

FORMULACIONES EN POLVO SECO DE ANTICUERPOS DE UNIÓN A LINFOPOYETINA ESTROMAL TÍMICA (TSLP) Y MÉTODOS PARA USARLOS

CAMPO DE LA DESCRIPCIÓN

La presente tecnología se relaciona generalmente con formulaciones en polvo seco de fragmentos de unión a antígenos derivados de anticuerpos específicos para la linfopoyetina estromal tímica (TSLP, por sus siglas en inglés), así como métodos para tratar el asma, inclusive asma leve, moderada y grave, asma eosinofílica y asma no eosinofílica o con bajo contenido de eosinófilos, mediante el uso de las formulaciones en polvo seco por vía pulmonar. Las formulaciones en polvo seco incluyen una mezcla de leucina y trileucina que tiene como resultado una formulación particularmente adecuada para administrar fragmentos de unión a antígeno derivados de anticuerpos anti-TSLP por inhalación.

ANTECEDENTES

El asma afecta a unas 300 millones de personas en todo el mundo, incluidos todos los grupos etarios, y representa una carga grave para el sistema de atención de la salud y para la sociedad debido a la pérdida de productividad en el lugar de trabajo y la interrupción de la vida familiar. ("Pocket Guide for Asthma Management and Prevention," Global Initiative for Asthma; 2019). El asma causa síntomas como sibilancias, dificultad para respirar, opresión en el pecho y tos que varían con el tiempo en cuanto a su aparición, frecuencia e intensidad. Los síntomas a menudo se asocian con broncoconstricción, engrosamiento de la pared de las vías respiratorias y aumento de la producción de mucosidad. El asma puede tener varios grados de síntomas y estar bien o mal controlado, según el número de ataques y la gravedad.

La linfopoyetina estromal tímica (TSLP), una citosina derivada de células epiteliales producida en respuesta a estímulos ambientales y proinflamatorios, conduce a la activación de múltiples células inflamatorias y vías corriente abajo. La TSLP aumenta en las vías respiratorias de los pacientes con asma y se correlaciona con la expresión de citosinas y quimiosinas Th2, y la gravedad de la enfermedad. Si bien la TSLP es fundamental para la regulación de la inmunidad por Th2, también puede desempeñar un papel clave en otras vías de inflamación y, por lo tanto, ser relevante para múltiples fenotipos de asma.

La administración de anticuerpos contra TSLP a un paciente, en particular mediante inhalación, proporcionaría un método mejorado de tratamiento para pacientes asmáticos, incluidos aquellos con asma leve que pueden requerir la administración diaria de dosis bajas.

BREVE COMPENDIO DE LA DESCRIPCIÓN

En vista de lo anterior, en un aspecto proporcionado en el presente documento se proporciona una formulación en polvo seco que comprende una pluralidad de

micropartículas, las micropartículas comprenden: leucina, alrededor de 1 % a alrededor de 10 % de trileucina en peso y un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo anti-linfopoyetina estromal tímica (TSLP).

En algunas modalidades, el fragmento de unión al antígeno del anticuerpo anti-linfopoyetina estromal tímica (TSLP) comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende: una secuencia de CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:1, una secuencia de CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:2, y una secuencia de CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:3, donde cualquiera de las CDR1, 2 o 3 de cadena pesada comprende opcionalmente una única sustitución de aminoácido, y un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:5, una secuencia de CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:6, y una secuencia de CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:7, donde cualquiera de las CDR 1, 2 o 3 de cadena ligera comprende opcionalmente una única sustitución de aminoácido, donde la leucina y la trileucina están presentes en una relación de concentración de leucina:trileucina de alrededor de 0,1:1 a alrededor de 30:1.

En otro aspecto, se proporciona un método para tratar el asma en un paciente, que comprende administrar por inhalación la formulación en polvo seco del primer aspecto.

En otro aspecto, se proporciona una formulación en polvo seco según el primer aspecto, para usar en un método de tratamiento, donde la formulación se administra por inhalación. En algunas modalidades, la formulación es para usar en el tratamiento del asma.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las características y los aspectos anteriores y diferentes de la presente tecnología se pueden entender mejor a partir de la siguiente descripción de las modalidades y como se ilustra en los dibujos adjuntos. Los dibujos adjuntos, que se incorporan a la presente y forman parte de la memoria descriptiva, sirven además para ilustrar los principios de la presente tecnología. Los dibujos no se encuentran necesariamente a escala.

La FIG. 1 muestra la unión de Fab₁ a TSLP hu medida mediante KinExA.

La FIG. 2 muestra la unión de Fab₁ a TSLP cyno medida mediante KinExA.

La FIG. 3 muestra la unión competitiva de Fab₁ a TSLP hu medida mediante el ensayo HTRF.

La FIG. 4 muestra que Fab₁ inhibe la liberación de CCL17 de las PBMC expuestas a TSLP.

La FIG. 5 muestra que Fab₁, Fab₂ y Fab₃ inhiben la liberación de CCL17 inducida por TSLP a partir de PBMC.

Las FIGS. 6A-6C muestran los perfiles de PK en suero con Fab₁, BAL y ELF después de la inhalación única (Grupo 1 y 2) y el aumento de dosis repetida (Grupo 3).

La FIG. 7 muestra micropartículas de una formulación en polvo seco de acuerdo con las modalidades de la presente.

La FIG. 8A muestra los resultados de la densidad aparente comprimida en función de la leucina y la trileucina en las formulaciones en polvo seco.

La FIG. 8B muestra el llenado de cápsulas con formulaciones en polvo seco descritas en el presente documento.

La FIG. 9 muestra los resultados de la superficie específica medida mediante BET, en m²/g, para micropartículas de formulaciones en polvo seco de acuerdo con modalidades del presente documento.

La FIG. 10 muestra la correlación indirecta del contenido de humedad con la concentración de leucina.

Las FIGS. 11A-11D muestran la rugosidad de la superficie de las micropartículas detectadas por SEM.

La FIG. 12 muestra la correlación entre el diámetro aerodinámico de masa media (MMAD, por sus siglas en inglés) y los valores en % en peso de leucina y trileucina.

La FIG. 13 muestra la correlación entre la deposición por dispositivo y los valores en % en peso de leucina y trileucina.

La FIG. 14 muestra la correlación entre la fracción de partículas finas (FPF, por sus siglas en inglés) y los valores en % en peso de leucina y trileucina.

La FIG. 15A muestra el número de partículas subvisibles después de la reconstitución de una formulación que comprende 40 % (p/p) de Fab₁ y concentraciones variables de polisorbato-80 (PS-80) con respecto a una concentración de solución de Fab₁ de 30 mg/ml (en la Figura “≥” comprende un límite de tamaño superior de 200 μm)

La FIG. 15B muestra el número de partículas subvisibles después de la reconstitución de una formulación que comprende 40 % (p/p) de Fab₁ y concentraciones variables de PS-80 con respecto a una concentración de solución de Fab₁ de 2,5 mg/ml (en la Figura “≥” comprende un límite de tamaño superior de 200 μm)

La FIG. 16A muestra el número de partículas subvisibles después de la reconstitución de una formulación que comprende 40 % (p/p) de Fab₁ y concentraciones variables de poloxámero-188 con respecto a una concentración de solución de Fab₁ de 30 mg/ml (en la Figura “≥” comprende un límite de tamaño superior de 200 μm)

La FIG. 16B muestra el número de partículas subvisibles después de la reconstitución de una formulación que comprende 40 % (p/p) de Fab₁ y concentraciones variables de poloxámero-188 con respecto a una concentración de solución de Fab₁ de 2,5 mg/ml (en la

Figura “≥” comprende un límite de tamaño superior de 200 μm)

La FIG 17A muestra el % del contenido de humedad de una formulación que comprende 40 % (p/p) de Fab₁ y PS-80 al 1,1 % después de un almacenamiento de 1 o 3 meses a 40 °C y 75 % de humedad relativa (40/75) y durante 3 meses a 25 °C y 60 % de humedad relativa (25/60).

La FIG 17B muestra la distribución de tamaño de partícula (PSD, por sus siglas en inglés) de una formulación que comprende 40 % (p/p) de Fab₁ y PS-80 al 1,1 % después de un almacenamiento durante 1 o 3 meses a 40 °C y 75 % de humedad relativa (40/75) y durante 3 meses a 25 °C y 60 % de humedad relativa (25/60).

La FIG 17C muestra la morfología de partícula de una formulación que comprende 40 % (p/p) de Fab₁ y PS-80 al 1,1 % después de un almacenamiento de 1 o 3 meses a 40 °C y 75 % de humedad relativa (40/75) y durante 3 meses a 25 °C y 60 % de humedad relativa (25/60).

La FIG 18A muestra el % del contenido de humedad de una formulación que comprende 1 % (p/p) de Fab₁ y PS-80 al 1,1 % después de un almacenamiento de 1 o 3 meses a 40 °C y 75 % de humedad relativa (40/75) y durante 3 meses a 25 °C y 60 % de humedad relativa (25/60).

La FIG 18B muestra la distribución de tamaño de partícula (PSD) de una formulación que comprende 1 % (p/p) de Fab₁ y PS-80 al 1,1 % después de un almacenamiento durante 1 o 3 meses a 40 °C y 75 % de humedad relativa (40/75) y durante 3 meses a 25 °C y 60 % de humedad relativa (25/60).

La FIG 18C muestra la morfología de partícula de una formulación que comprende 1 % (p/p) de Fab₁ y PS-80 al 1,1 % después de un almacenamiento de 1 o 3 meses a 40 °C y 75 % de humedad relativa (40/75) y durante 3 meses a 25 °C y 60 % de humedad relativa (25/60).

La FIG. 19A muestra el número de partículas subvisibles tras la reconstitución de una formulación que comprende 40 % de Fab₁ y 1,1 % de PS-80 (p/p) con respecto a una concentración de solución de Fab₁ de 30 mg/ml, después del almacenamiento a 40/75 durante 1 o 3 meses y 25/60 durante 3 meses.

La FIG. 19B muestra el número de partículas subvisibles tras la reconstitución de una formulación que comprende 1 % de Fab₁ y 1,1 % de PS-80 (p/p) con respecto a una concentración de solución de Fab₁ de 0,75 mg/ml, después del almacenamiento a 40/75 durante 1 o 3 meses y 25/60 durante 3 meses.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La formulación en polvo seco descrita en el presente documento aborda una necesidad no satisfecha al permitir el uso de fragmentos de unión de anticuerpos anti-TSLP para el tratamiento del asma en un entorno de atención primaria. Los sujetos que padecen asma

suelen controlar los síntomas asmáticos mediante composiciones farmacéuticas de autoadministración, tales como los agonistas beta de acción prolongada y/o glucocorticoides, por inhalación.

Mientras que los medicamentos biológicos existentes, ya sea aprobados o en fase de investigación clínica, ofrecen un nuevo paradigma de tratamiento para los pacientes con asma, por lo general, no pueden administrarse a los sujetos por la ruta pulmonar familiar. El tezepelumab, un medicamento biológico de última generación, es un anticuerpo monoclonal (mAb) de inmunoglobulina humana G2 (IgG2) que se une a TSLP, evitando su interacción con el complejo receptor de TSLP. En un ensayo reciente de fase 2, aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo, los sujetos con asma que recibieron inyecciones subcutáneas de tezepelumab tuvieron tasas más bajas de exacerbaciones de asma clínicamente significativas que aquellos que recibieron placebo (Corren *et al* (2017) *NEJM* 377:936-946).

La invención descrita en la presente combina las ventajas terapéuticas de los medicamentos biológicos de última generación, tales como tezepelumab, con la vía de administración más familiar para los sujetos que padecen asma. Por lo tanto, la invención permite que dichas terapias de última generación se administren en un entorno de atención primaria, ampliando así la disponibilidad de estos medicamentos a sujetos que están más allá del alcance de la atención especializada.

Además, las formulaciones descritas en el presente documento pueden ser particularmente útiles para tratar pacientes con asma menos grave que normalmente serían tratados en un entorno de atención primaria. Por ejemplo, los pacientes con una escala de Iniciativa Global para el Asma (GINA, por sus siglas en inglés) de 3 o menos, convenientemente una escala GINA de 2 o 3, pueden ser particularmente aptos para el tratamiento con la formulación descrita en este documento. En determinadas modalidades, los pacientes con una puntuación GINA de 3 son aptos para el tratamiento con la formulación descrita en el presente documento. En determinadas modalidades, los pacientes con una puntuación GINA de 2 son aptos para el tratamiento con la formulación descrita en el presente documento. Además, al administrar los medicamentos biológicos directamente al pulmón, se reducen los efectos secundarios asociados con la administración sistémica (como la inflamación en el lugar de la inyección).

Además, las formulaciones brindan la posibilidad de tratar a pacientes con asma moderada-grave que podrían ser controlados en un entorno de atención primaria, o para tratar a pacientes con asma moderada-grave con difícil acceso al tratamiento a través de atención especializada. Por ejemplo, las formulaciones pueden ser útiles para el tratamiento de pacientes con asma moderada a grave con una escala de 4-5 de la Iniciativa Global para el

Asma (GINA). Convenientemente, las formulaciones prevén la posibilidad de tratar el asma de moderada a grave que no está controlada. Convenientemente, las formulaciones brindan la posibilidad de tratar el asma moderada-grave que no está controlada con dosis medias a dosis altas de ICS:LABA con una o más exacerbaciones y síntomas frecuentes.

El término "alrededor de" se usa en la presente para significar aproximadamente, en la región de o alrededor. Cuando el término "alrededor de" se usa junto con un intervalo numérico, modifica ese intervalo al extender los límites por encima y por debajo de los valores numéricos establecidos. En general, el término "alrededor de" se utiliza en la presente para modificar un valor numérico por encima y por debajo del valor establecido por una variación de 10 %.

Como se describe en el presente documento, las formulaciones en polvo seco se proporcionan para la estabilización y administración de principios activos farmacéuticos. Convenientemente, las formulaciones en polvo seco se formulan para administración pulmonar, incluso por inhalación a través de un inhalador en polvo seco (DPI, por sus siglas en inglés).

Tal como se usa en el presente documento, una "formulación en polvo seco" se refiere a una formulación que incluye una pluralidad de micropartículas sólidas en una composición de polvo que contiene convenientemente menos del 20 % de humedad, más convenientemente menos de alrededor de 10 % de humedad, menos de alrededor de 5-6 % de humedad o menos de alrededor de 3 % humedad. Como se describe en el presente documento, las formulaciones en polvo seco se pueden utilizar para la administración por inhalación a un paciente. En otras modalidades, las formulaciones en polvo seco se pueden reconstituir y administrar en forma líquida, ya sea por vía oral, intravenosa, parenteral, etc. Como se describe en este documento, una ventaja de las formulaciones en polvo seco proporcionadas es el mayor rendimiento para mejorar la capacidad de fabricación. Una ventaja adicional es que la plataforma de formulación descrita en este documento proporciona una densidad aparente comprimida alta. Esto significa que se puede envasar una mayor masa de polvo por unidad de suministro (por ejemplo, dentro de una cápsula). Esto significa que se le puede administrar una dosis alta de agente activo por unidad de administración al sujeto. Esta sorprendente ventaja puede mejorar el cumplimiento del paciente al reducir el número de dosis unitarias que se deben tomar. Además, la densidad aparente comprimida alta puede permitir que se administre una dosis más alta de agente activo, lo que aumenta el extremo superior del intervalo de dosis administrada. Esto puede permitir la entrega de agentes activos en dosis terapéuticamente eficaces donde antes no era posible.

Una "micropartícula", como se usa en el presente documento, se refiere a una partícula

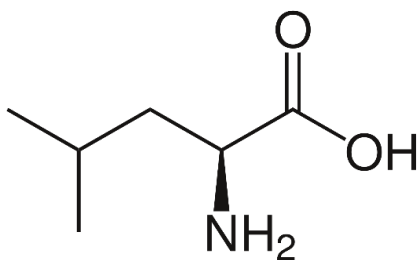
sólida que tiene un tamaño de diámetro medio de masa (MMD) de menos de 20 μm . El diámetro medio de masa es una medida del tamaño medio de partícula de las micropartículas, medido utilizando un método adecuado, que incluye, por ejemplo, sedimentación centrífuga, microscopía electrónica, dispersión de luz, difracción láser, etc.

Las formulaciones en polvo seco descritas en el presente documento contienen convenientemente una pluralidad de micropartículas. Como se usa en la presente, "pluralidad" se refiere a 2 o más de un elemento, y se refiere convenientemente a 5 o más, 10 o más, 50 o más, 100 o más, 500 o más, 1000 o más, etc.

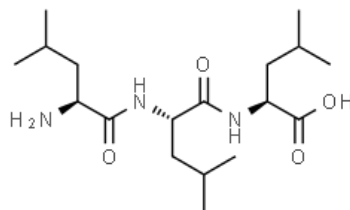
En modalidades, las formulaciones en polvo seco incluyen una pluralidad de micropartículas, las micropartículas comprenden convenientemente leucina; alrededor de 1 % a alrededor de 10 % de trileucina en peso; y el fragmento de unión al anticuerpo anti-TSLP definido en el presente documento. A menos que se indique lo contrario, "agente activo" se refiere a un fragmento de unión al antígeno derivado de un anticuerpo anti-TSLP, como se define en el presente documento.

La FIG. 7 muestra una micrografía electrónica de barrido de micropartículas de una formulación en polvo seco de ejemplo proporcionada en este documento. En modalidades adicionales, las formulaciones en polvo seco que incluyen una pluralidad de micropartículas comprenden convenientemente alrededor de 1 % a alrededor de 25 % de leucina; alrededor de 1% a alrededor de 10 % de trileucina; y el agente activo.

Como se usa en la presente, "leucina", ya sea que esté presente como un solo aminoácido o como un componente de aminoácido de un péptido, se refiere al aminoácido leucina ($\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$), que puede ser una mezcla racémica o en su forma D o L, así como formas modificadas de leucina (es decir, donde uno o más átomos de leucina han sido sustituidos por otro átomo o grupo funcional). La estructura química de la leucina se proporciona a continuación:



"Trileucina", tal como se utiliza en la presente, se refiere al compuesto químico en el que tres moléculas de leucina están unidas en un péptido, como leucina-leucina-leucina (Leu-Leu-Leu), $\text{C}_{18}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_4$. La estructura química de la trileucina se proporciona a continuación:



Las cantidades de leucina y trileucina proporcionadas en este documento, a menos que se indique lo contrario, se proporcionan como porcentajes en peso (% en peso) de las formulaciones. Como las formulaciones en polvo seco contienen sustancialmente poca o nada de agua, los componentes en peso de las formulaciones en polvo seco son, por lo tanto, porcentajes en peso seco de las formulaciones finales.

En modalidades de la formulación que comprenden leucina; trileucina; y el fragmento de unión al antígeno, la leucina y la trileucina se mantienen en un intervalo de relación deseado que proporciona las características de densidad aparente comprimida mejoradas descritas en este documento, así como también proporciona las características de micropartícula deseadas que permiten un mejor almacenamiento y suministro. En las modalidades, la relación en peso de leucina y trileucina en las micropartículas, es decir, leucina:trileucina, es alrededor de 0,1:1 a alrededor 30:1. En modalidades adicionales, la leucina y la trileucina están presentes en una relación en peso de leucina:trileucina en alrededor de 0,1:1 a alrededor 25:1, alrededor de 0,5:1 a alrededor 20:1, alrededor de 1:1 a alrededor 20:1, alrededor de 1:1 a alrededor 15:1, alrededor de 1:1 a alrededor 12:1, alrededor de 1:1 a alrededor 10:1, alrededor de 1:1 a alrededor 7:1, alrededor de 1:1 a alrededor 6:1, o alrededor 1:1, alrededor de 2:1, alrededor de 3:1, alrededor de 4:1, alrededor de 5:1, alrededor de 5,1:1, alrededor de 5,2:1 alrededor de 5,25:1, alrededor de 5,3:1, alrededor de 5,4:1, alrededor de 5,5:1, alrededor de 5,75:1 o alrededor de 6:1.

A menos que se indique lo contrario, las proporciones descritas en este documento se expresan como proporciones en % en peso (p/p— también conocida como “relación de peso”), es decir, el peso de leucina:peso de trileucina en las formulaciones descritas en este documento. Las proporciones se logran proporcionando una concentración mg/mL deseada de leucina y trileucina en una materia prima, y luego secado para eliminar el solvente de la materia prima que tiene como resultado una micropartícula atomizada donde la relación de concentración inicial (expresada en mg/mL) se mantiene como una relación final de leucina:trileucina en peso.

