadamente 0,083%; aproximadamente 0,084%; aproximadamente 0,085%; aproximadamente 0,086%; aproximadamente 0,087%; aproximadamente 0,088%; aproximadamente 0,089%; aproximadamente 0,09%; aproximadamente 0,091%; aproximadamente 0,092%; aproximadamente 0,093%; aproximadamente 0,094%; aproximadamente 0,095%; aproximadamente 0,096%; aproximadamente 0,097%; aproximadamente 0,098%; aproximadamente 0,099%; o aproximadamente 0,10 % de surfactante (por ejemplo, polisorbato 20 o polisorbato 80).

En una modalidad, el polvo farmacéutico formulado comprende un surfactante no iónico anfipático, tal como un éster de ácido graso de polioxetilensorbitán. En una modalidad, el surfactante es polisorbato 20 o polisorbato 80. En una modalidad, la relación en peso de polisorbato a proteína en el polvo farmacéutico formulado en cuestión es de 0,003:1 - 1:5, 0,03:10, 0,3:50, 0,3:25, 1:50, 0,3:10, 3:50, 3:25 o 1:5.

- 5 Pueden incluirse estabilizadores térmicos en el polvo farmacéutico formulado (y por lo tanto cualquier precursor acuoso para inhibir o reducir la formación de agregados y otros productos de degradación durante el estrés térmico. Los estabilizadores térmicos pueden ser aminoácidos, preferentemente aminoácidos con cadenas laterales hidrófobas, carbohidratos, alcoholes de azúcar, polímeros, copolímeros y copolímeros de bloque, polipéptidos, surfactantes y similares. Los ejemplos de estabilizadores térmicos útiles incluyen Pluronic F68, arginina, lisina, aquellos aminoácidos con cadenas laterales hidrófobas que incluyen glicina, prolina, valina, leucina e isoleucina, sorbitol, manitol, glicerol, trehalosa, dextrosa, sacarosa y otros carbohidratos, varias ciclodextrinas, cloruro de sodio y sus combinaciones. Ver Goldberg y otros, "Formulation development of therapeutic monoclonal antibodies using high-throughput fluorescence and static light scattering techniques: role of conformational and colloidal stability", 100(4) J. Pharm. Sci. 1306-1315, 2011, y Bhamhani y otros, "Formulation design and high-throughput excipient selection based on structural integrity and conformational stability of dilute and highly concentrated IgG1 monoclonal antibody solutions," 101(3) J. Pharm. Sci. 1120-1135, 2012. Los estabilizadores térmicos reivindicados se seleccionan de sacarosa, trehalosa, manitol, isoleucina, prolina, o combinaciones de los mismos.
- 10 20 25 30 35 40 45 50 55 60
- El carbohidrato puede ser un azúcar reductor o un azúcar no reductor. Los "azúcares reductores" incluyen, por ejemplo, azúcares con un grupo cetona o aldehído y contienen un grupo hemiacetal reactivo, lo que permite que el azúcar actúe como agente reductor. Los ejemplos específicos de azúcares reductores incluyen fructosa, glucosa, gliceraldehído, lactosa, arabinosa, manosa, xirosa, ribosa, ramnosa, galactosa y maltosa. Los azúcares no reductores pueden comprender un carbono anomérico que es un acetal y no es sustancialmente reactivo con aminoácidos o polipéptidos para iniciar una reacción de Maillard. Los ejemplos específicos de azúcares no reductores incluye sacarosa, trehalosa, sorbosa, sucralosa, melezitosa y rafinosa. Los ácidos de azúcar incluyen, por ejemplo, ácidos sacáricos, gluconato y otros polihidroxiazúcares y sales de estos.
- En algunas modalidades, los estabilizadores térmicos se incluyen en una relación masa por masa o mol por mol con la proteína. Si bien no deseamos limitarnos a la teoría, se cree que los estabilizadores térmicos en parte reemplazan el agua que rodeaba la proteína para ayudar a mantener la estabilidad de la proteína (terapia de reemplazo de agua), lo que permite de esta manera eliminar el agua mientras se mantiene la estructura de la proteína. De acuerdo con un aspecto de la invención, la relación de proteína a estabilizador se maximiza para permitir la formulación de mayores cantidades de proteína por unidad de volumen mientras se mantiene la estructura adecuada de la proteína. En una modalidad, por cada 5 partes en peso de proteína, el polvo farmacéutico formulado contiene ≤ 2 partes en peso de estabilizador térmico. Por ejemplo, si la solución acuosa de materia prima de prepartículas contiene 5 mg/ml de proteína, entonces la totalidad del estabilizador térmico se incluiría en ≤ 2 mg/ml para mantener la relación de 5 partes de proteína a ≤ 2 partes de estabilizador térmico en el polvo farmacéutico formulado en cuestión. En una modalidad, por cada 5 partes en peso de proteína, el polvo farmacéutico formulado contiene ≤ 1 parte en peso de estabilizador térmico. Por ejemplo, si la solución acuosa de materia prima contiene 5 mg/ml de proteína, entonces la totalidad del estabilizador térmico se incluiría en ≤ 1 mg/ml para mantener la relación de 5 partes de proteína por peso a 1 parte de estabilizador térmico por peso en el polvo farmacéutico formulado en cuestión. En algunas modalidades, la relación peso a peso de proteína a estabilizador térmico es de 5:2 - 100:1, 5:2 - 10:3, 20:7 - 4:1, 10:3 - 5:1, 4:1 - 20:3, 5:1 - 10:1, 20:3 - 20:1, 10:1 - 40:1, 20:1 - 50:1 o 40:1 - 100:1.
- En otra modalidad, por cada mol de proteína, el polvo farmacéutico formulado contiene < 300 moles de estabilizador térmico. Por ejemplo, si la materia prima de la solución acuosa precursora contiene 1 mM de proteína, entonces la totalidad del estabilizador térmico se incluiría en < 300 mM para mantener la relación molar de estabilizador térmico a proteína de < 300:1 en el polvo farmacéutico formulado en cuestión. En algunas modalidades, la relación molar de estabilizador térmico a proteína es de 350:1 - 1:1, 350:1 - 300:1, 325:1 - 275:1, 300:1 - 250:1, 275:1 - 225:1, 250:1 - 200:1, 225:1 - 175:1, 200:1 - 150:1, 175:1 - 125:1, 150:1 - 100:1, 125:1 - 75:1, 100:1 - 50:1, 75:1 - 25:1 o 50:1 - ≤ 1:1.
- El componente estabilizador térmico puede contener más de una especie molecular. Por ejemplo, el estabilizador térmico puede consistir en uno o más de sacarosa, trehalosa, manitol, arginina (Arg) y los aminoácidos hidrófobos glicina (Gly), alanina (Ala), valina (Val), leucina (Leu), isoleucina (Ile), prolina (Pro), fenilalanina (Phe), metionina (Met) y triptófano (Trp) en varias cantidades relativas que se suman a la cantidad acumulada total de estabilizador térmico. Las Tablas 1 y 2 proporcionan ejemplos de relaciones útiles de estabilizador térmico y proteína en soluciones de materias primas acuosas específicas, y la Tabla 4 proporciona ejemplos de relaciones útiles de estabilizador térmico y proteína en polvos farmacéuticos formulados específicos y la estabilidad de la proteína en polvo derivada de esas formulaciones de materias primas de la Tabla 3. Los estabilizadores térmicos reivindicados se seleccionan de sacarosa, trehalosa, manitol, isoleucina, prolina, o combinaciones de los mismos.
- En algunas modalidades, el estabilizador térmico en cuestión puede ser una molécula grande (> 200 gramos por mol). Las moléculas grandes que son útiles como estabilizadores térmicos incluyen disacáridos tales como sacarosa, trehalosa, lactosa, maltosa, cellobiosa y similares. La sacarosa y la trehalosa son estabilizadores de

molécula grande preferidos. Los estabilizadores térmicos reivindicados se seleccionan de sacarosa, trehalosa, manitol, isoleucina, prolina, o combinaciones de los mismos.

Tabla 1: Materia Prima de Polvo Farmacéutico con Estabilizadores Térmicos

Ejemplar	Proteína (mg/ml)	Estabilizador Térmico (mg/ml)			
		Sacarosa	Trehalosa	Manitol	Isoleucina
1	50	10	-	-	-
2	50	20	-	-	-
3	50	10	-	5	5
4	50	-	10	-	-
5	50	-	20	-	-
6	50	-	10	5	5
7	50	-	-	10	10
8	50	-	-	-	-
9	50	-	10	-	-
10	50	-	20	-	-
11	50	-	10	-	-
12	5	1	-	-	-
13	5	2	-	-	-
14	5	1	-	0,5	0,5
15	5	-	1	-	-
16	5	-	2	-	-
17	5	-	1	0,5	0,5
18	5	-	-	1	1

5

Tabla 2: Materia prima de polvo farmacéutico con estabilizadores térmicos, tampón y surfactante

Formulación	Proteína (mg/ml)	Fosfato (mM)	Estabilizador Térmico				Polisorbato 20 (% p/v)
			Sacarosa (% p/v)	Trehalosa (% p/v)	Manitol (% p/v)	Isoleucina (% p/v)	
19	50	10	2				0,015
20	50	10	1				0,015
21	50	10	1		0,5	0,5	0,015
22	50	10		2			0,015
23	50	10		1	0,5	0,5	0,015
24	50	10			1	1	0,015
25	50	10	2				0,03
26	50	10	1				0,03
27	50	10	1		0,5	0,5	0,03
28	50	10		2			0,03
29	50	10		1	0,5	0,5	0,03
30	50	10			1	1	0,03
31	50	10	2				0,06
32	50	10	1				0,06
33	50	10	1		0,5	0,5	0,06
34	50	10		2			0,06
35	50	10		1	0,5	0,5	0,06
36	50	10			1	1	0,06
37	50	10	2				0,1
38	50	10	1				0,1
39	50	10	1		0,5	0,5	0,1
40	50	10		2			0,1
41	50	10		1	0,5	0,5	0,1
42	50	10			1	1	0,1
43	5	1	0,2				0,015
44	5	1	0,1				0,015
45	5	1	0,1		0,05	0,05	0,015
46	5	1		0,2			0,015
47	5	1		0,1	0,05	0,05	0,015
48	5	1			0,1	0,1	0,015
49	5	1	0,2				0,03
50	5	1	0,1				0,03
51	5	1	0,1		0,05	0,05	0,03

(continuación)

Formulación	Proteína (mg/ml)	Fosfato (mM)	Estabilizador Térmico				Polisorbato 20 (% p/v)
			Sacarosa (% p/v)	Trehalosa (% p/v)	Manitol (% p/v)	Isoleucina (% p/v)	
52	5	1		0,2			0,03
53	5	1		0,1	0,05	0,05	0,03
54	5	1			0,1	0,1	0,03
55	5	1	0,2				0,06
56	5	1	0,1				0,06
57	5	1	0,1		0,05	0,05	0,06
58	5	1		0,2			0,06
59	5	1		0,1	0,05	0,05	0,06
60	5	1			0,1	0,1	0,06
61	5	1	0,2				0,1
62	5	1	0,1				0,1
63	5	1	0,1		0,05	0,05	0,1
64	5	1		0,2			0,1
65	5	1		0,1	0,05	0,05	0,1
66	5	1			0,1	0,1	0,1

Tabla 3: Materia prima de polvo farmacéutico con estabilizadores térmicos, tampón y surfactante

Ejemplar	Componentes de Materia Prima Líquida (mg/ml)							
	Proteína	Sacarosa	Trehalosa	Manitol	Isoleucina	Prolina	Fosfato	Polisorbato
67	50	0	0	0	0	0	1,5	0
68	5	0,5	0,25	0	0,25	0	0,15	0,15
69	5	0,5	0	0,25	0,25	0	0,15	0,15
70	5	0	0,5	0,25	0,25	0	0,15	0,15
71	5	0,5	0	0	0,5	0	0,15	0,15
72	5	0,5	0	0	0	0,5	0,15	0,15
73	5	0,5	0	0,5	0	0	0,15	0,15
74	5	1	0	0	0	0	0,15	0,15
75	5	2	0	0	0	0	0,15	0,2
76	5	2	0	0	0	0	0,15	0
77	5	0	2	0	0	0	0,15	0
78	5	0	1	0,5	0,5	0	0,15	0
79	50	5	0	0	0	0	1,5	0
80	50	10	0	0	0	0	1,5	0
81	50	5	0	2,5	2,5	0	1,5	0
82	50	20	0	0	0	0	1,5	0
83	50,6	9	0	4,5	4,5	0	1,35	0
84	50	10	0	10	0	0	1,5	0
85	50	10	0	0	10	0	1,5	0
86	50	10	0	5	5	0	1,5	0
87	50	0	0	10	10	0	1,5	0
88	50	0	0	20	0	0	1,5	0
89	50	0	0	0	20	0	1,5	0

5

Tabla 4: Relaciones de Componentes de Polvo Farmacéutico y Tasa de Agregación

Ejemplar	% p/p de glicoproteína en polvo	Relación en peso de estabilizador térmico/glicoproteína	Relación molar de estabilizador térmico/glicoproteína	Tasa de agregación a 50 °C (%HMW/mes <sup>-1</sup> )
67	97,5	0,0	0	20,0
68	82,0	0,2	93	10,3
69	82,0	0,2	109	9,4
70	82,0	0,2	106	9,5
71	82,0	0,2	121	8,6
72	82,0	0,2	133	8,4
73	82,0	0,2	97	9,3
74	82,0	0,2	67	11,8
75	71,6	0,4	134	7,6
76	73,4	0,4	134	8,2
77	73,4	0,4	122	8,5

(continuación)

Ejemplar	% p/p de glicoproteína en polvo	Relación en peso de estabilizador térmico/glicoproteína	Relación molar de estabilizador térmico/glicoproteína	Tasa de agregación a 50 °C (%HMW/mes <sup>-1/2</sup> )
78	73,4	0,4	212	5,7
79	90,1	0,1	34	14,8
80	83,8	0,2	67	12,5
81	83,8	0,2	109	12,2
82	73,4	0,4	134	8,2
83	75,6	0,4	194	7,5
84	73,4	0,4	193	6,2
85	73,4	0,4	243	6,0
86	73,4	0,4	218	5,4
87	73,4	0,4	302	4,9
88	73,4	0,4	253	6,8
89	73,4	0,4	351	7,8

En algunas modalidades, el estabilizador térmico en cuestión comprende una o más moléculas pequeñas ( $\leq 200$  gramos por mol) sin un estabilizador de molécula grande. Para una relación de peso dada, la inclusión de

5 estabilizadores térmicos de bajo peso molecular puede maximizar la relación de estabilizador térmico a proteína sobre una base molar, lo que proporciona de esta manera un beneficio para la estabilidad. Las moléculas pequeñas que son útiles como estabilizadores térmicos incluyen monosacáridos como ribosa, desoxirribosa, glucosa, fructosa, galactosa y similares, alcoholes de azúcar y otros polioles como eritritol, glicerol, treitol, arabinol, xilitol, ribitol, manitol, sorbitol, galactitol, fucitol, iditol, inositol y similares, y aminoácidos tales como arginina y los aminoácidos hidrófobos glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina y triptófano y similares. Los aminoácidos hidrófobos tienen cadenas laterales alifáticas con momentos dipolares muy pequeños y una cabeza de ácido carboxílico (polar). Los aminoácidos hidrófobos libres son, por lo tanto, anfipáticos. Si bien no se desea ceñirse a ninguna teoría, el estabilizador térmico anfipático puede proporcionar determinada protección a la proteína frente a la desnaturalización de la interfaz aire-líquido. Los estabilizadores térmicos de molécula pequeña preferidos incluyen 10 manitol, isoleucina y prolina. Los estabilizadores térmicos reivindicados se seleccionan de sacarosa, trehalosa, manitol, isoleucina, prolina, o combinaciones de los mismos.

