

COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA FABRICAR MICROPARTÍCULAS DE PROTEÍNA**CAMPO**

[0001] La invención en general se refiere a composiciones y métodos
5 para formular proteínas estables en un período de tiempo
prolongado. La invención se refiere específicamente a las
composiciones y métodos para elaborar formulaciones de proteína
terapéutica que se mantengan estables y activas biológicamente a
temperaturas ambiente y fisiológicas durante un período de tiempo
10 prolongado.

ANTECEDENTES

[0002] Las macromoléculas terapéuticas, tales como anticuerpos y
proteínas de fusión Fc receptor, deben formularse en una manera que
15 no solamente convierte las moléculas adecuadas para la
administración a pacientes, pero también mantiene su estabilidad
durante el almacenamiento y mientras en el sitio de administración.
Por ejemplo, las proteínas terapéuticas (por ejemplo, anticuerpos)
en solución líquida son propensas a la degradación, agregación y/o
20 modificaciones químicas no deseadas salvo que la solución se
formule adecuadamente. También deben tenerse en cuenta otras
consideraciones además de la estabilidad cuando se prepara una
formulación de proteína terapéutica. Los ejemplos de dichas
consideraciones adicionales incluyen la viscosidad de la solución y
25 la concentración del anticuerpo que puede ajustarse mediante una
formulación determinada. Cuando se formula una proteína terapéutica
con liberación prolongada, se debe prestar especial atención para
lograr una formulación que se mantenga estable en el transcurso del
tiempo y a temperatura fisiológica y de almacenamiento, que
30 contenga una concentración adecuada del anticuerpo u otro agente
biológico terapéutico y posea otras propiedades que permitan que la

formulación se administre de forma conveniente a los pacientes.

[0003] Las formulaciones líquidas de las moléculas biológicas se diseñan en general para proporcionar una estabilidad a largo plazo cuando se congelan o refrigeran, pero a menudo fallan en proporcionar una estabilidad a largo plazo a temperatura ambiente. Una solución conocida en la técnica para conservar la estabilidad y la actividad terapéutica/biológica de una molécula biológica es la criodesecación o, de otro modo, la liofilización de la molécula. La liofilización puede proporcionar una "torta" seca que se mantenga relativamente estable a temperatura ambiente durante un período de tiempo relativamente largo. La estabilidad de la temperatura ambiente puede ser especialmente importante en el almacenamiento y distribución de agentes bioterapéuticos alrededor del mundo, especialmente en los lugares en donde la electricidad y refrigeración no están garantizadas.

[0004] Otro problema emergente en las técnicas de la formulación farmacéutica es la necesidad de un aumento de concentraciones de la proteína terapéutica para facilitar el suministro de grandes cantidades de fármaco en una pequeña cantidad de espacio. El problema de maximizar la cantidad de fármaco de proteína por volumen de unidad se ve exacerbado por la necesidad recíproca de reducir la cantidad de excipientes que ayude a estabilizar la proteína. A medida que la relación molar del fármaco de proteína y estabilizador aumenta, la cantidad de proteína se maximiza con el riesgo de desestabilizar la proteína.

[0005] La publicación de la solicitud de patente estadounidense n.º 2016/0176986 A1 describe una formulación de IgG1 de alta concentración (≥ 200 mg/mL) en un solvente no acuoso. Esa formulación contiene partículas de IgG1 secadas por aspersión suspendidas en una solución no acuosa diseñada para el suministro subcutáneo. Las partículas secadas por aspersión contienen

trehalosa como estabilizante y la molécula IgG1 en una relación de peso a peso de 1:2.

[0006] Shire et ál. (J. Pharm. Sci., vol 93, n.º 6, junio 2004, 1390-1402) describen la elaboración de formulaciones de proteína de alta concentración mediante liofilización. Shire describe la relación molar óptima de lioprotector y proteína como 300:1 o mayor. Una formulación de anticuerpo con una relación molar de 500:1 de lioprotector y anticuerpo se describió como con estabilidad significativa a temperatura ambiente, pero sin hipertonicidad no deseada. Ese mismo anticuerpo formulado con un lioprotector inferior (250:1 lioprotector y anticuerpo por mol) mostró una tonicidad mejorada y útil, pero con una estabilidad mucho más reducida. La formulación de compromiso 250:1 requiere almacenamiento a 2-8 °C para mantener una estabilidad razonable.

[0007] Ajmera y Scherliesz (Int. J. Pharm., vol. 463, 2014, 98-107) describen el uso de aminoácidos densos en nitrógeno, arginina e histidina, para estabilizar la catalasa durante el secado por aspersión. El efecto estabilizante se atribuyó a la unión de hidrógeno mediada por nitrógeno. La relación de peso a peso del aminoácido y catalasa para la estabilización eficaz fue 1:1 o 2:1.

COMPENDIO

[0008] En un aspecto, la invención proporciona un método para fabricar un polvo farmacéutico formulado. De acuerdo con este aspecto, se rocía una solución acuosa que contiene un estabilizante térmico y una glicoproteína con una relación de masa de 1:5-2:5 o entre estos. Luego se aplica calor a la solución acuosa rociada para evaporar el agua de las gotas en aerosol y formar un polvo de proteína. En una modalidad, las partículas individuales que comprenden el polvo de proteína se recubren posteriormente con un polímero biodegradable.

[0009] En un aspecto, la invención proporciona un método para fabricar un polvo farmacéutico formulado. De acuerdo con este aspecto, se rocía una solución acuosa que contiene un estabilizante térmico y una glicoproteína con una relación molar menor que 300:1. Luego se aplica calor a la solución acuosa rociada para evaporar el agua de las gotas en aerosol y formar un polvo de proteína. En una modalidad, las partículas individuales que comprenden el polvo de proteína se recubren posteriormente con un polímero biodegradable.

[00010] En un aspecto, la invención proporciona un método para fabricar un polvo farmacéutico formulado. De acuerdo con este aspecto, se rocía una solución acuosa que contiene una glicoproteína sin un estabilizante térmico. Luego se aplica calor a la solución acuosa rociada para evaporar el agua de las gotas en aerosol y formar un polvo de proteína. En una modalidad, las partículas individuales que comprenden el polvo de proteína se recubren posteriormente con un polímero biodegradable.

[00011] En un aspecto, la invención proporciona un polvo farmacéutico formulado que contiene alrededor de 60 %-97 % (p/p) de una glicoproteína y alrededor de 3 %-40 % (p/p) de un estabilizante térmico. De acuerdo con este aspecto, el polvo farmacéutico formulado no está completamente seco y el porcentaje de cambio en la cantidad de la especie con alto peso molecular de la glicoproteína es menor que 5 %. En una modalidad, las partículas de proteína individuales del polvo tienen un recubrimiento de polímero biodegradable.

FIGURAS

[00012] La Figura 1 es una gráfica de línea que representa la distribución de tamaño de las partículas en diámetro circular equivalente (ECD, por sus siglas en inglés) por volumen de partículas secadas por aspersion suspendidas en etanol, tal como se

mide mediante imagenología de microflujo (MFI, por sus siglas en inglés). Las partículas se secaron por aspersión a diferentes temperaturas de entrada: 100 °C (línea discontinua de puntos); 110 °C (línea discontinua); 120 °C (línea de puntos) y 130 °C (línea continua).

[00013] La Figura 2 es una gráfica de línea que representa la distribución de tamaño en diámetro circular equivalente (ECD) por volumen de partículas secadas por aspersión suspendidas en etanol, tal como se mide mediante imagenología de microflujo (MFI). La formulación previamente secada por aspersión contenía 0 % (línea discontinua de puntos), 0,03 % (línea discontinua) y 0,1 % (línea continua) p/v de polisorbato 20 (PS20).

[00014] La Figura 3 es un histograma que representa la cantidad de distribución de partículas secadas por aspersión en relación de aspecto suspendidas en etanol, tal como se mide mediante imagenología de microflujo (MFI). Una relación de aspecto igual a 1 representa una morfología esférica de la partícula. La formulación previamente secada por aspersión contenía 0 % (histograma relleno con puntos), 0,03 % (histograma relleno con líneas diagonales) y 0,1 % (histograma relleno completamente) p/v de polisorbato 20 (PS20).

[00015] La Figura 4 es un gráfico de línea que representa la distribución de tamaño en diámetro circular equivalente (ECD) por volumen de partículas secadas por aspersión suspendidas en etanol, tal como se mide mediante imagenología de microflujo (MFI). El proceso de soluto bajo (representado por la línea discontinua) utilizó alrededor de una concentración de soluto 10 veces menor que el proceso estándar (representado por la línea continua).

[00016] La Figura 5 es un gráfico de línea que representa la distribución de tamaño en diámetro circular equivalente (ECD) en volumen de partículas secadas por aspersión (micropartículas de

proteína sin recubrimiento de polímero; línea discontinua) y las partículas recubiertas por aspersión (micropartículas de proteína recubiertas con polímero, línea continua) tal como se mide mediante imagenología de microflujo (MFI).