En el presente documento se describen ejemplos de porcentajes en peso de leucina y

trileucina que se pueden utilizar en las formulaciones en polvo seco para lograr estas proporciones. Convenientemente, las formulaciones en polvo seco comprenden alrededor de 5 % a alrededor de 15 % de leucina y alrededor de 1 % a alrededor de 5 % de tripleucina. En modalidades, las formulaciones en polvo seco comprenden alrededor de 8 % a alrededor de 11 % de leucina y alrededor de 2 % a alrededor de 4 % de tripleucina, y en modalidades, las formulaciones en polvo seco comprenden alrededor de 10,5 % de leucina y alrededor de 2 % de tripleucina.

En modalidades de ejemplo, las formulaciones en polvo seco comprenden alrededor de 1 % a alrededor de 10 % de tripleucina en peso, más convenientemente alrededor de 1 % a alrededor de 9 %, alrededor de 1 % a alrededor de 8 %, alrededor de 1 % a alrededor de 7 %, alrededor de 1 % a alrededor de 6 %, alrededor de 1 % a alrededor de 5 %, alrededor de 2 % a alrededor de 10 %, alrededor de 2 % a alrededor de 9 %, alrededor de 2 % a alrededor de 8 %, alrededor de 2 % a alrededor de 7 %, alrededor de 2 % a alrededor de 6 %, alrededor de 2 % a alrededor de 5 %, alrededor de 2 % a alrededor de 4 %, o alrededor de 1 %, alrededor de 1,5 %, alrededor de 2 %, alrededor de 2,5 %, alrededor de 3 %, alrededor de 3,5 %, alrededor de 4 %, alrededor de 4,5 %, alrededor de 5 %, alrededor de 5,5 %, o alrededor de 6 % de tripleucina, en peso.

En modalidades de ejemplo, las formulaciones en polvo seco comprenden alrededor de 1 % a alrededor de 25 % de leucina en peso, más convenientemente alrededor de 2 % a alrededor de 20 %, alrededor de 3 % a alrededor de 20 %, alrededor de 4 % a alrededor de 20 %, alrededor de 5 % a alrededor de 20 %, alrededor de 5 % a alrededor de 15 %, alrededor de 7 % a alrededor de 12 %, alrededor de 8 % alrededor de 11 %, alrededor de 9 % a alrededor de 11 %, alrededor de 10 % a alrededor de 11 % o alrededor de 5 %, alrededor de 6 %, alrededor de 7 %, alrededor de 8 %, alrededor de 8,5 %, alrededor de 9 %, alrededor de 10 %, alrededor de 10,5 %, alrededor de 11 %, alrededor de 11,5 %, alrededor de 12 %, alrededor de 12,5 % o alrededor de 13 % de leucina en peso.

En modalidades adecuadas, las formulaciones en polvo seco comprenden alrededor de 8 % a alrededor de 11 % de leucina y alrededor de 2 % a alrededor de 4 % de tripleucina en peso, más convenientemente alrededor de 9 % a alrededor de 11 % de leucina, y alrededor de 2 % a alrededor de 3 % de tripleucina en peso. En modalidades de ejemplo, las formulaciones en polvo seco comprenden alrededor de 10,5 % de leucina y alrededor de 2 % de tripleucina en peso.

Como se describe en este documento, se ha descubierto sorprendentemente que el uso de la combinación de leucina y tripleucina en una formulación en polvo seco permite reducir la cantidad total de leucina y tripleucina requerida para preparar micropartículas, en comparación con las formulaciones en polvo seco que contienen solo uno de estos

componentes, sin dejar de proporcionar la estabilidad deseada. En determinadas modalidades, las formulaciones de la presente invención tienen una mayor densidad aparente comprimida en comparación con las formulaciones de la técnica, lo que puede permitir el suministro de una mayor concentración de un agente activo a los pulmones de un paciente después de la inhalación. Estas características mejoradas parecen estar relacionadas con la incorporación de leucina y trileucina en las micropartículas.

Un proceso de ejemplo de preparación de una formulación en polvo seco, de acuerdo con las modalidades de este documento, puede tener lugar de la siguiente manera. Una materia prima líquida que contiene los componentes finales deseados de la formulación en polvo seco se atomiza usando un atomizador, hasta obtener una nube fina. A continuación, la nube se seca como se describe en este documento. Las gotas atomizadas contienen los componentes disueltos, inicialmente como una gota líquida. A medida que se seca la gota, diferentes componentes de la formulación comienzan a saturarse y precipitarse a diferentes velocidades. Como se describe en este documento, comienza a formarse una capa alrededor de una superficie exterior de las micropartículas de las formulaciones en polvo seco. Esta capa incluye convenientemente los componentes de leucina y trileucina en una superficie exterior de la cubierta. Cabe señalar que la leucina y la trileucina se ubican preferentemente en una superficie exterior de las micropartículas, mientras que también se pueden encontrar cantidades más pequeñas de leucina y trileucina en todas las micropartículas. En modalidades, se encuentra convenientemente una mayor concentración de leucina y trileucina en o cerca de la superficie de las micropartículas, en lugar de cerca del centro de las micropartículas. En modalidades, el centro de las micropartículas contiene una cantidad sustancial del agente activo, junto con otros componentes del excipiente como se describe en este documento, convenientemente en forma amorfa. Como se usa en el presente documento, una "cantidad sustancial" del agente activo significa que al menos alrededor de 60 % del agente activo (es decir, del agente activo total en la formulación) está ubicado en o cerca del centro de las micropartículas, convenientemente al menos alrededor de 70 %, y más convenientemente al menos alrededor de 75 %, al menos alrededor de 80 %, al menos alrededor de 85 %, al menos alrededor de 90 %, al menos alrededor de 95 %, y en modalidades alrededor de 95 %-100 %, del agente activo se encuentra en o cerca del centro de las micropartículas.

En modalidades adicionales, las micropartículas contienen leucina y trileucina ubicadas sustancialmente en todas las micropartículas, pero con mayores cantidades en o cerca de la superficie de las micropartículas. Como se usa en la presente, "sustancialmente en todas las micropartículas" significa que la leucina y/o la trileucina se encuentra en un gradiente desde la superficie exterior de las micropartículas hacia el centro de las micropartículas, pero

convenientemente con cantidades decrecientes de leucina y/o trileucina a medida que avanza hacia el centro, y en modalidades, no se encuentra leucina o trileucina en el centro de las micropartículas donde se encuentra el agente activo. En otras modalidades, las cantidades de leucina y trileucina pueden ser sustancialmente uniformes en toda la sección transversal de las micropartículas.

En modalidades, sustancialmente cada una de las micropartículas de las formulaciones en polvo seco comprende leucina y trileucina. Es decir, convenientemente al menos alrededor de 60 % de las micropartículas contienen leucina y trileucina, o al menos alrededor de 70 %, y más convenientemente al menos alrededor de 75 %, al menos alrededor de 80 %, al menos alrededor de 85 %, al menos alrededor de 90 %, al menos alrededor de 95 %, y en modalidades alrededor de 95 %-100 %, de las micropartículas comprenden leucina y trileucina. En modalidades, cada una de las micropartículas de las formulaciones en polvo seco comprende leucina y trileucina.

En modalidades adicionales, la leucina y/o la trileucina se puede encontrar en las formulaciones en polvo seco, pero no está contenida ni asociada con una micropartícula de la formulación. De esta manera, en modalidades, la leucina y/o trileucina libre que no se encuentra asociada con una micropartícula puede encontrarse en las formulaciones en polvo seco. Sin embargo, en general, la cantidad de leucina y/o trileucina libre (es decir, no asociada con una micropartícula) es del orden de menos de alrededor de 10 %, menos de alrededor de 5 %, menos de alrededor de 1 %, y más convenientemente menos de alrededor de 0,1 % de la cantidad total de leucina y/o trileucina en las formulaciones.

En determinadas modalidades, las formulaciones en polvo seco descritas en el presente documento tienen una densidad aparente comprimida que permite el suministro de una gran cantidad de agente activo. "Densidad aparente comprimida" se refiere a la masa por unidad de volumen (convenientemente g/cm^3) de un polvo cuando se mide bajo las siguientes condiciones. Un ensayo adecuado para medir la densidad aparente comprimida (cBD) se describe en los ejemplos (véase, por ejemplo, el Ejemplo 6). Convenientemente, la densidad aparente comprimida (CBD) de los polvos se mide usando un analizador de densidad, tal como un analizador de densidad GeoPyc® Model 1360 (Micromeritics, Norcross, GA). Las muestras de polvo se preparan convenientemente en un ambiente de baja humedad (< 5 % de HR), antes de la transferencia a la cámara de muestra del analizador de densidad que ha sido purgada con gas nitrógeno. Se registra el peso neto de la muestra de polvo y luego se aplica a la muestra una fuerza de compresión de 10-14 N, convenientemente 12 N, a una velocidad de 250-350 pasos de consolidación por segundo, convenientemente 300 pasos de consolidación por segundo. La distancia lineal recorrida por el émbolo para cada paso de consolidación se traduce en un desplazamiento de volumen de la muestra de polvo. Luego,

un promedio de las mediciones de cada paso de consolidación se transforma en un valor de densidad aparente calculado para la formulación en polvo seco, expresado en g/cm³.

Convenientemente, la densidad aparente comprimida de una formulación en polvo seco descrita en este documento es de al menos 0,4 g/cm³, y convenientemente entre alrededor de 0,4 g/cm³ a alrededor de 1,0 g/cm³, y más convenientemente alrededor de 0,4-0,9 g/cm³, alrededor de 0,4-0,8 g/cm³, alrededor de 0,5-0,8 g/cm³, alrededor de 0,6-0,8 g/cm³ o alrededor de 0,4 g/cm³, alrededor de 0,5 g/cm³, alrededor de 0,6 g/cm³, alrededor de 0,7 g/cm³, o alrededor de 0,8 g/cm³. En determinadas modalidades, la densidad aparente comprimida de una formulación en polvo seco descrita en este documento es de alrededor de 0,4 g/cm³ a alrededor de 0,9 g/cm³. En determinadas modalidades, la densidad aparente comprimida de una formulación en polvo seco descrita en este documento es de alrededor de 0,5 g/cm³ a alrededor de 0,8 g/cm³.

La FIG. 8A muestra los resultados de la densidad aparente comprimida en función de la leucina y la trileucina en las formulaciones en polvo seco descritas en la presente. Cada una de las columnas representa una cantidad de trileucina en las formulaciones. Dentro de cada columna, la cantidad de leucina aumenta de alrededor de 1 % a alrededor 20 %. Como se muestra, el aumento de la cantidad de trileucina tiene como resultado una densidad aparente comprimida más baja, y el aumento de leucina dentro de cada grupo también reduce la densidad aparente comprimida. Para lograr una densidad aparente comprimida de entre alrededor de 0,5 g/cm³ a alrededor de 0,8 g/cm³ la cantidad de trileucina debe mantenerse por debajo 4 % en peso.

Las formulaciones descritas en el presente documento comprenden un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo anti-linfopoyetina estromal tímica (anti-TSLP). Ventajosamente, los inventores han descubierto que las formulaciones descritas en el presente documento permiten la administración del fragmento de unión al antígeno mediante inhalación directamente hacia el pulmón. La administración de un fragmento de unión al antígeno terapéuticamente activo de un anticuerpo anti-TSLP mediante inhalación permite ventajosamente el uso de medicamentos biológicos para el tratamiento del asma en un entorno de atención primaria.

La secuencia del polipéptido TSLP se proporciona a continuación:

Met Phe Pro Phe Ala Leu Leu Tyr Val Leu Ser Val Ser Phe Arg Lys Ile Phe Ile Leu Gln Leu Val Gly Leu Val Leu Thr Tyr Asp Phe Thr Asn Cys Asp Phe Glu Lys Ile Lys Ala Ala Tyr Leu Ser Thr Ile Ser Lys Asp Leu Ile Thr Tyr Met Ser Gly Thr Lys Ser Thr Glu Phe Asn Asn Thr Val Ser Cys Ser Asn Arg Pro His Cys Leu Thr Glu Ile Gln Ser Leu Thr Phe Asn Pro Thr Ala Gly Cys Ala Ser Leu Ala Lys Glu Met Phe Ala Met Lys Thr Lys Ala Ala Leu Ala Ile Trp Cys Pro Gly Tyr Ser Glu Thr Gln Ile Asn Ala Thr Gln Ala Met Lys Lys Arg Arg Lys Arg Lys Val Thr

Thr Asn Lys Cys Leu Glu Gln Val Ser Gln Leu Gln Gly Leu Trp Arg Arg Phe Asn Arg Pro Leu
Leu Lys Gln Gln (SEQ ID NO: 27)

El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína que comprende al menos dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras conectadas por enlaces disulfuro. El término "anticuerpo" incluye anticuerpos de origen natural así como todas las formas recombinantes de anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos humanizados, anticuerpos totalmente humanos y anticuerpos quiméricos. Cada cadena pesada normalmente se compone de una región variable de cadena pesada (VH) y una región constante de cadena pesada (CH). Cada cadena ligera normalmente se compone de una región variable de cadena ligera (VL) y una región constante de cadena ligera (CL). Sin embargo, el término "anticuerpo" también incluye otros tipos de anticuerpos, tales como anticuerpos de un solo dominio, anticuerpos de cadena pesada, es decir, anticuerpos compuestos únicamente por una o más cadenas pesadas, en particular, dos, y nanocuerpos, es decir, anticuerpos compuestos únicamente por un dominio variable monomérico simple.

Los fragmentos de unión a anticuerpos incluyen (i) fragmentos Fab, fragmentos monovalentes que consisten en la región variable y el primer dominio constante de cada cadena pesada y ligera; (ii) fragmentos F(ab)₂, fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) fragmentos Fd que consisten en la región variable y el primer dominio constante CH1 de la cadena pesada; (iv) fragmentos Fv que consisten en la región variable de cadena pesada y cadena ligera de un solo brazo de un anticuerpo; (v) fragmentos scFv, fragmentos Fv que consisten en una única cadena de polipéptidos; (vi) fragmentos (Fv)₂ que consisten en dos fragmentos Fv unidos entre sí de forma covalente; (vii) un dominio variable de cadena pesada; y (viii) multicuerpos que consisten en una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera unidas covalentemente de tal manera que la asociación de las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera solo puede ocurrir de forma intermolecular pero no intramolecular. En modalidades, el fragmento de unión al anticuerpo de la invención se selecciona de Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, minicuerpo o diacuerpo. En determinadas modalidades, el fragmento de unión al anticuerpo es un Fab. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-TSLP del que se deriva el fragmento de unión al antígeno es una IgG1.

Las secuencias de un Fab de ejemplo de la invención (denominado en el presente documento Fab₁) incluyen:

FAB1 HCDR1

Thr Tyr Gly Met His (SEQ ID NO: 1)

FAB1 HCDR2

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys His Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly (SEQ ID NO: 2)

FAB1 HCDR3

Ala Pro Gln Trp Glu Leu Val His Glu Ala Phe Asp Ile (SEQ ID NO: 3)

FAB1 VH DE CADENA PESADA

Gln Met Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys
Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Thr Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys His Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
Phe Thr Ile Thr Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Asn Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Pro Gln Trp Glu Leu Val His Glu Ala Phe Asp Ile Trp
Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser (SEQ ID NO: 4)

FAB1 LCDR1

Gly Gly Asn Asn Leu Gly Ser Lys Ser Val His (SEQ ID NO: 5)

FAB1 LCDR2

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser (SEQ ID NO: 6)

FAB1 LCDR3

Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Val Val (SEQ ID NO: 7)

FAB1 VL DE CADENA LIGERA

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly
Gly Asn Asn Leu Gly Ser Lys Ser Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu
Val Val Tyr Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Trp Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly
Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Gly Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp
Asp Ser Ser Ser Asp His Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu (SEQ ID NO: 8)

FAB1 CADENA PESADA VARIABLE VH (ácido nucleico)

cagatgcagt tgggtgaatc tgggtggcggc gtggtgcagc ctggcagatc tctgagactg 60
tcttgtccg cctccggctt cacctcaga acctacggaa tgcactgggt ccgacaggcc 120
cctggcaaag gattggaatg ggtcgccgtg atttggtacg acggctcaa caagcactac 180
gccgactccg tgaagggcag attcaccatc accagagaca actccaagaa caccctgaac 240
ctgcagatga actccctgag agccgaggac accgccgtgt actattgtgc tagagcccct 300
cagtgggaac tcgtgcatga ggccttgac atctggggcc agggaacaat ggtcaccgtc 360
tcctca 366 (SEQ ID NO: 9)

FAB1 CADENA LIGERA VARIABLE VL (ácido nucleico)

tcatatgttc ttacacaacc accgtcgggt tcggttgctc caggacaaac agctcgaatt 60
acatgcggag gaaacaacct cggtatcgaag tcggttcact ggatcaaca aaagccagga 120
caagctccag ttctcgtggt gtacgatgat tcagatcgac catcatggat ccagagcgga 180
ttctcaggat caaactcggg aaatactgcc acgctcaca ttcacgcgg agaagcggga 240
gatgaagctg attactattg ccaagtgtgg gactcgtcgt cagatcatgt tgttttcgga 300

ggtggaacaa agctcacagt gctc 324 (SEQ ID NO: 10)

FAB1 CADENA PESADA (polipéptido)

Gln Met Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys
Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Thr Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys His Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
Phe Thr Ile Thr Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Asn Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Pro Gln Trp Glu Leu Val His Glu Ala Phe Asp Ile Trp
Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
Lys Ser Cys Asp Lys (SEQ ID NO:28)

FAB1 CADENA LIGERA (polipéptido)

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly
Gly Asn Asn Leu Gly Ser Lys Ser Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu
Val Val Tyr Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Trp Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly
Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Gly Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp
Asp Ser Ser Ser Asp His Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys
Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu
Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr
Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly
Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser (SEQ ID NO:29)

FAB1 CADENA PESADA (ácido nucleico)

cagatgcagt tgggtgaatc tgggtggcggc gtggtgcagc ctggcagatc tctgagactg 60
tcttgtccg cctccggctt caccttcaga acctacggaa tgcactgggt ccgacaggcc 120
cctggcaaag gattggaatg ggtcgccgtg atttggtacg acggctcaa caagcactac 180
gccgactccg tgaagggcag attcaccatc accagagaca actccaagaa caccctgaac 240
ctgcagatga actccctgag agccgaggac accgccgtgt actattgtgc tagagcccct 300
cagtgggaac tcgtgcatga ggccttgac atctggggcc aggaacaat ggtcaccgtc 360
tcctcagcct ccaccaaggg cccatcggtc tccccctgg caccctctc caagagcacc 420
tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact actccccga accggtgacg 480
gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca cctcccggc tgtctacag 540
tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgacagtgc cctccagcag cttgggcacc 600
cagacctaca tctgaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt 660

gagcccaaatt cttgtgacaa a 681 (SEQ ID NO:30)

FAB1 CADENA LIGERA (ácido nucleico)

tcatatgttc ttacacaacc accgtcgggt tcggttgctc caggacaaac agctcgaatt 60

acatgcggag gaaacaacct cggatcgaag tcggttcact ggtatcaaca aaagccagga 120

caagctccag ttctcgtggt gtacgatgat tcagatcgac catcatggat cccagagcga 180

ttctcaggat caaactcggg aaatactgcc acgtcacaa ttcacgcgg agaagcgga 240

gatgaagctg attactattg ccaagtgtgg gactcgtcgt cagatcatgt tgttttcgga 300

ggtggaacaa agctcacagt gctcggctag cccaaggctg cccctcgggt cactctgttc 360

ccgccctct ctgaggagct tcaagccaac aaggccacac tgggtgtgtct cataagtgc 420

tttaccggg gagccgtgac agtggcctgg aaggcagata gcagccccgt caaggcgga 480

gtggagacca ccacacctc caaacaagc aacaacaagt acgcggccag cagctatctg 540

agcctgacgc ctgagcagtg gaagtcacac agaagctaca gctgccaggt cacgcatgaa 600

gggagcaccg tggagaagac agtggcccct acagaatgtt ca 642 (SEQ ID NO:31)

Las formulaciones en polvo seco proporcionadas en la presente comprenden una pluralidad de micropartículas, las micropartículas comprenden: leucina; alrededor de 1 % a alrededor de 10 % de trileucina en peso; y el fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo anti-linfopoyetina estromal tímica (TSLP), donde la leucina y la trileucina se presentan en una relación de concentración de leucina:trileucina de alrededor de 0,1:1 a alrededor de 30:1.