15 En algunas modalidades, el estabilizador térmico comprende solo sacarosa, solo trehalosa, solo isoleucina, solo manitol o solo prolina. En algunas modalidades, el estabilizador térmico comprende una combinación de sacarosa y trehalosa. En algunas modalidades, el estabilizador térmico comprende una combinación de sacarosa y trehalosa en una relación en peso de 3:1 - 1:3, aproximadamente 2:1, aproximadamente 4:3, aproximadamente 1:1, aproximadamente 3:4 o aproximadamente 1:2.

20 En algunas modalidades, el estabilizador térmico comprende una combinación de sacarosa, manitol e isoleucina. En algunas modalidades, el estabilizador térmico comprende una combinación de sacarosa, manitol e isoleucina en una relación en peso de 4:3:1, 2:1:1, 4:1:3, 2:3:1, 1:1:1 o 2:1:3.

25 En algunas modalidades, los polvos farmacéuticos formulados con sacarosa solo tienen tasas de agregación más altas que los que usan manitol, isoleucina, prolina o sus combinaciones (Figura 6).

30 En algunas modalidades, el estabilizador térmico comprende una combinación de trehalosa, manitol e isoleucina. En algunas modalidades, el estabilizador térmico comprende una combinación de trehalosa, manitol e isoleucina en una relación en peso de 4:3:1, 2:1:1, 4:1:3, 2:3:1, 1:1:1 o 2:1:3.

35 En algunas modalidades, el estabilizador térmico comprende una combinación de sacarosa e isoleucina. En algunas modalidades, el estabilizador térmico comprende una combinación de sacarosa y trehalosa en una relación en peso de 3:1 - 1:3, aproximadamente 2:1, aproximadamente 4:3, aproximadamente 1:1, aproximadamente 3:4 o aproximadamente 1:2.

40 En algunas modalidades, el estabilizador térmico comprende una combinación de sacarosa y prolina. En algunas modalidades, el estabilizador térmico comprende una combinación de sacarosa y prolina en una relación en peso de 3:1 - 1:3, aproximadamente 2:1, aproximadamente 4:3, aproximadamente 1:1, aproximadamente 3:4 o aproximadamente 1:2.

45 En algunas modalidades, el estabilizador térmico comprende una combinación de sacarosa y manitol. En algunas modalidades, el estabilizador térmico comprende una combinación de sacarosa y manitol en una relación en peso de 3:1 - 1:3, aproximadamente 2:1, aproximadamente 4:3, aproximadamente 1:1, aproximadamente 3:4 o aproximadamente 1:2.

En algunas modalidades, el estabilizador térmico comprende una combinación de manitol e isoleucina. En algunas modalidades, el estabilizador térmico comprende una combinación de manitol e isoleucina en una relación en peso de 3:1 - 1:3, aproximadamente 2:1, aproximadamente 4:3, aproximadamente 1:1, aproximadamente 3:4 o aproximadamente 1:2.

- 5 En una modalidad, el estabilizador térmico es sacarosa presente en una relación en peso con respecto a la proteína en el polvo farmacéutico formulado proporcionado de aproximadamente 1:5 a 2:5. En otra modalidad, el polvo farmacéutico formulado comprende sacarosa, manitol, isoleucina y proteína en una relación en peso de aproximadamente 2:1:1:10.
- 10 En una modalidad, el estabilizador térmico es trehalosa presente en una relación en peso con respecto a la proteína en el polvo farmacéutico formulado proporcionado de aproximadamente 1:5 a 2:5. En otra modalidad, el polvo farmacéutico formulado comprende trehalosa, manitol, isoleucina y proteína en una relación en peso de aproximadamente 2:1:1:10.
- 15 En una modalidad, el polvo farmacéutico formulado comprende aproximadamente 71-75 % (p/p) de glicoproteína, 14-15 % (p/p) de manitol, 14-15 % (p/p) de isoleucina o prolina, 2-2,5 % (p/p) tampón y 3-8% (p/p) de agua.
- 20 En algunas modalidades, el polvo farmacéutico formulado se produce a partir de una solución acuosa que contiene la proteína en cuestión y otros excipientes. Esta solución acuosa precursora también se denomina "materia prima". En algunas modalidades, la materia prima puede contener, en una base de peso a volumen (p/v), de aproximadamente 0,005 % a aproximadamente 5 % de estabilizador térmico; de 0,01 % a 4 % de estabilizador térmico; alrededor de ,02 % a alrededor de 3 % de estabilizador térmico; o de aproximadamente 0,05 % a aproximadamente 2 % de estabilizador térmico. En algunas modalidades, el polvo farmacéutico formulado de la
- 25 presente invención, puede comprender (p/v) aproximadamente 0,01%; 0,02%; 0,03%; 0,04%; 0,05%; 0,06%; 0,07%; 0,08%; 0,09%; 0,10%; 0,11%; 0,12%; 0,13%; 0,14%; 0,15%; 0,16%; 0,17%; 0,18%; 0,19%; 0,20%; 0,21%; 0,22%; 0,23%; 0,24%; 0,25%; 0,26%; 0,27%; 0,28%; 0,29%; 0,30%; 0,31%; 0,32%; 0,33%; 0,34%; 0,35%; 0,36%; 0,37%; 0,38%; 0,39%; 0,40%; 0,41%; 0,42%; 0,43%; 0,44%; 0,45%; 0,46%; 0,47%; 0,48%; 0,49%; 0,50%; 0,51%; 0,52%; 0,53%; 0,54%; 0,55%; 0,56%; 0,57%; 0,58%; 0,59%; 0,60%; 0,61%; 0,62%;
- 30 0,63%; 0,64%; 0,65%; 0,66%; 0,67%; 0,68%; 0,69%; 0,70%; 0,71%; 0,72%; 0,73%; 0,74%; 0,75%; 0,76%; 0,77%; 0,78%; 0,79%; 0,80%; 0,81%; 0,82%; 0,83%; 0,84%; 0,85%; 0,86%; 0,87%; 0,88%; 0,89%; 0,90%; 0,91%; 0,92%; 0,93%; 0,94%; 0,95%; 0,96%; 0,97%; 0,98%; 0,99%; 1,0%; 1,1%; 1,2%; 1,3%; 1,4%; 1,5%; 1,6%; 1,7%; 1,8%; 1,9%; 2,0%; 2,1%; 2,2%; 2,3%; 2,4%; 2,5%; 2,6%; 2,7%; 2,8%; 2,9%; 3,0%; 3,1%; 3,2%; 3,3%; 3,4%; 3,5%; 3,6%; 3,7%; 3,8%; 3,9%; 4,0%; 4,1%; 4,2%; 4,3%; 4,4%; 4,5%; 4,6%; 4,7%; 4,8%; 4,9% o aproximadamente 5,0 % de estabilizadores térmicos.

En un aspecto de la invención donde no hay estabilizador térmico presente en el polvo, el agua residual sirve para estabilizar la proteína.

- 40 La proteína proporcionada en el polvo farmacéutico formulado en cuestión no se limita a ninguna entidad de proteína en particular. Como se usa en la presente, "proteína" incluye proteínas terapéuticas, proteínas recombinantes usadas en investigación o terapia, proteínas trampa y otras proteínas de fusión de receptor Fc, proteínas quiméricas, anticuerpos, anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanos, anticuerpos biespecíficos, fragmentos de anticuerpos, nanocuerpos, anticuerpos recombinantes quimeras, citocinas, quimiocinas, hormonas peptídicas y similares. Las proteínas pueden producirse mediante el uso de sistemas de producción basados en células recombinantes, tales como el sistema de baculovirus de insectos, sistemas de levaduras (por ejemplo, Pichia sp.), sistemas de mamíferos (por ejemplo, células CHO y derivados de CHO como células CHO-K1). Ghaderi y otros, "Production platforms for biotherapeutic glycoproteins: Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation," 28 Biotechnol Genet Eng Rev. 147-75 (2012) mencionado en la presente por referencia a las proteínas terapéuticas y su producción. Se reivindica que la proteína es (a) una glucoproteína que contiene Fc seleccionada de un anticuerpo o una proteína de fusión Fc receptora, o (b) un receptor soluble.

- 55 En algunas modalidades, la proteína es una proteína terapéutica. Las proteínas terapéuticas pueden ser proteínas de unión a antígenos, tales como, por ejemplo, fragmentos de receptores solubles, anticuerpos (que incluye las IgG) y derivados o fragmentos de anticuerpos, otras proteínas que contienen Fc, que incluye las proteínas de fusión de Fc, y proteínas de fusión receptor-Fc, que incluye las proteínas de tipo trampa como, por ejemplo, afibbercept (una molécula trampa de VEGF), rilonacept (una molécula trampa de IL1) y etanercept (una molécula trampa de TNF). Huang, C., Curr. Opin. Biotechnol. 20: 692-99 (2009) se menciona en la presente con respecto a las moléculas de tipo trampa. Las patentes de Estados Unidos núms. 7,303,746 B2, 7,303,747 B2 y 7,374,758 B2 se mencionan en la presente con respecto a afibbercept. La patente de Estados Unidos núm. 6,927,044 B2 se menciona en la presente con respecto a rilonacept. La patente de Estados Unidos núm. 8,063,182 B2 se menciona en la presente con respecto a etanercept.

- 60 El término "proteína" incluye cualquier polímero de aminoácidos que tenga más de aproximadamente 50 aminoácidos unidos covalentemente a través de enlaces amida. Las proteínas contienen una o más cadenas de polímeros de aminoácidos, generalmente conocidas en la técnica como "polipéptidos". Una proteína puede contener

uno o múltiples polipéptidos para formar una sola biomolécula funcional. Los "polipéptidos" generalmente contienen más de 50 aminoácidos, mientras que los "péptidos" generalmente contienen 50 aminoácidos o menos.

- 5 Las proteínas pueden contener varias modificaciones covalentes y no covalentes. Los puentes disulfuro (es decir, entre los residuos de cisteína para formar cistina) pueden estar presentes en algunas proteínas. Estos enlaces covalentes pueden estar dentro de una sola cadena polipeptídica o entre dos cadenas polipeptídicas individuales. Por ejemplo, los puentes disulfuro son esenciales para la estructura y función adecuadas de la insulina, las inmunoglobulinas, la protamina y similares. Para una revisión reciente de la formación de enlaces disulfuro, ver Oka y Bulleid, "Forming disulfides in the endoplasmic reticulum", 1833(11) Biochim Biophys Acta 2425-9 (2013).
- 10 10 Además de la formación de enlaces disulfuro, las proteínas pueden estar sujetas a otras modificaciones postraduccionales. Esas modificaciones incluyen lipidação (por ejemplo, miristoilación, palmitoilación, farnesilación, geranilgeranilación y formación de anclas de glicosilfosfatidinositol (GPI), alquilación (por ejemplo, metilación), acilación, amidación, glicosilación (por ejemplo, adición de grupos glucosilo en arginina, asparagina, cisteína, hidroxilisina, serina, treonina, tirosina y/o triptófano) y fosforilación (es decir, la adición de un grupo fosfato a la serina, treonina, tirosina y/o histidina). Para una revisión reciente sobre la modificación postraduccional de proteínas producidas en eucariotas, ver Mowen y David, "Unconventional post-translational modifications in immunological signaling", 15(6) Nat Immunol 512-20 (2014); y Blixt y Westerlind, "Arranging the post-translational glycoproteome (PTG)", 18 Curr Opin Chem Biol. 62-9 (2014).
- 15 20 En una modalidad, la proteína proporcionada en el polvo farmacéutico formulado es una glicoproteína, que abarca cualquier proteína con un grupo glicosilo. Los anticuerpos y las proteínas de fusión receptor-Fc (también conocidas como proteínas trampa o moléculas trampa) son ejemplos de glicoproteínas. Los anticuerpos producidos en sistemas de mamíferos heterólogos también se glicosilan en varios residuos (por ejemplo, en residuos de asparagina) con varios polisacáridos, y pueden diferir de una especie a otra, lo que puede afectar la antigenicidad de los anticuerpos terapéuticos (ver Butler y Spearman, "The choice of mammalian cell host and possibilities for glycosylation engineering", 30 Curr Opin Biotech 107-112 (2014)). Los N-glicanos de las moléculas de IgG generalmente incluyen N-acetilglucosamina manosilada, que en algunos casos puede incluir grupos adicionales de galactosa y/o fucosa. Los anticuerpos generalmente tienen una masa de aproximadamente 150 - 170 kD (kg/mol) lo que proporciona la glicosilación aproximadamente 2-3 % de la masa. Ver Plomp y otros, "Recent Advances in Clinical Glycoproteomics of Immunoglobulins (Igs)", Mol Cell Proteomics. julio de 2016; 15(7): 2217-28.
- 25 30 Las moléculas trampa se N-glicosilan de manera similar ya que contienen un dominio Fc de inmunoglobulina. Las moléculas trampa tienen un mayor intervalo de peso molecular, de aproximadamente 50 kD para etancept, alrededor de 100 kD para afibercept, a aproximadamente de 250 kD para rilonacept. Dado el tamaño más pequeño de la cadena polipeptídica de afibercept, el nivel relativo de contribución de la glicosilación a la masa de la molécula de afibercept es mayor que el de un anticuerpo, es decir, aproximadamente 5 % - 16 % de la masa total o más. Aunque no se desea ceñirse a la teoría, la diferencia en la glicosilación relativa de diferentes proteínas puede afectar a la relación óptima de estabilizador térmico a proteína en el polvo farmacéutico formulado en cuestión.
- 35 40 Por ejemplo, en una modalidad específica en la que la proteína es afibercept, la partícula farmacéutica formulada en cuestión comprende en peso aproximadamente un 62 % de polipéptido, aproximadamente un 12 % de glicano, aproximadamente un 25 % de sacarosa y aproximadamente un 2 % de fosfato. En otra modalidad específica en la que la proteína es afibercept, la partícula farmacéutica formulada en cuestión comprende en peso aproximadamente un 71 % de polipéptido, aproximadamente un 13 % de glicano, aproximadamente un 2 % de fosfato y aproximadamente un 14,1 % de sacarosa.
- 45 50 Por ejemplo, en una modalidad específica en la que la proteína es una molécula de IgG1, la partícula farmacéutica formulada en cuestión comprende en peso aproximadamente un 81 % de proteína, aproximadamente un 1,5 % de histidina, aproximadamente un 16 % de sacarosa y aproximadamente un 0,2 % de polisorbato 80.
- 55 55 Por ejemplo, en una modalidad específica en la que la proteína es una molécula de IgG4, la partícula farmacéutica formulada en cuestión comprende en peso aproximadamente un 45 % de proteína, aproximadamente un 0,4 % de acetato, aproximadamente un 56 % de sacarosa y aproximadamente un 0,4 % de polisorbato 20.
- 60 65 Las inmunoglobulinas (también conocidas como "anticuerpos") son ejemplos de proteínas que tienen múltiples cadenas polipeptídicas y extensas modificaciones postraduccionales. La proteína inmunoglobulina canónica (por ejemplo, IgG) comprende cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas ligera y dos cadenas pesadas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada a través de un enlace disulfuro de cistina y las dos cadenas pesadas están unidas entre sí a través de dos enlaces disulfuro de cistina. Las inmunoglobulinas producidas en sistemas de mamíferos también se glicosilan en varios residuos (por ejemplo, en residuos de asparagina) con varios polisacáridos, y pueden diferir de una especie a otra, lo que puede afectar la antigenicidad de los anticuerpos terapéuticos. Butler y Spearman, "The choice of mammalian cell host and possibilities for glycosylation engineering", 30 Curr Opin Biotech 107-112 (2014) se menciona en la presente por referencia a la producción heteróloga de glicoproteínas en sistemas de células de mamíferos.