5 [00017] La Figura 6, paneles A y B, son gráficas de punto que representan la velocidad de la formación de las especies con alto peso molecular (HMW, por sus sigas en inglés) en función de la raíz cuadrada del tiempo a 50 °C, tal como se mide mediante SEC-UPLC. Las velocidades se grafican de acuerdo con su relación de peso
10 estabilizante térmico:proteína (6A) y las relaciones molares (6B). Las formulaciones denotadas por los cuadrados rellenos completamente contienen únicamente sacarosa. Las formulaciones que contienen otros estabilizantes térmicos se representan únicamente por círculos abiertos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[00018] Si bien en la práctica o evaluación de la presente invención se puede utilizar cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente, a continuación se describen los
20 métodos y materiales preferidos.

[00019] Un problema emergente en la industria biofarmacéutica es el suministro de formulaciones de proteína estables a concentraciones lo suficientemente altas para permitir el suministro de una dosis eficaz en un pequeño volumen. Para ayudar a mantener la estabilidad
25 de la proteína, se incluyen diversos estabilizantes y otros excipientes en la formulación. Esto presenta un equilibrio entre la estabilidad de la proteína y la concentración de esta. La invención proporciona una formulación mejorada que contiene una proteína que se mantiene estable a una alta densidad. La cantidad de proteína estable suministrada por volumen de unidad se aumenta sin
30 sacrificar la estabilidad de la proteína.

[00020] En un aspecto, la invención proporciona un polvo farmacéutico formulado que contiene alrededor de 60 %-97 % (p/p) de una glicoproteína y alrededor de 3 %-40 % (p/p) de un estabilizante térmico. En otro aspecto, la invención proporciona un polvo farmacéutico formulado que contiene alrededor de 85 %-97 % (p/p) de una glicoproteína, sin un estabilizante térmico. En una modalidad de ese aspecto, el agua residual que resta en el polvo estabiliza la proteína.

[00021] En algunas modalidades, el polvo farmacéutico formulado contiene 60-70 % (p/p) de glicoproteína, 60-70 % (p/p) de glicoproteína, 65-75 % (p/p) de glicoproteína, 70-80 % (p/p) de glicoproteína, 75-85 % (p/p) de glicoproteína, 80-90 % (p/p) de glicoproteína, 85-95 % (p/p) de glicoproteína, alrededor de 60 % (p/p) de glicoproteína, alrededor de 62 % (p/p) de glicoproteína, alrededor de 64 % (p/p) de glicoproteína, alrededor de 66 % (p/p) de glicoproteína, alrededor de 68 % (p/p) de glicoproteína, alrededor de 70 % (p/p) de glicoproteína, alrededor de 72 % (p/p) de glicoproteína, alrededor de 74 % (p/p) de glicoproteína, alrededor de 76 % (p/p) de glicoproteína, alrededor de 78 % (p/p) de glicoproteína, alrededor de 80 % (p/p) de glicoproteína, alrededor de 82 % (p/p) de glicoproteína, alrededor de 84 % (p/p) de glicoproteína, alrededor de 86 % (p/p) de glicoproteína, alrededor de 88 % (p/p) de glicoproteína, alrededor de 90 % (p/p) de glicoproteína, alrededor de 92 % (p/p) de glicoproteína, alrededor de 94 % (p/p) de glicoproteína, alrededor de 96 % (p/p) de glicoproteína o alrededor de 98 % (p/p) de glicoproteína.

[00022] En algunas modalidades, el polvo farmacéutico formulado contiene 3-6 % (p/p) de estabilizante térmico, 5-7 % (p/p) de estabilizante térmico, 6-8 % (p/p) de estabilizante térmico, 7-9 % (p/p) de estabilizante térmico, 8-10 % (p/p) de estabilizante térmico, 9-11 % (p/p) de estabilizante térmico, 10-12 % (p/p) de

estabilizante térmico, 11-13 % (p/p) de estabilizante térmico, 12-14 % (p/p) de estabilizante térmico, 13-15 % (p/p) de estabilizante térmico, 14-16 % (p/p) de estabilizante térmico, 15-17 % (p/p) de estabilizante térmico, 16-18 % (p/p) de estabilizante térmico, 17-19 % (p/p) de estabilizante térmico, 18-20 % (p/p) de estabilizante térmico, 19-21 % (p/p) de estabilizante térmico, 20-22 % (p/p) de estabilizante térmico, 21-23 % (p/p) de estabilizante térmico, 22-24 % (p/p) de estabilizante térmico, 23-25 % (p/p) de estabilizante térmico, 24-26 % (p/p) de estabilizante térmico, 25-27 % (p/p) de estabilizante térmico, 22-24 % (p/p) de estabilizante térmico, 23-25 % (p/p) de estabilizante térmico, 24-26 % (p/p) de estabilizante térmico, 25-27 % (p/p) de estabilizante térmico, 22-24 % (p/p) de estabilizante térmico, 23-25 % (p/p) de estabilizante térmico, 24-26 % (p/p) de estabilizante térmico, 25-27 % (p/p) de estabilizante térmico, 26-28 % (p/p) de estabilizante térmico, 27-29 % (p/p) de estabilizante térmico, 28-30 % (p/p) de estabilizante térmico, 29-31 % (p/p) de estabilizante térmico, 30-32 % (p/p) de estabilizante térmico, 31-33 % (p/p) de estabilizante térmico, 32-34 % (p/p) de estabilizante térmico, 33-35 % (p/p) de estabilizante térmico, 34-36 % (p/p) de estabilizante térmico, 35-37 % (p/p) de estabilizante térmico, 36-38 % (p/p) de estabilizante térmico, 37-39 % (p/p) de estabilizante térmico, 38-40 % (p/p) de estabilizante térmico o 39-41 % (p/p) de estabilizante térmico.

[00023] En algunas modalidades, el polvo farmacéutico formulado de la invención contiene una población de partículas de proteína de escala micrométrica. Las partículas de proteína de escala micrométrica que constituyen el polvo pueden denominarse en la presente como "partículas que contienen proteína micronizadas", "partículas de proteína", "micropartículas de proteína", "micropartículas", "población de partículas que contienen proteína micronizadas", "problación de partículas de proteína", "población

de micropartículas de proteína", "población de micropartículas", "micropartículas de proteína que constituyen el polvo" o "micropartículas de proteína constituyentes".

[00024] En algunas modalidades, el polvo formulado objeto fluye libremente en condiciones de almacenamiento rutinarias y durante las operaciones de rellenado farmacéuticas. En algunas modalidades, el polvo objeto tiene una relación de Hausner (es decir, la relación de la densidad compactada del polvo con respecto a la densidad aparente del polvo) en condiciones de operación de relleno o condiciones de almacenamiento de $< 1,5$, $< 1,45$, $< 1,4$, $< 1,35$, $< 1,3$, $< 1,25$, $< 1,2$, $< 1,15$ o $< 1,1$.

[00025] En algunas modalidades, el método preferido para determinar la fluidez del polvo es mediante un ensayo en recipiente de volcado. Se rellena parcialmente un recipiente de vidrio transparente con el polvo farmacéutico formulado, luego el recipiente se rota en su eje vertical. Un polvo que puede volcarse libremente mientras se rota el recipiente puede fluir. En algunas modalidades, se considera que un polvo que tiene alguna cantidad de carga estática que provoca su adhesión a las paredes del recipiente o que requiera un pequeño golpe o remoción estática para que se vuelque durante la rotación del recipiente puede fluir. En algunas modalidades, el polvo puede fluir cuando 30% , $< 25\%$, $< 20\%$, $< 15\%$, $< 10\%$ o $< 5\%$ de la superficie interna del recipiente se cubre de polvo después de la rotación del recipiente. En algunas modalidades, el polvo puede fluir cuando las partículas constituyentes que se adhirieron a las paredes del recipiente después de la rotación se removieron de las paredes del recipiente cuando el recipiente se golpea en una superficie dura o con un dedo 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces o 10 veces. En algunas modalidades, el polvo puede fluir cuando las partículas constituyentes que se adhirieron a las

paredes del recipiente después de la rotación se remueven de las paredes del recipiente cuando este es golpeado con una fuerza acumulativa de ≤ 25 micronewtons (μN), alrededor de 25 μN , alrededor de 20 μN , alrededor de 15 μN , alrededor de 10 μN , alrededor de 9 μN , alrededor de 8 μN , alrededor de 7 μN , alrededor de 6 μN , alrededor de 5 μN , alrededor de 4 μN , alrededor de 3 μN , alrededor de 2 μN , alrededor de 1 μN o < 1 μN . En algunas modalidades, un polvo en el cual la gran mayoría de las partículas constituyentes se adhieren a las paredes de los recipientes debido a fuerzas estáticas y no se vuelca no puede fluir. En algunas modalidades, un polvo de referencia preferido que representa un polvo que puede fluir consiste en perlas de vidrio de 50-150 μm (estándar de control de calidad de Malvern, parte n.º CRM0016, producida por Whitehouse Scientific, Chester, Reino Unido).