En determinadas modalidades, el fragmento de unión al antígeno dentro de la formulación en polvo seco comprende

a. un dominio variable de cadena pesada que comprende:

una secuencia de CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:1, una secuencia de CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:2, y una secuencia de CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:3, donde cualquiera de las CDR1, 2 o 3 de cadena pesada comprende opcionalmente una única sustitución de aminoácido, y

b. un dominio variable de cadena ligera que comprende:

una secuencia de CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:5, una secuencia de CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:6, y una secuencia de CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:7, donde cualquiera de las CDR 1, 2 o 3 de cadena ligera comprende opcionalmente una única sustitución de aminoácido.

En determinadas modalidades, el fragmento de unión al antígeno dentro de la formulación en polvo seco comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende una

secuencia de CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:1, una secuencia de CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:2, y una secuencia de CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:3, y una secuencia de CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:5, una secuencia de CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:6, y una secuencia de CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:7.

En modalidades adicionales, el fragmento de unión al antígeno para usar en las formulaciones en polvo seco comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:4; y un dominio variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO:8. En modalidades adicionales, el fragmento de unión al antígeno para usar en las formulaciones en polvo seco comprende una cadena pesada que tiene la secuencia establecida en la SEQ ID NO:28; y una cadena ligera que tiene la secuencia establecida en la SEQ ID NO:29.

En modalidades adicionales, el fragmento de unión al antígeno para usar en las formulaciones en polvo seco comprende un dominio variable de cadena pesada que es una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 90 %, 85 % u 80 % idéntica a la SEQ ID NO: 4 y un dominio variable de cadena ligera que es una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 90 %, 85 % u 80 % idéntica a la SEQ ID NO: 8.

En modalidades adicionales, el fragmento de unión al antígeno para usar en las formulaciones en polvo seco comprende (a) un dominio variable de cadena pesada que es una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 90 %, 85 % u 80 % idéntica a la SEQ ID NO: 4; o una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de polinucleótidos que es al menos 80 % idéntica a la SEQ ID NO: 30, (b) un dominio variable de cadena ligera que es una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 90 %, 85 % u 80 % idéntica a la SEQ ID NO: 8; o una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de polinucleótidos que es al menos un 80 % idéntica a la SEQ ID NO: 31; o un dominio variable de cadena pesada de (a) y un dominio variable de cadena ligera de (b)

Otras secuencias de CDR de cadena ligera (LCDR), dominio variable de cadena ligera (VL), CDR de cadena pesada (HCDR) y dominio variable de cadena pesada (VH) de fragmentos de unión al antígeno de la invención incluyen:

FAB2 LCDR1

Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His (SEQ ID NO:11)

FAB2 VL DE CADENA LIGERA

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly

Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val
Val Tyr Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Trp Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn
Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Gly Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp
Ser Ser Ser Asp His Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu (SEQ ID NO:12)

FAB3 LCDR1

Gly Gly Asn Asn Val Gly Ser Lys Ser Val His (SEQ ID NO:13)

FAB3 VL DE CADENA LIGERA

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly
Gly Asn Asn Val Gly Ser Lys Ser Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu
Val Val Tyr Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Trp Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly
Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Gly Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp
Asp Ser Ser Ser Asp His Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu (SEQ ID NO:14)

FAB4 HCDR2

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys His Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly (SEQ ID NO:15)

FAB4 VH DE CADENA PESADA

Gln Met Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys
Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Thr Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys His Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg
Phe Thr Ile Thr Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Asn Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Pro Gln Trp Glu Leu Val His Glu Ala Phe Asp Ile Trp
Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser (SEQ ID NO:16)

FAB5 HCDR2

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys His Tyr Ala Asp Ser Val Lys Ala (SEQ ID NO:17)

FAB5 VH DE CADENA PESADA

Gln Met Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys
Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Thr Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys His Tyr Ala Asp Ser Val Lys Ala Arg
Phe Thr Ile Thr Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Asn Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Pro Gln Trp Glu Leu Val His Glu Ala Phe Asp Ile Trp
Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser (SEQ ID NO:18)

FAB6 LCDR1

Gly Gly Gln Asn Leu Gly Ser Lys Ser Val His (SEQ ID NO:19)

FAB6 VL DE CADENA LIGERA

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly
Gly Gln Asn Leu Gly Ser Lys Ser Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu
Val Val Tyr Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Trp Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly

Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Gly Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp
Asp Ser Ser Ser Asp His Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu (SEQ ID NO:20)

FAB7 LCDR1

Gly Gly Asn Gln Leu Gly Ser Lys Ser Val His (SEQ ID NO:21)

FAB7 VL DE CADENA LIGERA

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly
Gly Asn Gln Leu Gly Ser Lys Ser Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu
Val Val Tyr Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Trp Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly
Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Gly Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp
Asp Ser Ser Ser Asp His Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu (SEQ ID NO:22)

FAB8 LCDR3

Gln Val Trp Asp Thr Ser Ser Asp His Val Val (SEQ ID NO:23)

FAB8 VL DE CADENA LIGERA

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly
Gly Asn Asn Leu Gly Ser Lys Ser Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu
Val Val Tyr Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Trp Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly
Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Gly Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp
Asp Thr Ser Ser Asp His Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu (SEQ ID NO:24)

FAB9 LCDR3

Gln Val Trp Asp Ser Thr Ser Asp His Val Val (SEQ ID NO: 25)

FAB9 VL DE CADENA LIGERA

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly
Gly Asn Asn Leu Gly Ser Lys Ser Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu
Val Val Tyr Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Trp Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly
Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Gly Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp
Asp Ser Thr Ser Asp His Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu (SEQ ID NO:26).

En determinadas modalidades, los dominios de cadena variable pesada y de cadena variable ligera del fragmento de unión al antígeno de la invención comprenden cualquiera de las combinaciones de secuencias de CDR establecidas en la siguiente tabla:

	CDR 1, 2 y 3 VH	CDR 1, 2 y 3 VL
Fab ₁	SEQ ID NOS:1, 2 y 3	SEQ ID NOS:5, 6 y 7
Fab ₂	SEQ ID NOS:1, 2 y 3	SEQ ID NO:11, 6 y 7
Fab ₃	SEQ ID NOS:1, 2 y 3	SEQ ID NO:14, 6 y 7
Fab ₄	SEQ ID NO:1, 15 y 3	SEQ ID NOS:5, 6 y 7
Fab ₅	SEQ ID NOS: 1, 17 y 3	SEQ ID NOS:5, 6 y 7

Fab ₆	SEQ ID NOs:1, 2 y 3	SEQ ID NOs:19, 6 y 7
Fab ₇	SEQ ID NOs:1, 2 y 3	SEQ ID NOs:19, 6 y 7
Fab ₈	SEQ ID NOs:1, 2 y 3	SEQ ID NOs:5, 6 y 23
Fab ₉	SEQ ID NOs:1, 2 y 3	SEQ ID NOs:5, 6 y 25

La formulación descrita en el presente documento puede administrarse en combinación con un agente activo adicional para usar en el tratamiento del asma. Los ejemplos de agentes activos que se pueden administrar en combinación con la formulación en polvo seco descrita en este documento incluyen, de forma no taxativa, corticosteroides inhalados (ICS), broncodilatadores (incluidos los agonistas beta de acción prolongada (LABA), agonistas antimuscarínicos de acción prolongada (LAMA), agonista beta de acción corta (SABA) y agonistas β_2 muscarínicos (MABA)), antihistamínicos, antileucotrienos, inhibidores de la PDE-4, inhibidores de la cinasa Janus e inhibidores de la fosfoinositida 3-cinasa. En determinadas modalidades, el agente activo adicional se combina en la formulación de la invención junto con el fragmento de unión al anticuerpo anti-TSLP descrito en este documento.

En modalidades adecuadas, las formulaciones en polvo seco descritas en el presente documento comprenden además un agente de estabilización de vidrio para ayudar a estabilizar la formulación y, en particular, a estabilizar el agente activo. Un "agente de estabilización vítreo" se refiere a un excipiente que estabiliza un agente activo (convenientemente un polipéptido) en una formulación en polvo seco, convenientemente sustituyendo el agua en la superficie del agente activo durante el secado, o impidiendo de otro modo el proceso de degradación, y forma un sólido amorfo que incluye el agente activo. Los ejemplos de agentes de estabilización vítreos incluyen sacáridos amorfos, azúcares poliméricos, amortiguadores, sales o polímeros sintéticos (por ejemplo, ácido poli-L-glicólico), así como mezclas de dichos componentes. En modalidades adecuadas, el agente de estabilización vítreo es un sacárido amorfo. En modalidades adicionales, el agente de estabilización vítreo es un amortiguador. En aún otras modalidades, las formulaciones descritas en el presente documento pueden incluir tanto un sacárido amorfo como un amortiguador, que juntos o por separado pueden actuar como un agente de estabilización vítreo.

Los sacáridos amorfos de ejemplo para usar en las formulaciones descritas en el presente documento incluyen, de forma no taxativa, trehalosa, sacarosa, rafinosa, inulina, dextrano, manitol y ciclodextrina. Convenientemente, el sacárido amorfo se encuentra presente en alrededor de 30 % a alrededor de 70 % (porcentaje en peso) de la formulación en polvo seco. En modalidades adicionales, el sacárido amorfo está presente en alrededor de 30 % a

alrededor de 65 %, alrededor del 35 % a alrededor 65 %, alrededor de 35 % a alrededor 60 %, alrededor de 40 % a alrededor 60 %, alrededor de 30 % a alrededor 50 %, o alrededor de 30 %, alrededor de 35 %, alrededor de 40 %, alrededor de 45 %, alrededor de 50 %, alrededor de 55 % o alrededor de 60 %. Convenientemente, el sacárido amorfo es trehalosa, y está presente en las formulaciones a alrededor de 30 %-60 %, más convenientemente alrededor de 35 %-55 %, o alrededor de 35 %, alrededor de 40 %, alrededor de 45 % o alrededor de 50 % del peso de la formulación en polvo seco.

Los amortiguadores de ejemplo que se pueden incluir en las formulaciones en polvo seco, convenientemente como agentes de estabilización vítreos, incluyen varios amortiguadores de citrato (tal como el citrato de sodio), un amortiguador de fosfato, un amortiguador de histidina, un amortiguador de glicina, un amortiguador de acetato y un amortiguador de tartrato, así como combinaciones de dichos amortiguadores. Las cantidades de amortiguadores que se pueden incluir en las formulaciones en polvo seco pueden oscilar entre alrededor de 0,1 % y alrededor de 20 %, más convenientemente alrededor de 0,5 % a alrededor 15 %, alrededor de 1 % a alrededor 10 %, alrededor de 2 % a alrededor de 8 %, alrededor de 3 % a alrededor de 7 %, o alrededor de 1 %, alrededor de 2 %, alrededor de 3 %, alrededor de 4 %, alrededor de 5 %, alrededor de 6 %, alrededor de 7 %, alrededor de 8 %, alrededor de 9 % o alrededor de 10 %.

Los amortiguadores también proporcionan control del pH de las formulaciones en polvo seco, manteniendo convenientemente un pH entre alrededor de pH 5 y alrededor de 8, por ejemplo, un pH entre alrededor de pH 5 y alrededor de pH 6, o alrededor de pH 5,5 a alrededor de pH 6,5 o alrededor de pH 6 a alrededor de pH 7, o alrededor de pH 6,5 a alrededor de pH 7,5 o alrededor de pH 7 a alrededor de pH 8.

En modalidades adicionales, se proporcionan formulaciones en polvo seco que comprenden alrededor de 30 %-50 %, trehalosa, alrededor de 10 %-11 % de leucina, alrededor de 1 %-3 % trileucina, alrededor de 8 %-9 % de amortiguador de citrato y un agente activo, más convenientemente alrededor de 39 % de trehalosa, alrededor de 10,5 % de leucina, alrededor de 2% trileucina, alrededor de 8,5 % de amortiguador de citrato y un agente activo.

En modalidades adicionales, se proporcionan formulaciones en polvo seco que consisten esencialmente en alrededor de 30 %-50 % de un sacárido amorfo, leucina, alrededor de 1 % a alrededor de 10 % de trileucina, alrededor de 1 % a alrededor de 10 % de un amortiguador y un agente activo, donde la leucina y la trileucina están presentes en una proporción de concentración de leucina:trileucina de alrededor de 0,1:1 a alrededor 30:1. En modalidades adicionales, se proporcionan formulaciones en polvo seco que consisten esencialmente en alrededor de 30 %-50 % de un sacárido amorfo, alrededor de 8 % a alrededor de 11 % de

leucina, alrededor de 2 % a alrededor 4 % de trileucina, alrededor de 1 % a alrededor de 10 % de un amortiguador y un agente activo. Se proporcionan formulaciones en polvo seco adicionales que consisten esencialmente en alrededor de 35 %-45 % de trehalosa, alrededor de 9 % a alrededor de 11 % de leucina, alrededor de 2 % a alrededor 3 % de trileucina, alrededor de 2 % a alrededor de 85 de amortiguador de citrato y un agente activo. En modalidades adicionales, las formulaciones en polvo seco consisten esencialmente en alrededor de 39 % de trehalosa, alrededor de 10,5 % de leucina, alrededor de 2 % de trileucina, alrededor de 8,5 % de un amortiguador de citrato y un agente activo.

En las composiciones y formulaciones que "consisten esencialmente" en los ingredientes enumerados, tales composiciones y formulaciones contienen los componentes enumerados y aquellos que no afectan materialmente las características básicas y novedosas de las formulaciones reivindicadas. Los componentes que no afectan materialmente las características básicas y novedosas de las formulaciones reivindicadas son aquellos que no limitan la capacidad de la leucina y la trileucina para estabilizar las formulaciones en polvo seco. Convenientemente, las composiciones y formulaciones que consisten esencialmente en los ingredientes enumerados excluyen específicamente otros aminoácidos o aminoácidos tripéptidos, pero pueden incluir azúcares adicionales, amortiguadores, etc.

En modalidades de ejemplo, se proporciona una formulación en polvo seco que comprende alrededor de 30 - 50 % de trehalosa, alrededor de 10 %-11 % de leucina, alrededor de 1 %-3 % de trileucina, alrededor de 8 %-9 % de amortiguador de citrato y alrededor de 30-50 % de un fragmento de anticuerpo anti-TSLP, más convenientemente alrededor de 39 % de trehalosa, alrededor de 10,5 % de leucina, alrededor de 2 % de trileucina, alrededor de 8,5 % de amortiguador de citrato y alrededor de 40 % de un fragmento de anticuerpo anti-TSLP.

En modalidades de ejemplo adicionales, se proporcionan formulaciones en polvo seco que consisten esencialmente en alrededor de 30-50 %, trehalosa, alrededor de 10 %-11 % de leucina, alrededor de 1 %-3 % trileucina, alrededor de 8 %-9 % de amortiguador de citrato y alrededor de 30-50 % de un fragmento de anticuerpo anti-TSLP, más convenientemente alrededor de 39 %d de trehalosa, alrededor de 10,5 % de leucina, alrededor de 2 % de trileucina, alrededor de 8,5 % de amortiguador de citrato y alrededor de 40 % de agente activo. Las micropartículas que componen las formulaciones en polvo seco descritas en el presente documento tienen convenientemente un diámetro medio aerodinámico de masa (MMAD) especificado cuando se proporcionan en forma de aerosol. Las micropartículas también pueden tener un diámetro medio de volumen óptico equivalente especificado (oVMD). El oVMD también puede denominarse distribución del tamaño de partículas (PSD o pPSD).

Como se usa en este documento, "diámetro aerodinámico de masa media" o "MMAD" es

una medida del tamaño aerodinámico de una micropartícula dispersa. El diámetro aerodinámico se utiliza para describir un polvo aerosolizado en términos de su comportamiento de sedimentación y es el diámetro de una esfera de densidad unitaria que tiene la misma velocidad de sedimentación, en el aire, que la micropartícula. El diámetro aerodinámico abarca la forma de las partículas, la densidad y el tamaño físico de una micropartícula. Como se usa en el presente documento, MMAD se refiere al punto medio o la mediana de la distribución aerodinámica del tamaño de las partículas de un polvo en aerosol determinado por impacto en cascada, a menos que se indique lo contrario. Convenientemente, las micropartículas de las formulaciones en polvo seco proporcionadas en este documento tienen un diámetro medio aerodinámico de masa (MMAD) de alrededor de 1 μm a alrededor de 10 μm , más convenientemente de alrededor de 2 μm a alrededor de 8 μm , de alrededor de 2 μm a alrededor de 7 μm , alrededor de 2 μm a alrededor de 6 μm , alrededor de 2 μm a alrededor de 5 μm , alrededor de 2 μm a alrededor de 4 μm , alrededor de 3 μm a alrededor de 7 μm , alrededor de 4 μm a alrededor de 7 μm , alrededor de 3 μm a alrededor de 6 μm , o alrededor de 2 μm , alrededor de 3 μm , alrededor de 4 μm , alrededor de 5 μm , alrededor de 6 μm , o alrededor de 7 μm .

Convenientemente, la fracción de partículas finas (la fracción de partículas emitidas desde un dispositivo de inhalación que tiene un diámetro aerodinámico de partículas de menos de 5 μm de las formulaciones en polvo seco descritas en este documento es $\geq 50\%$, más convenientemente $\geq 60\%$. Esta fracción de partículas finas (FPF) puede contribuir a una baja retención en el dispositivo de las formulaciones en polvo seco de menos de 20 %, convenientemente menos de 15 %, menos de 10 %, o menos de 5 %, permanece en un dispositivo después de la entrega a un paciente.

En modalidades adicionales, las micropartículas tienen convenientemente un diámetro medio de volumen óptico equivalente (oVMD) de alrededor de 0,5 μm a alrededor de 7 μm . El diámetro medio del volumen óptico equivalente (oVMD) se refiere al diámetro medio de una esfera que mejor se aproxima a una interacción óptica específica de la micropartícula con la luz, donde la mitad de las micropartículas se aproximan mejor mediante una esfera equivalente más pequeña, y la mitad de las micropartículas se aproximan mejor por una esfera equivalente mayor que la media, cuando se mide utilizando una técnica óptica adecuada. En modalidades de ejemplo, las micropartículas tienen un diámetro medio de volumen óptico equivalente (oVMD) de alrededor de 0,5 μm a alrededor de 6 μm , o alrededor de 1 μm a alrededor de 5 μm , o alrededor de 1 μm a alrededor de 4 μm , o alrededor de 2 μm a alrededor de 4,5 μm , o alrededor de 2,5 μm a alrededor de 4 μm , o alrededor de 2 μm a alrededor de 4 μm , o alrededor de 2 μm a alrededor de 3 μm , o alrededor de 2 μm a alrededor de 3,5 μm , o alrededor de 1 μm , alrededor de 1,5 μm ,

alrededor de 2 μm , alrededor de 2,5 μm , alrededor de 3 μm , alrededor de 3,5 μm , alrededor de 4 μm , alrededor de 4,5 μm o alrededor de 5 μm .

Como se describe en este documento, una densidad aparente comprimida alta permite la administración de una mayor cantidad de agente activo, utilizando el mismo volumen de administración. Ciertos agentes biológicos pueden requerir cargas útiles de administración de hasta 50 mg/dosis, o superior, para obtener un tratamiento eficaz. Como se muestra ilustrativamente en la FIG. 8B, la combinación de leucina y trileucina puede tener como resultado una formulación en polvo seco que tiene una mayor densidad aparente y, por lo tanto, para la misma cantidad de peso de relleno, ocupa un volumen sustancialmente menor.

Las formulaciones de plataforma de ejemplo que se muestran en la FIG. 8B se proporcionan a continuación. LTC indica una formulación sin trileucina (TLeu), pero que contiene un amortiguador de leucina, trehalosa y citrato; TTC indica una formulación sin leucina (Leu), pero que contiene un amortiguador de trileucina, trehalosa y citrato; TLTC indica la inclusión de leucina y trileucina, así como amortiguador de trehalosa y citrato. Cit se refiere al amortiguador de citrato. Tre se refiere a la trehalosa.