Los anticuerpos a menudo se usan como biomoléculas terapéuticas. El término "anticuerpo", como se usa en la presente, incluye moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente descripción como HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de la cadena pesada comprende tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente descripción como LCVR o VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de la cadena ligera comprende un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones de estructura (FR). Cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino terminal al extremo carboxilo terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (las CDR de la cadena pesada pueden abreviarse como HCDR1, HCDR2 y HCDR3; las CDR de la cadena ligera pueden abreviarse como LCDR1, LCDR2 y LCDR3). El término anticuerpo de "alta afinidad" se refiere a aquellos anticuerpos que tienen una afinidad de unión a su diana de al menos 10-9 M, al menos 10-1 M; al menos 10-11 M; o al menos 10-12 M, medido mediante resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, BIACORE™ o ELISA de afinidad en solución.

La frase "anticuerpo biespecífico" incluye un anticuerpo capaz de unirse selectivamente a dos o más epítopos. Los anticuerpos biespecíficos generalmente comprenden dos cadenas pesadas diferentes, donde cada cadena pesada se une específicamente a un epítopo diferente-lo mismo en dos moléculas diferentes (por ejemplo, antígenos) o en la misma molécula (por ejemplo, en el mismo antígeno). Si un anticuerpo biespecífico es capaz de unirse selectivamente a dos epítopos diferentes (un primer epítopo y un segundo epítopo), la afinidad de la primera cadena pesada por el primer epítopo generalmente será al menos de uno o dos o tres o cuatro órdenes de magnitud inferior que la afinidad de la primera cadena pesada por el segundo epítopo, y viceversa. Los epítopos reconocidos por un anticuerpo biespecífico pueden estar en la misma o en diferentes dianas (por ejemplo, en la misma o en una proteína diferente). Los anticuerpos biespecíficos pueden obtenerse, por ejemplo, mediante la combinación de cadenas pesadas que reconocen epítopos diferentes del mismo antígeno. Por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico que codifican las secuencias variables de las cadenas pesadas que reconocen epítopos diferentes del mismo antígeno pueden fusionarse a secuencias de ácido nucleico que codifican diferentes regiones constantes de las cadenas pesadas, y tales secuencias pueden expresarse en una célula que expresa una cadena ligera de inmunoglobulina. Un anticuerpo biespecífico típico tiene dos cadenas pesadas, cada una con tres CDR de la cadena pesada, seguidas por (del extremo N-terminal al extremo C-terminal) un dominio CH1, una región bisagra, un dominio CH2, y un dominio CH3, y una cadena ligera de inmunoglobulina que puede no conferir especificidad de unión al antígeno pero que puede asociarse con cada cadena pesada, o puede asociarse con cada cadena pesada y puede unirse a uno o más de los epítopos que se unen a las regiones de unión al epítopo de la cadena pesada, o que pueden asociarse con cada cadena pesada y permite la unión de una o ambas de las cadenas pesadas a uno o ambos epítopos.

La frase "cadena pesada" o "cadena pesada de inmunoglobulina" incluye una secuencia de una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina de cualquier organismo, ya menos que se especifique de cualquier otra manera incluye un dominio variable de cadena pesada. Los dominios variables de cadena pesada incluyen tres CDR de cadena pesada y cuatro regiones FR, a menos que se especifique de cualquier otra manera. Los fragmentos de cadenas pesadas incluyen CDR, CDR y FR, y sus combinaciones. Una cadena pesada típica tiene, después del dominio variable (del extremo N-terminal al extremo C-terminal), un dominio CH1, una región bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. Un fragmento funcional de una cadena pesada incluye un fragmento que es capaz de reconocer específicamente un antígeno (por ejemplo, reconocer el antígeno con una KD en el intervalo micromolar, nanomolar o picomolar), que es capaz de expresarse y secretarse de una célula, y que comprende al menos una CDR.

La frase "cadena ligera" incluye una secuencia de región constante de cadena ligera de inmunoglobulina de cualquier organismo y, a menos que se especifique de cualquier otra manera, incluye cadenas ligeras kappa y lambda humanas. Los dominios variables de cadena ligera (VL) típicamente incluyen tres CDR de cadena ligera y cuatro regiones de estructura (FR), a menos que se especifique de cualquier otra manera. Generalmente, una cadena ligera de longitud completa incluye, desde el extremo amino terminal al extremo carboxilo terminal, un dominio VL que incluye FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, y una secuencia de aminoácidos de la región constante de una cadena ligera. Las cadenas ligeras que pueden usarse con esta invención incluyen aquellas, por ejemplo, que no se unen selectivamente ni al primer ni al segundo antígeno unidos selectivamente por la proteína de unión al antígeno. Las cadenas ligeras adecuadas incluyen aquellas que pueden identificarse mediante la detección de las cadenas ligeras más comúnmente empleadas en bibliotecas de anticuerpos existentes (bibliotecas húmedas o in silico), donde las cadenas ligeras no interfieren sustancialmente con la afinidad y/o selectividad de los dominios de unión al antígeno de las proteínas de unión a antígeno. Las cadenas ligeras adecuadas incluyen aquellas que pueden unirse a uno o ambos epítopos que están unidos por las regiones de unión al antígeno de la proteína de unión a antígeno.

La frase "dominio variable" incluye una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera o pesada de inmunoglobulina (modificada según se deseé) que comprende las siguientes regiones de aminoácidos, en secuencia

del extremo N-terminal al extremo C-terminal (a menos que se indique de cualquier otra manera): FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Un "dominio variable" incluye una secuencia de aminoácidos capaz de plegarse en un dominio canónico (VH o VL) que tiene una estructura de hoja beta dual en donde las hojas beta están conectadas por un enlace disulfuro entre un residuo de una primera hoja beta y una segunda hoja beta.

- 5 La frase "región determinante de la complementariedad" o el término "CDR" incluye una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico de los genes de inmunoglobulina de un organismo que normalmente (es decir, en un animal de tipo salvaje) aparece entre dos regiones de estructura en un régión variable de una cadena ligera o pesada de una molécula de inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo o un receptor de células T).
- 10 Una CDR puede estar codificada, por ejemplo, por una secuencia de línea germinal o una secuencia reordenada o no reordenada y, por ejemplo, por una célula B o una célula T vírgenes o maduras. En algunas circunstancias (por ejemplo, para una a CDR3), las CDR pueden estar codificados por dos o más secuencias (por ejemplo, secuencias de la línea germinal) que no son contiguas (por ejemplo, en una secuencia de ácido nucleico no reorganizada) pero que son contiguas en una secuencia de ácido nucleico de células B, por ejemplo, como resultado del empalme o la conexión de las secuencias (por ejemplo, recombinación V-D-J para formar una cadena pesada CDR3).

15 La frase "proteína que contiene Fc" incluye anticuerpos, anticuerpos biespecíficos, inmunoadhesinas, y otras proteínas de unión que comprenden al menos una porción funcional de una región de inmunoglobulina CH2 y CH3. Una "porción funcional" se refiere a una región CH2 y CH3 que puede unirse a un receptor Fc (por ejemplo, un FcyR; o un FcRN, es decir, un receptor Fc neonatal), y/o que puede participar en la activación del complemento. Si la región CH2 y CH3 contiene delecciones, sustituciones, y/o inserciones u otras modificaciones que la vuelven incapaz de unirse a cualquier receptor Fc y además incapaz de activar el complemento, la región CH2 y CH3 no es funcional.

20 Las proteínas que contienen Fc pueden comprender modificaciones en los dominios de inmunoglobulina, que incluyen cuando las modificaciones afectan una o más funciones efectoras de la proteína de unión (por ejemplo, modificaciones que afectan la unión a FcyR, la unión a FcRN y por lo tanto la vida media, y/o la actividad CDC). Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a, las siguientes modificaciones y sus combinaciones, con referencia a la numeración EU de una región constante de inmunoglobulina: 238, 239, 248, 249, 250, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 301, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 315, 318, 320, 322, 324, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 337, 338, 339, 340, 342, 344, 356, 358, 359, 360, 361, 362, 373, 375, 376, 378, 380, 382, 383, 384, 386, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 428, 430, 433, 434, 435, 437, 438 y 439.

25 Por ejemplo, y no por medio de limitación, la proteína de unión es una proteína que contiene Fc y muestra una vida media sérica mejorada (en comparación con la misma proteína que contiene Fc sin la(s) modificación(es) mencionada(s)) y tiene una modificación en la posición 250 (por ejemplo, E o Q); 250 y 428 (por ejemplo, L o F); 252 (por ejemplo, L/Y/F/W o T), 254 (por ejemplo, S o T) y 256 (por ejemplo, S/R/Q/E/D o T); o una modificación en 428 y/o 433 (por ejemplo, L/R/S/I/P/Q o K) y/o 434 (por ejemplo, H/F o Y); o una modificación en 250 y/o 428; o una modificación en 307 o 308 (por ejemplo, 308F, V308F) y 434. En otro ejemplo, la modificación puede comprender una modificación 428L (por ejemplo, M428L) y 434S (por ejemplo, N434S); una 428L, 259I (por ejemplo, V259I), y una modificación 308F (por ejemplo, V308F); una modificación 433K (por ejemplo, H433K) y una 434 (por ejemplo, 434Y); una modificación 252, 254 y 256 (por ejemplo, 252Y, 254T y 256E); una modificación 250Q y 428L (por ejemplo, T250Q y M428L); una modificación 307 y/o 308 (por ejemplo, 308F o 308P).

30 40 45 50 55 Algunas proteínas recombinantes que contienen Fc contienen receptores o fragmentos de receptores, ligandos o fragmentos de ligandos que tienen compañeros de unión afines en sistemas biológicos. "Proteínas de fusión de receptor Fc" se refiere a moléculas recombinantes que contienen un receptor soluble fusionado a un dominio Fc de inmunoglobulina. Algunas proteínas de fusión de receptor Fc pueden contener dominios de unión a ligandos de múltiples receptores diferentes que afectan a uno dado. Esas proteínas de fusión de receptor Fc se conocen como "trampas" o "moléculas trampa". Rilonacept y afibbercept son ejemplos de trampas comercializadas que antagonizan IL1R (ver la patente de Estados Unidos núm. 7,927,583) y VEGF (ver la patente de Estados Unidos núm. 7,087,411), respectivamente. Otras proteínas recombinantes que contienen Fc incluyen aquellas proteínas recombinantes que contienen un péptido fusionado con un dominio Fc, por ejemplo, la tecnología MIMETIBODY™ de Centocor. Las proteínas recombinantes que contienen Fc se describen en C. Huang, "Receptor-Fc fusion therapeutics, traps, and MIMETIBODY technology", 20(6) Curr. Opin. Biotechnol. 692-9 (2009).

60 65 Las "proteínas de fusión Fc" comprenden parte o la totalidad de dos o más proteínas, una de las cuales es una porción Fc de una molécula de inmunoglobulina, que no están fusionadas en su estado natural. Se ha descrito la preparación de proteínas de fusión que comprenden determinados polipéptidos heterólogos fusionados con varias porciones de polipéptidos derivados de anticuerpos (que incluye el dominio Fc), por ejemplo, por Ashkenazi y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10535, 1991; Byrn y otros, Nature 344: 677, 1990; y Hollenbaugh y otros, "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", en Current Protocols in Immunology, Supl. 4, páginas 10.19.1 - 10.19.11, 1992. Las "proteínas de fusión del receptor Fc" comprenden uno o más de uno o más dominios extracelulares de un receptor acoplado a un resto Fc, que en algunas modalidades comprende una región bisagra seguida de un dominio CH2 y CH3 de una inmunoglobulina. En algunas modalidades, la proteína de fusión Fc contiene dos o más cadenas receptoras distintas que se unen a uno o más ligandos. Por ejemplo, una proteína de

fusión Fc es una trampa, tal como, por ejemplo, una trampa de IL-1 (por ejemplo, Rilonacept, que contiene la región de unión al ligando de IL-1RAcP fusionada con la región extracelular de IL-1R1 fusionada con Fc de hIgG1; ver la patente de Estados Unidos núm. 6,927,004), o una trampa de VEGF (por ejemplo, Aflibercept, que contiene el dominio 2 de Ig del receptor Flt1 de VEGF fusionado con el dominio 3 de Ig del receptor Flk1 de VEGF fusionado con Fc de hIgG1; por ejemplo, SEQ ID NO: 1; ver la patente de Estados Unidos núm. 7,087,411 y 7,279,159).  
 5 "Antagonista de VEGF" se refiere a cualquier fármaco, medicamento u otra molécula que antagonice o reduzca de cualquier otra manera la actividad de un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). VEGF es un miembro de la familia de factores de crecimiento PDGF. Actúa predominantemente sobre las células endoteliales para promover la mitogénesis y la migración celular y, de esta manera, estimular la vasculogénesis y la angiogénesis. El VEGF  
 10 puede usarse ectópicamente para tratar la isquemia, particularmente la cardiopatía isquémica. Por el contrario, pueden usarse antagonistas de VEGF para inhibir la angiogénesis. Los antiangiogénicos son útiles en el tratamiento del cáncer, ya que los tumores requieren neovascularización para continuar su crecimiento y hacer metástasis, y en el tratamiento de la neovascularización coroidea que conduce a la degeneración macular húmeda relacionada con la edad. Para una revisión de VEGF y fármacos usados para promover o inhibir la actividad de VEGF, ver Wu y otros,  
 15 "A systems biology perspective on sVEGFR1: its biological function, pathogenic role and therapeutic use", 14(3) J. Cell Mol. Med. 528-52 (2010); Yadav y otros, "Tumour Angiogenesis and Angiogenic Inhibitors: A Review", 9(6) J. Clin. Diagn. Res. XE01-XE05 (2015); y I. Zachary, "VEGF signalling: integration and multi-tasking in endothelial cell biology", 31 (Parte 6) Biochem. Soc. Trans. 1171-7 (2003).  
 20 Los inhibidores de VEGF incluyen moléculas pequeñas que inhiben las tirosina cinasas estimuladas por VEGF, que incluye, por ejemplo, lapatinib, sunitinib, sorafenib, axitinib y paxopanib (Yadav, 2015). Los inhibidores macromoleculares de VEGF incluyen el anticuerpo monoclonal bevacizumab, el fragmento Fab ranibizumab, la trampa afibercept y el aptámero pegilado pegaptanib (Id).  
 25 Otros factores de crecimiento implicados en la angiogénesis y que sirven como dianas terapéuticas para la neovascularización incluyen, entre otras cosas, la angiopoietina-2 (Ang2) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Ang2 es un componente de la vía Angiopoietin-Tie (AT) y, como tal, está implicado en la remodelación vascular. La vía AT, en la que la angiopoietina-1 se une y agoniza el receptor afín Tie2, promueve la supervivencia de las células endoteliales y la construcción, maduración y mantenimiento de los vasos sanguíneos.  
 30 Ang2 también está implicado en la linfangiogénesis. Ang2 también se une y modula la señalización de Tie2 y parece funcionar como un antagonista de Tie2 en presencia de Ang1. Ver Thurston y Daly, "The Complex Role of Angiopoietin-2 in the Angiopoietin-Tie Signaling Pathway", 2(9) Cold Spring Harb. Perspect. Med. a006650 (2012), y Chintharlapalli y otros, "Angiopoietin-2: an attractive target for improved antiangiogenic tumor therapy", 73(6) Cancer Res. 1649-57 (2013).  
 35 Ang2 está implicado en el cáncer y la inflamación. Está regulado positivamente en varios carcinomas, citomas y sarcomas, así como también en sepsis y enfermedades inflamatorias. Ang2 juega un papel en el reclutamiento de leucocitos. El bloqueo de Ang2 da como resultado una inhibición parcial del crecimiento de xenoinjertos de tumores humanos. (Thurston, 2012.) Los anticuerpos contra Ang2 y otros inhibidores de péptidos que se unen a Ang2 están  
 40 en desarrollo para el tratamiento de enfermedades y afecciones causadas o exacerbadas por la angiogénesis. Los anticuerpos anti-Ang2 se describen en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núms. 6,166,185; 7,521,053; 7,205,275; y las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos núms. 2006/0018909; 2006/0246071; 2006/068953; 2007/0154482; y 2011/0027286.  
 45 El sistema PDGF contiene una familia de ligandos de factores de crecimiento diméricos y un receptor de tirosina quinasas. Comprende cinco (5) isoformas de ligando: PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-CC, PDGF-DD y PDGF-AB; y dos (2) receptores: PDGFRA (receptor alfa) y PDGFRB (receptor beta). El PDGF está implicado en la división de células embrionarias y en la remodelación de tejidos y la angiogénesis en el desarrollo posterior. Los inhibidores de la quinasa, por ejemplo, sorafenib, nilotinib, dasatinib, sunitinib, nintedanib e imatinib son inhibidores de PDGF útiles para el tratamiento de cánceres. También están en desarrollo varios anticuerpos anti-PDGFR para antagonizar la señalización de PDGF para el tratamiento del cáncer y otras enfermedades relacionadas con la angiogénesis. Ver Kono y otros, "Adding to the mix: fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor receptor pathways as targets in non-small cell lung cancer", 12(2) Curr. Cancer Drug Targets 107-23 (2012); Bauman y otros, "Antagonism of Platelet-Derived Growth Factor Receptor in Non-Small Cell Lung Cancer: Rationale and Investigations", 13 Clin. Cancer Res. 4632s (2007); y Stock y otros, "Platelet-derived growth factor receptor-α: a novel therapeutic target in human hepatocellular cancer", 6 Mol. Cancer Ther. 1932-41 (2007); las patentes de Estados Unidos núms. 5,468,468; 7,740,850; 8,425,911; y 8,574,578; y las solicitudes de patentes de Estados Unidos núms. 2009/0053241; 2011/0177074; 2012/0009199; 2012/0027767; y 2014/0193402.  
 55 60 El polvo farmacéutico formulado en cuestión puede fabricarse a partir de una solución acuosa (preursora) de materia prima. Por lo tanto, la proteína proporcionada puede incluirse en el material de alimentación a determinadas concentraciones. La concentración de proteína así como también la concentración total de soluto en la materia prima puede afectar el tamaño de la micropartícula de proteína constituyente en polvo resultante, por lo tanto, el tamaño de las micropartículas puede controlarse al ajustar la concentración de proteína o la concentración de otros solutos en la materia prima. Si bien no se desea ceñirse a la teoría, concentraciones más bajas de proteína u otros solutos en la materia prima pueden producir un polvo más fino que contiene micropartículas más pequeñas de proteína  
 65