[00026] En algunas modalidades, la fluidez del polvo se mide mediante el ángulo de reposo, la compresión (por ejemplo, relación de Hausner) el flujo en un tambor rotativo, el flujo a través de un orificio, el análisis de celda de corte, reometría o velocidad de dispensación. En algunas modalidades, la fluidez se mide con un analizador de polvo REVOLUTION (Mercury Scientific Inc., Newtown, CT), medidor de polvo EVOLUTION (Mercury), medidor de flujo de polvo VOLUTION (Mercury) o un medidor de fluidez FT 300 (Sotax AG, Aesch, CH). Rao et ál., European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, volumen 74, edición 2, febrero 2010, páginas 388-396, se incorpora a la presente para la determinación de la velocidad de flujo mediante rotación del tambor y avalancha.

[00027] En algunas modalidades, la fluidez se determina mediante el flujo a través de un orificio. En algunas modalidades, cuando la cantidad de polvo es limitada (por ejemplo, 1-2 gramos o menos), el flujo a través de orificio se lleva a cabo mediante la ruptura iterativa de estructuras de bóveda, seguido por el flujo del polvo

a través de un orificio (por ejemplo, 3 mm) y se mide el peso del polvo que pasa a través del orificio en función del tiempo. La velocidad de flujo se informa en miligramos por segundo. En algunas modalidades, el polvo farmacéutico formulado puede fluir cuando la velocidad de flujo a través de un orificio de 3 mm es ≥ 10 mg/s, ≥ 15 mg/s, ≥ 20 mg/s, ≥ 25 mg/s, ≥ 30 mg/s, ≥ 35 mg/s, ≥ 40 mg/s, ≥ 45 mg/s, ≥ 50 mg/s, ≥ 55 mg/s, ≥ 60 mg/s, ≥ 65 mg/s, ≥ 70 mg/s, ≥ 75 mg/s, ≥ 80 mg/s, ≥ 85 mg/s, ≥ 90 mg/s, ≥ 95 mg/s o ≥ 100 mg/s. Seppälä et ál., APPS PharmSciTech, Vol. 11, n.º 1, marzo 2010, páginas 402-408, se incorpora a la presente con respecto a la caracterización de la fluidez de la mezcla de fármaco/excipientes mediante la velocidad de flujo a través de un orificio.

[00028] La micropartícula de proteína componente del polvo farmacéutico formulado puede ser sustancialmente de forma esférica. Algunas micropartículas de proteína se acercan a la forma de esfera, mientras que otras micropartículas de proteína tienen una forma más irregular. La forma de las micropartículas de proteína puede determinarse mediante, entre otros, dispersión de luz estática (DLS, por sus siglas en inglés), imagenología de microflujo (MFI) o difracción láser. DLS se basa en la medición de la intensidad de luz dispersa en diversos ángulos diferentes que resultan de una luz intensa dirigida a una suspensión de partícula. Luego, se aplica la ecuación de Fraunhofer a los datos de dispersión para determinar el tamaño y la forma de las micropartículas de proteína. US 5,104,221 A se incorpora a la presente mediante referencia con respecto a la aplicación de la ecuación de Fraunhofer para determinar el tamaño y la forma de las partículas a escala micrométrica. DLS se aplica en general a objetos de 1 micrón o menores. MFI se basa en una serie de imágenes de campo brillante de partículas obtenidas a partir de una corriente de muestras que pasa a través de una célula de flujo. Las

imágenes se analizan para determinar el tamaño de la partícula y la relación de aspecto o circularidad. La circularidad se refiere a qué tan redonda o esférica es la micropartícula de proteína y se expresa en una escala de 0-1, en donde 1 es totalmente esférica. La expresión "relación de aspecto", que normalmente tiene la connotación de longitud por ancho de un objeto, se utiliza indistintamente con "circularidad". La relación de aspecto puede expresarse como la relación de la longitud del eje menor con la longitud del eje mayor. Por tanto, una partícula más esférica tiene una "relación de aspecto" menor que 1 (por ejemplo, 0,98).

[00029] La difracción láser es otro método basado en la difracción de Fraunhofer utilizado para determinar la forma y el tamaño de partícula en el intervalo 1-100 micrómetros. La luz con láser se pasa a través de la suspensión de partícula y un lente intermedio enfoca la luz difractada en un sensor. De Boer et ál., Int. J. Pharmaceutics, 249 (1-2): 219-231 (2002) se incorpora a la presente con respecto al dimensionamiento de partícula mediante difracción láser. En una modalidad, la distribución de tamaño de la micropartícula de proteína que constituye el polvo se determina mediante difracción láser con el uso de un analizador de tamaño de partícula láser Malvern Mastersizer 3000 (Malvern, Reino Unido).

[00030] En algunas modalidades, la forma de la micropartícula de proteína es aproximadamente esferoidal. En una modalidad, la relación de aspecto de la micropartícula de proteína es $\geq 0,80$. En otra modalidad, la relación de aspecto de la micropartícula de proteína es de alrededor de 0,90 a alrededor de 0,98. La forma de la micropartícula de proteína puede determinarse mediante, entre otros, imagenología de microflujo (MFI).

[00031] Tal como se usa en la presente, el término "diámetro" de una micropartícula de componente de polvo incluye el significado de cualquiera de los siguientes: (a) el diámetro de una esfera que

circunscribe la micropartícula, (b) el diámetro de la esfera más grande que se ajusta dentro de los límites de la micropartícula o el núcleo de proteína, (c) cualquier medida entre la esfera circunscrita de (a) y la esfera limitada de (b), lo que incluye la media entre ambos, (d) la longitud del eje más largo de la micropartícula, (e) la longitud del eje más corto de la micropartícula, (f) cualquier medida entre la longitud del eje largo (d) y la longitud del eje corto (e), lo que incluye la media entre ambos, y/o (g) el diámetro circular equivalente ("ECD"), tal como se determina mediante MFI, métodos de oscurecimiento de luz como DLS o similares. MFI y DLS se describen en términos generales en Sharma et ál., "Micro-flow imaging: flow microscopy applied to subvisible particulate analysis in protein formulations", 12(3) AAPS J. 455-64 (2010); y B. J. Frisken, "Revisiting the Method of Cumulants for the Analysis of Dynamic Light-Scattering Data," 40(24) Applied Optics 4087-91 (2001), que se incorporan a la presente con respecto a la imagenología de microflujo y la dispersión de luz dinámica. El diámetro se expresa en general en micrómetros (μm o micrón).

[00032] La micropartícula de proteína del polvo farmacéutico formulado objeto puede ser de forma aproximadamente esférica y tener un diámetro que varíe de 2 micrones a alrededor de 45 micrones. En una modalidad, la mayoría de las micropartículas de proteína del polvo tienen un diámetro menor que 10 micrones, tal como se determina mediante MFI. En algunas modalidades, el tamaño de la micropartícula de proteína del polvo farmacéutico formulado modo es 1-10 μm , 2-10 μm , 3-10 μm , 4-10 μm , 5-10 μm , 6-10 μm , 7-10 μm , 8-10 μm , 9-10 μm , 1-9 μm , 1-8 μm , 1-7 μm , 1-6 μm , 1-5 μm , 1-4 μm , 1-3 μm , 1-2 μm , 2-9 μm , 2-8 μm , 2-7 μm , 2-6 μm , 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 , alrededor de 5 μm , alrededor de 5,5 μm ,
alrededor de 6 μm , alrededor de 6,5 μm , alrededor de 7 μm ,
alrededor de 7,5 μm , alrededor de 8 μm , alrededor de 8,5 μm ,
alrededor de 9 μm , alrededor de 9,5 μm o alrededor de 10 μm .

5 [00033] En algunas modalidades, el diámetro de la micropartícula de
proteína es $< 50 \mu\text{m}$. En una modalidad, el diámetro de la
micropartícula de proteína es $< 12 \mu\text{m}$. En otra modalidad, el
diámetro de la micropartícula de proteína es $< 10 \mu\text{m}$. En aun otra
modalidad, el diámetro de la micropartícula de proteína es de
10 alrededor de 0,5 μm a alrededor de 7,0 μm . En una modalidad
específica, el diámetro de la micropartícula de proteína es
alrededor de 5,0 μm . En otra modalidad específica, el diámetro de
la micropartícula de proteína es alrededor de 2,5 μm . El diámetro
de las micropartículas de proteína puede determinarse mediante,
15 entre otros, MFI o dispersión de luz estática.