Tabla 1: Formulaciones de plataforma de ejemplo

Plataforma	% Tre	% Leu	% TLeu	% Cit
LTC	46	45	0	9
TTC	81	0	11,2	7,8
TLTC	79	10,5	2	8,5

Las cápsulas (cápsulas de tamaño 3) de cada formulación se muestran en los respectivos pesos de llenado en la FIG. 8B. Como se ilustra, para la formulación de TLTC, la combinación de trileucina y leucina permite el llenado de una cápsula con 100 mg de formulación en polvo seco, manteniendo al mismo tiempo algo de espacio restante en la cápsula. Las otras formulaciones no pudieron llenarse por encima de alrededor de 70-80 mg de peso de llenado. Esto representa la gran mejora proporcionada por el uso de leucina y trileucina en combinación para preparar una formulación con una densidad aparente comprimida alta, lo que permite un peso de llenado alto.

Como se describe en este documento, el uso de leucina y trileucina en las formulaciones en polvo seco también tiene como resultado micropartículas que tienen los tamaños deseados (MMAD), así como el área de superficie específica (SSA) y la rugosidad deseables, lo que tiene como resultado micropartículas que pueden fluir convenientemente y administrarse a los pulmones usando varias plataformas de inhalación.

El área superficial específica (SSA) de las micropartículas se define como el área superficial total de las micropartículas por unidad de masa (convenientemente con unidades de m^2/g).

Los métodos para medir el SSA son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, mediciones de Brunauer-Emmett-Teller (BET) usando evaluación de área de superficie específica de materiales por adsorción de nitrógeno medida en función de la presión relativa. El área de superficie se determina calculando la cantidad de gas adsorbato correspondiente a una capa monomolecular en la superficie de las micropartículas. La técnica mide el área externa y cualquier evaluación del área de poros para determinar el área de superficie específica total. Los instrumentos para medir BET son conocidos en la técnica.

En modalidades, el área de superficie específica (SSA) de las micropartículas de las formulaciones en polvo seco es de alrededor de 3 m²/g a unos 8 m²/g. En modalidades adecuadas, la SSA de la pluralidad de micropartículas es de alrededor de 3,5 m²/g-7,5 m²/g, o alrededor de 4 m²/g-7 m²/g, o alrededor de 4,5 m²/g-7 m²/g, o alrededor de 5 m²/g-7 m²/g, o alrededor de 4,5 m²/g-6 m²/g, o alrededor de 5 m²/g-6 m²/g, o alrededor de 4 m²/g, alrededor de 4,5 m²/g, alrededor de 5 m²/g, alrededor de 5,5 m²/g, alrededor de 6 m²/g, alrededor de 6,5 m²/g, o alrededor de 7 m²/g.

La FIG. 9 muestra los resultados de la superficie específica medida mediante BET, en m²/g. Cada una de las columnas de la FIG. 9 representa una cantidad diferente de trileucina en las formulación. Dentro de cada columna, la cantidad de leucina aumenta de alrededor de 1 % a alrededor 20 %. Las micrografías insertadas demuestran la apariencia física de las micropartículas con un SSA bajo (abajo a la izquierda) y un SSA alto (arriba a la derecha). Como se muestra, a un % en peso más bajo de trileucina, SSA permanece por debajo de alrededor de 5 m²/g, pero aumenta con el aumento de leucina. Sobre alrededor de 2 % de trileucina, el SSA aumenta a más de 3,0 m²/g, y también aumenta con el aumento del porcentaje de leucina. Valores SSA superiores a 5,5 m²/g, y acercándose a 7,0 m²/g, se logran con cantidades de trileucina por encima de 4 %. Un intervalo deseable de área de superficie específica de alrededor de 4-7 m²/g se puede lograr fácilmente usando entre alrededor de 1-6 % trileucina, y cantidades de leucina entre alrededor de 1-20 %. Como se muestra, al utilizar una cantidad de trileucina por debajo de alrededor de 6 %, la cantidad de leucina se puede mantener por debajo 10 %, incluso debajo 5 %, y todavía mantener un SSA deseable y micropartículas con una rugosidad superficial. La micrografía en la parte superior izquierda muestra la forma de las micropartículas de las formulaciones en polvo seco descritas en el presente documento, mostrando un tamaño deseable, una superficie específica y una rugosidad superficial.

En determinadas modalidades, la formulación en polvo seco tiene una densidad aparente comprimida de alrededor de 0,4-1,0 g/cm³. Convenientemente, la densidad aparente comprimida de la formulación en polvo seco es de alrededor de 0,5-0,8 g/cm³. En modalidades, la densidad aparente comprimida de una formulación en polvo seco descrita

en la presente es alrededor de 0,4-0,9 gm/cm³, alrededor de 0,4-0,8 gm/cm³, alrededor de 0,5-0,8 gm/cm³, alrededor de 0,6-0,8 gm/cm³ o alrededor de 0,4 gm/cm³, alrededor de 0,5 gm/cm³, alrededor de 0,6 gm/cm³, alrededor de 0,7 gm/cm³, o alrededor de 0,8 gm/cm³. En determinadas modalidades, la densidad aparente comprimida de una formulación en polvo seco descrita en este documento es de alrededor de 0,4 gm/cm³ a alrededor de 0,9 gm/cm³. En determinadas modalidades, la densidad aparente comprimida de una formulación en polvo seco descrita en este documento es de alrededor de 0,5 gm/cm³ a alrededor de 0,8 gm/cm³.

Las formulaciones en polvo seco incluyen convenientemente un agente de estabilización de vidrio como se describe en el presente documento, que incluye un sacárido amorfo o un amortiguador, o el uso tanto de un sacárido amorfo como de un amortiguador. Los sacáridos amorfos de ejemplo incluyen los descritos en la presente, inclusive trehalosa, sacarosa, rafinosa, inulina, dextrano y ciclodextrina. Convenientemente, el sacárido amorfo está presente en alrededor de 30 % a alrededor de 70 %, y en modalidades es trehalosa, convenientemente presente en alrededor de 35 %-60, o 35 %-55 %.

Los amortiguadores de ejemplo para usar en las formulaciones en polvo seco se describen en el presente documento e incluyen un amortiguador de citrato, un amortiguador de fosfato y un amortiguador de tartrato. Convenientemente, el amortiguador está presente en alrededor de 1 % a alrededor 10 %, y en modalidades es un amortiguador de citrato. En determinadas modalidades, el pH del amortiguador de citrato es de alrededor de pH 5,5 a alrededor de pH 6,5, tal como alrededor de pH 5,5, alrededor de pH 5,6, alrededor de pH 5,7, alrededor de pH 5,8, alrededor de pH 5,9, alrededor de pH 6,0, alrededor de pH 6,1, alrededor de pH 6,2, alrededor de pH 6,3, alrededor de pH 6,4 o alrededor de pH 6,5. En determinadas modalidades, el pH del amortiguador de citrato es alrededor de 6,4.

En determinadas modalidades, las formulaciones en polvo seco descritas en el presente documento comprenden un tensioactivo. Tal como se define en el presente documento, "tensioactivo" se refiere a una molécula o compuesto que reduce la aglomeración de partículas, la adhesión de partículas a la superficie de una cápsula, las paredes del recipiente o los componentes de la válvula de un dispositivo de administración inhalable. También se ha encontrado que un tensioactivo reduce la formación de partículas subvisibles (SVP) tras la reconstitución de la formulación. Eliminar o reducir la formación de SVP simplifica la caracterización analítica de la formulación, ya que elimina la carga de rastrear la formación de SVP durante la fabricación. La caracterización analítica de SVP puede implicar el desarrollo de técnicas ortogonales para identificar y cuantificar las SVP con fines de control de calidad. Por lo tanto, eliminar las SVP o reducirlas a niveles aceptables elimina la necesidad de este paso de caracterización del proceso de fabricación, agilizando la

fabricación. La eliminación de las SVP también puede hacer que el intervalo de dosis sea más predecible, ya que se desconoce la cinética de liberación del fármaco de las SVP. Además, es probable que la eliminación de las SVP aumente la cantidad de agente activo disponible para participar en la actividad farmacológica posterior a la reconstitución, lo que puede significar no solo que se puede lograr una dosis administrada más alta, sino que también se puede calcular una predicción más precisa de la dosis administrada. Una dosis administrada más alta también puede beneficiar al paciente, por ejemplo, al reducir potencialmente el número o la frecuencia de las dosis que deben administrarse para obtener un beneficio farmacológico.

Una "partícula subvisible" ("SVP") es una partícula no visible a simple vista de alrededor de 1 μm a alrededor de 200 μm . La presencia de partículas subvisibles se puede determinar reconstituyendo una formulación en polvo seco y el líquido que tiene una calidad turbia. La determinación real de la presencia de SVP se puede confirmar utilizando una técnica como la formación de imágenes de microflujo. Las imágenes de microflujo (o MFI) combinan la microscopía de flujo de microfluidos y el análisis de partículas de imágenes de alta resolución para cuantificar los recuentos de SVP. MFI puede agrupar estos recuentos en un intervalo de tamaños de partículas, por ejemplo, agrupando los recuentos de partículas en un intervalo de tamaño de alrededor de 1 a alrededor de 200 μm , de alrededor de 2 μm a alrededor de 200 μm , de alrededor de 5 μm a alrededor de 200 μm , de alrededor de 10 μm a alrededor de 200 μm y alrededor de 25 μm a alrededor de 200 μm . Los ejemplos muestran que la inclusión de un tensioactivo en la formulación en polvo seco reduce la presencia de SVP en cada intervalo de tamaño de partícula en comparación con una formulación de control en la que no hay tensioactivo (por ejemplo, Fig. 15A). Por lo tanto, en determinadas modalidades, una formulación en polvo seco descrita en el presente documento comprende un tensioactivo, donde tras la reconstitución, se reduce el número de partículas subvisibles en la formulación. En algunas modalidades, el número de partículas subvisibles disminuye en comparación con una formulación equivalente que no tiene tensioactivo.

En determinadas modalidades, el número de SVP de alrededor de 25 μm a alrededor de 200 μm de tamaño se reduce por debajo de 30.000 partículas por ml, tal como 25.000 partículas por ml, 20.000 partículas por ml, 15.000 partículas por ml, 10.000 partículas por ml o 5000 partículas por ml. En determinadas modalidades, el número de SVP de alrededor de 25 μm a alrededor de 200 μm de tamaño se reduce por debajo de 1.000 partículas por ml. En determinadas modalidades, el número de SVP de alrededor de 25 μm a alrededor de 200 μm de tamaño se reduce por debajo de 1000 partículas por ml. En determinadas modalidades, el número de SVP de alrededor de 25 μm a alrededor de 200 μm de tamaño se reduce por debajo de 100 partículas por ml.

En determinadas modalidades, el número de SVP de alrededor de 10 μm a alrededor de 200 μm de tamaño se reduce por debajo de 100.000 partículas por ml, tal como 90.000 partículas por ml, 80.000 partículas por ml, 70.000 partículas por ml, 60.000 partículas por ml, 50.000 partículas por ml, 40.000 partículas por ml o 30.000 partículas por ml. En determinadas modalidades, el número de SVP de alrededor de 10 μm a alrededor de 200 μm de tamaño se reduce por debajo de 10.000 partículas por ml. En determinadas modalidades, el número de SVP de alrededor de 10 μm a alrededor de 200 μm de tamaño se reduce por debajo de 1000 partículas por ml. En determinadas modalidades, el número de SVP de alrededor de 10 μm a alrededor de 200 μm de tamaño se reduce por debajo de 100 partículas por ml.

En determinadas modalidades, el número de SVP de alrededor de 5 μm a alrededor de 200 μm de tamaño se reduce por debajo de 200.000 partículas por ml, tal como 180.000 partículas por ml, 170.000 partículas por ml, 160.000 partículas por ml, 150.000 partículas por ml o 140.000 partículas por ml. En determinadas modalidades, el número de SVP de alrededor de 5 μm a alrededor de 200 μm de tamaño se reduce por debajo de 50.000 partículas por ml. En determinadas modalidades, el número de SVP de alrededor de 5 μm a alrededor de 200 μm de tamaño se reduce por debajo de 10.000 partículas por ml. En determinadas modalidades, el número de SVP de alrededor de 5 μm a alrededor de 200 μm de tamaño se reduce por debajo de 2000 partículas por ml.

En determinadas modalidades, el número de SVP de alrededor 2 μm a alrededor de 200 μm en tamaño disminuyen a menos de 1×10^6 partículas por ml, tal como $0,8 \times 10^6$ partículas por ml, $0,7 \times 10^6$ partículas por ml, $0,6 \times 10^6$ partículas por ml o $0,5 \times 10^6$ partículas por ml. En determinadas modalidades, el número de SVP de alrededor de 2 μm a alrededor de 200 μm de tamaño se reduce por debajo de 100.000 partículas por ml. En determinadas modalidades, el número de SVP de alrededor de 2 μm a alrededor de 200 μm de tamaño se reduce por debajo de 50.000 partículas por ml. En determinadas modalidades, el número de SVP de alrededor de 2 μm a alrededor de 200 μm de tamaño se reduce por debajo de 10.000 partículas por ml.

En determinadas modalidades, el número de SVP de alrededor 1 μm a alrededor de 200 μm en tamaño disminuyen a menos de 2×10^6 partículas por ml, tal como $1,8 \times 10^6$ partículas por ml, $1,7 \times 10^6$ partículas por ml, $1,6 \times 10^6$ partículas por ml o $1,5 \times 10^6$ partículas por ml. En determinadas modalidades, el número de SVP de alrededor de 1 μm a alrededor de 200 μm de tamaño se reduce por debajo de 200.000 partículas por ml. En determinadas modalidades, el número de SVP de alrededor de 1 μm a alrededor de 200 μm de tamaño se reduce por debajo de 150.000 partículas por ml.

En determinadas modalidades, el número de SVP de alrededor de 25 μm a alrededor de

200 µm de tamaño se reduce más de 2 veces, tal como más de 3 veces, más de 4 veces, más de 5 veces, más de 6 veces, más de 7 veces, más de 8 veces o más de 9 veces, tras la reconstitución, en comparación con un control de referencia. En determinadas modalidades, el número de SVP de alrededor de 25 µm a alrededor de 200 µm de tamaño se reduce más de 10 veces tras la reconstitución en comparación con el control de referencia.

En determinadas modalidades, el número de SVP de alrededor de 10 µm a alrededor de 200 µm de tamaño se reduce más de 2 veces, tal como más de 3 veces, más de 4 veces, más de 5 veces, más de 6 veces, más de 7 veces, más de 8 veces o más de 9 veces, tras la reconstitución, en comparación con un control de referencia. En determinadas modalidades, el número de SVP de alrededor de 10 µm a alrededor de 200 µm de tamaño se reduce más de 10 veces tras la reconstitución en comparación con el control de referencia.

En determinadas modalidades, el número de SVP de alrededor de 5 µm a alrededor de 200 µm de tamaño se reduce más de 2 veces, tal como más de 3 veces, más de 4 veces, más de 5 veces, más de 6 veces, más de 7 veces, más de 8 veces o más de 9 veces, tras la reconstitución, en comparación con un control de referencia. En determinadas modalidades, el número de SVP de alrededor de 5 µm a alrededor de 200 µm de tamaño se reduce más de 10 veces tras la reconstitución en comparación con el control de referencia.

En determinadas modalidades, el número de SVP de alrededor de 2 µm a alrededor de 200 µm de tamaño se reduce más de 2 veces, tal como más de 3 veces, más de 4 veces, más de 5 veces, más de 6 veces, más de 7 veces, más de 8 veces o más de 9 veces, tras la reconstitución, en comparación con un control de referencia. En determinadas modalidades, el número de SVP de alrededor de 2 µm a alrededor de 200 µm de tamaño se reduce más de 10 veces tras la reconstitución en comparación con el control de referencia. En determinadas modalidades, el número de SVP de alrededor de 2 µm a alrededor de 200 µm de tamaño se reduce más de 100 veces tras la reconstitución en comparación con el control de referencia.

En determinadas modalidades, el número de SVP de alrededor de 1 µm a alrededor de 200 µm de tamaño se reduce más de 2 veces, tal como más de 3 veces, más de 4 veces, más de 5 veces, más de 6 veces, más de 7 veces, más de 8 veces o más de 9 veces, tras la reconstitución, en comparación con un control de referencia. En determinadas modalidades, el número de SVP de alrededor de 1 µm a alrededor de 200 µm de tamaño se reduce más de 10 veces tras la reconstitución en comparación con el control de referencia.

En determinadas modalidades, el control de referencia es una formulación equivalente que carece de un tensioactivo. En algunas modalidades, la formulación se reconstituye en agua. En algunas modalidades, la formulación se reconstituye a una concentración de agente activo de 30 mg/ml. En algunas modalidades, la formulación se reconstituye a una

concentración de agente activo de 2,5 mg/ml. En algunas modalidades, el número de SVP se determina mediante imagenología de microflujo (MFI). En determinadas modalidades, el número de SVP se determina mediante imagenología de microflujo (MFI) mediante el uso de un método como se define en los ejemplos.

Los tensioactivos de ejemplo adecuados para su uso en las formulaciones en polvo seco descritas en el presente incluyen, de forma no taxativa, polisorbato-20 (PS-20), polisorbato-40 (PS-40), polisorbato-60 (PS-60), polisorbato-80 (PS-80) y poloxámero-188. En determinadas modalidades, las formulaciones descritas en el presente documento comprenden PS-80, convenientemente a una concentración en el intervalo de alrededor de 0,27 % en peso a alrededor de 2,7 % en peso, convenientemente de alrededor de 0,27 % en peso a alrededor de 1,33 % en peso, convenientemente de alrededor de 0,67 % en peso a alrededor de 1,33 % en peso. En determinadas modalidades, la formulación comprende PS-80 a una concentración en el intervalo de alrededor de 0,3 % en peso a alrededor de 3 % en peso. En determinadas modalidades, la formulación comprende PS-80 a una concentración en el intervalo de alrededor de 0,3 % en peso a alrededor de 2,5 % en peso. En determinadas modalidades, la formulación comprende PS-80 a una concentración en el intervalo de alrededor de 0,5 % en peso a alrededor de 2,5 % en peso. En determinadas modalidades, la formulación comprende PS-80 a una concentración en el intervalo de alrededor de 0,5 % en peso a alrededor de 2 % en peso. En determinadas modalidades, la formulación comprende PS-80 a una concentración en el intervalo de alrededor de 0,5 % en peso a alrededor de 1,5 % en peso.

En modalidades de ejemplo, la formulación comprende PS-80 a una concentración en el intervalo de alrededor de 0,67 % a alrededor de 1,33 %.

En modalidades de ejemplo, la formulación comprende PS-80 a una concentración de alrededor de 0,7 % (p/p), alrededor de 0,8 % (p/p), alrededor de 0,9 % (p/p), alrededor de 1,0 % (p/p), alrededor de 1,1 % (p/p), alrededor de 1,2 % (p/p), o alrededor de 1,3 % (p/p). En algunas modalidades, la formulación comprende PS-80 a una concentración de alrededor de 1,1 % (p/p).

En modalidades de ejemplo, la composición comprende PS-80 a una concentración de 0,7 % $\pm$ 0,35 (p/p), alrededor de 0,8 % $\pm$ 0,4 (p/p), alrededor de 0,9 % $\pm$ 0,45 (p/p), alrededor de 1,0 % $\pm$ 0,5 (p/p), alrededor de 1,1 % $\pm$ 0,55 (p/p), alrededor de 1,2 % $\pm$ 0,6 (p/p), alrededor de 1,3 % $\pm$ 0,65 (p/p), alrededor de 1,4 % $\pm$ 0,7 (p/p), alrededor de 1,5 % $\pm$ 0,75 (p/p), alrededor de 1,6 % $\pm$ 0,8 (p/p) o alrededor de 1,7 % $\pm$ 0,75 (p/p). En algunas modalidades, la formulación comprende PS-80 a una concentración de alrededor de 1,1 % $\pm$ 0,55 (p/p).