constituyente. Concentraciones más altas de proteína u otros solutos en la materia prima pueden producir un polvo más grueso que contiene micropartículas más grandes de proteína constituyente.

La concentración de proteína en la solución acuosa precursora puede encontrarse en un intervalo desde tan solo 5 1 mg/ml o menos hasta tanto como sea posible, como aproximadamente 175-200 mg/ml o más. En algunas modalidades, la solución acuosa precursora contiene la proteína en cuestión a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 500 mg/ml de proteína; de aproximadamente 5 mg/ml a aproximadamente 400 mg/ml de proteína; de aproximadamente 5 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml de proteína; de aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 180 mg/ml de proteína; de aproximadamente 25 mg/ml a 10 aproximadamente 150 mg/ml de proteína; o de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 180 mg/ml de proteína. En algunas modalidades, la solución acuosa precursora contiene la proteína en cuestión a una concentración de 15 aproximadamente 1 mg/ml; aproximadamente 2 mg/ml; aproximadamente 5 mg/ml; aproximadamente 10 mg/ml; aproximadamente 15 mg/ml; aproximadamente 20 mg/ml; aproximadamente 25 mg/ml; aproximadamente 30 mg/ml; aproximadamente 35 mg/ml; aproximadamente 40 mg/ml; aproximadamente 45 mg/ml; 20 aproximadamente 50 mg/ml; aproximadamente 55 mg/ml; aproximadamente 60 mg/ml; aproximadamente 65 mg/ml; aproximadamente 70 mg/ml; aproximadamente 75 mg/ml; aproximadamente 80 mg/ml; aproximadamente 85 mg/ml; aproximadamente 86 mg/ml; aproximadamente 87 mg/ml; aproximadamente 88 mg/ml; aproximadamente 89 mg/ml; aproximadamente 90 mg/ml; aproximadamente 95 mg/ml; aproximadamente 100 mg/ml; aproximadamente 105 mg/ml; 25 aproximadamente 110 mg/ml; aproximadamente 115 mg/ml; aproximadamente 120 mg/ml; aproximadamente 125 mg/ml; aproximadamente 130 mg/ml; aproximadamente 131 mg/ml; aproximadamente 132 mg/ml; aproximadamente 133 mg/ml; aproximadamente 134 mg/ml; aproximadamente 135 mg/ml; aproximadamente 140 mg/ml; aproximadamente 145 mg/ml; aproximadamente 150 mg/ml; aproximadamente 155 mg/ml; aproximadamente 160 mg/ml; aproximadamente 165 mg/ml; aproximadamente 170 mg/ml; 30 aproximadamente 175 mg/ml; aproximadamente 180 mg/ml; aproximadamente 185 mg/ml; aproximadamente 190 mg/ml; aproximadamente 195 mg/ml; aproximadamente 200 mg/ml; aproximadamente 205 mg/ml; aproximadamente 210 mg/ml; aproximadamente 215 mg/ml; aproximadamente 220 mg/ml; aproximadamente 225 mg/ml; aproximadamente 230 mg/ml; aproximadamente 235 mg/ml; aproximadamente 240 mg/ml; aproximadamente 245 mg/ml; aproximadamente 250 mg/ml; aproximadamente 255 mg/ml; aproximadamente 260 mg/ml; aproximadamente 265 mg/ml; aproximadamente 270 mg/ml; aproximadamente 275 mg/ml; aproximadamente 280 mg/ml; aproximadamente 285 mg/ml; aproximadamente 200 mg/ml; aproximadamente 200 mg/ml o aproximadamente 300 mg/ml.

Como se ha descrito anteriormente, la proteína terapéutica puede ser una proteína de unión a antígeno, tal como un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una molécula trampa u otra proteína de fusión Fc receptora, receptores solubles y similares. En una modalidad particular, la proteína terapéutica es afibercept, una molécula trampa antagonista de VEGF. Las soluciones de materia prima para la formación de micropartículas que contienen afibercept pueden contener de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml de afibercept, 35 aproximadamente 2 mg/ml, aproximadamente 3 mg/ml, aproximadamente 4 mg/ml, aproximadamente 5 mg/ml, aproximadamente 6 mg/ml, aproximadamente 7 mg/mL, aproximadamente 8 mg/ml, aproximadamente 9 mg/ml, 40 aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 15 mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 25 mg/ml, aproximadamente 30 mg/ml, aproximadamente 35 mg/ml, aproximadamente 40 mg/ml, aproximadamente 45 mg/ml, aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 55 mg/ml, aproximadamente 60 mg/ml, aproximadamente 65 mg/ml, aproximadamente 70 mg/ml, aproximadamente 75 mg/ml, aproximadamente 80 mg/ml, aproximadamente 85 mg/ml, aproximadamente 90 mg/ml, aproximadamente 95 mg/ml o aproximadamente 100 mg/ml de proteína trampa de VEGF. Las soluciones pueden contener uno o más tampones de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 50 mM. En una modalidad, el tampón es de aproximadamente fosfato 10 mM a un pH de aproximadamente 6 ± 0,5.

En algunas modalidades, las micropartículas de proteína del polvo farmacéutico formulado en cuestión se recubren con un polímero. El término "polímero" incluye macromoléculas que comprenden monómeros repetitivos conectados por enlaces químicos covalentes. Los polímeros útiles para micropartículas terapéuticas son biocompatibles y biodegradables. Un polímero biodegradable o biocompatible puede ser natural o sintético. Los polímeros naturales incluyen polinucleótidos, polipéptidos, tales como proteínas naturales, proteínas recombinantes, gelatina, colágenos, fibrinas, fibrofína, poliaspartatos, poliglutamatos, polileucina, copolímeros de leucina-glutamato; y polisacáridos, tales como alginatos de celulosa, dextrano y polímeros de hidroxilo de dextrano, amilosa, inulina, pectina y goma guar, quitosano, quitina, heparina y ácido hialurónico. Los polímeros biodegradables o biocompatibles sintéticos incluyen ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), copolímero poliláctico-poliglicólico (PLGA), poli-D,L-lactida-coglicolida (PLGA), PLGA-óxido de etileno fumarato, PLGA-alfa-succinato de tocoferilo esterificado a polietilenglicol 1000 (PLGA-TGPS), polianhídrido poli[1,6-bis(p-carboxifenoxi)hexano](pCPH), poli(ácido hidroxibutírico-ácido cohidroxivalérico) (PHB-PVA), polietilenglicol-copolímero de poli(ácido láctico) (PEG-PLA), poli-ε-caprolactona (PCL), poli-alquil-cianoacrilato (PAC), poli(etil)cianoacrilato (PEC), polisobutilcianoacrilato, poli-N-(2-hidroxipropil)metacrilamida (poli(HPMA)), butirato de poli-β-R-hidroxi (PHB), alcanoato de poli-□-R-hidroxi (PHA), ácido poli-β-R-málico, polímeros de fosfolípidos y colesterol, 2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina/polietilenglicol-diestearoilfosfatidilehtanolamina (DOPC/PEG-DSPE)/colesterol, etilcelulosa, polirotaxanos y polipseudorotaxanos a base de ciclodextrina (CD), polibutilensuccinato (PBS), poliortoésteres, copolímeros de poliortoéster-poliamidina, copolímeros de poliortoéster-diamina, poliortoésteres que incorporan ácidos latentes para controlar las tasas de degradación y, entre otros, copolímeros de poli(etilenglicol)/poli(tereftalato de butileno).

- La etilcelulosa (EC) es un biomaterial bien conocido y fácilmente disponible usado en las ciencias farmacéuticas y alimentarias. Es un derivado de la celulosa en el que algunos de los grupos hidroxilo de la glucosa se sustituyen por éter etílico. Martinac y otros, 22(5) J. Microencapsulación 549-561 (2005) se menciona en la presente por el uso de etilcelulosa como polímero biocompatible en la fabricación de microesferas. El documento US 4,210,529 se menciona en la presente por la etilcelulosa y los derivados de la etilcelulosa.
- La poli-D,L-lactida-co-glicolida (PLGA) también es un polímero Martina biodegradable y biocompatible bien conocido, aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), usado en la ingeniería de tejidos y los sistemas de suministros farmacéuticos. La PLGA es un poliéster que comprende monómeros de ácido glicólico y ácido láctico. Astete y Sabliov, 17(3) Biomater. Sci. Polym. Ed. 247-89 (2006) se menciona en la presente por la síntesis de la PLGA y la fabricación de nanopartículas de la PLGA.
- La poli-ε-caprolactona (PCL) es otro polímero biodegradable y biocompatible aprobado por la FDA para su uso en humanos como dispositivo de suministro de fármacos. La PCL es un poliéster de ε-caprolactona, que se hidroliza rápidamente en el cuerpo para formar un ácido hidroxicarboxílico no tóxico o de baja toxicidad. Labet y Thielemans, 38 Chemical Society Reviews 3484-3504 (2009) se menciona en la presente por la fabricación de la PCL. Sinha y otros, 278(1) Int. J. Pharm. 1-23 (2004) se menciona en la presente por la fabricación de microesferas y nanoesferas basadas en la PCL.
- El poliortoéster (POE) es un polímero bioerosionable diseñado para el suministro de fármacos. Generalmente es un polímero de un acetal de ceteno, preferentemente un acetal de diceteno cíclico, como por ejemplo, 3,9-dimetileno-2,4,8,10-tetraoxa espiro[5,5]-undecano, que se polimeriza mediante condensación de glicol para formar los enlaces ortoéster. Los poliortoésteres pueden modificarse para controlar su perfil de liberación del fármaco y las tasas de degradación mediante el intercambio de varios dioles y polioles hidrófobos, como por ejemplo, mediante el reemplazo de un hexanotriol con un decanotriol, así como también al añadir ácidos latentes, como por ejemplo, ácido octanodioico o similares, a la cadena principal para aumentar la sensibilidad al pH. Otras modificaciones al poliortoéster incluyen la integración de una amina para aumentar la funcionalidad. Los documentos US 5,968,543; US 4,764,364; US 4,304,767; Heller y Barr, 5(5) Biomacromolecules 1625-32 (2004); y Heller, 57 Adv. Drug. Deliv. Rev. 2053-62 (2005) se mencionan en la presente por los poliortoésteres.
- El polietilenglicol (PEG) puede entrecruzarse para formar un gel en el que se incorporan las micropartículas de proteína. Gibas y Janik, "Review: synthetic polymer hydrogels for biomedical applications", 4(4) Chemistry & Chemical Technology 297-304 (2010) se menciona en la presente por los geles de PEG entrecruzados.
- Los polímeros que se prefieren para aplicaciones que aplican calor cuando se secan por aspersión tienen altas temperaturas de transición vítreo. En algunas modalidades, una temperatura de transición vítreo alta es  $\geq 10^{\circ}\text{C}$ ,  $\geq 15^{\circ}\text{C}$ ,  $\geq 20^{\circ}\text{C}$ ,  $\geq 25^{\circ}\text{C}$ ,  $\geq 30^{\circ}\text{C}$ ,  $\geq 35^{\circ}\text{C}$ ,  $\geq 45^{\circ}\text{C}$  o  $\geq 30^{\circ}\text{C}$ .
- En un aspecto, la invención proporciona un método para fabricar el polvo farmacéutico formulado en cuestión mediante el "secado por aspersión" de la solución acuosa precursora que contiene la proteína en cuestión y cualquier excipiente adicional (también conocido como "materia prima" como se describió en la presente descripción). El término "secado por aspersión" significa un método para producir un polvo que comprende partículas de tamaño micrométrico a partir de una solución, lodo o suspensión mediante el uso un secador por aspersión. Los secadores por aspersión emplean un atomizador o una boquilla de aspersión para dispersar la suspensión o lodo en un aspersión de tamaños de gota controlado. Pueden generarse tamaños de gota de 10 a 500  $\mu\text{m}$  mediante secado por aspersión. A medida que el solvente (agua o solvente orgánico) se seca, la sustancia proteica se seca en una partícula del tamaño de una micra (es decir, micropartícula de proteína), lo que forma una sustancia similar a un polvo; o en el caso de una suspensión de polímero de micropartículas de proteína, forma una cubierta endurecida de polímero alrededor de la carga de proteína. El secado por aspersión puede realizarse en equipos tales como, por ejemplo, un BUCHI Mini Spray Dryer B-290 (Büchi Labortechnik AG, Flawil, CH). Elversson y Millqvist-Fureby, "Aqueous two-phase systems as a formulation concept for spray-dried protein", 294(1,2) International Journal of Pharmaceutics 73-87 (2005) se menciona en la presente por el secado por aspersión.
- En una modalidad particular, la materia prima se bombea al secador por aspersión a una velocidad de aproximadamente 2 ml/min a aproximadamente 15 ml/min, o aproximadamente 7 ml/min. En una modalidad, la presión de la boquilla es de aproximadamente 35 psi a aproximadamente 100 psi. En una modalidad, la presión de la boquilla es de aproximadamente 75 psi. La temperatura de entrada del secador por aspersión se establece a una temperatura igual o superior al punto de ebullición del agua, tal como, p. ej., a de aproximadamente 100  $^{\circ}\text{C}$  a aproximadamente 130  $^{\circ}\text{C}$ . La temperatura de salida a una temperatura por debajo del punto de ebullición del agua y por encima de la temperatura ambiente, tal como, p. ej., de aproximadamente 55  $^{\circ}\text{C}$ . En una modalidad específica, se bombea una solución de proteína (p. ej., una solución de trampa de VEGF o una solución de IgG) a un BUCHI Mini Spray Dryer B-290 a aproximadamente 7 ml/min, con una temperatura de entrada de aproximadamente 100  $^{\circ}\text{C}$ , 110  $^{\circ}\text{C}$ , 120  $^{\circ}\text{C}$  o 130  $^{\circ}\text{C}$  y una temperatura de salida de unos 55  $^{\circ}\text{C}$ , con el aspirador ajustado a 33 m<sup>3</sup>/h y el gas de spray a 530 l/h.