[00034] El diámetro de la micropartícula de proteína se correlaciona
positivamente con el volumen de la micropartícula de proteína. Por
ejemplo, una esfera perfecta de 10 micrones es aproximadamente 5×10^{-4}
nanolitros y una esfera perfecta de 5 micrones es
20 aproximadamente 7×10^{-5} nanolitros. En algunas modalidades, el
volumen de micropartícula de proteína del polvo farmacéutico
formulado modo es $5 \times 10^{-7} - 5 \times 10^{-4} \text{ nL}$, $10^{-6} - 5 \times 10^{-4} \text{ nL}$, $5 \times 10^{-6} - 5 \times 10^{-4}$
 nL , $10^{-5} - 5 \times 10^{-4} \text{ nL}$, $5 \times 10^{-5} - 5 \times 10^{-4} \text{ nL}$, $10^{-4} - 5 \times 10^{-4} \text{ nL}$, alrededor
de $5 \times 10^{-7} \text{ nL}$, alrededor de $6 \times 10^{-7} \text{ nL}$, alrededor de $7 \times 10^{-7} \text{ nL}$,
25 alrededor de $8 \times 10^{-7} \text{ nL}$, alrededor de $9 \times 10^{-7} \text{ nL}$, alrededor de 10^{-6} nL ,
alrededor de $2 \times 10^{-6} \text{ nL}$ o alrededor de $3 \times 10^{-6} \text{ nL}$, alrededor de 4×10^{-6}
 nL , alrededor de $5 \times 10^{-6} \text{ nL}$ o alrededor de $6 \times 10^{-6} \text{ nL}$, alrededor de
 $7 \times 10^{-6} \text{ nL}$, alrededor de $8 \times 10^{-6} \text{ nL}$ o alrededor de $9 \times 10^{-6} \text{ nL}$, alrededor
de 10^{-5} nL , alrededor de $2 \times 10^{-5} \text{ nL}$ o alrededor de $3 \times 10^{-5} \text{ nL}$,
30 alrededor de $4 \times 10^{-5} \text{ nL}$, alrededor de $5 \times 10^{-5} \text{ nL}$ o alrededor de 6×10^{-5}
 nL , alrededor de $7 \times 10^{-5} \text{ nL}$, alrededor de $8 \times 10^{-5} \text{ nL}$ o alrededor de

9×10^{-5} nL, alrededor de 10^{-4} nL, alrededor de 2×10^{-4} nL o alrededor de 3×10^{-4} nL, alrededor de 4×10^{-4} nL, alrededor de 5×10^{-4} nL o alrededor de 6×10^{-4} nL, alrededor de 7×10^{-4} nL, alrededor de 8×10^{-4} nL o alrededor de 9×10^{-4} nL, o 10^{-3} nL.

- 5 [00035] En una modalidad de la invención, el polvo farmacéutico formulado proporcionado está "completamente seco". Un polvo que está completamente seco puede contener hasta 3 % (p/p) de agua. En algunas modalidades, un polvo completamente seco contiene ≤ 3 % (p/p) de agua, $\leq 2,9$ % (p/p) de agua, $\leq 2,8$ % (p/p) de agua, $\leq 2,7$ % (p/p) de agua, $\leq 2,6$ % (p/p) de agua, $\leq 2,5$ % (p/p) de agua, $\leq 2,4$ % (p/p) de agua, $\leq 2,3$ % (p/p) de agua, $\leq 2,2$ % (p/p) de agua, $\leq 2,1$ % (p/p) de agua, $\leq 2,0$ % (p/p) de agua, $\leq 1,9$ % (p/p) de agua, $\leq 1,8$ % (p/p) de agua, $\leq 1,7$ % (p/p) de agua, $\leq 1,6$ % (p/p) de agua, $\leq 1,5$ % (p/p) de agua, $\leq 1,4$ % (p/p) de agua, $\leq 1,3$ % (p/p) de agua, $\leq 1,2$ % (p/p) de agua, $\leq 1,1$ % (p/p) de agua, $\leq 1,0$ % (p/p) de agua, $\leq 0,9$ % (p/p) de agua, $\leq 0,8$ % (p/p) de agua, $\leq 0,7$ % (p/p) de agua, $\leq 0,6$ % (p/p) de agua, $\leq 0,5$ % (p/p) de agua, $\leq 0,4$ % (p/p) de agua, $\leq 0,3$ % (p/p) de agua, $\leq 0,2$ % (p/p) de agua o $\leq 0,1$ % (p/p) de agua. En algunas modalidades, un polvo completamente seco contiene alrededor de 3 % (p/p) de agua, alrededor de 2,5 % (p/p) de agua, alrededor de 2 % (p/p) de agua, alrededor de 1,5 % (p/p) de agua, alrededor de 1 % (p/p) de agua, alrededor de 0,5 % (p/p) de agua o alrededor de 0 % (p/p) de agua. En algunas modalidades, un polvo completamente seco contiene 0 %-3 % (p/p) de agua, 0,05 %-3 % (p/p) de agua, 0,5 %-3 % (p/p) de agua, 1 %-3 % (p/p) de agua, 2 %-3 % (p/p) de agua, 0 %-2 % (p/p) de agua, 0,05 %-2 % (p/p) de agua, 0,5 %-2 % (p/p) de agua, 1 %-2 % (p/p) de agua, 0 %-1 % (p/p) de agua, 0,05 %-1 % (p/p) de agua o 0,5 %-1 % (p/p) de agua.
- 30 [00036] En otra modalidad, el polvo farmacéutico formulado proporcionado no está completamente seco. En algunas modalidades,

el polvo farmacéutico formulado proporcionado que no está completamente seco contiene como máximo 10 % (p/p) de agua. En algunas modalidades, el polvo farmacéutico formulado proporcionado que no está completamente seco contiene más de 3 % (p/p) de agua y

5 máximo 10 % (p/p) de agua, 3,5 %-10 % (p/p) de agua, 4 %-10 % (p/p) de agua, 4,5 %-10 % (p/p) de agua, 5 %-10 % (p/p) de agua, 5,5 %-10 % (p/p) de agua, 6 %-10 % (p/p) de agua, 6,5 %-10 % (p/p) de agua, 7 %-10 % (p/p) de agua, 7,5 %-10 % (p/p) de agua, 8 %-10 % (p/p) de agua, 8,5 %-10 % (p/p) de agua, 9 %-10 % (p/p) de agua,

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

[00037] En algunas modalidades, el polvo farmacéutico formulado proporcionado puede contener hasta 10 % (p/p) de agua. En algunas

25 modalidades, el polvo contiene ≤ 10 % (p/p) de agua, $\leq 9,5$ % (p/p) de agua, ≤ 9 % (p/p) de agua, $\leq 8,5$ % (p/p) de agua, ≤ 8 % (p/p) de agua, $\leq 7,5$ % (p/p) de agua, ≤ 7 % (p/p) de agua, $\leq 6,5$ % (p/p) de agua, ≤ 6 % (p/p) de agua, $\leq 5,5$ % (p/p) de agua, ≤ 5 % (p/p) de agua, $\leq 4,5$ % (p/p) de agua, ≤ 4 % (p/p) de agua, $\leq 3,5$ % (p/p) de agua, ≤ 3 % (p/p) de agua, $\leq 2,5$ % (p/p) de agua, ≤ 2 % (p/p) de agua, $\leq 1,5$ % (p/p) de agua, ≤ 1 % (p/p) de agua o $\leq 0,5$ % (p/p) de

30

agua. En algunas modalidades, el polvo contiene alrededor de 10 % (p/p) de agua, alrededor de 9,5 % (p/p) de agua, alrededor de 9 % (p/p) de agua, alrededor de 8,5 % (p/p) de agua, alrededor de 8 % (p/p) de agua, alrededor de 7,5 % (p/p) de agua, alrededor de 7 % (p/p) de agua, alrededor de 6,5 % (p/p) de agua, alrededor de 6 % (p/p) de agua, alrededor de 5,5 % (p/p) de agua, alrededor de 5 % (p/p) de agua, alrededor de 4,5 % (p/p) de agua, alrededor de 4 % (p/p) de agua, alrededor de 3,5 % (p/p) de agua, alrededor de 3 % (p/p) de agua, alrededor de 2,5 % (p/p) de agua, alrededor de 2 % (p/p) de agua, alrededor de 1,5 % (p/p) de agua, alrededor de 1 % (p/p) de agua, alrededor de 0,5 % (p/p) de agua, o alrededor de 0 % (p/p) de agua. En algunas modalidades, el polvo contiene 0,01 %-10 % (p/p) de agua, 0,01 %-3 % (p/p) de agua, 0,5 %-4 % (p/p) de agua, 3 %-10 % (p/p) de agua, 0 %-3 % (p/p) de agua, 0,5 %-3,5 % (p/p) de agua, 1 %-4 % (p/p) de agua, 1,5 %-4,5 % (p/p) de agua, 2 %-5 % (p/p) de agua, 2,5 %-5,5 % (p/p) de agua, 3 %-6 % (p/p) de agua, 3,5 %-6,5 % (p/p) de agua, 4 %-7 % (p/p) de agua, 4,5 %-7,5 % (p/p) de agua, 5 %-8 % (p/p) de agua, 5,5 %-8,5 % (p/p) de agua, 6 %-9 % (p/p) de agua, 6,5 %-9,5 % (p/p) de agua o 7 %-10 % (p/p) de agua.