En determinadas modalidades, las formulaciones descritas en la presente comprenden

poloxámero-188 convenientemente en una concentración en el intervalo de alrededor de 1 % en peso a alrededor de 10 % en peso. En modalidades de ejemplo, la formulación comprende poloxámero-188 (P188) a una concentración en el intervalo de alrededor de 0,67 % a alrededor de 2,67 %. En determinadas modalidades, la formulación comprende P188 a una concentración en el intervalo de alrededor de 0,3 % en peso a alrededor de 3 % en peso. En determinadas modalidades, la formulación comprende P188 a una concentración en el intervalo de alrededor de 0,3 % en peso a alrededor de 2,5 % en peso. En determinadas modalidades, la formulación comprende P188 a una concentración en el intervalo de alrededor de 0,5 % en peso a alrededor de 2,5 % en peso. En determinadas modalidades, la formulación comprende P188 a una concentración en el intervalo de alrededor de 0,5 % en peso a alrededor de 2 % en peso. En determinadas modalidades, la formulación comprende P188 a una concentración en el intervalo de alrededor de 0,5 % en peso a alrededor de 1,5 % en peso.

En modalidades de ejemplo, la formulación comprende P188 a una concentración en el intervalo de alrededor de 0,67 % a alrededor de 1,67 %.

En modalidades de ejemplo, la formulación comprende P188 a una concentración de alrededor de 0,7 % (p/p), alrededor de 0,8 % (p/p), alrededor de 0,9 % (p/p), alrededor de 1,0 % (p/p), alrededor de 1,1 % (p/p), alrededor de 1,2 % (p/p), o alrededor de 1,3 % (p/p), alrededor de 1,4 % (p/p), alrededor de 1,5 % (p/p), alrededor de 1,6 % (p/p) o alrededor de 1,7 % (p/p).

En modalidades de ejemplo, la formulación en polvo seco comprende alrededor de 39 % de trehalosa, alrededor de 10,5 % de luecina, alrededor de 2 % de trileucina, alrededor de 8,5 % de amortiguador de citrato y el agente activo.

Los tamaños adecuados para las micropartículas de las formulaciones en polvo seco se describen en la presente y, en modalidades, la pluralidad de micropartículas tiene un diámetro aerodinámico de masa media (MMAD) de alrededor de 2 μm a alrededor de 4 μm cuando se proporciona en forma de aerosol. Las áreas superficiales específicas adecuadas (SSA) de las micropartículas se describen en este documento e incluyen, por ejemplo, un área superficial específica de alrededor de 4-7 m^2/g . Convenientemente, las micropartículas tienen un diámetro medio de volumen óptico (oVMD) de alrededor de 1 μm a alrededor de 5 μm .

En modalidades adicionales, en el presente documento se proporciona un método para preparar una formulación en polvo seco. En modalidades, el método comprende convenientemente preparar una materia prima líquida, que comprende leucina, alrededor de 0,1 mg/mL a alrededor de 6 mg/mL trileucina, el agente activo, y que comprende convenientemente además un agente de estabilización de vidrio. Si se desea, se puede

omitir un agente de estabilización de vidrio como se describe en este documento de las formulaciones en polvo seco. La materia prima líquida también puede comprender un tensioactivo. La materia prima líquida se prepara combinando estos componentes en un disolvente líquido, para crear una materia prima en la que se disuelve cada uno de los componentes. Se puede añadir calentamiento según se desee o se requiera para aumentar la solubilidad de los diversos componentes para formar la materia prima líquida. Los disolventes líquidos de ejemplo incluyen agua, inclusive agua desionizada, así como soluciones diluidas de alcoholes con agua. En modalidades, el agente activo se agrega convenientemente a la materia prima líquida después de la adición y disolución de los componentes restantes de la materia prima.

En modalidades adecuadas de los métodos de preparación, la leucina y la trileucina están presentes en una proporción de concentración de leucina:trileucina acerca de 0,1:1 a alrededor 30:1 en la materia prima líquida. Como se describe en este documento, cuando se prepara una materia prima líquida, la leucina y la trileucina se proporcionan como cantidades en mg/mL. Por lo tanto, en tales modalidades, la relación de concentración de leucina:trileucina de alrededor de 0,1:1 a alrededor 30:1 en el volumen establecido de la materia prima líquida corresponde a la relación de leucina:trileucina en peso en la materia prima líquida. En modalidades adicionales, la leucina y la trileucina se encuentran presentes en una relación de concentración de leucina:trileucina de alrededor de 0,1:1 a alrededor de 25:1, alrededor de 0,5:1 a alrededor de 20:1, alrededor de 1:1 a alrededor de 20:1, alrededor de 1:1 a alrededor de 15:1, alrededor de 1:1 a alrededor de 12: 1, alrededor de 1:1 a alrededor de 10:1, alrededor de 1:1 a alrededor de 7:1, alrededor de 1:1 a alrededor de 6:1, o alrededor de 1:1:, alrededor de 2:1, alrededor de 3:1, alrededor de 4:1, alrededor de 5:1, alrededor de 5:1:1:, alrededor de 5,2:1 alrededor de 5,25:1, alrededor de 5,3:1, alrededor de 5,4:1, alrededor de 5,5:1, alrededor de 5,75:1 o alrededor de 6:1, en la materia prima líquida. A continuación, la materia prima líquida puede atomizarse. En determinadas modalidades, la materia prima líquida se filtra antes de la atomización. En determinadas modalidades, la materia prima líquida se filtra a través de un filtro de 0,22 micrones. En determinadas modalidades, la materia prima líquida que comprende leucina y trileucina se filtra antes de la adición del agente activo. En determinadas modalidades, la materia prima líquida se filtra antes de la adición del agente activo antes de atomizarse. La atomización se refiere a convertir la materia prima líquida en gotitas finas, utilizando convenientemente un gas presurizado (tal como CO₂ o un gas inerte). Los dispositivos de ejemplo para producir una materia prima líquida atomizada se conocen en la técnica e incluyen el uso de varias boquillas atomizadoras que tienen los tamaños y características de flujo deseados. Los parámetros de ejemplo para la atomización que incluyen una temperatura de salida de

alrededor de 50 °C-90 °C, convenientemente alrededor de 60 °C-80 °C, o alrededor de 70 °C; una tasa de alimentación de materia prima de alrededor de 8-15 ml/min, convenientemente alrededor de 9-14 ml/min, alrededor de 10-13 ml/min, o alrededor de 12 ml/min; un flujo de gas atomizador de alrededor de 9-15 kg/hora (hr o h), convenientemente alrededor de 10-14 kg/hr, alrededor de 12-14 kg/hr, o alrededor de 13 kg/hr; y tasa de flujo de gas de secado de alrededor de 60-100 kg/hr, convenientemente alrededor de 60-90 kg/hr, alrededor de 70-90 kg/hr, o alrededor de 80 kg/hr.

A continuación, la materia prima líquida atomizada se puede secar, convenientemente con calor y en combinación con un flujo de aire para ayudar en el secado. El resultado del secado da lugar a una pluralidad de micropartículas. Las temperaturas de secado oscilan típicamente entre alrededor de 50 °-100 °C, o alrededor de 60°-100 °C, o alrededor de 70 ° - 90 °C; el flujo de aire puede ser del orden de unos 10-40 m³/hora.

En el presente documento se describen ejemplos de agentes de estabilización vítrea, que incluyen sacáridos amorfos y amortiguadores, así como cantidades adecuadas de los agentes de estabilización vítrea. También se proporcionan cantidades adecuadas de leucina y trileucina. Dado que la formulación en polvo seco final debe contener las cantidades indicadas de leucina y trileucina (y otros componentes), dichas cantidades también se utilizan en la materia prima líquida. El resultado del proceso de secado que sigue a la atomización es que se elimina cualquier disolvente líquido y, por lo tanto, la cantidad total del peso seco original de los componentes corresponde al peso seco final de los compuestos en la formulación en polvo seco. Los agentes activos de ejemplo también se describen en este documento.

Los métodos de preparación de formulaciones en polvo seco descritos en este documento proporcionan convenientemente micropartículas que tienen las características físicas deseadas indicadas, que incluyen la densidad aparente comprimida, el área superficial específica y los tamaños deseados. Los tamaños de ejemplo se describen en este documento, al igual que los SSA de ejemplo, que incluyen un área de superficie específica de menos de alrededor de 10 m²/g, convenientemente alrededor de 4-7 m²/g. Convenientemente, los métodos proporcionan una pluralidad de micropartículas que tienen un diámetro medio de volumen óptico equivalente (oVMD) de alrededor de 1 µm a alrededor de 5 µm, como se describe en el presente documento; un diámetro aerodinámico de masa media (MMAD) de alrededor de 2 µm a alrededor de 4 µm cuando se proporciona en forma de aerosol; una densidad aparente comprimida de alrededor de 0,4 g/cm³ -0,8 g/cm³.

Una ventaja de los métodos de preparación de formulaciones en polvo seco descritos en la presente se relaciona con la naturaleza de alto rendimiento del proceso. Por ejemplo, si se establece un flujo de atomización en 20 ml/min, el siguiente rendimiento en gramos/hora se

encuentra determinado.

Tabla 2: Implicaciones de la concentración en el rendimiento

Implicaciones de la concentración en el rendimiento			
Contenido de leucina	Contenido de trileucina	Carga máx de sólidos (mg/mL) (Solubilidad máx limitada)	Rendimiento (g/hr) (a velocidad de flujo del líquido de 20 ml/min del proceso)
	20.0%	25	30
60.0%		33	40
45.0%		44	53
	10.0%	50	60
30.0%		67	80
10.5%	2.0%	190	229
10.0%	2.5%	200	240
8.0%	2.0%	250	300

Como se establece, usando solo trileucina en una materia prima, con una concentración máxima de trileucina de 5 mg/mL, se alcanzó una carga máxima de sólidos de 25 mg/mL (relacionado con la solubilidad máxima). Esto tiene como resultado un total de 30 g/hora. Con solo leucina en 60 %, con una concentración máxima de leucina de 20 mg/mL, se alcanzó una carga máxima de sólidos de 33 mg/mL, y un rendimiento de 40 g/hora. También se muestran resultados adicionales para el uso de solo leucina y trileucina. En contraste, para las tres materias primas examinadas que contenían tanto leucina como trileucina, una carga máxima de sólidos de 250 mg/mL y un rendimiento de 300 g/hora se alcanzó usando sólo 8 % de leucina y 2 % de trileucina. Este fue un hallazgo sorprendente e inesperado de las ventajas de los métodos y formulaciones descritos en el presente documento, ya que se puede proporcionar una partícula dispersable usando cantidades relativamente pequeñas de leucina y trileucina, pero que también permite una gran cantidad de producción. Tal alto rendimiento impacta en gran medida en la capacidad de escalar la producción de las formulaciones en polvo seco descritas en este documento cuando se requieren grandes cantidades de las formulaciones.

Los métodos y formulaciones descritos en la presente permiten la producción de cápsulas, blísteres, etc., y otros envases adecuados para formulaciones en polvo seco. Dichos recipientes se pueden producir con 10-200 mg en polvo seco, convenientemente 10-100 mg o 25-75 mg o 50 mg o una formulación en polvo seco. Dichos recipientes pueden suministrar convenientemente de 0,1-10 mg de una formulación en polvo seco a los pulmones de un paciente.

En algunas modalidades, el uso de los métodos descritos en el presente documento proporciona formulaciones en polvo seco que pueden reducir el número total de cápsulas

requeridas para usar en un dispositivo de inhalación. Por ejemplo, el volumen requerido para administrar 50-100 mg de agente activo se puede reducir de dos cápsulas 00 más grandes a una sola cápsula de tamaño 3.

Los métodos descritos en el presente documento también proporcionan un mecanismo para aumentar la densidad aparente comprimida y el área superficial específica de una formulación en polvo seco que comprende una pluralidad de micropartículas. Como se describe a lo largo de la presente, al incorporar leucina y trileucina en la formulación en polvo seco, se obtiene una densidad aparente comprimida de alrededor de 0,4-1,0 g/cm³ (convenientemente alrededor de 0,5-0,8 g/cm³), se puede lograr fácilmente. Además, una superficie específica de unos 5-10 m²/g (convenientemente unos 5 m²/g a unos 7 m²/g), también se puede lograr. En modalidades adicionales, los tamaños de las micropartículas pueden formarse en los intervalos descritos en la presente, inclusive micropartículas con un diámetro aerodinámico de masa media (MMAD) de alrededor de 2 µm a alrededor de 4 µm cuando se proporciona en una forma de aerosol.

Los métodos para producir una forma de aerosol de una formulación en polvo seco se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, el uso de dispositivos inhaladores como un inhalador en polvo seco (DPI) (por ejemplo, un DPI Monodose RS01 de PLASTIAPE (Osnago, Italia). Las formulaciones en polvo seco descritas en este documento se pueden dispensar en una corriente de gas mediante un dispositivo de inhalación pasivo o activo, y permanecer suspendidas en el gas durante un tiempo suficiente para que el paciente inhale al menos una parte de las micropartículas para que una parte de las micropartículas llegue a los pulmones.

También se proporcionan en este documento métodos para tratar una afección médica en un paciente mamífero, que incluyen la administración al paciente por inhalación (incluido un inhalador en polvo seco) de las formulaciones en polvo seco como se describe en este documento.

Las condiciones médicas que se pueden tratar usando los métodos descritos en este documento incluyen aquellas que afectan el sistema nervioso, el sistema endocrino, el sistema muscular, el sistema cardiovascular, el sistema digestivo, el sistema respiratorio (y específicamente los pulmones), los sistemas hormonales, el sistema inmunológico el aparato reproductor, etc.

En modalidades, en el presente documento se proporciona un método para tratar una afección inflamatoria relacionada con TSLP en un paciente. Las condiciones inflamatorias relacionadas con TSLP pueden desencadenarse por reacciones alérgicas o irritantes o estimulantes ambientales. En algunas modalidades, la afección inflamatoria relacionada con TSLP puede ser asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, rinitis alérgica,

rinosinusitis alérgica, conjuntivitis alérgica, dermatitis atópica o esofagitis eosinofílica.

En algunas modalidades, la afección inflamatoria relacionada con TSLP es asma, y dicho método de tratamiento comprende administrar al paciente por inhalación una formulación en polvo seco que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-TSLP o una variante de fragmento de anticuerpo. En determinadas modalidades, el paciente es un adulto. En determinadas modalidades, el paciente es un niño o adolescente.

Como se describe en la presente, convenientemente la formulación en polvo seco incluye una pluralidad de micropartículas, las micropartículas comprenden: leucina; alrededor de 1 % a alrededor de 10 % de trileucina en peso; y un anticuerpo anti-linfopoyetina estromal tímica (anti-TSLP) o una variante de anticuerpo, donde la leucina y la trileucina se presentan en una relación de concentración de leucina:trileucina de alrededor de 0,1:1 a alrededor de 30:1. La formulación en polvo seco puede comprender una densidad aparente comprimida de alrededor de 0,3-1,0 g/cm³. Los componentes de ejemplo para su inclusión en la formulación y las cantidades de los mismos se describen a lo largo de la presente.

Como se describe en el presente documento, la capacidad de administrar el anticuerpo o la variante de anticuerpo anti-linfopoyetina estromal tímica (anti-TSLP) mediante inhalación proporciona un mecanismo de administración más adecuado para usar en un entorno de atención primaria.

En modalidades de los métodos para tratar el asma, la formulación en polvo seco se administra con frecuencia y en dosis más bajas que un medicamento anti-TSLP administrado sistémicamente. En algunas modalidades, la formulación puede administrarse diariamente. Tales modalidades pueden ser más convenientes para el sujeto o paciente. Además, dichas modalidades pueden reducir los efectos secundarios que pueden ocurrir a través de la administración sistémica.

Convenientemente, el fragmento de unión al antígeno del anticuerpo para uso en los métodos de tratamiento comprende

un dominio variable de cadena pesada que comprende:

una secuencia de CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:1;

una secuencia de CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:2;

una secuencia de CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:3; y

un dominio variable de cadena ligera que comprende:

una secuencia de CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:5;

una secuencia de CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:6; y

una secuencia de CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:7.

En modalidades adicionales de los métodos de tratamiento, el fragmento de unión a antígeno comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:4; y un dominio variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:8.

En algunas modalidades, las formas de asma susceptibles de tratamiento con la formulación de la invención incluyen asma leve, asma moderada, asma grave, asma sin eosinófilos, asma con eosinófilos bajos y asma con eosinófilos altos. En determinadas modalidades, las formulaciones de la invención pueden usarse en el tratamiento de asma leve. En determinadas modalidades, las formulaciones de la invención pueden usarse en el tratamiento de asma moderado. En determinadas modalidades, las formulaciones de la invención pueden usarse en el tratamiento de asma grave. En determinadas modalidades, las formulaciones de la invención pueden usarse en el tratamiento de asma no eosinofílica. En determinadas modalidades, las formulaciones de la invención pueden usarse en el tratamiento de asma con bajo contenido de eosinófilos. En determinadas modalidades, las formulaciones de la invención pueden usarse en el tratamiento de asma con alto contenido de eosinófilos.

Los términos "asma leve" y "asma moderada", tal como se utilizan en este documento, se refieren al asma que tiene una escala de la Iniciativa Global para el Asma (GINA) de 3 o menos, convenientemente una escala GINA de 2 o 3. La escala GINA mide la gravedad del asma, según los siguientes criterios (consulte la "Pocket Guide for Asthma Management and Prevention," Iniciativa mundial para el asma; 2019).

El término "asma grave", como se usa en este documento, se refiere al asma que requiere un tratamiento de alta intensidad (por ejemplo, Paso 4 y Paso 5 de GINA) para mantener un buen control, o donde no se logra un buen control a pesar del tratamiento de alta intensidad (GINA, Estrategia Global para la Gestión y Prevención del Asma). Iniciativa Global para el Asma (GINA) Diciembre 2012). El término "asma grave" también abarca el asma moderada-grave. Asmas moderados-graves adecuados para el tratamiento con las formulaciones descritas en la presente pueden ser aquellos no controlados en dosis media a dosis alta de ICS:LABA con una o más exacerbaciones y síntomas frecuentes. En determinadas modalidades, el asma grave se define además como asma grave con inflamación de tipo 2 caracterizada por eosinófilos en sangre elevados (es decir, un recuento de eosinófilos en sangre de ≥ 150 células/ μL) y/o el aumento de FeNO (es decir, $\text{FeNO} \geq 20$ ppb).

El término "FENO" se refiere al óxido nítrico exhalado fraccional, que es un biomarcador de

inflamación bronquial o de las vías respiratorias. FENO es producido por las células epiteliales de las vías respiratorias en respuesta a las citosinas inflamatorias, como TSLP, IL-4 e IL-13. Los niveles de FENO en adultos sanos oscilan entre 2 y 30 partes por billón (ppb). Un ensayo de ejemplo para medir FENO comprende sujetos que inhalan hasta la capacidad pulmonar total a través del monitor de inflamación de las vías respiratorias NIOX MINO® y luego exhalan durante 10 segundos a 50 ml/sec (asistido por señales visuales y auditivas).

El término "asma con alto contenido de eosinófilos", como se usa en el presente documento, se refiere a un paciente con asma que tiene un recuento de eosinófilos en sangre de detección de ≥ 250 células/ μ L.

Además, las formulaciones proporcionan la posibilidad de tratar pacientes con asma menos grave que son normalmente controlados en un entorno de atención primaria. Por ejemplo, los pacientes con una escala de la Iniciativa Global para el Asma (GINA) de 3 o menos, convenientemente una escala GINA de 2 o 3. La escala GINA mide la gravedad del asma, según los siguientes criterios (consulte la "Pocket Guide for Asthma Management and Prevention," Iniciativa mundial para el asma; 2019).

síntomas de asma durante el día más de dos veces por semana;

despertarse de noche debido al asma;

uso de un analgésico para el asma más de dos veces/semana; y

limitación de la actividad por asma. Una puntuación de cero de estos criterios se considera "bien controlada". Una puntuación de 1-2 de estos criterios se considera "parcialmente controlada". Una puntuación de 3-4 de estos criterios se considera "no controlada".

En algunas modalidades, las formulaciones brindan la posibilidad de tratar a pacientes con asma moderada-grave que podrían ser controlados en un entorno de atención primaria, o para tratar a pacientes con asma moderada-grave con difícil acceso al tratamiento a través de atención especializada. Por ejemplo, las formulaciones pueden ser útiles para el tratamiento de pacientes con asma moderada a grave con una escala de 4-5 de la Iniciativa Global para el Asma (GINA). Convenientemente, las formulaciones prevén la posibilidad de tratar el asma de moderada a grave que no está controlada. Convenientemente, las formulaciones brindan la posibilidad de tratar el asma moderada-grave que no está controlada con dosis medias a dosis altas de ICS:LABA con una o más exacerbaciones y síntomas frecuentes.