- En una modalidad, el polvo farmacéutico formulado se forma al someter la materia prima en cuestión a atomización para formar una neblina de goticas atomizadas y luego se aplica calor a la neblina de goticas atomizadas para formar el polvo farmacéutico formulado que comprende la proteína. En algunas modalidades, el polvo farmacéutico formulado resultante se somete a un secado adicional (también denominado "secado secundario"). El secado adicional incluye el horneado, la liofilización y el flujo de aire con nitrógeno. En otras modalidades, el polvo farmacéutico formulado resultante no se somete a secado adicional. En algunas modalidades, el polvo farmacéutico formulado resultante no se somete al horneado subsecuente. En algunas modalidades, el polvo farmacéutico formulado resultante no se somete a la liofilización subsecuente. En algunas modalidades, el polvo farmacéutico formulado resultante no se somete al secado por el flujo de aire de nitrógeno subsecuente.
- En una modalidad, la materia prima comprende un estabilizador térmico y una glicoproteína con una relación de masa de, o entre, 1:50-2:5. En una modalidad, por cada 5 partes en peso de proteína, la materia prima contiene ≤ 2 partes en peso de estabilizador térmico. Por ejemplo, si la materia prima contiene 5 mg/ml de proteína, entonces la totalidad del estabilizador térmico se incluiría en ≤ 2 mg/ml para mantener la relación de 5 partes de proteína a ≤ 2 partes de estabilizador térmico en el polvo farmacéutico formulado en cuestión, como se describió anteriormente en la presente descripción. En una modalidad, por cada 5 partes en peso de proteína, la materia prima contiene ≤ 1 parte en peso de estabilizador térmico. Por ejemplo, si la materia prima contiene 5 mg/ml de proteína, entonces la totalidad del estabilizador térmico se incluiría en ≤ 1 mg/ml para mantener la relación de 5 partes en peso de proteína a 1 parte en peso de estabilizador térmico en el polvo farmacéutico formulado en cuestión, como se describió anteriormente en la presente descripción. En algunas modalidades, la relación peso a peso de proteína a estabilizador térmico es de 5:2 - 100:1, 5:2 - 10:3, 20:7 - 4:1, 10:3 - 5:1, 4:1 - 20:3, 5:1 - 10:1, 20:3 - 20:1, 10:1 - 40:1, 20:1 - 50:1 o 40:1 - 100:1.
- En otra modalidad, por cada mol de proteína, la materia prima contiene < 300 moles de estabilizador térmico. Por ejemplo, si la materia prima contiene 1 mM de proteína, entonces la totalidad del estabilizador térmico se incluiría en < 300 mM para mantener la relación molar de estabilizador térmico a proteína de < 300:1 en el polvo farmacéutico formulado en cuestión resultante, como se describió anteriormente en la presente descripción. En algunas modalidades, la relación molar de estabilizador térmico a proteína es de 350:1 - 1:1, 350:1 - 300:1, 325:1 - 275:1, 300:1 - 250:1, 275:1 - 225:1, 250:1 - 200:1, 225:1 - 175:1, 200:1 - 150:1, 175:1 - 125:1, 150:1 - 100:1, 125:1 - 75:1, 100:1 - 50:1, 75:1 - 25:1 o 50:1 - ≤ 1:1.
- Se describe, pero no se reivindica, que la materia prima contiene la proteína en cuestión sin un estabilizador térmico.
- Se describe, pero no se reivindica, que el polvo farmacéutico formulado resultante está completamente seco, como se describe anteriormente.
- En otra modalidad, el polvo farmacéutico formulado resultante no está completamente seco, como se describió anteriormente en la presente descripción. En algunas modalidades, el polvo farmacéutico formulado que no está completamente seco comprende entre aproximadamente 3 % y aproximadamente 10 % (p/p) de agua, 3,5%-10% (p/p) de agua, 4%-10% (p/p) de agua, 4,5%-10% (p/p) de agua, 5%-10% (p/p) de agua, 5,5%-10% (p/p) de agua, 6%-10% (p/p) de agua, 6,5%-10% (p/p) de agua, 7%-10% (p/p) de agua, 7,5%-10% (p/p) de agua, 8%-10% (p/p) de agua, 8,5%-10% (p/p) de agua, 9%-10% (p/p) de agua, 9,5%-10% (p/p) de agua, >3%-9% (p/p) de agua, >3%-9% (p/p) de agua, >3%-8,5% (p/p) de agua, >3%-8% (p/p) de agua, >3%-7,5% (p/p) de agua, >3%-7% (p/p) de agua, >3%-6,5% (p/p) de agua, >3%-6% (p/p) de agua, >3%-5,5% (p/p) de agua, >3%-5% (p/p) de agua, >3%-4,5% (p/p) de agua, >3%-4% (p/p) de agua, >3%-3,5% (p/p) de agua, aproximadamente 3,1% (p/p) de agua, aproximadamente 3,5% (p/p) de agua, aproximadamente 4% (p/p) de agua, aproximadamente 4,5% (p/p) de agua, aproximadamente 5% (p/p) de agua, aproximadamente 5,5% (p/p) de agua, aproximadamente 6% (p/p) de agua, aproximadamente 6,5% (p/p) de agua, aproximadamente 7% (p/p) de agua, aproximadamente 7,5% (p/p) de agua, aproximadamente 8% (p/p) de agua, aproximadamente 8,5% (p/p) de agua, aproximadamente 9% (p/p) de agua, aproximadamente 9,5% (p/p) de agua o aproximadamente 10% (p/p) de agua.
- En algunas modalidades, el estabilizador térmico de la materia prima en cuestión comprende sacarosa o trehalosa, o una combinación de trehalosa y sacarosa.
- En otras modalidades, el estabilizador térmico de la materia prima en cuestión no comprende una molécula con una masa molecular superior a 200 g/mol. En algunas modalidades, el estabilizador térmico de la materia prima en cuestión se selecciona del grupo que consiste en manitol, isoleucina, prolina y sus combinaciones.
- En otras modalidades, el estabilizador térmico de la materia prima en cuestión comprende trehalosa o sacarosa combinada con manitol, isoleucina o prolina.

En una modalidad, la materia prima en cuestión también contiene un tampón. Los tampones preferidos incluyen fosfato, acetato e histidina. En una modalidades, la materia prima comprende 0,5 mM - 10 mM de un tampón.

En una modalidad, la materia prima en cuestión no contiene un tampón. Aquí, la materia prima es tamponada por la propia proteína en cuestión y el agua.

En una modalidad, la materia prima en cuestión también contiene un detergente no iónico. Los detergentes no iónicos incluyen polisorbatos como el polisorbato 20 y el polisorbato 80. En una modalidad, el surfactante no iónico está presente en la materia prima a una concentración de 0,01 - 0,2 % (p/v).

En algunas modalidades, la materia prima en cuestión contiene la proteína en cuestión, uno o más de (i) tampón(es), (ii) estabilizador(es) térmico(s) y/o (iii) surfactante(s). En una modalidad, la solución acuosa contiene de 2 a 200 mg/ml de la proteína, de 0,5 a 2 % (p/v) de estabilizador(es) térmico(s), de 1 a 10 mM de tampón y de 0,005 a 0,3 % (p/v) de surfactante(s). En una modalidad específica, la solución acuosa comprende 50 mg/ml de la proteína, 2 % p/v

15 de uno o más estabilizadores térmicos, tampón 10 mM y de 0,015 % a 0,1 % p/v de uno o más surfactantes no iónicos. En otra modalidad específica, la solución acuosa comprende 5 mg/ml de la proteína, 0,2 % p/v de uno o más estabilizadores térmicos, tampón 1 mM y de 0,015 % a 0,1 % p/v de uno o más surfactantes no iónicos.

En otra modalidad, las micropartículas de proteína constituyente del polvo formadas a partir de la materia prima en

20 En otra modalidad, las micropartículas de proteína constituyente del polvo formadas a partir de la materia prima en cuestión se recubren subsecuentemente con un polímero biodegradable. En algunas modalidades, el polvo farmacéutico formulado en cuestión se suspende en una solución de polímero. En una modalidad, la solución de polímero se forma al disolver el polímero en un polímero orgánico como cloruro de metileno, tetrahidrofurano, acetato de etilo, diclorometano, etanol o algún otro solvente útil. El acetato de etilo es ampliamente conocido como un solvente seguro y a menudo es usado en la preparación de medicamentos, implantes y productos alimenticios.

En algunas modalidades, el polímero puede ser etilcelulosa ("EC"), poli(ácido láctico) ("PLA"), poliortoéster ("POE"), poli-D,L-lactida-co-glicolida ("PLGA"), o poli- $\epsilon$ -caprolactona ("PCL"). En algunas modalidades, el polímero es ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), polietilenglicol (PEG) entrelazado, poli-D,L-lactida-co-glicolida (PLGA), PLGA-óxido de etileno fumarato, PLGA-alfa-succinato de tocoferilo esterificado a polietilenglicol 1000 (PLGA-TGPS).

30 PEG-oxido de eteno fumarato, PEG-una succinato de tococerilo esterificado a polietilenglicol 1000 (PEGA-TG), polianhídrido polí[1,6-bis(p-carboxifenoxy)hexano](pCPH), poli(ácido hidroxibutírico-ácido cohidroxivalérico) (PHB-PVA), polietilenglicol-copolímero de poli(ácido láctico) (PEG-PLA), poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL), poli-alquil-cianoacrilato (PAC), poli(ethyl)cianoacrilato (PEC), poliisobutilcianoacrilato, poli-N-(2-hidroxipropil)metacrilamida (poli(HPMA)), butirato de poli- $\beta$ -R-hidroxi (PHB), alcanoato de poli- $\beta$ -R-hidroxi (PHA), ácido poli- $\beta$ -R-málico, polímeros de fosfolípidos y colesterol, 2 diaciloyl glicerol 3-fosfatidilcolina/polietilenglicol diacetato/fosfatidilbutilamina.

35 losfisiolípidos y colesterol, 2-dioleol-sn-glicerol-3-fosfatidilcolina/poliétilenglicol-diestearofosfatidilserina/colesterol (DOPC/PEG-DSPE)/colesterol, polisacáridos, celulosa, etilcelulosa, metilcelulosa, alginatos, dextrano y polímeros de hidrogel de dextrano, amilosa, inulina, pectina y goma guar, quitosano, quitina, heparina, ácido hialurónico, polirotaxanos y polipseudotaxanos basados en ciclodextrina (CD), poliaspartatos, poliglutamatos, polilicicina, copolímeros de leucina-glutamato, succinato de polibutileno (PBS), gelatina, colágenos, fibrinas, fibroína, poliactéicos, copolímero de poliactéster-poliimidina, copolímeros de poliactéster-diamina, poliactésteres que

40 poliorthoésteres, copolímero de poliorthoéster-poliimidina, copolímeros de poliorthoéster-diamina, poliorthoésteres que incorporan ácidos latentes, copolímero de poli(etilenglicol)/poli(tereftalato de butileno) y combinaciones y copolímeros de estos.

El polímero puede disolverse en el solvente (por ejemplo, acetato de etilo) a una concentración de aproximadamente 10 mg/mL a aproximadamente 300 mg/mL (es decir, 1 % - 30 % [p/v]), de aproximadamente 15 mg/mL a aproximadamente 295 mg/mL, de aproximadamente 20 mg/mL a aproximadamente 290 mg/mL, de aproximadamente 25 mg/mL a aproximadamente 280 mg/mL, de aproximadamente 30 mg/mL a aproximadamente 270 mg/mL, de aproximadamente 35 mg/mL a aproximadamente 265 mg/mL, de aproximadamente 40 mg/mL a aproximadamente 260 mg/mL, de aproximadamente 15 mg/mL a aproximadamente 295 mg/mL, de aproximadamente

50 aproximadamente 260 mg/mL, de aproximadamente 45 mg/mL a aproximadamente 260 mg/mL, de  
aproximadamente 50 mg/mL a aproximadamente 255 mg/mL, de aproximadamente 55 mg/mL a aproximadamente  
250 mg/mL, aproximadamente 20 mg/mL, aproximadamente 25 mg/mL, aproximadamente 30 mg/mL,  
aproximadamente 35 mg/mL, aproximadamente 40 mg/mL, aproximadamente 45 mg/mL, aproximadamente  
50 mg/mL, aproximadamente 75 mg/mL, aproximadamente 100 mg/mL, aproximadamente 125 mg/mL,

55 aproximadamente 150 mg/mL, aproximadamente 175 mg/mL, aproximadamente 200 mg/mL, aproximadamente 225 mg/mL o aproximadamente 250 mg/mL. En una modalidad, la concentración de polímero en la alimentación interna del secador por aspersión es ≤ 10 % (p/v) y la concentración de polímero de la alimentación externa es ≤ 25 % (p/v).

Luego el polvo de proteína formulado en cuestión se añade a la solución de polímero a aproximadamente 10 mg/mL a aproximadamente 100 mg/mL, aproximadamente 15 mg/mL a aproximadamente 95 mg/mL, aproximadamente 20 mg/mL a aproximadamente 90 mg/mL, aproximadamente 25 mg/mL a aproximadamente 85 mg/mL, aproximadamente 30 mg/mL a aproximadamente 80 mg/mL, aproximadamente 35 mg/mL a aproximadamente 75 mg/mL, aproximadamente 40 mg/mL a aproximadamente 70 mg/mL, aproximadamente 45 mg/mL a aproximadamente 65 mg/mL, aproximadamente 50 mg/mL a aproximadamente 60 mg/mL, a aproximadamente 25 mg/mL, a aproximadamente 30 mg/mL, a aproximadamente 35 mg/mL, a aproximadamente 40 mg/mL, a aproximadamente 45 mg/mL o aproximadamente 50 mg/mL. El polvo y la solución de polímero se mezclan para formar un lodo o una suspensión, que luego se somete a dispersión y secado para formar el polvo farmacéutico.

formulado recubierto con polímero. La solución de polímero preferida contiene el polímero disuelto en un solvente que no disuelve las partículas de proteína suspendidas o sus excipientes. Por ejemplo, en aquellas modalidades en las que el polvo contiene sacarosa como excipiente, no se prefiere el etanol porque la sacarosa puede disolverse en etanol y dejar atrás la proteína en la partícula que es insoluble.