[00038] El contenido de agua de las micropartículas puede determinarse mediante cualquiera de uno o más métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen métodos gravimétricos, que incluyen termogravimetría, cromatografía de gases, espectroscopía de infrarrojo cercano, coulombimetría y el método de Karl Fischer. Estos métodos se analizan en J. K. Townes, "Moisture content in proteins: its effects and measurement", 705 J. Chromatography A 115-127, 1995, y las referencias que se citan allí. Por ejemplo, se puede utilizar el método (gravimétrico) de pérdida por secado (LOD, por sus siglas en inglés) en el cual se pesan las micropartículas, se someten a calentamiento para apartar el agua y otros volátiles y

luego se pesan nuevamente. La pérdida de masa se atribuye al agua (y otros volátiles) contenidos dentro del material de partida. La espectroscopía de infrarrojo cercano mide la reflectancia de 1100 nm a 2500 nm a través de un recipiente de vidrio (superficie de vidrio) que contiene la proteína para determinar el contenido de humedad sin destruir la muestra. Ver la farmacopea de los Estados Unidos, Revisión XXIII, Convención de USP, Rockville, MD 1995, pp. 1801-1802; y Savage et ál., "Determination of Adequate Moisture Content for Efficient Dry-Heat Viral Inactivation in Lyophilized Factor VIII by Loss on Drying and by Near Infrared Spectroscopy", 26 Biologicals 119-124, 1998. Un método preferido para determinar el contenido de agua es el método de Karl Fischer (volumétrico o coulombimétrico), que determina la cantidad de H₂O mediante la medición de la oxidación de SO₂ por I₂, en donde se consume una mol de I₂ por mol de H₂O.

[00039] El agua puede estabilizar o contribuir de otro modo a la estabilidad de la proteína del polvo farmacéutico formulado objeto y, en algunas modalidades, reemplazar el estabilizante térmico.

[00040] En una modalidad, la glicoproteína proporcionada en el polvo farmacéutico formulado es estable. El término "estable" o "estabilidad" se refiere a la retención de un nivel aceptable de estructura química o física o función biológica de la glicoproteína después de su almacenamiento en condiciones definidas, o después del depósito en un entorno fisiológicamente pertinente. La proteína puede ser estable incluso si no mantiene 100 % de su estructura química o función biológica después del almacenamiento o depósito durante una cantidad de tiempo definida. En determinadas circunstancias, el mantenimiento de alrededor de 80 %, alrededor de 85 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 96 %, alrededor de 97 %, alrededor de 98 % o alrededor de 99 % de la estructura o función de la proteína después del almacenamiento o

depósito durante una cantidad de tiempo definida puede considerarse como "estable".

[00041] La estabilidad puede medirse, entre otros, mediante la determinación del porcentaje de la molécula natural que se conserva en la formulación después del almacenamiento o depósito en un paciente durante una cantidad de tiempo definida a una temperatura definida. El porcentaje de proteína que mantiene su conformación natural puede determinarse mediante, entre otros, cromatografía de exclusión por tamaño (por ejemplo, cromatografía líquida de alto rendimiento de exclusión por tamaño [SE-HPLC]). Para determinar la estabilidad de la proteína, en una modalidad, el polvo farmacéutico formulado objeto se solubiliza y luego se somete a la proteína a análisis. La proteína natural incluye una proteína no agregada y no degradada. En algunas modalidades, al menos alrededor de 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de la forma natural de la proteína puede detectarse en el polvo farmacéutico formulado proporcionado después del almacenamiento durante una cantidad de tiempo definida a una temperatura definida o en condiciones fisiológicas después del depósito en el paciente (por ejemplo, implantación).

[00042] La proteína agregada puede detectarse como especie que migra como especie con alto peso molecular en un gel o tamiz cromatográfico. La expresión especie o proteína con "alto peso molecular" o "HMW" puede utilizarse indistintamente con "agregada", "agregadas" o "proteína agregada". Una proteína estable del polvo farmacéutico formulado objeto se somete a un aumento en la velocidad de la formación de las especies HMW (también denominada velocidad de agregación) de $< 10\%$ por $\text{mes}^{1/2}$, $< 9\%$ por $\text{mes}^{1/2}$, $< 8\%$ por $\text{mes}^{1/2}$, $< 7\%$ por $\text{mes}^{1/2}$, $< 6\%$ por $\text{mes}^{1/2}$, $< 5\%$ por $\text{mes}^{1/2}$, $< 4\%$ por $\text{mes}^{1/2}$, $< 3\%$ por $\text{mes}^{1/2}$, $< 2\%$ por $\text{mes}^{1/2}$ o $< 1\%$ por $\text{mes}^{1/2}$.

En una modalidad preferida, la velocidad de agregación de la proteína proporcionada en el polvo farmacéutico formulado es $< 5 \%$ por mes^{1/2}.

[00043] La cantidad de tiempo definida después de la cual la estabilidad se mide puede ser de al menos 14 días, al menos 28 días, al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 5 meses, al menos 6 meses, al menos 7 meses, al menos 8 meses, al menos 9 meses, al menos 10 meses, al menos 11 meses, al menos 12 meses, al menos 18 meses, al menos 24 meses o más. La temperatura en la cual las micropartículas pueden mantenerse cuando se evalúa la estabilidad puede ser cualquier temperatura de alrededor de -80°C a alrededor de 50°C , por ejemplo, almacenamiento a alrededor de -80°C , alrededor de -30°C , alrededor de -20°C , alrededor de 0°C , alrededor de 4°C - 8°C , alrededor de 5°C , alrededor de 25°C u otras temperaturas ambiente, alrededor de 35°C , alrededor de 37°C u otras temperaturas fisiológicas, alrededor de 45°C o alrededor de 50°C .

[00044] La estabilidad puede medirse mediante la determinación del porcentaje de proteína que forma un agregado (es decir, especie con alto peso molecular) después de una cantidad de tiempo definida a una temperatura definida, en donde la estabilidad es inversamente proporcional al porcentaje de especies con alto peso molecular (HWM) que se forman. El porcentaje de especies HMW de la proteína puede determinarse mediante cromatografía de exclusión por tamaño después de la solubilización, tal como se describió anteriormente. Una micropartícula de proteína también puede considerarse estable si después de tres meses a temperatura ambiente se detecta menos de alrededor de 25 %, 24 %, 23 %, 22 %, 21 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, o 0,1 % de la proteína en una forma HMW. Preferentemente, $< 10 \%$, $< 5 \%$ o $< 2 \%$ de la proteína proporcionada

en el polvo farmacéutico formulado está presente como una especie HMW.

[00045] La estabilidad puede medirse mediante la determinación del porcentaje de la proteína que se degrada o se encuentra de otro modo como una especie de bajo peso molecular (LMW, por sus siglas en inglés) dentro de la micropartícula después de una cantidad de tiempo definida a una temperatura definida, en donde la estabilidad es inversamente proporcional al porcentaje de especie LMW que se detecta en la micropartícula solubilizada. El porcentaje de especies LMW de la proteína puede determinarse mediante cromatografía de exclusión por tamaño, tal como se describió anteriormente. Una micropartícula de proteína también puede considerarse estable si después de tres meses a temperatura ambiente se detecta menos de alrededor de 25 %, 24 %, 23 %, 22 %, 21 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, o 0,1 % de la primera molécula en una forma LMW.

[00046] En algunas modalidades, el polvo farmacéutico formulado objeto contiene un amortiguador. Los amortiguadores son conocidos en la técnica. En general, se incluye un amortiguador en la materia prima de la solución de proteína acuosa utilizada para preparar el polvo objeto. En algunas modalidades, el amortiguador se incluye en la materia prima a una concentración de 1 mM a 100 mM. En algunas modalidades en particular, el amortiguador se incluye en la materia prima a alrededor de 10 mM. En determinadas modalidades, el amortiguador se encuentra presente en la materia prima a una concentración de 5 mM $\pm$ 0,75 mM a 15 mM $\pm$ 2,25 mM; 6 mM $\pm$ 0,9 mM a 14 mM $\pm$ 2,1 mM; 7 mM $\pm$ 1,05 mM a 13 mM $\pm$ 1,95 mM; 8 mM $\pm$ 1,2 mM a 12 mM $\pm$ 1,8 mM; 9 mM $\pm$ 1,35 mM a 11 mM $\pm$ 1,65 mM; 10 mM $\pm$ 1,5 mM; o alrededor de 10 mM. En algunas modalidades, el sistema amortiguador de la materia prima comprende histidina, fosfato y/o acetato a 10

mM $\pm$ 1,5 mM.

[00047] En algunas modalidades, el amortiguador se encuentra presente en el polvo farmacéutico formulado objeto a una concentración de ≤ 10 % (p/p), $\leq 9,5$ % (p/p), ≤ 9 % (p/p), $\leq 8,5$ % (p/p), ≤ 8 % (p/p), $\leq 7,5$ % (p/p), ≤ 7 % (p/p), $\leq 6,5$ % (p/p), ≤ 6 % (p/p), $\leq 5,5$ % (p/p), ≤ 5 % (p/p), $\leq 4,5$ % (p/p), ≤ 4 % (p/p), $\leq 3,5$ % (p/p), ≤ 3 % (p/p), $\leq 2,5$ % (p/p), ≤ 2 % (p/p), $\leq 1,5$ % (p/p), ≤ 1 % (p/p) o $\leq 0,5$ % (p/p). En algunas modalidades, el amortiguador se encuentra presente en el polvo farmacéutico formulado objeto a una concentración de 0,1-0,5 % (p/p), 0,5-1 % (p/p), 0,5-1,5 % (p/p), 1-2 % (p/p), 1,5-2,5 % (p/p), 2-3 % (p/p), 2,5-3,5 % (p/p), 3-4 % (p/p), 3,5-4,5 % (p/p), 4-5 % (p/p), 4,5-5,5 % (p/p), 5-6 % (p/p), 5,5-6,5 % (p/p), 6-7 % (p/p), 6,5-7,5 % (p/p), 8-9 % (p/p), 8,5-9,5 % (p/p) o 9-10 % (p/p).