Modalidades de ejemplo adicionales

La Modalidad 1 es una formulación en polvo seco que comprende una pluralidad de micropartículas, las micropartículas comprenden: leucina, alrededor de 1 % a alrededor de 10 % de trileucina en peso y un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo anti-

linfopoyetina estromal tímica (TSLP) que comprende: a. un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecidas en la SEQ ID NO:1, una secuencia de CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:2; y una secuencia de CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:3, donde cualquiera de la CDR1, 2 o 3 de cadena pesada comprende opcionalmente una única sustitución de aminoácidos, y b. un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:5, una secuencia de CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:6, y una secuencia de CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:7, donde cualquiera de las CDR 1, 2 o 3 de cadena ligera comprende opcionalmente una única sustitución de aminoácido, donde la leucina y la trileucina están presentes en una relación de concentración de leucina:trileucina alrededor de 0,1:1 a alrededor de 30:1.

La Modalidad 2 es una formulación en polvo seco de la modalidad 1, donde la formulación en polvo seco tiene una densidad aparente comprimida de alrededor de 0,4-1,0 g/cm³.

La Modalidad 3 es una formulación en polvo seco de cualquier modalidad anterior, que comprende además un agente de estabilización vítreo.

La Modalidad 4 es una formulación en polvo seco de la modalidad 3, donde el agente de estabilización vítreo es un sacárido amorfo o un amortiguador.

La Modalidad 5 es una formulación en polvo seco de la modalidad 3, donde el agente de estabilización vítreo es un sacárido amorfo o un amortiguador.

La Modalidad 6 es una formulación en polvo seco de la modalidad 4 o la modalidad 5, donde el sacárido amorfo se selecciona del grupo que consiste en trehalosa, sacarosa, rafinosa, inulina, dextrano, manitol y ciclodextrina.

La Modalidad 7 es una formulación en polvo seco de cualquiera de las modalidades 4-6, donde el amortiguador se selecciona del grupo que consiste en un amortiguador citrato, un amortiguador de fosfato, un amortiguador de histidina, un amortiguador de glicina, un amortiguador de acetato y un amortiguador de tartrato.

La Modalidad 8 es una formulación en polvo seco de cualquiera de las modalidades 4-7, donde el sacárido amorfo está presente en alrededor de 30 % a alrededor de un 70 % en peso.

La Modalidad 9 es una formulación en polvo seco de cualquiera de las modalidades 4-8, donde el sacárido amorfo es trehalosa.

La Modalidad 10 es una formulación en polvo seco de la modalidad 9, donde la trehalosa se

encuentra presente a alrededor de 30 %-65 % en peso.

La Modalidad 11 es una formulación en polvo seco de cualquiera de las modalidades 4-10, donde el amortiguador se encuentra presente a alrededor de 1 % a alrededor de 10 % en peso.

La Modalidad 12 es una formulación en polvo seco de cualquiera de las modalidades 1-11, donde la relación de concentración de leucina:trileucina es de alrededor de 1:1 a alrededor 12:1.

La Modalidad 13 es una formulación en polvo seco de cualquiera de las modalidades 1-12, donde la relación de concentración de leucina:trileucina es de alrededor de 1:1 a alrededor 7:1.

La Modalidad 14 es una formulación en polvo seco de cualquiera de las modalidades 1-13, donde la relación de concentración de leucina:trileucina es alrededor de 5,25:1.

La Modalidad 15 es una formulación en polvo seco de cualquiera de las modalidades 1-14, que comprende alrededor de 1 % a alrededor 7 % de tripleucina en peso.

La Modalidad 16 es una formulación en polvo seco de cualquiera de las modalidades 1-15, que comprende alrededor de 8 % a alrededor 11 % de tripleucina en peso y alrededor de 2 % a alrededor de 4 % de tripleucina en peso.

La Modalidad 17 es una formulación en polvo seco de cualquiera de las modalidades 1-16, que comprende alrededor de 10,5 % de leucina en peso y alrededor de 2 % de tripleucina en peso.

La Modalidad 18 es una formulación en polvo seco de cualquiera de las modalidades 1-17, que comprende además un tensioactivo, donde el tensioactivo se selecciona opcionalmente entre polisorbato-20 (PS-20), polisorbato-40 (PS-40), polisorbato-60 (PS-60), polisorbato-80 (PS-80) y poloxámero-188.

La Modalidad 19 es una formulación en polvo seco de la modalidad 18, donde el tensioactivo es PS-80, donde opcionalmente PS-80 está presente en una concentración en el intervalo de alrededor de 0,27 % en peso a alrededor de 2,7 % en peso.

La Modalidad 20 es una formulación en polvo seco de la modalidad 18, donde el tensioactivo es poloxámero-188, donde opcionalmente el poloxámero-188 está presente en una concentración en el intervalo de alrededor de 1 % en peso a alrededor de 10 % en peso.

La Modalidad 21 es una formulación en polvo seco de cualquiera de las modalidades 1-20, donde la pluralidad de micropartículas tiene un diámetro medio de volumen óptico equivalente (oVMD) de alrededor de 1 μm a alrededor de 5 μm .

La Modalidad 22 es una formulación en polvo seco de cualquiera de las modalidades 1-21, donde la pluralidad de micropartículas tienen un diámetro medio aerodinámico de masa (MMAD) de alrededor de 2 μm a alrededor de 4 μm cuando se proporciona en forma de

aerosol.

La Modalidad 23 es una formulación en polvo seco de cualquiera de las modalidades 2-22, donde la densidad aparente comprimida es alrededor de 0,5 g/cm³ a alrededor de 0,8 g/cm³.

La Modalidad 24 es una formulación en polvo seco de cualquiera de las modalidades 2-23, que comprende alrededor de 39 % de trehalosa, alrededor de 10,5 % de leucina, alrededor de 2 % de trileucina y alrededor de 8,5 % de amortiguador de citrato.

La Modalidad 25 es una formulación en polvo seco de cualquiera de las modalidades 1-24, donde la pluralidad de micropartículas tiene un área superficial específica de menos de alrededor de 10 m²/g.

La Modalidad 26 es una formulación en polvo seco de la modalidad 25, donde la pluralidad de micropartículas tiene un área de superficie específica de alrededor de 4 m²/g a alrededor de 7 m²/g.

La Modalidad 27 es una formulación en polvo seco de cualquier modalidad anterior, donde la CDR1 de dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos establecido en la SEQ ID NO:1, CDR2 de dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:2, CDR3 de dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:3, CDR1 de dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos establecidos en la SEQ ID NO:5, CDR2 de dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos establecidos en la SEQ ID NO:6 y CDR3 de dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:7.

La Modalidad 28 es una formulación en polvo seco de la modalidad 27, donde el fragmento de unión al antígeno comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:4 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO:8.

La Modalidad 29 es una formulación en polvo seco de cualquier modalidad anterior, donde el fragmento de unión al antígeno se selecciona de Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, minicuerpo o diacuerpo.

La Modalidad 30 es una formulación en polvo seco de la modalidad 29 donde el fragmento de unión al antígeno es un Fab.

La Modalidad 31 es una formulación en polvo seco de la modalidad 30, donde el Fab es humano o humanizado.

La Modalidad 32 es una formulación en polvo seco de cualquier modalidad anterior, donde el anticuerpo anti-TSLP del que se deriva el fragmento de unión al antígeno es una IgG1.

La Modalidad 33 es un método para tratar el asma en un paciente, que comprende administrar por inhalación la formulación en polvo seco según cualquiera de las modalidades

1-29.

La Modalidad 34 es un método de la modalidad 33, donde el asma es asma leve.

La Modalidad 35 es un método de la modalidad 33, donde el asma es asma moderado.

La Modalidad 36 es un método de la modalidad 33, donde el asma es asma grave.

La Modalidad 37 es un método de la modalidad 33, donde el asma es asma eosinofílica o no eosinofílico.

La Modalidad 38 es un método de la modalidad 33, donde el asma es asma con bajo contenido de eosinófilos.

La Modalidad 39 es un método de cualquiera de las modalidades 33-38, donde el asma se caracteriza por menos de tres de: síntomas de asma durante el día más de dos veces por semana; despertarse de noche debido al asma; uso de un analgésico para el asma más de dos veces/semana; y limitación de la actividad debido al asma.

La Modalidad 40 es una formulación en polvo seco de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-32, para el uso en un método de tratamiento, donde la formulación se administra mediante inhalación.

La Modalidad 41 es una formulación en polvo seco para usar de acuerdo con la modalidad 37, en un método para tratar el asma.

La Modalidad 42 es una formulación en polvo seco para usar de acuerdo con la modalidad 38, donde el asma es asma leve.

La Modalidad 43 es una formulación en polvo seco para usar de acuerdo con la modalidad 38, donde el asma es asma moderado.

La Modalidad 44 es una formulación en polvo seco para usar de acuerdo con la modalidad 38, donde el asma es asma grave.

La Modalidad 45 es una formulación en polvo seco para usar de acuerdo con la modalidad 38, donde el asma es asma eosinofílica o asma no eosinofílica.

La Modalidad 46 es una formulación en polvo seco para usar de acuerdo con la modalidad 38, donde el asma es asma con bajo contenido de eosinófilos.

La Modalidad 47 es una formulación en polvo seco para el uso de la modalidad 38, donde el asma se caracteriza por menos de tres de: síntomas de asma durante el día más de dos veces por semana; despertarse de noche debido al asma; uso de un analgésico para el asma más de dos veces/semana; y limitación de la actividad debido al asma.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1 – GENERACIÓN DE FABS ANTI-TSLP

Una serie de fragmentos de unión a anticuerpos (Fab) derivados del anticuerpo monoclonal anti-TSLP "A5" descrito en WO 2009/035577, que se incorpora a la presente como referencia en su totalidad, se generaron utilizando técnicas de clonación y biología molecular

estándar. En resumen, las secuencias de CDR de A5 se clonaron en un armazón Fab de IgG1, lo que tuvo como resultado el fragmento Fab denominado en la presente Fab₁ o Fab1. Las secuencias VH y VL de Fab₁ se describen como SEQ ID NOs:4 y 8, respectivamente. También se generaron variantes Fab₂₋₉ a partir de Fab₁ que comprenden mutaciones en las regiones CDR. La combinación de CDR VH y VL para cada Fabs1-9 se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3 Secuencia de CDR de Fabs₁₋₉ anti-TSLP

	CDR 1, 2 y 3 VH	CDR 1, 2 y 3 VL
Fab ₁	SEQ ID NOs:1, 2 y 3	SEQ ID NOs:5, 6 y 7
Fab ₂	SEQ ID NOs:1, 2 y 3	SEQ ID NO:11, 6 y 7
Fab ₃	SEQ ID NOs:1, 2 y 3	SEQ ID NO:14, 6 y 7
Fab ₄	SEQ ID NO:1, 15 y 3	SEQ ID NOs:5, 6 y 7
Fab ₅	SEQ ID NOs: 1, 17 y 3	SEQ ID NOs:5, 6 y 7
Fab ₆	SEQ ID NOs:1, 2 y 3	SEQ ID NOs:19, 6 y 7
Fab ₇	SEQ ID NOs:1, 2 y 3	SEQ ID NOs:19, 6 y 7
Fab ₈	SEQ ID NOs:1, 2 y 3	SEQ ID NOs:5, 6 y 23
Fab ₉	SEQ ID NOs:1, 2 y 3	SEQ ID NOs:5, 6 y 25

Se analizó la pureza, estabilidad y propensión a la agregación de Fab₁. En resumen, se formularon 50 mg/mL Fab₁ en citrato de sodio 30 mM, trehalosa 105 mM, pH 6,0. Las muestras se colocaron en cámaras de estabilidad a 40 °C y 5 °C durante diferentes períodos de tiempo. En diferentes momentos, las muestras se analizaron mediante técnicas analíticas relevantes, como la cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento (HP-SEC). Un sistema de HPLC de Agilent con inyector automático de temperatura controlada, DAD o VWD y Agilent ChemStation software/OpenLAB Se utilizó ECM CDS de Agilent Technologies (Santa Clara, CA, EUA). También se utilizaron una precolumna, una columna TSKgel (DI de 7,9 mm, n.º de catálogo 08543) y una columna TSK-Gel G3000SWxl (5 µm, 250 Å y 7,8 x 300 mm, n.º de catálogo 08541) de Tosoh Bioscience (Griesheim, Alemania). La fase móvil utilizada fue fosfato de sodio dibásico anhidro 0,1 M, sulfato de sodio 0,1 M, pH 6,8. Los resultados del análisis de estabilidad y agregación se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4 Estabilidad y agregación de Fab₁

	5 °C			40 °C		
Meses	% de monómero	% de agregado	% de fragmento	% monómero	% de agregado	% de fragmento
0,0	99,57	0,43	0,00	99,57	0,43	0,00
0,2				99,56	0,44	0,00

0,5	99,51	0,49	0,00	99,31	0,55	0,14
0,7				99,25	0,61	0,14
1	99,48	0,52	0,00	99,13	0,65	0,21
2	99,49	0,51	0,00			
3	99,47	0,53	0,00			
Tasa (m⁻¹)	-0,03	0,03	0,00	-0,51	0,27	0,25
RSQ	0,6504	0,6504	N/C	0,9296	0,9447	0,8943

La estabilidad de Fab₁ también se evaluó mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC). Se utilizó un MicroCal Capillary VP DSC de Malvern Panalytical (Malvern, Reino Unido) para la prueba y un software Origin 7.0 (Northampton, MA, EUA) para el análisis de datos. La muestra de Fab₁ se diluyó a 5 mg/mL con el amortiguador de formulación (citrato de sodio 30 mM, trehalosa 105 mM, pH 6,0). Para cada ejecución individual, el muestreador automático inyectó 500 µl de muestra de Fab₁ diluida y de referencia (amortiguador de formulación) en las células de muestra y de referencia de DSC. Las soluciones se calentaron de 25 °C a 100 °C a una velocidad de barrido de 95 °C/hora. También se obtuvo un escaneo del amortiguador (rellenado con celdas de muestra y de referencia) como blanco para la corrección de la línea base de la muestra.

El perfil de carga de Fab₁ también se determinó mediante imágenes de enfoque isoelectrico (IEF) utilizando un analizador iCE3. El analizador IEF capilar iCE3, el muestreador automático PrinCE MicroInjector y el capilar de transferencia recubierto MicroInjection fueron adquiridos y suministrados por Protein Simple. Las muestras se analizaron utilizando un cartucho FC con capilar recubierto de fluorocarbono y tanques de electrolito incorporados (Parte n.º 101701, Protein Simple). El automuestreador se mantuvo a 4 °C durante todo el análisis. Se determinó que el intervalo de pI de Fab₁ era de 8,35 a 8,80.

EJEMPLO 2 - FAB₁ SE UNE A HU Y CYNO TSLP CON AFINIDAD PM

Afinidad de la unión de Fab₁ a TSLP determinada por BIAcore

La especificidad y la afinidad de Fab₁ por TSLP humano y cyno expresada en células de mamífero recombinantes se determinaron utilizando un instrumento Biacore 8K SPR (GE Healthcare, Little Chalfont, Bucks, Reino Unido).

Los chips biosensores S Series C1, los kits de acoplamiento de amina, los amortiguadores de solución salina amortiguada con hepes y los amortiguadores de regeneración se obtuvieron de GE Healthcare y se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las superficies de estreptavidina se prepararon usando estreptavidina liofilizada que se reconstituyó con D-PBS. Brevemente, la estreptavidina se diluyó a 4 µg mL⁻¹ en acetato de

sodio 10 mM, pH 4,5, y se inmovilizó covalentemente en tres superficies de celdas de flujo de un chip biosensor S Series C1 mediante métodos estándar de acoplamiento de amina. Se logró una superficie final de estreptavidina de 170 unidades de respuesta (RU). Los reactivos de acoplamiento de amina también se usaron para preparar una superficie en blanco de control, sin estreptavidina inmovilizada, para que sirviera como superficie de referencia dentro de cada celda de flujo. Luego se tituló TSLP biotinilado marcado en el extremo N (humano y cyno) en cada superficie de estreptavidina para permitir < 100 RU de unión de Fab1 a saturación (R_{max}). El bajo nivel de unión del analito garantizó que los artefactos inducidos por el transporte de masa se minimizaran, especialmente cuando se combina con los caudales de ensayo relativamente rápidos de $50 \mu\text{L min}^{-1}$ utilizados durante los pasos de medición de la cinética. Se inyectaron diluciones (Cinética multiciclo) de Fab1 monomerizado (diluciones dobles en amortiguador HBS-EP+ que oscilan entre 1,25 y 20 nM), a un caudal de ensayo de $50 \mu\text{L min}^{-1}$, durante 2 minutos de asociación y 10 minutos de disociación. Se realizaron múltiples inyecciones de amortiguador solo en las mismas condiciones durante todo el experimento para permitir el procesamiento de referencia doble de los conjuntos de sensogramas finales.

La superficie del chip se regeneró completamente haciendo fluir dos pulsos de 30 segundos de glicina 10 mM pH 1,7. La afinidad de unión y la cinética se determinaron utilizando 1:1 modelo Langmuir.

Los resultados que se muestran en la Tabla 5 demuestran que Fab₁ se une a hu y cyno TSLP inmovilizados con afinidades similares (dentro de 2 veces; 46 pM y 88 pM, respectivamente).

Tabla 5 Afinidad de Fab₁ por TSLP humana y de Cynomolgus usando BIAcore

Analito	k_a ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (pM)
TSLP humana	2,39 E6	1,11 E-4	46,3
TSLP cyno	1,75 E6	1,55 E-4	88,4

Afinidad de unión determinada por ensayo de exclusión cinética (KinExA).

La afinidad de unión de la fase de solución (K_D) de Fab₁ por TSLP humana y cyno también se determinó usando un instrumento KinExA 3200 (Sapidyne Instruments, Boise, Idaho, EUA) y los datos resultantes se procesaron usando el software KinExA Pro versión 4.1.11. La metodología KinExA ha sido revisada (Darling y Brault, 2004).

Fab₁ se mezcló previamente con concentraciones variables de cada TSLP de hu y cyno hasta que se alcanzó el equilibrio (se prepararon al menos 12 concentraciones de cada TSLP hu y cyno utilizando un método de dilución en serie de 2 veces). Luego se midió la cantidad de Fab₁ libre usando el instrumento KinExA capturando Fab libre usando perlas recubiertas con TSLP de hu, eliminando el material no unido y detectando el Fab₁ unido

mediante fluorimetría usando un anticuerpo específico de especie comercial (anticuerpo específico de cadena pesada y ligera anti-humano de ratón etiquetado con Alexa Fluor 647 (Jackson ImmunoResearch 209-605-088)). El K_D de Fab₁ para TSLP hu fue extraído por ajuste global 1:1 a tres conjuntos de datos, derivados de valoraciones de hu TSLP en 1000 pM (rombos rellenos), 500 pM (triángulos invertidos rellenos) o 40 pM (cuadrados vacíos) soluciones de concentración fija de Fab₁ (FIG. 1). El K_D de Fab₁ para TSLP cyno fue extraído por ajuste global 1:1 a dos conjuntos de datos, derivados de valoraciones de TSLP cyno en 1000 pM (rombos rellenos) o 40 pM (cuadrados vacíos) soluciones de concentración fija de Fab₁ (FIG. 2).

La cantidad de Fab₁ libre detectada en cada concentración de TSLP hu y cyno se representó frente a la concentración valorada de TSLP (FIGS. 1 y 2, respectivamente). Se utilizó el software KinExA para calcular la constante de disociación de equilibrio (K_D). Los resultados que se muestran en la Tabla 6 demuestran que el Fab₁ se une al TSLP humano con una afinidad 1,7 veces mayor que la que se une al TSLP cyno en solución libre.

Tabla 6 Afinidad de fase soluble de Fab₁ para hu y cyno TSLP usando KinExA

Ligando	Afinidad (K_D) pM
TSLP humana	8,0 (95 % int. de conf.) 6,27-10,01 pM)
TSLP cyno	13,6 (95% int. de conf. 9,07-19,22 pM)

EJEMPLO 3 - FAB1 Y TEZEPELUMAB SE UNEN A TSLP CON CARACTERÍSTICAS DE UNIÓN SIMILARES

Las características de unión de Fab₁ a TSLP hu se compararon directamente con tezepelumab. El tezepelumab es un anticuerpo monoclonal (mAb) de inmunoglobulina humana G2 (IgG2) que se une a TSLP, evitando su interacción con el complejo receptor de TSLP. Un estudio de prueba de concepto en pacientes con asma atópica leve demostró que tezepelumab inhibió la respuesta asmática temprana y tardía y suprimió los biomarcadores de inflamación Th2 después de la exposición al alérgeno inhalado. Tezepelumab se está investigando actualmente en la clínica como un tratamiento de atención especializada para el tratamiento del asma grave.