- 5 En una modalidad, el polvo y el lodo o suspensión del polímero se somete a secado por aspersión, que se realiza de una manera similar al método para fabricar el polvo farmacéutico formulado en cuestión, pero con una temperatura de entrada ( $T_{\text{entrada}}$ ) reducida para proteger contra la ignición del solvente o polímero orgánico. Por ejemplo, cuando el solvente orgánico es diclorometano, la  $T_{\text{entrada}}$  puede ser 40 °C; cuando el solvente es acetato de etilo, la  $T_{\text{entrada}}$  puede ser 77 °C; y cuando el solvente es etanol, la  $T_{\text{entrada}}$  puede ser 78 °C. Brevemente, el polvo y el lodo o suspensión del polímero se bombean al secador por aspersión a una velocidad de aproximadamente 0,5 ml/min a aproximadamente 20 ml/min, aproximadamente 1,2 ml/min, aproximadamente 2,6 ml/min o aproximadamente 12,5 ml/min. En una modalidad, se usa un secador por aspersión con boquilla de alimentación dual para atomizar el lodo. En una modalidad, la viscosidad de la solución de polímero es < 20 cPoise a 20 °C. En una modalidad, la concentración de polímero de la alimentación interna es ≤ 10 % (p/v) y la concentración de polímero de la alimentación externa es ≤ 25 %. En una modalidad, las micropartículas se suspenden en la solución de polímero a < 10 % (p/v). En una modalidad, la  $T_{\text{entrada}}$  es dependiente del solvente, por ejemplo, 40 °C para diclorometano, 77 °C para acetato de etilo y 78 °C para etanol. En una modalidad, la  $T_{\text{salida}}$  es menor que la temperatura de transición vítrea del polvo farmacéutico formulado en cuestión y es una función de la  $T_{\text{entrada}}$ , el régimen de flujo, el solvente y el aspirador. En una modalidad, la  $T_{\text{máx}}$  de la boquilla es < 150 °C. En una modalidad, el régimen de flujo máximo del canal exterior es de aproximadamente 1,2 ml/min y el régimen de flujo máximo del canal interior es de aproximadamente 2,6 ml/min. En una modalidad, la potencia del sonicador del secador por aspersión es de aproximadamente 0,5 - 2 W y el aspirador se ajusta a aproximadamente el 80 %.
- 10 25 El polvo farmacéutico formulado recubierto con polímero resultante contiene micropartículas de proteínas constituyentes rodeadas con una corteza de polímero. Tales micropartículas de proteína recubiertas de polímero pueden tener cualquiera de una variedad de arquitecturas. En una modalidad, algunas micropartículas de proteína recubiertas de polímero contienen entre 1 y 50, entre 1 y 40, entre 1 y 30, entre 1 y 20, entre 1 y 10 o entre 1 y 5 micropartículas de proteína integradas en una única micropartícula de proteína recubierta de polímero. En algunas modalidades, una micropartícula de proteína recubierta de polímero individual contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 micropartículas de proteína. En algunas modalidades, el polvo farmacéutico formulado contiene un modo de micropartícula de proteína recubierta de polímero con 1-2, 2-3 o 3-4 micropartículas de proteína.
- 15 35 En algunas modalidades, las micropartículas de proteína recubiertas con polímero tienen un intervalo de diámetros de aproximadamente 2 µm a aproximadamente 70 µm, aproximadamente 5 µm a aproximadamente 65 µm, aproximadamente 10 µm a aproximadamente 60 µm, aproximadamente 15 µm a aproximadamente 55 µm, aproximadamente 20 µm a aproximadamente 50 µm, aproximadamente 15 µm, aproximadamente 20 µm, aproximadamente 25 µm o aproximadamente 30 µm. La variación de tamaño refleja en gran parte el grosor de la corteza del polímero, aunque el diámetro del núcleo de la proteína podría contribuir en cierta medida a la variación de tamaño. La manipulación de la concentración inicial de la solución de polímero o del propio polímero puede usarse para controlar el diámetro de la partícula final del tamaño de una micra.
- 20 40 45 50 Las micropartículas recubiertas de polímero de la presente invención son útiles en la liberación en el tiempo o la liberación prolongada de productos terapéuticos proteicos. Por ejemplo, se prevé que las micropartículas de afibbercept sean útiles en la liberación prolongada de afibbercept en el humor vítreo para el tratamiento de trastornos oculares vasculares, o la implantación subcutánea para la liberación prolongada de trampa de VEGF para tratar el cáncer u otros trastornos.
- 55 60 La solicitud de patente publicada de Estados Unidos núm. US 2013/0129830 A1, publicada el 23 de mayo de 2013, y la solicitud provisional de los Estados Unidos núm. 62/405,610, presentada el 7 de octubre de 2016, se mencionan en general en la presente.

**Ejemplos**

Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la técnica una descripción de cómo fabricar y usar los métodos y las composiciones de la invención, y no están destinados a limitar el alcance de lo que los inventores consideran como su invención.

**Ejemplo 1: Parámetros de Secado por Aspersión**

- 5 Se describe un método para producir un polvo farmacéutico formulado que contiene una proteína mediante el empleo de una etapa de secado por aspersión en una solución acuosa de materia prima que contiene la proteína. Una solución de materia prima que contenía 50 mg/ml de afibbercept, fosfato 10 mM (pH 6,2) y sacarosa al 2 % en p/v se sometió a secado por aspersión mediante el uso de un minisecador por aspersión BUCHI B-290 (Flawil, CH).
- 10 Aquí, la temperatura de entrada se varió de 100 °C a 130 °C en incrementos de diez grados y la ECD de las partículas resultantes se determinó mediante MFI. Como se muestra en la Figura 1, la temperatura de entrada del gas de secado no afectó la distribución de tamaño ni la morfología de las micropartículas de proteína.
- 15 A cada temperatura de entrada, menos del uno por ciento de las partículas resultantes tenían un tamaño superior a 10 micras. La exposición transitoria a altas temperaturas y el enfriamiento por evaporación impidieron que la proteína afibbercept se degradara durante el secado por aspersión.

**Ejemplo 2: Integridad y Estabilidad de la Proteína**

- 20 Se evaluó la integridad molecular de afibbercept en el polvo farmacéutico formulado en seco posterior a la aspersión. El polvo de afibbercept reconstituido se comparó con una formulación líquida de afibbercept para inyección oftálmica y con la formulación de materia prima precursora que contenía afibbercept. La formulación oftálmica comprendía 40 mg/mL de afibbercept, sacarosa al 5 % (p/v), polisorbato 20 al 0,03 % (p/v), NaCl 40 mM y fosfato 10 mM, pH 6,2.
- 25 La materia prima presecada por aspersión y las formulaciones reconstituidas secadas por aspersión comprendían 50 mg/mL de afibbercept, sacarosa al 2 % (p/v) y fosfato 10 mM, pH 6,2. El afibbercept en el polvo farmacéutico formulado en seco posterior a la aspersión mantuvo su natividad y potencia biológica (ver Tabla 5).
- 30 La estabilidad del afibbercept en el polvo secado por aspersión se evaluó al medir la formación de especies de alto peso molecular. La formación de especies de alto peso molecular (HMW) a 37 °C a los 3 meses, 6 meses y 12 meses se determinó mediante SE-UPLC de proteína reconstituida. El polvo de afibbercept secado por aspersión se incubó a 37 °C en condiciones secas y luego se reconstituyó a 50 mg/ml de afibbercept para el análisis. La tasa de formación de especies de HMW se determinó mediante regresión lineal del tiempo de raíz cuadrada para puntos de tiempo recolectados hasta 3 meses, 6 meses o 12 meses a 37 °C. Los resultados, que se representan en la Tabla 6, indican que la velocidad de agregación del afibbercept secado por aspersión se encuentra dentro de los parámetros farmacéuticamente aceptables.
- 35

TABLA 5: Integridad del Afibbercept Secado por Aspersión

		Afibbercept de Formulación Oftálmica	Afibbercept Presecado por Aspersión	Afibbercept Secado por Aspersión Reconstituido
% de Recuperación (RP-HPLC)		99	100	96
Pureza (SE-UPLC)	% Nativo	99,3	99,1	99,0
Análisis de Variantes de Carga (iCIEF)	% Principal	79,5	79,9	79,8
Pureza por SDS-PAGE (No Reducida)	% Principal	97,0	97,5	96,9
Pureza por SDS-PAGE (Reducida)	% Principal	99,0	99,0	99,0
mDSC	T <sub>m1</sub> (°C)	67,6	-	67,3
	T <sub>m2</sub> (°C)	85,3	-	85,6
% Recuperación (RP-HPLC)		99	100	96
Pureza (SE-UPLC)	% Nativo	99,3	99,1	99,0
FTIR	% de Hélice α	8,3	-	8,3
	% de Lámina β	39,2	-	39,5
% de Potencia Relativa (Bioensayo)		84	109	103

TABLA 6: Estabilidad del Polvo Formulado Secado por Aspersión de Aflibercept

Tamaño de partícula	Estabilizadores Térmicos + Formulación Base (50 mg/ml de aflibercept, fosfato 10 mM, pH 6,2)	Tasa de Formación de Especies de HMW de Aflibercept a 37 °C (% de HMW/vmo por SE-UPLC)
5 µm	sacarosa al 1 % en p/v	5,7 %
5 µm	sacarosa al 2 % en p/v	3,7 %

## Ejemplo 3: Estabilizadores Térmicos

- 5 Se demostró que agregar excipientes a la materia prima mejora la estabilidad térmica de la proteína en micropartículas. El aflibercept liofilizado y secado por aspersión (es decir, 2,5 micras de partículas fabricadas a partir de 5 mg/mL de materia prima de aflibercept a 50 °C en condiciones secas y se reconstituyeron a 5 mg/mL de aflibercept para su análisis. Los resultados se representan en la Tabla 7. La fluidez del polvo de las formulaciones que contenían manitol e isoleucina parecía similar a la fluidez de aquellas formulaciones que contenían únicamente sacarosa o trehalosa. La inclusión de manitol e isoleucina mejoró la estabilidad térmica de las formulaciones secadas por aspersión que comprenden las más pequeñas, es decir, partículas de 2,5 µm.
- 10

Tabla 7: Estabilidad Térmica de Micropartículas de Proteína de 2,5 micras

Formato	Tamaño de Partícula	Estabilizadores Térmicos + Formulación Base (5 mg/ml de aflibercept, fosfato 1 mM, pH 6,2)	Tasa de Formación de Especies de HMW de Aflibercept a 50 °C (% de HMW/vmo por SE-UPLC)
Secado por Aspersión	2,5 µm	sacarosa al 0,2 % en p/v	8,5 %
Secado por Aspersión	2,5 µm	trehalosa al 0,2 % en p/v	8,8 %
Secado por Aspersión	2,5 µm	sacarosa al 0,1 % en p/v manitol al 0,05 % en p/v Ile al 0,05 % en p/v	5,9 %
Secado por Aspersión	2,5 µm	trehalosa al 0,1 % en p/v manitol al 0,05 % en p/v Ile al 0,05 % en p/v	5,7 %
Secado por Aspersión	2,5 µm	manitol al 0,1 % en p/v Ile al 0,1 % en p/v	7,0 %

## 15 Ejemplo 4: Tamaño y Forma de las Partículas

- Se evaluó el efecto de la temperatura de entrada de la boquilla, la inclusión de surfactante, la concentración de soluto de aflibercept y la inclusión de estabilizadores térmicos sobre el tamaño o la forma de las partículas. La concentración de proteína y la inclusión de surfactante dieron como resultado micropartículas más pequeñas y, en el caso del surfactante, más redondas. Estos resultados se resumen en la Tabla 8.
- 20

Tabla 8: Tamaño y Forma de las Partículas

Parámetros de Secado por Aspersión	Efecto sobre el Tamaño de las Partículas	Efecto sobre la Morfología de Partículas	Efecto sobre la Estabilidad de Proteínas
Temperatura de entrada (110-130 °C)	Ninguno	Ninguno	Ninguno
+ Polisorbato 20 (< 0,1 % en p/v)	Disminuyó	Más esférica	Ninguno
↓ Concentración de Sólido	Disminuyó	Ninguno	Aumentaron las especies de HMW (~ 0,3 %) post secado por aspersión
+ Estabilizador Térmico	Ninguno	Ninguno	Disminuyó la tasa de formación de HMW en condiciones de estrés térmico seco. La magnitud es dependiente de la cantidad y el tipo de estabilizador térmico.

Como se describió en el Ejemplo 1, la temperatura de entrada se varió de 100 °C a 130 °C en incrementos de diez grados y la ECD de las partículas resultantes se determinó mediante MFI. Como se muestra en la Figura 1, la

25

temperatura de entrada del gas de secado no afectó la distribución del tamaño ni la morfología de la partícula. A cada temperatura de entrada, menos del uno por ciento de las partículas resultantes tenían un tamaño superior a 10 micras.

5 La adición de 0,03 %-0,1 % en p/v de polisorbato 20 a la materia prima produjo más partículas pequeñas cuando se secó por aspersión en comparación con las soluciones de materia prima que no contenían polisorbato 20 (Figura 2). El polvo de formulaciones que contenían más del 0,1 % en p/v de polisorbato 20 exhibió más aglomerados y fue menos fluido (es decir, más pegajoso). Los polvos de flujo bajo son difíciles de manejar en los procesos aguas abajo. Por lo tanto, se prefieren las formulaciones que contienen menos del 0,1 % en p/v de polisorbato 20. También 10 se descubrió que la adición de 0,03 % en p/v de polisorbato 20 a la solución de materia prima produce más partículas esféricas (es decir, relación de aspecto más alta [eje menor/eje mayor]) cuando se seca por aspersión (ver Figura 3).

15 Una menor concentración de soluto en la solución de materia prima redujo el tamaño de partícula del afibercept secado por aspersión a aproximadamente 2,5  $\mu\text{m}$  (en comparación con 5  $\mu\text{m}$ ). El método de secado por aspersión mediante el uso de 50 mg/ml de afibercept, fosfato 10 mM (pH 6,2), sacarosa al 2 % (p/v) como solución de materia prima produjo partículas de ~ 5  $\mu\text{m}$  de diámetro. Reducir la concentración de soluto en 10x en la solución de materia prima (es decir, 5 mg/ml de afibercept, fosfato 1 mM [pH 6,2], 0,2 % de sacarosa [p/v]) redujeron el tamaño de las micropartículas de proteína a la mitad a ~ 2,5  $\mu\text{m}$  (ver Figura 4). Esto representa una disminución de 8 veces en el 20 volumen de la partícula (2<sup>3</sup>). El secado por aspersión de la materia prima más diluida requirió 10 veces más tiempo (~ 1 h/g) para producir la misma cantidad de polvo que las formulaciones de mayor concentración. La mayor relación superficie a volumen de las micropartículas de proteína más pequeñas, junto con una exposición más prolongada a la temperatura de salida durante el secado por aspersión, puede estresar la proteína y comprometer la estabilidad hasta cierto punto.

#### 25 Ejemplo 5: Recubrimiento del Polímero

30 Las micropartículas de proteína de la presente invención pueden recubrirse con un polímero. Este proceso puede denominarse "recubrimiento por aspersión". Brevemente, se disolvió un poliortoéster en diclorometano, acetato de etilo o etanol hasta una viscosidad de aproximadamente < 20 cP a 20 °C. Como se utilizó una boquilla de alimentación dual (minisecador por aspersión BUCHI B-290 (Flawil, CH)), la concentración de polímero en la alimentación interna fue ≤ 10 % (p/v) y en la alimentación externa ≤ 25 % (p/v). Las micropartículas se suspendieron en la solución de polímero a menos del 10 % en p/v. La  $T_{\text{entrada}}$  fue de 40 °C cuando el solvente era diclorometano, 35 77 °C cuando el solvente era acetato de etilo y 78 °C cuando el solvente era etanol. La  $T_{\text{salida}}$  se mantuvo por debajo de la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) mediante el uso de una camisa térmica rellena de agua helada circulante para enfriar el ciclón. La  $T_{\text{salida}}$  era una función de la  $T_{\text{entrada}}$ , el régimen de flujo, la naturaleza del solvente y el aspirador. La  $T_{\text{máx}}$  de la boquilla se mantuvo por debajo de 150 °C. Los regímenes de flujo máximos del canal exterior y del canal interior de la boquilla de alimentación dual fueron de 1,2 ml/min y 2,6 ml/min, respectivamente. 40 La potencia del sonicador fue de 0,5 W a 2 W; y el aspirador se ajustó al 80 %.

45 MFI observó un cambio significativo en la distribución de tamaño hacia partículas más grandes después de recubrir por aspersión las micropartículas de proteína con poliortoéster (POE) (ver Figura 5).