[00048] En algunas modalidades, el amortiguador se selecciona de amortiguadores que se encuentran abarcados de forma inclusiva dentro del intervalo de pH de alrededor de 3 a alrededor de 9, o dentro del intervalo de pH de alrededor de 3,7 a alrededor de 8,0. Por ejemplo, la materia prima de la solución acuosa que contiene la proteína puede tener un pH de alrededor de 3,4, de alrededor de 3,6, de alrededor de 3,8, de alrededor de 4,0, de alrededor de 4,2, de alrededor de 4,4, de alrededor de 4,6, de alrededor de 4,8, de alrededor de 5,0, alrededor de 5,2, alrededor de 5,4, alrededor de 5,6, alrededor de 5,8, alrededor de 6,0, alrededor de 6,2, alrededor de 6,4, alrededor de 6,6, alrededor de 6,8, alrededor de 7,0, alrededor de 7,2, alrededor de 7,4, alrededor de 7,6, alrededor de 7,8 o alrededor de 8,0.

[00049] El amortiguador puede ser una combinación de amortiguadores individuales, tal como, por ejemplo, la combinación de histidina y acetato (amortiguador his-acetato). En una modalidad, el amortiguador tiene un intervalo de amortiguación de alrededor de

3,5 a alrededor de 6, o alrededor de 3,7 a alrededor de 5,6, tal como el intervalo amortiguado por acetato. En una modalidad, el amortiguador tiene un intervalo de amortiguación de alrededor de 5,5 a alrededor de 8,5, o alrededor de 5,8 a alrededor de 8,0, tal como el intervalo amortiguado por fosfato. En una modalidad, el amortiguador tiene un intervalo de amortiguación de alrededor de 5,0 a alrededor de 8,0, o alrededor de 5,5 a alrededor de 7,4, tal como el intervalo amortiguado por histidina.

[00050] En una modalidad, el polvo farmacéutico formulado objeto no contiene un amortiguador adicional. En este caso, cualquier capacidad de amortiguación de la materia prima acuosa líquida o polvo se proporciona mediante la proteína incluida, el estabilizante térmico, de haberlo, o el agua.

[00051] Un tensioactivo (uno o más) también puede incluirse en la materia prima acuosa que contiene la proteína previa a la micropartícula. Tal como se usa en la presente, el término "tensioactivo" significa una sustancia que reduce la tensión superficial de un fluido en el cual se disuelve y/o reduce la tensión interfacial entre aceite y agua. Los tensioactivos pueden ser iónicos o no iónicos. Los tensioactivos no iónicos de ejemplo que pueden incluirse en la materia prima (y posteriormente en el polvo farmacéutico formulado) incluyen, por ejemplo, poli(óxido de etileno) de alquilo, poliglucósidos de alquilo (por ejemplo, octil glucósido y decilmaltosida), alcoholes grasos tales como alcohol cetílico y alcohol oleílico, cocamida MEA, cocamida DEA y cocamida TEA. Los tensioactivos no iónicos específicos que pueden incluirse en la materia prima incluyen, por ejemplo, estéres de sorbitán de polioxietileno (denominados también polisorbatos), tales como polisorbato 20, polisorbato 28, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 65, polisorbato 80, polisorbato 81 y polisorbato 85; poloxámeros tales como poloxámero 188, poloxámero 407; polietilen-

polipropilenglicol o polietilenglicol (PEG). El polisorbato 20 también se conoce como TWEEN 20, monolaurato de sorbitán y monolaurato de polioxietilensorbitán.

[00052] La cantidad de tensioactivo contenido dentro de la solución de materia prima puede variar en función de las propiedades y efectos específicos deseados del polvo. Las propiedades aparentes del polvo, como la fluidez, pueden verse afectadas por el contenido de tensioactivo regulador. Sin desear limitarse a la teoría, el tensioactivo afecta la interfaz aire-superficie de las gotas de proteína acuosa (precursoras del polvo objeto) al reducir la tensión superficial. Mayores concentraciones de tensioactivo producen micropartículas de proteína más redondas y lisas, lo que puede mejorar la fluidez. Menores concentraciones de tensioactivo producen micropartículas de proteína menos redondas y con hoyuelos.

[00053] En determinadas modalidades, la solución acuosa precursa que contiene la proteína objeto puede contener alrededor de 0,015 % (p/v) a alrededor de 0,1 % (p/v) de tensioactivo (por ejemplo, polisorbato 20 o polisorbato 80). Por ejemplo, la materia prima puede contener alrededor de 0,015 %; alrededor de 0,016 %; alrededor de 0,017 %; alrededor de 0,018 %; alrededor de 0,019 %; alrededor de 0,02 %; alrededor de 0,021 %; alrededor de 0,022 %; alrededor de 0,023 %; alrededor de 0,024 %; alrededor de 0,025 %; alrededor de 0,026 %; alrededor de 0,027 %; alrededor de 0,028 %; alrededor de 0,029 %; alrededor de 0,03 %; alrededor de 0,031 %; alrededor de 0,032 %; alrededor de 0,033 %; alrededor de 0,034 %; alrededor de 0,035 %; alrededor de 0,036 %; alrededor de 0,037 %; alrededor de 0,038 %; alrededor de 0,039 %; alrededor de 0,04 %; alrededor de 0,041 %; alrededor de 0,042 %; alrededor de 0,043 %; alrededor de 0,044 %; alrededor de 0,045 %; alrededor de 0,046 %; alrededor de 0,047 %; alrededor de 0,048 %; alrededor de 0,049 %; alrededor de 0,05 %; alrededor de 0,051 %; alrededor de 0,052 %;

alrededor de 0,053 %; alrededor de 0,054 %; alrededor de 0,055 %;
 alrededor de 0,056 %; alrededor de 0,057 %; alrededor de 0,058 %;
 alrededor de 0,059 %; alrededor de 0,06 %; alrededor de 0,061 %;
 alrededor de 0,062 %; alrededor de 0,063 %; alrededor de 0,064 %;
 5 alrededor de 0,065 %; alrededor de 0,066 %; alrededor de 0,067 %;
 alrededor de 0,068 %; alrededor de 0,069 %; alrededor de 0,07 %;
 alrededor de 0,071 %; alrededor de 0,072 %; alrededor de 0,073 %;
 alrededor de 0,074 %; alrededor de 0,075 %; alrededor de 0,076 %;
 alrededor de 0,077 %; alrededor de 0,078 %; alrededor de 0,079 %;
 10 alrededor de 0,08 %; alrededor de 0,081 %; alrededor de 0,082 %;
 alrededor de 0,083 %; alrededor de 0,084 %; alrededor de 0,085 %;
 alrededor de 0,086 %; alrededor de 0,087 %; alrededor de 0,088 %;
 alrededor de 0,089 %; alrededor de 0,09 %; alrededor de 0,091 %;
 alrededor de 0,092 %; alrededor de 0,093 %; alrededor de 0,094 %;
 15 alrededor de 0,095 %; alrededor de 0,096 %; alrededor de 0,097 %;
 alrededor de 0,098 %; alrededor de 0,099 %; o alrededor de 0,10 %
 de tensioactivo (por ejemplo, polisorbato 20 o polisorbato 80).

[00054] En una modalidad, el polvo farmacéutico formulado comprende
 un tensioactivo no iónico anfipático, tal como un éster de ácido
 20 graso de un sorbitán de polioxietileno. En una modalidad, el
 tensioactivo es polisorbato 20 o polisorbato 80. En una modalidad,
 la relación en peso del polisorbato y la proteína en el polvo
 farmacéutico formulado objeto es 0,003:1 - 1:5, 0,03:10, 0,3:50,
 0,3:25, 1:50, 0,3:10, 3:50, 3:25 o 1:5.

25 [00055] Los estabilizantes térmicos pueden incluirse en el polvo
 farmacéutico formulado (y, por lo tanto, cualquier precursor
 acuoso) para inhibir o reducir la formación de agregados y otros
 productos de degradación durante el estrés térmico. Los
 estabilizantes térmicos pueden ser aminoácidos, preferentemente
 30 aminoácidos con cadenas laterales hidrofóbicas, carbohidratos,
 alcoholes de azúcar, polímeros, copolímeros y copolímeros de

bloque, polipéptidos, tensioactivos y similares. Los ejemplos de estabilizantes térmicos útiles incluyen pluronic F68, arginina, lisina, los aminoácidos con cadenas laterales hidrofóbicas que incluyen glicina, prolina, valina, leucina e isoleucina, sorbitol, manitol, glicerol, trehalosa, dextrosa, sacarosa y otros carbohidratos, diversas ciclodextrinas, cloruro de sodio y combinaciones de estos. Ver Goldberg et ál., "Formulation development of therapeutic monoclonal antibodies using high-throughput fluorescence and static light scattering techniques: role of conformational and colloidal stability", 100(4) J. Pharm. Sci. 1306-1315, 2011, y Bhambhani et ál., "Formulation design and high-throughput excipient selection based on structural integrity and conformational stability of dilute and highly concentrated IgG1 monoclonal antibody solutions", 101(3) J. Pharm. Sci. 1120-1135, 2012.