La potencia de unión *in vitro* de Fab₁ se determinó mediante el uso de un ensayo de unión a TSLP:mAb basado en transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) Fluorescencia homogénea resuelta en el tiempo (HTRF®, Cisbio International). Se usó criptato de estreptavidina para la detección de TSLP biotinilado. En resumen, las muestras de Fab₁ sin etiquetar se titularon en el ensayo HTRF para competir con tezepelumab marcado con DyLight por la unión a His-Avi hu biotinilado TSLP. También se realizó un ensayo competitivo utilizando tezepelumab no etiquetado y tezepelumab etiquetado con DyLight como control positivo.

Los resultados muestran que Fab₁ compite por unirse a huTSLP con tezepelumab y se une a TSLP hu con una potencia similar a tezepelumab (IC₅₀: Fab₁- 0,38 nM; tezepelumab - 0,23 nM - FIG. 3). El ensayo HTRF también se realizó usando Fabs₂₋₉, lo que muestra que cada uno de estos Fab también compite por unirse a hu TSLP con tezepelumab y se une a hu TSLP con una potencia similar a tezepelumab (Tabla 7).

Tabla 7 IC₅₀ de Fabs₂₋₉ según lo determinado por el ensayo HTRF

	IC ₅₀ nM
Fab ₂	0,29
Fab ₃	0,24
Fab ₄	0,36
Fab ₅	0,42
Fab ₆	0,32
Fab ₇	0,24
Fab ₈	0,29
Fab ₉	0,29

Ejemplo 4 - Fab₁ neutraliza la actividad de TSLP en un ensayo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

A continuación, se determinó si la unión de Fab₁ a TSLP tiene actividad de bloqueo funcional en un ensayo de células primarias midiendo la liberación de CCL17 inducida por TSLP de PBMC tras el tratamiento con Fab₁.

La sangre se obtuvo de donantes sanos bajo el programa de donantes de sangre establecido en MedImmune, Cambridge, Reino Unido. Se aislaron células mononucleares de sangre periférica mediante un procedimiento estándar usando un gradiente de Ficoll. Brevemente, 20 ml de sangre diluida con PBS (10 ml de sangre:30ml de PBS) se colocaron en capas sobre ficoll de 15 ml. Los tubos se centrifugaron a 400 g durante 40 minutos a temperatura ambiente sin descanso. Las capas de PBMC se recogieron y las células se lavaron dos veces con 50 ml de PBS. Las PBMC se contaron utilizando un hemocitómetro y azul de tripano para excluir las células muertas y se resuspendieron en medios de cultivo (RPMI con suero bovino fetal al 10 % y 1 % penicilina/estreptomicina) antes de sembrar en una placa de 96 pocillos. Las células se estimularon con TSLP (0,5 ng/ml) en presencia del fragmento Fab₁ del anticuerpo de unión a TSLP, durante 48 h. También se realizaron ensayos utilizando el anticuerpo de unión a TSLP tezepelumab, como control positivo. Después de 48 h, se eliminaron los sobrenadantes y se analizó la producción de CCL17 usando un R & D duoset ELISA, según protocolo del fabricante. Los experimentos se realizaron utilizando seis donantes en tres experimentos independientes.

Los resultados muestran que Fab₁ inhibía la producción de CCL17 a partir de PBMC con

una IC_{50} de 1,39 nM (FIG. 4). El ensayo se repitió utilizando además de Fab₁, Fab₂ y Fab₃ (que comprenden las secuencias de cadena pesada variable y cadena ligera variable como se describe en la Tabla 3) y se obtuvieron resultados similares (FIG. 5).

EJEMPLO 5 - DETERMINACIÓN DE LA DOSIS MÁXIMA TOLERADA Y LA FARMACOCINÉTICA DESPUÉS DE LA INHALACIÓN DE FAB1 EN MONOS CYNOMOLGUS

El objetivo del estudio fue determinar la dosis máxima tolerada (MTD, por sus siglas en inglés) o la dosis máxima factible (MFD, por sus siglas en inglés) y la farmacocinética (PK) de Fab₁ en aerosol después de la exposición por inhalación a través de una máscara facial en macacos Cynomolgus.

Los monos cynomolgus hembra recibieron una sola inhalación de 8 min y 20 min de Fab₁ (Grupos 1 y 2, tres animales por grupo). Las dosis entregadas al pulmón para el Grupo 1 y 2 fueron 1 y 2 mg/kg basado en un depósito pulmonar del 25 %. El grupo 3 fue un aumento de dosis repetido. Un mono cynomolgus hembra y un macho fueron tratados de la siguiente manera: 8 min de inhalación diaria durante los primeros 2 días, 20 min de inhalación diaria durante 2 días, 60 min de inhalación diaria durante 3 días. Se recogieron muestras de sangre en serie para determinar la PK del suero Fab₁ y la concentración de urea. Se recogieron muestras de lavado broncoalveolar (BAL) para determinar la PK de Fab₁ y concentración de urea. El líquido de revestimiento epitelial (ELF) se calculó a partir del BAL utilizando la concentración de urea como marcador de dilución. La inmunoafinidad híbrida LC-MS/MS se utilizó el método para determinar la concentración de Fab₁ en matrices de muestra de suero y BAL. El límite inferior de cuantificación fue 4 ng/mL en suero y 10 ng/mL en BAL. Se realizó un análisis no compartimental (NCA) en los datos de PK de plasma individual utilizando Phoenix WinNonlin (versión 7.0, Certara, LP, St Louis, MO).

Después de la inhalación de Fab₁, la concentración sérica de PK, BAL y ELF aumenta con la dosis, y hubo una gran variabilidad en la concentración de Fab₁ (FIGS. 6A-6C). La semivida terminal en suero media de Fab₁ oscila entre 9,75 y 13,6 h. La $C_{máx}$ sérica se alcanzó en la mediana de $T_{máx}$ de 2 a 4 horas después de la inhalación. La concentración de ELF fue mucho mayor que la del suero después de la inhalación (>2000 veces superior) lo que sugiere que la distribución de Fab₁ al suero fue baja después de la dosis de inhalación.

Ejemplo 6: EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE LAS FORMULACIONES ATOMIZADAS QUE COMPRENDEN LEUCINA Y TRILEUCINA

Los siguientes métodos evalúan el impacto de las proporciones de concentración de trileucina y leucina en las propiedades de las partículas.

En total, 24 polvos de diferentes % en peso de trileucina, leucina y trehalosa (TLT) se secaron por aspersion en un secador por aspersion a escala piloto utilizando parámetros de

proceso idénticos a una concentración total de sólidos de materia prima de 10 %. Dado que las materias primas se prepararon con una concentración total de sólidos del 10 % (100 mg/mL), todos los valores de % en peso en este estudio también son idénticos a los valores de concentración (mg/mL). El intervalo de valores de concentración para cada excipiente de partículas se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8: Intervalos de composición de componentes de partículas

Componente	Valor mínimo	Valor máximo
Trileucina	0,71 mg/mL	5,72 mg/mL
Leucina	0,62 mg/mL	19,94 mg/mL
Trehalosa	65,84 mg/mL	90,16 mg/mL
Citrato trisódico	8,5 mg/mL	8,5 mg/mL

Cada materia prima (Tabla 9) se preparó disolviendo los excipientes en agua. Una vez que todos los excipientes se disolvieron por completo, las materias primas se secaron por aspersión usando los siguientes parámetros de proceso: temperatura de salida, 70 °C; tasa de alimentación de materia prima, 12 ml/min; flujo de gas del atomizador, 13 kg/hr; y flujo de gas de secado, 80 kg/hr. Los parámetros se seleccionaron para lograr las propiedades objetivo de partículas y aerosoles para una formulación en polvo seco destinada a la inhalación. Cada una de las 24 formulaciones se fabricó en lotes de 18 g para proporcionar suficiente polvo para la caracterización y la evaluación del rendimiento del producto. Los lotes se aleatorizaron y se produjeron a lo largo de dos días.

Tabla 9: Concentraciones de materia prima para las formulaciones 1-24

Ejecución	Conc. de trileucina	Conc. de leucina	Conc. de trehalosa	Conc. de citrato trisódico	Relación de concentración leucina/trileucina
	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	
1	1,43	13,08	76,99	8,5	9,1
2	0,71	0,62	90,16	8,5	0,9
3	0,71	4,98	85,80	8,5	7,0
4	0,71	19,94	70,85	8,5	28,1
5	1,43	16,20	73,87	8,5	11,3
6	2,86	14,95	73,69	8,5	5,2
7	2,86	9,97	78,67	8,5	3,5
8	2,86	19,94	68,70	8,5	7,0
9	2,86	4,36	84,28	8,5	1,5
10	5,72	19,94	65,84	8,5	3,5

11	0,71	15,58	75,21	8,5	21,9
12	5,72	15,58	70,20	8,5	2,7
13	5,00	11,84	74,66	8,5	2,4
14	0,71	7,48	83,31	8,5	10,5
15	2,86	0,62	88,02	8,5	0,2
16	3,57	18,07	69,86	8,5	5,1
17	5,72	0,62	85,16	8,5	0,1
18	5,72	6,23	79,55	8,5	1,1
19	1,43	11,22	78,85	8,5	7,0
20	0,71	9,97	80,82	8,5	14,0
21	4,29	3,12	84,10	8,5	0,7
22	4,29	16,82	70,39	8,5	3,9
23	5,72	9,97	75,81	8,5	1,7
24	3,57	9,97	77,96	8,5	2,8

Se evaluaron las siguientes características físicas del polvo para todas las formulaciones

Tabla 10: Parámetros de partículas analizados

Análisis / Salida DOE	Instrumento
Contenido de humedad residual	Horno KF
Distribución del tamaño de partículas primarias	Sympatec R
Temperatura de transición vítrea (Tg)	DSC
Densidad aparente comprimida ¹	GeoPyc
Morfología Visual SEM (cualitativa)	SEM
Área superficial específica	BET
Cristalinidad (cualitativa)	XRPD
Cobertura superficial de excipientes sobre partículas	ToF-SIMS

¹fuerza de compresión de 300.000 N/m² o 38N si se utiliza una cámara de muestra de 12,7 mm.

La densidad aparente comprimida (CBD) de los polvos se mide usando un analizador de densidad GeoPyc® Model 1360 (Micromeritics, Norcross, GA). Las muestras de polvo se prepararon convenientemente en un ambiente de baja humedad (< 5 % de HR), antes de la transferencia a la cámara de muestra del analizador de densidad que haya sido purgada con gas nitrógeno. Se registró el peso neto de la muestra en polvo, y luego se aplicó una fuerza de compresión de 12 N a la muestra mediante un émbolo, a una velocidad de 300 pasos de consolidación por segundo. La distancia lineal recorrida por el émbolo para cada paso de consolidación se tradujo en un desplazamiento de volumen de la muestra de polvo. Luego, un promedio de las mediciones de cada paso de consolidación se transformó en un valor de densidad aparente calculado, expresado en g/cm³.

Los resultados muestran que se encontró que el contenido de leucina y trileucina tiene un impacto significativo en las propiedades de las partículas. La trileucina se identificó como el factor primario con mayor impacto, mientras que la leucina se identificó como un factor secundario con un impacto también notable. Los resultados se resumen en la Tabla 11.

Tabla 11: Resultados de la Caracterización de Partículas

Análisis / Salida DOE	Impacto
Contenido de humedad residual	Correlación de la reducción del contenido de humedad con el aumento del contenido de leucina (ver FIG. 14)
Distribución del tamaño de partículas primarias	No se observa tendencia con Leucina o Trileucina
Temperatura de transición vítrea (Tg)	No se observa tendencia con Leucina o Trileucina
Densidad aparente comprimida ¹	Correlación negativa primaria con trileucina; Correlación Secundaria Negativa con Leucina. CBD de entre 0,45 a 0,85 g/cm ³ (FIG. 8A)
Morfología Visual SEM	Correlación positiva con TriLeucina y aspereza/rugosidad de la superficie (FIG. 11A-11D)
Área superficial específica	Correlación positiva primaria con trileucina; Correlación Positiva Secundaria con Leucina La SSA de las formulaciones es de 2,5 a 6,5 m ² /g (FIG. 9)
Cristalinidad	Se logró una mayor cristalinidad con contenidos más altos de leucina combinados con contenidos más bajos de trileucina

Cobertura superficial de excipientes sobre partículas	Mayor cobertura de superficie lograda con el aumento de % de TriLeucina y Leucina en peso (el 50 % de cobertura de partículas de trileucina se logró por encima de 1,4 % en peso)
---	---

¹Fuerza de compresión de 300.000 N/m² o 38N si se utiliza una cámara de muestra de 12,7 mm.

EJEMPLO 7 – CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO DEL AEROSOL DE LAS FORMULACIONES DE LEUCINA/TRILEUCINA

El siguiente ejemplo evalúa el rendimiento de aerosol de las formulaciones que comprenden leucina y trileucina en un dispositivo inhalador en polvo seco. Los rendimientos del rendimiento del aerosol enumerados en la Tabla 7 se probaron en 20 de las 24 formulaciones enumeradas en la Tabla 4. Toda la caracterización del rendimiento del producto se completó con un dispositivo Monodose RS01, con cápsulas de tamaño 3. El análisis Next Generation Impactor (NGI) se realizó a una tasa de flujo de 60L/min.

La prueba de impacto en cascada se realizó según la USP <601> para medir el rendimiento del aerosol de las formulaciones secadas por aspersión cuando se administran desde un dispositivo inhalador en polvo seco. El aparato impactador en cascada utilizado fue el Next Generation Impactor (NGI; USP41, Capítulo <601>). Para las mediciones de aerosol realizadas en estos ejemplos, se dispersó una cápsula de HPMC de tamaño 3 que contenía la formulación de polvo secado por aspersión desde el dispositivo inhalador en polvo seco y se administró al NGI bajo un vacío a 60 L/min según la metodología USP. Se recuperaron muestras de cada etapa del NGI y se analizó el contenido de proteínas mediante absorción UV a 280 nm. Los principales parámetros de rendimiento del aerosol calculados a partir de estas mediciones fueron a) Fracción de partículas finas < 5 µm (FPF < 5 µm), definida como la fracción de polvo emitida por el dispositivo que se mide para ser < 5 µm de diámetro de partículas aerodinámicas; y b) diámetro aerodinámico de masa media MMAD.

Tabla 12: Caracterización de aerosoles

Análisis / Salida DOE	Instrumento/Técnica utilizada
Diámetro aerodinámico de masa media (MMAD)	NGI
% de deposición del dispositivo	NGI
% FPF < 5µm	NGI

Los resultados del análisis de aerosol se resumen en la Tabla 13.

Tabla 13: Resultados de la caracterización de aerosoles

Análisis / Salida DOE	Impacto
MMAD (diámetro aerodinámico de masa media)	Fuerte correlación negativa con trileucina. Se logró un intervalo de valores de MMAD de 1,75 a 3,25 μm (FIG. 12).
% de Deposición del dispositivo	Correlación negativa con trileucina en etapas. En general, un % en peso de trileucina sobre 3 % tuvo como resultado una reducción en la deposición del dispositivo (FIG. 13).
% de FPF (fracción de partículas finas) < 5 μm	Correlación positiva con trileucina Correlación negativa con trileucina. Todas las 20 formulaciones probadas tenían FPF de >60 %, indicando un buen rendimiento (FIG. 14).

Ejemplo 8 – Generación de formulaciones de leucina/trileucina inhalables que comprenden un fragmento de unión de anticuerpo anti-TSLP (Fab)

Se probaron las características de otra formulación que comprende un Fab diferente. Se usó un Fab anti-TSLP, derivado de un anticuerpo monoclonal IgG1 humano que se une específicamente a TSLP (linfopoyetina estromal tímica) (véanse las secuencias establecidas en las SEQ ID NOS: 1-8 proporcionadas en este documento). Se generaron formulaciones distintas que comprendían las concentraciones en masa indicadas en la Tabla 14.

Tabla 14: Composiciones de formulaciones secadas por atomización que contienen Fab anti-TSLP

Formulación	Fab anti-TSLP [% p/p]	Trehalosa [% p/p]	Leucina [% p/p]	Trileucina [% p/p]	Citrato, pH 6,0 [% p/p]
n.º 1	1	78	10,5	2	8,5
n.º 2	12	67	10,5	2	8,5
n.º 3	40	39	10,5	2	8,5

El Fab anti-TSLP se recibió inicialmente en un amortiguador líquido que comprendía trehalosa 105 mM, citrato 30 mM, pH 6,0. La leucina, la trileucina, la trehalosa y el citrato se disolvieron en una solución acuosa separada, que luego se agregó a la solución Fab anti-TSLP para crear soluciones de materia prima líquida a granel para el secado por atomización. La Tabla 15 resume las composiciones de materia prima preparadas para lograr las composiciones de formulación de polvo objetivo. Las soluciones de materia prima líquida luego se secaron por aspersión, utilizando los parámetros de proceso enumerados

en la Tabla 16. Los parámetros se seleccionaron para lograr las propiedades objetivo de partículas y aerosoles para una formulación en polvo seco destinada a la inhalación.

Tabla 15 Composiciones de materias primas líquidas para secado por aspersión

	Formulación n.º 1	Formulación n.º 2	Formulación n.º 3
Fab anti-TSLP [mg/mL]	0,75	9,0	24
trehalosa [mg/mL]	58,5	50,3	23,4
leucina [mg/mL]	7,9	7,9	6,3
Trileucina [mg/mL]	1,5	1,5	1,2
Citrato, pH 6,0 [mg/mL]	6,4	6,4	5,1
Concentración total de materia prima [mg/mL]	75	75	60

Tabla 16: Parámetros clave del proceso de secado por aspersión

	Formulación n.º 1	Formulación n.º 2	Formulación n.º 3
Temperatura de salida (°C)	70	70	70
Tasa de alimentación de materia prima (mL/min)	20	17	3
Flujo de gas del atomizador (kg/h)	13	13	2,1
Flujo de gas de secado (kg/hr)	155	155	59,5

Los resultados de la caracterización del desempeño en polvo y aerosol de las formulaciones secadas por aspersión se resumen en la Tabla 17. Para las mediciones del rendimiento del aerosol, las tres formulaciones se probaron con 20 mg de polvo secado por aspersión cargados en una cápsula de HPMC de tamaño 3 y dispersados desde un dispositivo inhalador en polvo seco.

Tabla 17 Propiedades de polvo y aerosol de formulaciones que contienen Fab anti-TSLP secado por aspersión

	Formulación n.º 1 1 % p/p de Fab anti-TSLP	Formulación n.º 2 12 % de p/p de Fab anti-TSLP	Formulación n.º 3 40 % de p/p de Fab anti-TSLP
oVMD [µm] (n=2)	1,5 (d50) 3,5 (d90)	1,5 (d50) 3,5 (d90)	1,9 (d50) 4,1 (d90)

cBD [g/cm ³]	0,72	0,70	0,58
SSA [m ² /g]	3,5	4,12	4,6
FPM _{<5μm} [mg Fab ₁] (n=3)	0,17	1,9	5,9
FPF _{<5 μm} [%] (n=3)	95,1	94,3	85,4
MMAD (n=3)	2,3	2,2	2,7

De particular interés es el éxito en el llenado de 50 mg de Formulación n.º 3 en una sola cápsula de HPMC de tamaño 3, atribuible a la alta densidad aparente del polvo. La alta densidad aparente (cBD) permitió la entrega de una carga útil muy alta desde una sola cápsula (FPM < 5 μm de aproximadamente 14 mg, FPF de 82 %, MMAD de 2,4 μm).

Además, la Formulación n.º 3, exhibe un cBD similar (0,58 g/cm³) y SSA (4,6 m²/g) a la de la formulación Fab anti-IL-4 n.º 2 (CBD = 0,59 g/cm³, SSA = 4,5 m²/g), lo que sugiere que las propiedades del polvo se traducen entre formulaciones farmacéuticas que comprenden diferentes ingredientes activos.