#### Ejemplo 6: Comparación de Descripciones de Proteínas

50 La proteína (afibercept) de micropartículas de proteína reconstituida (Recon DP) se comparó con la proteína previamente secada por aspersión (Pre-SD FDS) y el afibercept preparado como una formulación líquida (EYLEA® DP) para determinar los efectos perjudiciales del secado por aspersión. En un experimento, cada una de estas tres formulaciones se sometió a velocidad de sedimentación - ultracentrifugación analítica (SV-AUC). Este método se usa para detectar y cuantificar agregados de proteínas (ver Arthus y otros, "Detection of protein aggregates by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation (SV-AUC): sources of variability and their relative importance", 98(10) J. Pharm. Sci. 3522-39, 2009). La SV-AUC mostró que todos los lotes son comparables en términos de especies de HMW (Tabla 9). El EYLEA® DP puede tener un contenido de agregados ligeramente más bajo, mientras que el afibercept deshidratado por aspersión reconstituido puede tener agregados desplazados a especies más 55 grandes. Pero dada la variabilidad entre las muestras repetidas, ninguna de esas tendencias es claramente significativa y, en general, estos resultados no proporcionan evidencia clara o convincente de que las tres muestras no sean comparables.

Tabla 9: Agregación de las Proteínas Determinada mediante SV-AUC

	Coeficiente de sedimentación de monómero, S (Media ± DE)	% de Dímero Putativo (7,5-8,0 S) (Media ± DE)	% de Agregados Totales (Media ± DE)
EYLEA® DP	5,161 ± 0,004	1,3 ± 0,7	1,7 ± 1,2
Pre-SD FDS	5,181 ± 0,014	1,5 ± 0,5	2,2 ± 1,2

(continuación)

	Coeficiente de sedimentación de monómero, S (Media ± DE)	% de Dímero Putativo (7,5-8,0 S) (Media ± DE)	% de Agregados Totales (Media ± DE)
DP de Reconocimiento	5,174 ± 0,002	1,5 ± 0,5	2,3 ± 1,2

En otro experimento, cada una de estas tres formulaciones se sometió a cromatografía de exclusión por tamaño - dispersión de luz láser multiángulo (SEC-MALLS). Este método también se usa para detectar y cuantificar agregados de proteínas, así como también proteínas mal plegadas (ver P.J. Wyatt, "Light scattering and the absolute characterization of macromolecules", 272 Anal. Chim. Acta 1-40, 1993; Odaka y otros, "Ligand-Binding Enhances the Affinity of Dimerization of the Extracellular Domain of the Epidermal Growth Factor Receptor1", 122 J. Biochem. 116-121, 1997; J.S. Philo, "Is any measurement method optimal for all aggregate sizes and types?" 8(3) AAPS J. E564-71, 2006). La SEC-MALLS mostró que todos los lotes eran comparables con respecto a los porcentajes de área máxima y la masa calculada para cada especie (ver Tabla 10).

Tabla 10: Agregación de las Proteínas Determinada mediante SEC-MALLS

Muestra	Pico 1 (HMW)		Pico 2 (Principal - Nativo)	
	MW (kDa)	% del Área del Pico	MW (kDa)	% del Área del Pico
EYLEA® DP	264,2 (0,0)	1,0 (0,4)	119,6 (1,0)	99,0 (0,0)
Pre-SD FDS	264,9 (3,0)	0,5 (0,0)	119,9 (0,0)	99,5 (0,0)
DP de Reconocimiento	268,1 (6,0)	1,2 (0,0)	120,4 (1,0)	98,8 (0,0)

Las tres formulaciones de afibbercept también se sometieron a electroforesis capilar (CE)-huella digital de oligosacáridos (ver Chen y otros, "Profiling glycoprotein n-linked oligosaccharide by capillary electrophoresis", 19(15) Electrophoresis 2639-44, 1998) y la toma de huellas dactilares de fragmentos trípticos por cromatografía líquida de ultrarrendimiento - espectroscopía de masas (UPLC-MS) (ver Sinha y otros, "Comparison of LC and LC/MS methods for quantifying N-glycosylation in recombinant IgGs", 19(11) J. Am. Soc. Mass. Spectrom. 1643-54, 2008) para evaluar la glicosilación y otras modificaciones postraduccionales, así como también la secuencia primaria. La huella dactilar de oligosacáridos-CE mostró que todos los lotes son comparables (Tabla 11).

Tabla 11: Modificaciones Postraduccionales

Modificación Postraduccional	EYLEA® DP	Pre-SD FDS	DP de Reconocimiento
Péptidos en el Extremo C-terminal con y sin Lys <sup>432</sup>	Sin Lys <sup>432</sup>	96,2 %	96,4 %
	Con Lys <sup>432</sup>	3,8 %	3,6 %
	Asn <sup>84</sup>	78,9 %	79,5 %
Nivel de Desamidación (isoAsp) en Asn <sup>84</sup> -Motivo Gly	isoAsp <sup>84</sup>	21,1 %	20,5 %
	Met <sup>10</sup>	97,6 %	97,5 %
Nivel de Oxidación en Met <sup>10</sup>	Met(O) <sup>10</sup>	2,4 %	2,5 %
	Met <sup>192</sup>	96,6 %	96,6 %
Nivel de Oxidación en Met <sup>192</sup>	Met(O) <sup>192</sup>	3,4 %	3,4 %
	Met <sup>237</sup>	97,2 %	97,2 %
Nivel de Oxidación en Met <sup>237</sup>	Met(O) <sup>237</sup>	2,8 %	2,8 %
	9 <sup>1</sup> DYLTHR <sup>96</sup>	0,29 %	0,34 %
Glicación del Péptido del Extremo N-terminal en Arg <sup>5</sup>	Extremo N-terminal Modificado	9,2 %	9,0 %
Nivel de no glicosilación de Asn <sup>68</sup>	Glicosilado	64,3 %	63,8 %
	No Glicosilado	35,7 %	36,2 %

Los cromatogramas del mapa de péptidos en condiciones reductoras y no reductoras fueron visualmente comparables entre las tres muestras de afibbercept. No se observaron picos únicos o significativos correspondientes a secuencias mutadas en la muestra secada por aspersión. Todas las modificaciones postraduccionales estuvieron presentes en todas las muestras: Eliminación de la lisina en el extremo C-terminal, desamidación de asparagina, oxidación de metionina y glicación de asparagina. Los perfiles de glicosilación específicos de sitio en los 5 sitios de glicosilación unidos a N se muestran en las tres muestras. Los patrones de los péptidos con enlaces disulfuro en las tres muestras se ajustan a los patrones de enlaces disulfuro esperados para afibbercept. No se identificaron niveles significativos de péptidos que contienen cisteína libres o revueltos en los mapas de péptidos no reducidos en las tres

muestras analizadas. Los análisis de mapeo de péptidos del afibbercept secado por aspersión se ajustaron al EYLEA® DP estándar de referencia.

Ejemplo 7: Efecto de la Humedad sobre la Estabilidad de la Proteína en los Polvos Farmacéuticos Formulados

- 5 Se prepararon formulaciones secadas por aspersión de tres proteínas diferentes de acuerdo con el proceso expuesto en el Ejemplo 1. Se prepararon cuatro polvos formulados para cada una de las tres proteínas con cantidades variables de humedad. Las tres proteínas eran una IgG1, una IgG4 y una molécula trampa (afibbercept).  
 10 Cada polvo de afibbercept contenía 83,8 % (p/p) de afibbercept, 2,1 % (p/p) de fosfato y 14,1 % (p/p) de sacarosa con cantidades de agua en un intervalo entre < 0,5 % y > 6 %. Cada polvo de IgG1 contenía 80,9 % (p/p) de IgG1, 1,5 % (p/p) de histidina, 16,4 % (p/p) de sacarosa y 0,2 % de polisorbato 80 con cantidades de agua en un intervalo entre < 0,5 % y > 6 %. Cada polvo de IgG4 contenía 44,5 % (p/p) de IgG1, 0,4 % (p/p) de acetato, 56,3 % (p/p) de sacarosa y 0,4 % de polisorbato 20 con cantidades de agua en un intervalo entre < 0,5 % y > 6 %.  
 15 Los polvos se almacenaron a 50 °C durante un máximo de 6 semanas. Las muestras se obtuvieron a las tres semanas, al mes ya las seis semanas. Las muestras se reconstituyeron y se evaluó el cambio de proteínas en especies de alto peso molecular mediante SE-UPLC. La tasa de agregación se calculó en base a los valores de las HMW obtenidos de las muestras reconstituidas. Los resultados se presentan en la Tabla 12.

20 Tabla 12: Efecto de la Humedad en el Polvo Farmacéutico Formulado sobre la Estabilidad de las Proteínas

Molécula	Contenido de Humedad (% agua en p/p)	Tasa de agregación a 50 °C (% de HMW/mes <sup>-½</sup> )
IgG4	0,36	1,08
	0,80	1,08
	3,71	1,38
	12,94	11,62
IgG1	0,01	12,60
	0,88	11,07
	5,31	8,74
	13,06	20,84
afibbercept	0,01	13,29
	0,92	12,47
	5,45	10,99
	14,12	27,20

## REIVINDICACIONES

1. Un método para fabricar un polvo farmacéutico formulado, comprendiendo el método:

- 5        a. atomizar una solución acuosa mediante un secador por aspersión, comprendiendo la solución acuosa:
- 10      i. 0,1 %-2,0 % (p/v) de un estabilizador térmico y de 50 mg/ml a 180 mg/ml de una proteína con una relación de masa de, o entre, 1:5-2:5, en donde el estabilizador térmico se selecciona de sacarosa, trehalosa, manitol, isoleucina, prolina, o combinaciones de los mismos y la proteína es (a) una glicoproteína que contiene Fc seleccionada de un anticuerpo o una proteína de fusión Fc receptora, o (b) un receptor soluble, y  
15      ii. 0,01-0,2 % (p/v) de un surfactante no iónico seleccionado del grupo que consiste en óxido de alquil polietileno, alquil poliglucósidos, alcoholes grasos, cocamida MEA, cocamida DEA, cocamida TEA, ésteres de polioxietilensorbitán; poloxámeros, poloxámero 188, poloxámero 407, polietileno-polipropilenglicol y polietilenglicol,
- 20      en donde una temperatura de entrada del secador por aspersión se establece a una temperatura de 100 °C a 130 °C y una temperatura de salida del secador por aspersión se establece a una temperatura que está por debajo del punto de ebullición del agua y por encima de la temperatura ambiente; y  
25      b. aplicar calor a la solución acuosa atomizada para formar el polvo farmacéutico formulado, en donde el polvo farmacéutico formulado no se somete a secado secundario, en donde el polvo farmacéutico formulado comprende entre un 3 % y un 10 % (p/p) de agua.
- 30      2. El método de la reivindicación 1, en donde la proteína de fusión Fc receptora es una proteína trampa.
- 35      3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la proteína es un receptor soluble.
- 40      4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la temperatura de salida del secador por aspersión se establece a 55 °C.
- 45      5. El método de la reivindicación 1, que comprende además:
- 50      suspender el polvo farmacéutico formulado en una solución orgánica que comprende un polímero biodegradable; y  
55      secar por atomización la suspensión para formar un polvo farmacéutico formulado recubierto, en donde el polvo farmacéutico formulado no se somete a secado secundario antes de formar el polvo farmacéutico formulado recubierto.
- 60      6. Un método de fabricación de un polvo farmacéutico formulado, comprendiendo el método:
- 65      a. atomizar una solución acuosa mediante un secador por aspersión, comprendiendo la solución acuosa:
- 70      i. 0,1 %-2,0 % (p/v) de un estabilizador térmico y de 50 mg/ml a 180 mg/ml de una proteína en una proporción molar inferior a 300 moles del estabilizador térmico por mol de la proteína, en donde el estabilizador térmico se selecciona de sacarosa, trehalosa, manitol, isoleucina, prolina, o combinaciones de los mismos, y en donde la proteína es (a) una glicoproteína que contiene Fc seleccionada de un anticuerpo o una proteína de fusión Fc receptora, o (b) un receptor soluble, y  
75      ii. 0,01-0,2 % (p/v) de un surfactante no iónico seleccionado del grupo que consiste en óxido de alquil polietileno, alquil poliglucósidos, alcoholes grasos, cocamida MEA, cocamida DEA, cocamida TEA, ésteres de polioxietilensorbitán; poloxámeros, poloxámero 188, poloxámero 407, polietileno-polipropilenglicol y polietilenglicol,
- 80      en donde una temperatura de entrada del secador por aspersión se establece a una temperatura de 100 °C a 130 °C y una temperatura de salida del secador por aspersión se establece a una temperatura que está por debajo del punto de ebullición del agua y por encima de la temperatura ambiente; y  
85      b. aplicar calor a la solución acuosa atomizada para formar el polvo farmacéutico formulado, en donde el polvo farmacéutico formulado no se somete a secado secundario, en donde el polvo farmacéutico formulado comprende entre un 3 % y un 10 % (p/p) de agua.
- 90      7. El método de la reivindicación 6, en donde la proteína de fusión Fc receptora es una proteína trampa.
- 95      8. El método de la reivindicación 6 o 7, en donde la proteína es un receptor soluble.
- 100     9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en donde la temperatura de salida del secador por aspersión se establece a 55 °C.
- 105     10. El método de la reivindicación 6, que comprende además:

suspender el polvo farmacéutico formulado en una solución orgánica que comprende un polímero biodegradable;  
y  
secar por atomización la suspensión para formar un polvo farmacéutico formulado recubierto, en donde el polvo  
farmacéutico formulado no se somete a secado secundario antes de formar el polvo farmacéutico formulado  
recubierto.

5        11. Un polvo farmacéutico formulado que comprende:

10      60 %-97 % (p/p) de una glicoproteína, y 3 %-40 % (p/p) de un estabilizador térmico, en donde la glicoproteína es  
un anticuerpo o una proteína de fusión Fc receptora, y en donde el estabilizador térmico se selecciona de  
sacarosa, trehalosa, manitol, isoleucina, prolina, o combinaciones de los mismos;

15      0,01-0,2 % (p/v) de un surfactante no iónico seleccionado del grupo que consiste en óxido de alquil polietileno,  
alquil poliglucósidos, alcoholes grasos, cocamida MEA, cocamida DEA, cocamida TEA, ésteres de  
polioxietilensorbitán; poloxámeros, poloxámero 188, poloxámero 407, polietileno-polipropilenglicol y  
polietilenglicol; y

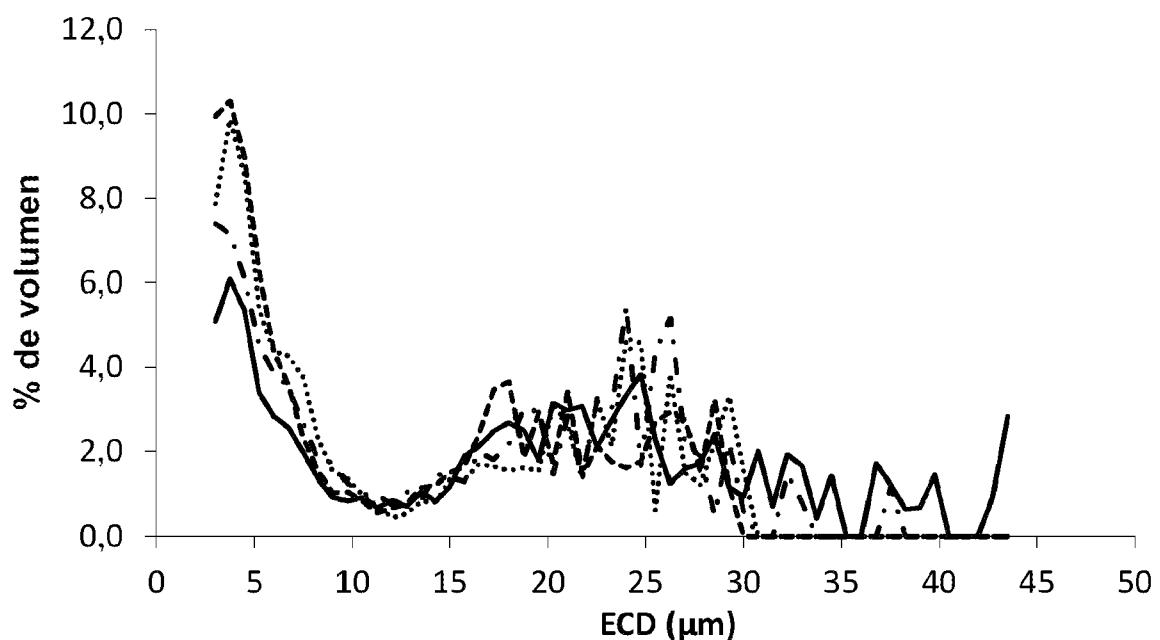
3        3 %-10 % (p/p) de agua, en donde el polvo farmacéutico formulado no se somete a secado secundario, y en  
donde la tasa de agregación es inferior al 5 % por mes  $\wedge \frac{1}{2}$ .