[00056] El carbohidrato puede ser un azúcar reductor o un azúcar no reductor. Los "azúcares reductores" incluyen, por ejemplo, azúcares con un grupo cetona o aldehído y contienen un grupo hemiacetal reactivo, lo que permite que el azúcar funcione como un agente reductor. Los ejemplos específicos de azúcares reductores incluyen fructosa, glucosa, gliceraldehído, lactosa, arabinosa, manosa, xilosa, ribosa, ramnosa, galactosa y maltosa. Los azúcares no reductores pueden comprender un carbono anomérico que es un acetal y no es sustancialmente reactivo con aminoácidos o polipéptidos para iniciar una reacción de Maillard. Los ejemplos específicos de azúcares no reductores incluyen sacarosa, trehalosa, sorbosa, sucralosa, melezitosa y rafinosa. Los azúcares ácidos incluyen, por ejemplo, ácidos sacáricos, gluconato y otros azúcares de polihidroxí y sales de estos.

[00057] En algunas modalidades, los estabilizantes térmicos se incluyen en una relación de masa a masa o mol a mol con la

proteína. Sin limitarse a la teoría, se considera que los estabilizantes térmicos en parte reemplazan el agua que rodeaba la proteína para ayudar a mantener la estabilidad de la proteína (terapia de reemplazo de agua), lo que permite la remoción de agua mientras se mantiene la estructura de la proteína. De acuerdo con un aspecto de la invención, la relación de proteína y estabilizante se maximiza para permitir la formulación de mayores cantidades de proteína por volumen de unidad, mientras se mantiene la estructura de proteína adecuada. En una modalidad, para cada 5 partes de proteína en peso, el polvo farmacéutico formulado contiene ≤ 2 partes de estabilizante térmico en peso. Por ejemplo, si la solución acuosa de materia prima previa a la partícula contiene 5 mg/ml de proteína, por consiguiente, se incluiría la totalidad del estabilizante térmico a ≤ 2 mg/ml para mantener la relación de 5 partes de proteína a ≤ 2 partes de estabilizante térmico en el polvo farmacéutico formulado objeto. En una modalidad, para cada 5 partes de proteína en peso, el polvo farmacéutico formulado contiene ≤ 1 parte de estabilizante térmico en peso. Por ejemplo, si la solución acuosa de materia prima contiene 5 mg/ml de proteína, por consiguiente, se incluiría la totalidad del estabilizante térmico a ≤ 1 mg/ml para mantener la relación de 5 partes de proteína en peso a 1 parte de estabilizante térmico en peso en el polvo farmacéutico formulado objeto. En algunas modalidades, la relación peso a peso de la proteína y estabilizante térmico es 5:2 - 100:1, 5:2 - 10:3, 20:7 - 4:1, 10:3 - 5:1, 4:1 - 20:3, 5:1 - 10:1, 20:3 - 20:1, 10:1 - 40:1, 20:1 - 50:1 o 40:1 - 100:1.

[00058] En otra modalidad, para cada mol de proteína, el polvo farmacéutico formulado contiene < 300 moles de estabilizante térmico. Por ejemplo, si la materia prima en solución acuosa precursora contiene 1 mM de proteína, por consiguiente, se

incluiría la totalidad del estabilizante térmico a < 300 mM para mantener la relación molar de estabilizante térmico y proteína de $< 300:1$ en el polvo farmacéutico formulado objeto. En algunas modalidades, la relación molar de estabilizante térmico y proteína es 350:1 - 1:1, 350:1 - 300:1, 325:1 - 275:1, 300:1 - 250:1, 275:1 - 225:1, 250:1 - 200:1, 225:1 - 175:1, 200:1 - 150:1, 175:1 - 125:1, 150:1 - 100:1, 125:1 - 75:1, 100:1 - 50:1, 75:1 - 25:1 o 50:1 - $\leq 1:1$.

[00059] El componente de estabilizante térmico puede contener más de una especie molecular. Por ejemplo, el estabilizante térmico puede consistir en cualquiera de sacarosa, trehalosa, manitol, arginina (Arg) y/o los aminoácidos hidrofóbicos glicina (Gly), alanina (Ala), valina (Val), leucina (Leu), isoleucina (Ile), prolina (Pro), fenilalanina (Phe), metionina (Met) y triptófano (Trp) en diversas cantidades relativas que suman la cantidad agregada total del estabilizante térmico. Las Tablas 1 y 2 proporcionan ejemplos de relaciones útiles de estabilizante térmico y proteína en soluciones de materia prima acuosas específicas, y la Tabla 4 proporciona ejemplos de relaciones útiles de estabilizante térmico y proteína en los polvos farmacéuticos formulados específicos y la estabilidad de la proteína en polvo derivadas de las formulaciones de materia prima de la Tabla 3.

[00060] En algunas modalidades, el estabilizante térmico objeto puede ser una gran molécula (> 200 gramos por mol). Las moléculas grandes que son útiles como estabilizante térmico incluyen disacáridos tales como sacarosa, trehalosa, lactosa, maltosa, celobiosa y similares. La sacarosa y trehalosa son estabilizantes de gran molécula preferidos.

Tabla 1: Materia prima de polvo farmacéutico con estabilizantes térmicos

Ejemplar	Proteína	Estabilizante térmico (mg/ml)
----------	----------	-------------------------------

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

Tabla 2: Materia prima de polvo farmacéutico con estabilizantes térmicos, amortiguador y tensioactivo

Formula- ción	Prote- ína (mg/mL)	Fos- fato (mM)	Estabilizante térmico				Polisor- -bato 20 (%) p/v)
			Saca- rosa (% p/v)	Treha- losa (% p/v)	Mani- tol (% p/v)	Isoleu- cina (%) p/v)	
19	50	10	2				0,015
20	50	10	1				0,015
21	50	10	1		0,5	0,5	0,015

22	50	10		2			0,015
23	50	10		1	0,5	0,5	0,015
24	50	10			1	1	0,015
25	50	10	2				0,03
26	50	10	1				0,03
27	50	10	1		0,5	0,5	0,03
28	50	10		2			0,03
29	50	10		1	0,5	0,5	0,03
30	50	10			1	1	0,03
31	50	10	2				0,06
32	50	10	1				0,06
33	50	10	1		0,5	0,5	0,06
34	50	10		2			0,06
35	50	10		1	0,5	0,5	0,06
36	50	10			1	1	0,06
37	50	10	2				0,1
38	50	10	1				0,1
39	50	10	1		0,5	0,5	0,1
40	50	10		2			0,1
41	50	10		1	0,5	0,5	0,1
42	50	10			1	1	0,1
43	5	1	0,2				0,015
44	5	1	0,1				0,015
45	5	1	0,1		0,05	0,05	0,015
46	5	1		0,2			0,015
47	5	1		0,1	0,05	0,05	0,015
48	5	1			0,1	0,1	0,015
49	5	1	0,2				0,03
50	5	1	0,1				0,03
51	5	1	0,1		0,05	0,05	0,03

52	5	1		0,2			0,03
53	5	1		0,1	0,05	0,05	0,03
54	5	1			0,1	0,1	0,03
55	5	1	0,2				0,06
56	5	1	0,1				0,06
57	5	1	0,1		0,05	0,05	0,06
58	5	1		0,2			0,06
59	5	1		0,1	0,05	0,05	0,06
60	5	1			0,1	0,1	0,06
61	5	1	0,2				0,1
62	5	1	0,1				0,1
63	5	1	0,1		0,05	0,05	0,1
64	5	1		0,2			0,1
65	5	1		0,1	0,05	0,05	0,1
66	5	1			0,1	0,1	0,1

Tabla 3: Materia prima de polvo farmacéutico con estabilizantes térmicos, amortiguador y tensioactivo

Ejem- plar	Componentes de materia prima líquida (mg/mL)							
	Pro- teína	Saca- rosa	Treha -losa	Mani -tol	Isoleu -cina	Pro- lina	Fos- fato	Poli- sorbato
67	50	0	0	0	0	0	1,5	0
68	5	0,5	0,25	0	0,25	0	0,15	0,15
69	5	0,5	0	0,25	0,25	0	0,15	0,15
70	5	0	0,5	0,25	0,25	0	0,15	0,15
71	5	0,5	0	0	0,5	0	0,15	0,15
72	5	0,5	0	0	0	0,5	0,15	0,15
73	5	0,5	0	0,5	0	0	0,15	0,15
74	5	1	0	0	0	0	0,15	0,15
75	5	2	0	0	0	0	0,15	0,2

76	5	2	0	0	0	0	0,15	0
77	5	0	2	0	0	0	0,15	0
78	5	0	1	0,5	0,5	0	0,15	0
79	50	5	0	0	0	0	1,5	0
80	50	10	0	0	0	0	1,5	0
81	50	5	0	2,5	2,5	0	1,5	0
82	50	20	0	0	0	0	1,5	0
83	50,6	9	0	4,5	4,5	0	1,35	0
84	50	10	0	10	0	0	1,5	0
85	50	10	0	0	10	0	1,5	0
86	50	10	0	5	5	0	1,5	0
87	50	0	0	10	10	0	1,5	0
88	50	0	0	20	0	0	1,5	0
89	50	0	0	0	20	0	1,5	0