EJEMPLO 9 - PROPIEDADES DEL POLVO Y AEROSOL DE FORMULACIONES ANTI-TSLP SECADAS POR ASPERSIÓN EN TRES TAMAÑOS DE LOTE

Este ejemplo proporciona un análisis de las propiedades del polvo y del aerosol de las formulaciones de leucina/trileucina con Fab anti-TSLP que utilizan tamaños de lote más grandes para permitir estudios de toxicología por inhalación no GLP y GLP. El escalado requiere el uso de equipos de secado por aspersión a escala alternativa y ajustes a los parámetros del proceso de secado por aspersión, para tener en cuenta el aumento de calor y el flujo másico a través del sistema y la necesidad de ciclos de procesamiento prolongados.

Se fabricaron tres lotes de formulaciones Fab anti-TSLP secadas por pulverización en tamaños de lotes crecientes. Los lotes comprendían: anti-TSLP Fab al 40 % p/p, trehalosa al 39 % p/p, leucina al 10,5 % p/p, trileucina al 2 % p/p, y citrato pH 6,0 al 8,5 % p/p. Los parámetros de proceso seleccionados para cada lote se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18 Parámetros del proceso del secador por atomización para tres lotes de formulación Fab anti-TSLP de tamaño de lote creciente

	Lote n.º 1	Lote n.º 2	Lote n.º 3
Concentración de materia prima [mg/mL]	60	75	75
Temperatura de salida (°C)	70	70	70
Tasa de alimentación de	3	5	12

materia prima (mL/min)			
Flujo de gas del atomizador (kg/h)	2,1	2,1	13,3
Flujo de gas de secado (kg/hr)	59,5	59,5	155
Tamaño total del lote*	8,5 g	348 g	1,2 kg
Secador por atomización	A escala de laboratorio	A escala de laboratorio	Escala intermedia
Días/horas de producción	1 día / 1,1h	2 días / 15,9 horas	2 días / 22,4 horas

*Peso del polvo procesado

Prueba de rendimiento de aerosol de lote n.º 1 se realizó con una masa de relleno de polvo de 50 mg en una cápsula HPMC de tamaño 3, mientras que los lotes n.º 2 y n.º 3 se ensayaron con una masa de relleno de 20 mg. Si bien hay un ligero aumento en el oVMD a medida que el tamaño del lote aumentó de 8,5 g a 1,2 kg, se logró una densidad de polvo a granel comprimido (cBD) de entre 0,45 y 0,85 g/cm³. El rendimiento del aerosol de los polvos también se mantuvo independientemente del tamaño del lote, con una alta carga útil de Fab anti-TSLP desde el dispositivo inhalador basado en cápsulas. El demuestra la escalabilidad de la formulación con ajustes mínimos en el proceso de secado por aspersión. Los resultados completos de la caracterización del polvo y las pruebas de rendimiento del aerosol se resumen en la Tabla 19.

Tabla 19 Propiedades del polvo y rendimiento del aerosol para tres lotes Fab anti-TSLP de tamaño de lote creciente

	Lote n.º 1	Lote n.º 2	Lote n.º 3
oVMD [µm] (n=2)	1,5 (d50) 3,2 (d90)	1,7 (d50) 3,8 (d90)	1,9 (d50) 4,1 (d90)
CBD [g/cm ³]			0,58
SSA [m ² /g]			4,6
FPM _{<5µm} [mg anti-TSLP Fab] (n=3)	14,3	5,6	5,9
FPF _{<5µm} [%] (n=3)	81,9	83,4	85,4
MMAD [µm] (n=3)	2,4	2,4	2,7

Ejemplo 10 Caracterización adicional de formulaciones de leucina/trileucina que comprenden un tensioactivo.

Se generaron lotes adicionales de formulaciones de trileucina/leucina que comprendían cantidades variables de PS-80. Las composiciones de formulación y los parámetros de proceso para la generación de cada lote se muestran en la Tabla 20. Por lo demás, la generación de la formulación fue como se describe en el ejemplo 6.

Tabla 20: Composiciones de formulación y parámetros del proceso de secado por aspersión para formulaciones que comprenden cantidades crecientes de PS-80

Descripción	40% FAB ₁ , control (sin PS80)			40% FAB ₁ , 0.27% p/p de PS80 (0.02% p/v de PS80)			40% FAB ₁ , 0.67% p/p de PS80 (0.05% p/v de PS80)			40% FAB ₁ , 1.33% p/p de PS80 (0.10% p/v de PS80)			40% FAB ₁ , 2.00% p/p de PS80 (0.15% p/v de PS80)			40% FAB ₁ , 2.67% p/p de PS80 (0.20% p/v de PS80)		
	% p/p	mg/ml		% p/p	mg/ml		% p/p	mg/ml		% p/p	mg/ml		% p/p	mg/ml		% p/p	mg/ml	
Composición FAB ₁	40.00	29.60		40.00	29.60		40.00	29.60		40.00	29.60		40.00	29.60		40.00	29.60	
Citrato trisódico anhidro	7.75	5.74		7.75	5.74		7.75	5.81		7.75	5.81		7.75	5.81		7.75	5.66	
Ácido cítrico anhidro	0.75	0.56		0.75	0.56		0.75	0.56		0.75	0.56		0.75	0.56		0.75	0.55	
Trehalosa anhidra	39.00	28.86		38.73	28.66		38.34	28.75		37.67	28.26		37.02	27.76		36.29	26.49	
Trileucina	2.00	1.48		2.00	1.48		2.00	1.50		2.00	1.50		2.00	1.50		2.00	1.46	
Leucina	10.50	7.77		10.50	7.77		10.50	7.88		10.50	7.88		10.50	7.88		10.50	7.67	
PS80	0.00	0.00		0.27	0.20		0.66	0.50		1.33	0.99		1.98	1.49		2.71	1.98	
Gas de secado (slpm)	850			850			850			850			850			850		
Tasa de alimentación de líquido (ml/min)	5			5			5			5			5			5		
Atomizador (slpm)	30			30			30			30			30			30		
Temp de entrada (°C)	100			100			100			100			100			100		
Temp de salida (°C)	70			70			70			70			70			70		
GLR	7			7			7			7			7			7		
Tiempo de ejecución (hr)	0.68			0.27			0.67			0.67			0.67			0.68		

Las propiedades de aerosol de las formulaciones de la Tabla 20 se analizaron usando los métodos descritos en el Ejemplo 7. Los resultados del análisis se muestran en la Tabla 21.

Tabla 21: Desempeño en aerosol de formulaciones que comprenden PS-80

Descripción	%FPF ($<5,0\mu\text{m}$)	FPM ($<5,0\mu\text{m}$) (mg)	MMAD (μm)
40 % de FAB ₁ , control	78	5,5	2,55
40 % de FAB ₁ , 0,27 % p/p PS80	77	5,9	2,56
40 % de FAB ₁ , 0,67 % p/p PS80	70	4,4	2,68
40 % de FAB ₁ , 1,33 % p/p PS80	75	4,5	2,7
40 % de FAB ₁ , 2,00 % p/p PS80	82	4,2	2,27
40 % de FAB ₁ , 2,67 % p/p PS80	68	4,0	2,63

También se midieron el contenido de agregados, oVMD, contenido de humedad residual, Tg, cBD y SSA utilizando los métodos descritos en los ejemplos anteriores. Los resultados del análisis de las propiedades del polvo se muestran en la Tabla 22.

Tabla 22: Propiedades del polvo de formulaciones en polvo seco que comprenden FAB₁ y variantes (p/p) cantidades de PS-80.

% p/p de ps80		0 %	0,27 %	0,67 %	1,33 %	2,00 %	2,67 %
HP-SEC	% MPP	99,3	99,3	99,5	99,5	99,5	99,4
	% de Ag	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1
oVMD	d10 (μm)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	d50 (μm)	1,8	1,8	1,8	1,7	1,2	1,5
	d90 (μm)	4	3,9	4,0	3,9	2,9	4,6
	Lapso	1,9	1,9	2,0	2,0	2,1	2,7
Humedad residual (%)		1,6	1,6	1,7	1,9	1,9	0,4
Tg	Abierto (°C)	123	124	121	121	121	124
	Cerrado (°C)	99	98	96	95	96	115
cBD (g/cm ³)		0,58	0,60	0,59	0,59	nm*	0,55
SSA (m ² /g)		4,60	5,02	4,37	4,05	nm	4,24

*nm – no medido

El análisis muestra que las propiedades del polvo son, en gran medida, equivalentes a las de la formulación de control, independientemente del % (p/p) cantidad de PS-80.

A continuación, se analizó el contenido de partículas subvisibles (SVP) de las formulaciones

descritas en la Tabla 22. Los recuentos de partículas subvisibles (SVP) se midieron utilizando la tecnología de imagenología de microflujo (MFI). La MFI combina microscopía de flujo microfluídica y un análisis de partículas de imagenología de alta resolución para cuantificar los conteos de SVP y agrupar estos conteos a través de un intervalo de tamaño de partícula. Antes de la prueba, las muestras de polvo se disolvieron en agua y se agitaron suavemente para garantizar una distribución uniforme de las partículas, luego se cargaron en Protein Simple MFI 5200 (CA, EUA). Los resultados se informaron como recuentos para diferentes tamaños de partículas ($\leq 1 \mu\text{m}$, $\leq 2 \mu\text{m}$, $\leq 5 \mu\text{m}$, $\leq 10 \mu\text{m}$ y $\leq 25 \mu\text{m}$) por ml. La FIG. 14A muestra que la inclusión de 0,27 % (p/p) PS-80 en la formulación en polvo seco reduce el número absoluto de SVP por ml en la reconstitución. La reducción en los recuentos de SVP disminuye al aumentar la concentración de PS-80. Se observaron disminuciones significativas en SVP al agregar 0,67 % (p/p) PS-80, con una cantidad insignificante de SVP con un diámetro de partícula superior a $5 \mu\text{m}$. La tendencia se observó cuando la formulación se reconstituyó a una concentración de 30 mg/ml FAB₁ o 2,5 mg/ml FAB₁ (FIG. 14B).

La caracterización de la formulación y el análisis de las SVP se llevaron a cabo como se describe anteriormente para una segunda formulación que contenía excipientes. En este estudio, se utilizó como excipiente poloxámero 188, a diferencia de PS-80.

Se examinaron cantidades de múltiples % p/p poloxámero 188. Las composiciones de formulación y los parámetros de proceso para la generación de cada lote de formulación fueron como se describe en la Tabla 20 para formulaciones que contienen PS-80. Se modificó la cantidad de trehalosa para compensar la cantidad variable de poloxámero 188.

También se midieron el contenido de agregados, oVMD, contenido de humedad residual, Tg, CBD y SSA utilizando los métodos descritos en los ejemplos anteriores. Los resultados del análisis de las propiedades del polvo se muestran en la Tabla 23.

Tabla 23: Propiedades del polvo de formulaciones en polvo seco que comprenden FAB₁ y variantes (p/p) cantidades de poloxámero-188.

% p/p P-188		0	0,67 %	1 %	1,67 %	2,67 %	10 %
HP- SEC	% MPP	99,3	99,5	99,3	99,5	99,5	99,3
	% de Ag	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
oVMD	d10 (μm)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	d50 (μm)	1,8	1,9	1,8	1,8	1,7	1,8
	d90 (μm)	4,0	4,2	3,9	4,2	4,1	4,3
	Lapso	1,9	2,0	1,9	2,1	2,1	2,1
Humedad residual (%)		1,6	1,3	1,9	1,2	1,2	1,5

T _g	Abierto (°C)	123	122	121	123	123	122
	Cerrado (°C)	99	102	94	103	103	98
cBD (g/cm ³)		0,58	0,60	0,57	0,67	0,75	Nm*
SSA (m ² /g)		4,60	Nm	4,71	Nm	4,45	nm

*nm – no medido

Las propiedades de aerosol de las formulaciones de poloxámero-188 también se analizaron usando los métodos descritos en el Ejemplo 7. Los resultados del análisis se muestran en la Tabla 24.

Tabla 24: Desempeño en aerosol de formulaciones que comprenden Poloxámero-188 (P188)

Descripción	%FPF (<5,0um)	FPM (<5,0um) (mg)	MMAD (um)
40 % de FAB ₁ , control	78	5,5	2,55
40 % de FAB ₁ , 0,67 % p/p P188	67	4,5	2,61
40 % de FAB ₁ , 1 % p/p P188	86	5,4	2,82
40 % de FAB ₁ , 1,67 % p/p P188	66	4,2	2,76
40 % de FAB ₁ , 2,67 % p/p P188	70	4,6	2,91
40 % de FAB ₁ , 10 % p/p P188	56	3,0	3,41

Se analizó el contenido de SVP de las formulaciones de P188 utilizando los métodos descritos anteriormente. La FIG 15A muestra que la inclusión de 0,67 % (p/p) P188 en la formulación en polvo seco reduce el número absoluto de SVP por ml en la reconstitución. La tendencia se observó cuando la formulación se reconstituyó a una concentración de 30 mg/ml FAB₁ (FIG. 15A) o 2,5 mg/ml FAB₁ (FIG. 15B).

Ejemplo 11 Caracterización adicional de formulaciones de leucina/trileucina que comprenden 1,1 % (p/p) de PS-80.

En este ejemplo, las propiedades del polvo de una formulación en polvo seco que comprende 1 % o 40 % (p/p) de Fab₁ y 1,1 % (p/p) de PS-80 fueron analizados. Las composiciones de formulación completas se muestran en la Tabla 25. Las formulaciones se fabricaron como se describe en el Ejemplo 6.

Tabla 25: Cantidades en peso de excipientes en formulaciones en polvo seco que comprenden 1,1 % (p/p) de PS-80 y 40 % (p/p) o 1 % (p/p) de Fab₁.

	Fab ₁ 40 % (p/p)	Fab ₁ 1% (p/p)
--	-----------------------------	---------------------------

Trileucina	2	2
Leucina	10,5	10,5
Trehalosa	37,9	76,9
Amortiguador de citrato	8,5	8,5

La estabilidad de las formulaciones se analizó después del almacenamiento durante uno o tres meses a 40 °C y 75 % de humedad relativa (40/75) o 25 °C y 60 % de humedad relativa (25/60). Se probaron las distribuciones de tamaño de partículas, el contenido de humedad y la rugosidad de la superficie. Las Figuras 16A y B muestran que el contenido de humedad y las distribuciones de tamaño de partícula permanecieron estables a lo largo del tiempo para formulaciones que contenían 40 % (p/p) de Fab₁. La Figura C muestra que la morfología de las partículas se mantiene constante a lo largo del tiempo. Las Figuras 17A y 17B muestran que el contenido de humedad y las distribuciones de tamaño de partícula permanecieron estables a lo largo del tiempo para formulaciones que contenían 1 % (p/p) de Fab₁. La Figura 17C muestra que la morfología de las partículas se mantiene constante a lo largo del tiempo.

La formación de SVP en la reconstitución después del almacenamiento en 40/75 durante 1 o 3 meses, o 25/60 durante 3 meses se analizó. El análisis se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 8. La Figura 18A muestra que, tras la reconstitución de la formulación de 40 % (p/p) de Fab₁ a una concentración de Fab₁ de 30 mg/ml, la cantidad de SVP que se forma bajo cada condición no cambia. La Figura 18B muestra que, tras la reconstitución de formulación de 1 % (p/p) de Fab₁ a una concentración de Fab₁ de 0,75 mg/ml, la cantidad de SVP que se forma bajo cada condición no cambia.

Las características del aerosol también se probaron después del almacenamiento. Los resultados se muestran en la Tabla 26 y 27.

Tabla 26: Rendimiento de aerosol de formulaciones que comprenden 40 % (p/p) de Fab₁ y 1,1 % (p/p) de PS-80 inmediatamente después de la fabricación y después del almacenamiento durante 1 o 3 meses a 40/75 o 3 meses en 25/60.

	T = 0	1m 40/75	3m 40/75	3m 25/60
% FPF (<5um)	81	87	77	78
FPM (<5um)	5,2	5,1	4,7	5,1

(mg)				
MMAD (μm)	2,97	2,77	3,20	3,16
DD (%)	85	87	82	84

Tabla 27: Rendimiento de aerosol de formulaciones que comprenden 1 % (p/p) de Fab₁ y 1,1 % (p/p) de PS-80 inmediatamente después de la fabricación y después del almacenamiento durante 1 o 3 meses a 40/75 o 3 meses en 25/60.

	T = 0	1m 40/75	3m 40/75	3m 25/60
% FPF ($<5\mu\text{m}$)	79	79	73	73
FPM ($<5\mu\text{m}$) (mg)	0,12	0,11	0,11	0,1
MMAD (μm)	3,11	3,05	3,24	3,27
DD (%)	77	83	81	78

El porcentaje de dosis administrada (DD) también se caracterizó después del almacenamiento de cada formulación en cada condición. Los resultados se muestran en la Tabla 26 y 27.

La potencia de Fab₁ en cada una de las formulaciones descritas en la Tabla 25 también se evaluó después del almacenamiento a 40/75 durante 1 o 3 meses, o 25/60 durante 3 meses. La potencia se determinó usando fluorescencia homogénea resuelta en el tiempo (HTRF). HTRF combina la tecnología de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) con mediciones resueltas en el tiempo (TR). Cuando dos fluoróforos, un donante y un aceptor, están muy cerca uno del otro, la excitación del donante provoca una transferencia de energía al aceptor, creando así una señal FRET. En este ensayo, el criptato de estreptavidina-europio, unido a TSLP humano biotinilado, es el donante y un mAb anti-TSLP marcado con d2 es el aceptor. FAB₁ se une al TSLP humano y evita la unión del mAb marcado. Esto, a su vez, aumenta la distancia entre los fluoróforos donante y aceptor y tiene como resultado una disminución de la señal FRET.

Después de evaluar el paralelismo entre el estándar de referencia y el control del ensayo o entre el estándar de referencia y las muestras de prueba, se realiza un ajuste de curva

logística de cuatro parámetros (4PL) restringido y las potencias relativas del control del ensayo FAB₁ y las muestras de prueba se calculan dividiendo el valor IC₅₀ de el estándar de referencia por el valor IC₅₀ del control de ensayo o cada muestra de prueba y multiplicando por 100 %.

Los niveles de potencia de Fab₁ estaban entre el 85 y el 110 % de la potencia de Fab₁ inmediatamente reconstituido (es decir, t=0) de la formulación equivalente.

Referencias:

Darling RJ, Brault PA. Assay and Drug Development Technologies. 2004;2:647-657

Gauvreau GM, O'Byrne PM, Boulet LP, et al. N Engl J Med 2014;370:2102-10

Tepper, JS, et al Int J Toxicol 2016;35: 376-92

Rennard, SI, et al J Appl Physiol 1986;60:532-538

Será evidente para un experto en las técnicas pertinentes que se pueden realizar otras modificaciones y adaptaciones adecuadas a los métodos y aplicaciones descritos en el presente documento sin apartarse del alcance de ninguna de las modalidades. Los ejemplos a continuación se incluyen en la presente con fines ilustrativos solamente y no pretenden ser limitantes.

Debe entenderse que si bien se han ilustrado y descrito ciertas realizaciones en este documento, las reivindicaciones no deben limitarse a las formas o disposiciones específicas de las piezas descritas y mostradas. En la memoria descriptiva, se han descrito realizaciones ilustrativas y, aunque se emplean términos específicos, se utilizan únicamente en un sentido genérico y descriptivo y no con fines limitativos. Las modificaciones y variaciones de las modalidades son posibles en virtud de las instrucciones anteriores. Por lo tanto, debe entenderse que las modalidades pueden ponerse en práctica de una forma diferente a la descrita específicamente.

Aunque se describen anteriormente varias modalidades, debe entenderse que se presentan solamente como ilustraciones y ejemplos de la presente tecnología, y no son de ningún modo limitantes. Será evidente para los expertos en la técnica relevante que pueden realizarse varios cambios en la forma y detalles en la presente sin apartarse del espíritu y alcance de la presente tecnología. Por lo tanto, la extensión y el alcance de la presente tecnología no deberían verse limitados por ninguna de las modalidades anteriormente descritas, sino que deberían definirse únicamente de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes. También se entenderá que cada característica de cada realización discutida en este documento, y de cada referencia citada en este documento, puede usarse en combinación con las características de cualquier otra modalidad. Todas las patentes y publicaciones tratadas en la presente se incorporan mediante referencia a la presente en su totalidad.