20      12. El polvo farmacéutico formulado de la reivindicación 11, en donde la proteína Fc receptora es una proteína  
trampa.

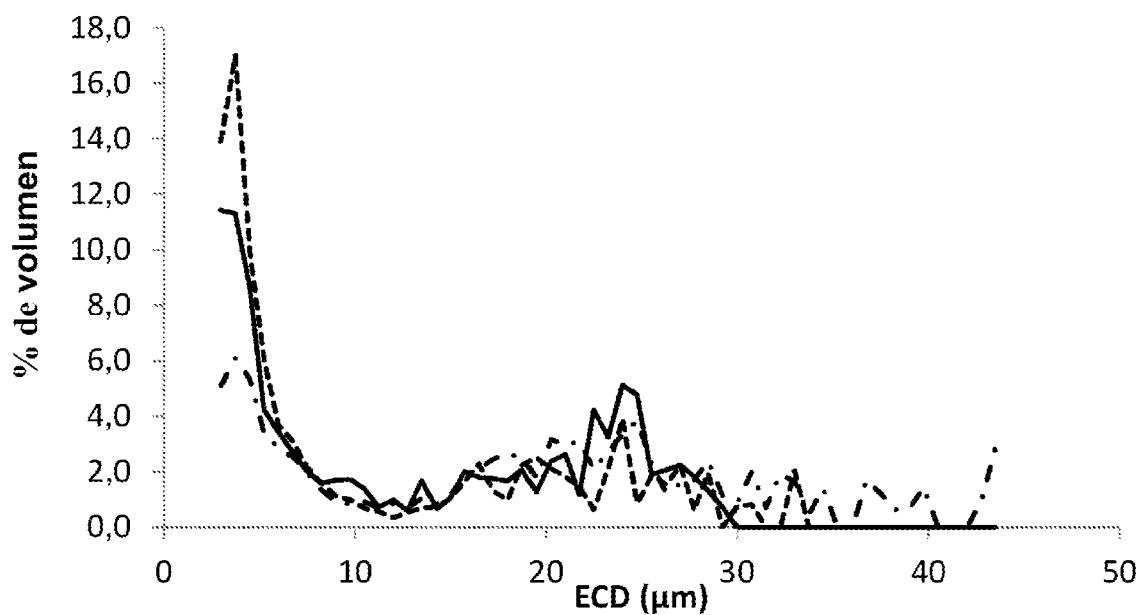
25      13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o el polvo formulado de la reivindicación 11 o 12, en  
donde el alquil poliglucósido se selecciona de octil glucósido y decil maltósido.

30      14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o el polvo formulado de la reivindicación 11 o 12, en  
donde los alcoholes grasos se seleccionan de alcohol cetílico y alcohol oleílico.

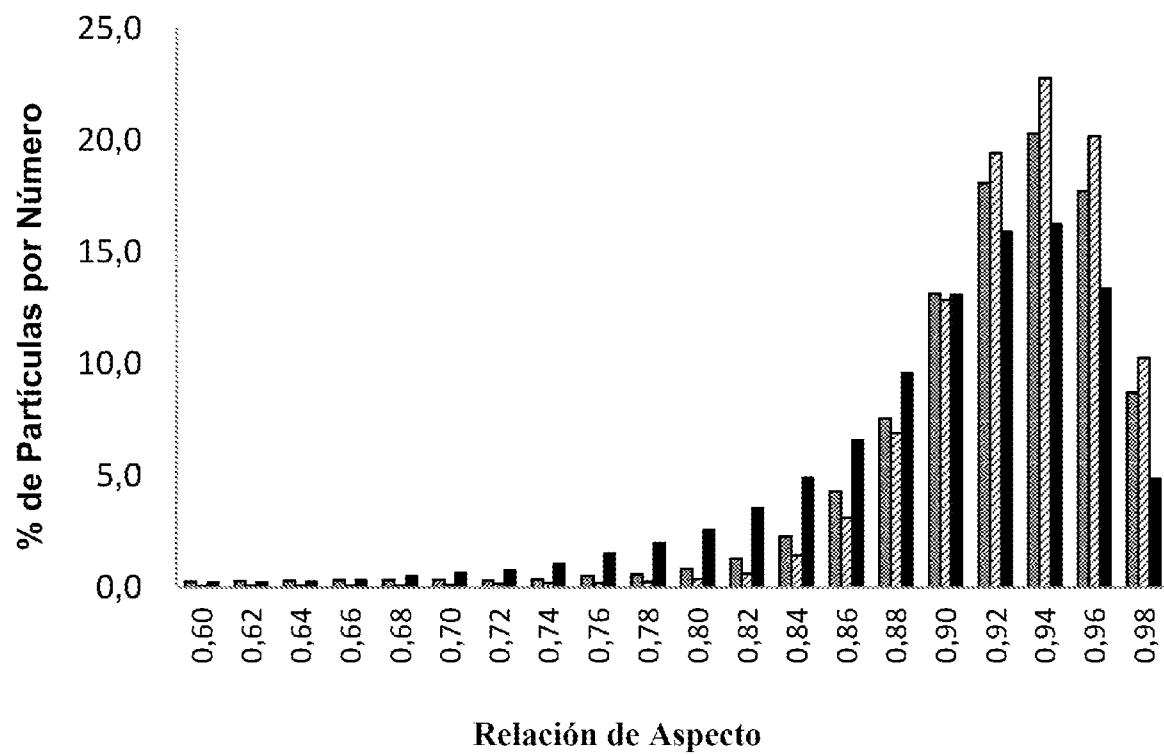
35      15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o el polvo formulado de la reivindicación 11 o 12, en  
donde el éster de polioxietilensorbitán se selecciona de polisorbato 20, polisorbato 28, polisorbato 40, polisorbato 60,  
polisorbato 65, polisorbato 80, polisorbato 81 y polisorbato 85.



**FIGURA 1**



**FIGURA 2**



**FIGURA 3**

ES 2 981 791 T3

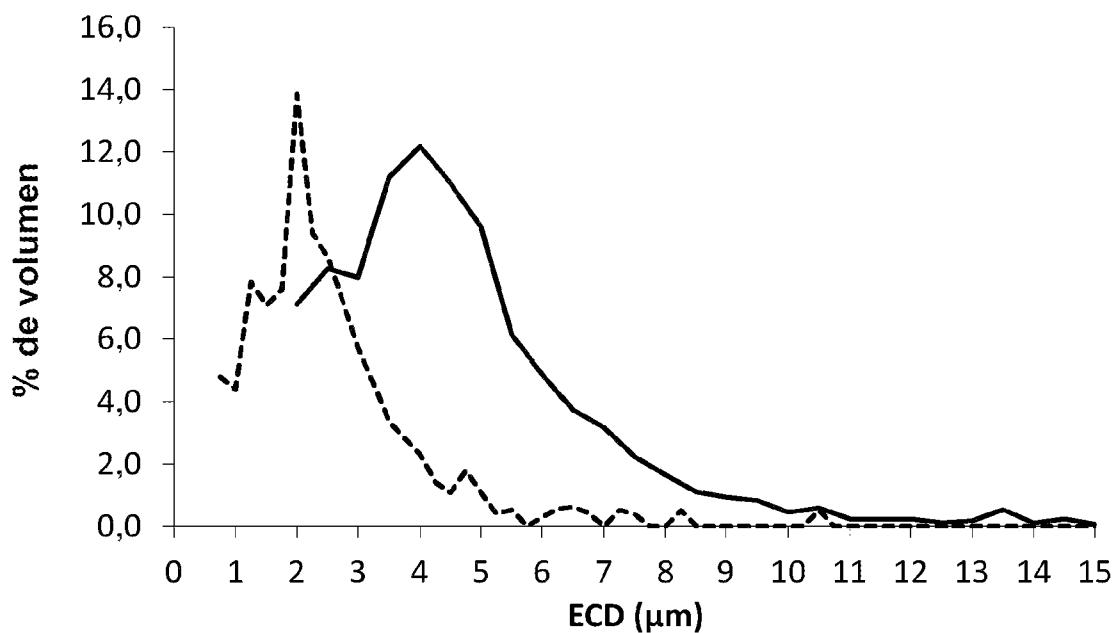
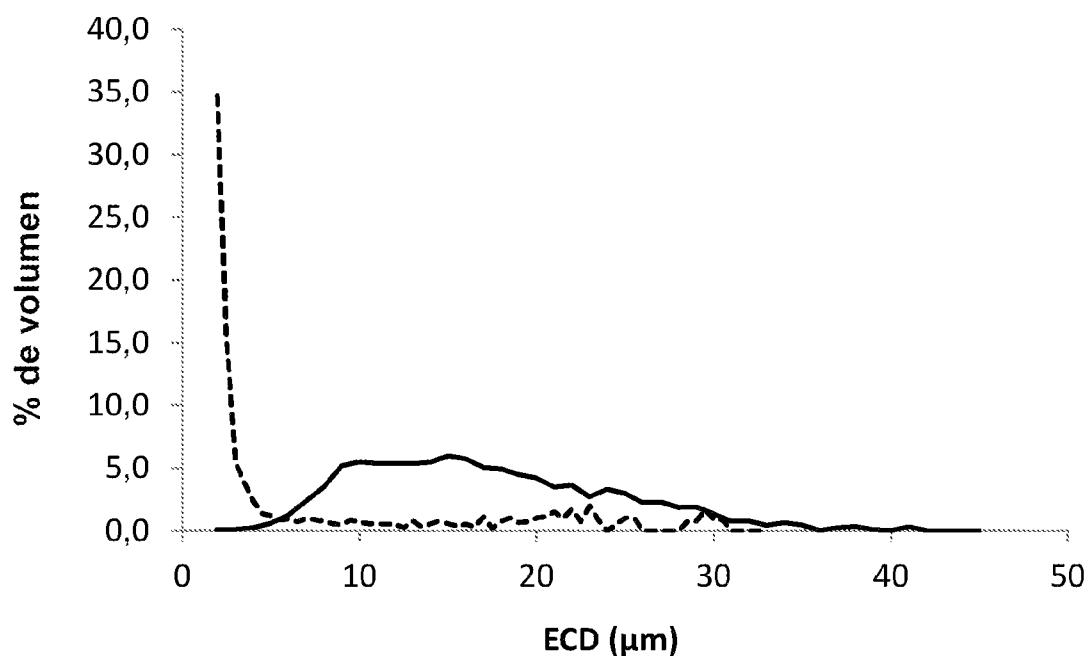


FIGURA 4

### ES 2 981 791 T3



**FIGURA 5**

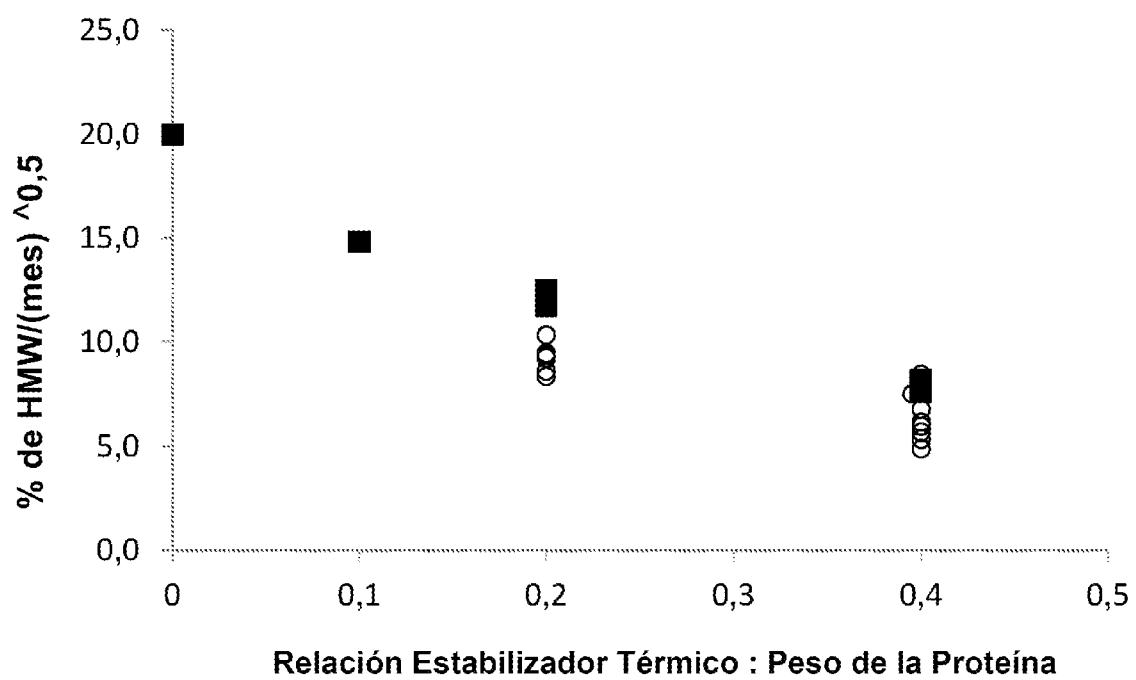
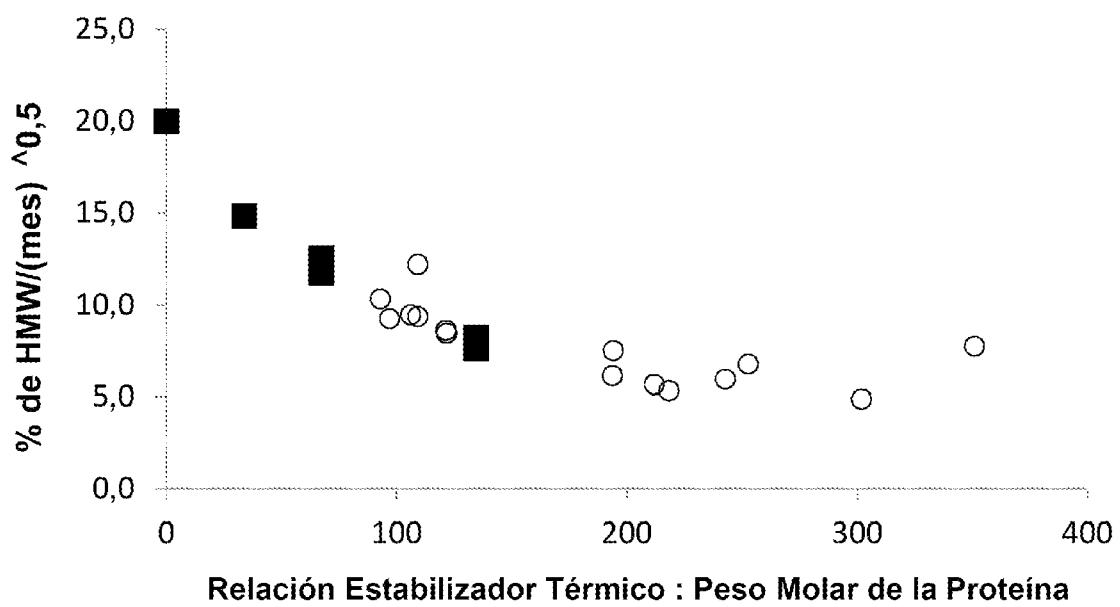


FIGURA 6A

ES 2 981 791 T3



**FIGURA 6B**