Tabla 4: Relaciones de componente de polvo farmacéutico y velocidad de agregación

Ejem- plar	% p/p de glicoproteí -na en polvo	Relación en peso de estabilizante térmico/glico- proteína	Relación molar de estabilizante térmico/glico- proteína	Velocidad de agregación a 50 °C (% HMW/mes ^{-1/2})
67	97,5	0,0	0	20,0
68	82,0	0,2	93	10,3
69	82,0	0,2	109	9,4
70	82,0	0,2	106	9,5
71	82,0	0,2	121	8,6
72	82,0	0,2	133	8,4
73	82,0	0,2	97	9,3
74	82,0	0,2	67	11,8

75	71,6	0,4	134	7,6
76	73,4	0,4	134	8,2
77	73,4	0,4	122	8,5
78	73,4	0,4	212	5,7
79	90,1	0,1	34	14,8
80	83,8	0,2	67	12,5
81	83,8	0,2	109	12,2
82	73,4	0,4	134	8,2
83	75,6	0,4	194	7,5
84	73,4	0,4	193	6,2
85	73,4	0,4	243	6,0
86	73,4	0,4	218	5,4
87	73,4	0,4	302	4,9
88	73,4	0,4	253	6,8
89	73,4	0,4	351	7,8

[00061] En algunas modalidades, el estabilizante térmico objeto comprende una o más moléculas pequeñas (≤ 200 gramos por mol) sin un estabilizante de gran molécula. Para una relación en peso determinada, la inclusión de estabilizantes térmicos de bajo peso molecular puede maximizar la relación de estabilizante térmico y proteína en una base molar, lo que proporciona un beneficio en la estabilidad. Las pequeñas moléculas que son útiles como un estabilizante térmico incluyen monosacáridos tales como ribosa, desoxirribosa, glucosa, fructosa, galactosa y similares, alcoholes de azúcar y otros polioles tales como eritritol, glicerol, treitol, arabital, xilitol, ribitol, manitol, sorbitol, galactitol, fucitol, iditol, inositol y similares, y aminoácidos tales como arginina y aminoácidos hidrofóbicos glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina y triptófano y similares. Los aminoácidos hidrofóbicos tienen cadenas laterales

alifáticas con pequeños momentos dipolares y un extremo de ácido carboxílico (polar). Por tanto, los aminoácidos hidrofóbicos libres son anfipáticos. Sin desear limitarse a la teoría, el estabilizante térmico anfipático puede proporcionar algo de protección a la proteína contra la desnaturalización de la interfaz de aire-líquido. Los estabilizantes térmicos de molécula pequeña preferidos incluyen manitol, isoleucina y prolina.

[00062] En algunas modalidades, el estabilizante térmico comprende únicamente sacarosa, únicamente trehalosa, únicamente isoleucina, únicamente manitol o únicamente prolina. En algunas modalidades, el estabilizante térmico comprende una combinación de sacarosa y trehalosa. En algunas modalidades, el estabilizante térmico comprende una combinación de sacarosa y trehalosa en una relación en peso de 3:1 - 1:3, alrededor de 2:1, alrededor de 4:3, alrededor de 1:1, alrededor de 3:4 o alrededor de 1:2.

[00063] En algunas modalidades, el estabilizante térmico comprende una combinación de sacarosa, manitol e isoleucina. En algunas modalidades, el estabilizante térmico comprende una combinación de sacarosa, manitol e isoleucina en una relación en peso de 4:3:1, 2:1:1, 4:1:3, 2:3:1, 1:1:1 o 2:1:3.

[00064] En algunas modalidades, los polvos farmacéuticos formulados únicamente con sacarosa tienen velocidades de agregación mayores que los que utilizan manitol, isoleucina, prolina o combinaciones de estos (Figura 6).

[00065] En algunas modalidades, el estabilizante térmico comprende una combinación de trehalosa, manitol e isoleucina. En algunas modalidades, el estabilizante térmico comprende una combinación de trehalosa, manitol e isoleucina en una relación en peso de 4:3:1, 2:1:1, 4:1:3, 2:3:1, 1:1:1 o 2:1:3.

[00066] En algunas modalidades, el estabilizante térmico comprende una combinación de sacarosa e isoleucina. En algunas modalidades,

el estabilizante térmico comprende una combinación de sacarosa y trehalosa en una relación en peso de 3:1 - 1:3, alrededor de 2:1, alrededor de 4:3, alrededor de 1:1, alrededor de 3:4 o alrededor de 1:2.

5 [00067] En algunas modalidades, el estabilizante térmico comprende una combinación de sacarosa y prolina. En algunas modalidades, el estabilizante térmico comprende una combinación de sacarosa y prolina en una relación en peso de 3:1 - 1:3, alrededor de 2:1, alrededor de 4:3, alrededor de 1:1, alrededor de 3:4 o alrededor de
10 1:2.

[00068] En algunas modalidades, el estabilizante térmico comprende una combinación de sacarosa y manitol. En algunas modalidades, el estabilizante térmico comprende una combinación de sacarosa y manitol en una relación en peso de 3:1 - 1:3, alrededor de 2:1,
15 alrededor de 4:3, alrededor de 1:1, alrededor de 3:4 o alrededor de 1:2.

[00069] En algunas modalidades, el estabilizante térmico comprende una combinación de manitol e isoleucina. En algunas modalidades, el estabilizante térmico comprende una combinación de manitol e
20 isoleucina en una relación en peso de 3:1 - 1:3, alrededor de 2:1, alrededor de 4:3, alrededor de 1:1, alrededor de 3:4 o alrededor de 1:2.

[00070] En una modalidad, el estabilizante térmico es sacarosa presente en una relación en peso con la proteína en el polvo
25 farmacéutico formulado proporcionado de alrededor de 1:5 a 2:5. En otra modalidad, el polvo farmacéutico formulado comprende sacarosa, manitol, isoleucina y proteína en una relación en peso de alrededor de 2:1:1:10.

[00071] En una modalidad, el estabilizante térmico es trehalosa presente en una relación en peso con la proteína en el polvo
30 farmacéutico formulado proporcionado de alrededor de 1:5 a 2:5. En

otra modalidad, el polvo farmacéutico formulado comprende trehalosa, manitol, isoleucina y proteína en una relación en peso de alrededor de 2:1:1:10.

[00072] En una modalidad, el polvo farmacéutico formulado comprende
 5 alrededor de 71-75 % (p/p) de glicoproteína, 14-15 % (p/p) de manitol, 14-15 % (p/p) de isoleucina o prolina, 2-2,5 % (p/p) de amortiguador y 3-8 % (p/p) de agua.

[00073] En algunas modalidades, el polvo farmacéutico formulado se produce a partir de una solución acuosa que contenía la proteína
 10 objeto y otros excipientes. Esta solución acuosa precursora también se denomina como "materia prima". En algunas modalidades, la materia prima puede contener en una relación de peso a volumen (p/v) alrededor de 0,005 % a alrededor de 5 % de estabilizante
 15 térmico; alrededor de 0,01 % a alrededor de 4 % de estabilizante térmico; alrededor de 0,02 % a alrededor de 3 % de estabilizante térmico; o alrededor de 0,05 % a alrededor de 2 % de estabilizante térmico. En algunas modalidades, el polvo farmacéutico formulado de la presente invención puede comprender (p/v) alrededor de 0,01 %;
 20 0,02 %; 0,03 %; 0,04 %; 0,05 %; 0,06 %; 0,07 %; 0,08 %; 0,09 %; 0,10 %; 0,11 %; 0,12 %; 0,13 %; 0,14 %; 0,15 %; 0,16 %; 0,17 %; 0,18 %; 0,19 %; 0,20 %; 0,21 %; 0,22 %; 0,23 %; 0,24 %; 0,25 %; 0,26 %; 0,27 %; 0,28 %; 0,29 %; 0,30 %; 0,31 %; 0,32 %; 0,33 %; 0,34 %; 0,35 %; 0,36 %; 0,37 %; 0,38 %; 0,39 %; 0,40 %; 0,41 %; 0,42 %; 0,43 %; 0,44 %; 0,45 %; 0,46 %; 0,47 %; 0,48 %; 0,49 %;
 25 0,50 %; 0,51 %; 0,52 %; 0,53 %; 0,54 %; 0,55 %; 0,56 %; 0,57 %; 0,58 %; 0,59 %; 0,60 %; 0,61 %; 0,62 %; 0,63 %; 0,64 %; 0,65 %; 0,66 %; 0,67 %; 0,68 %; 0,69 %; 0,70 %; 0,71 %; 0,72 %; 0,73 %; 0,74 %; 0,75 %; 0,76 %; 0,77 %; 0,78 %; 0,79 %; 0,80 %; 0,81 %; 0,82 %; 0,83 %; 0,84 %; 0,85 %; 0,86 %; 0,87 %; 0,88 %; 0,89 %;
 30 0,90 %; 0,91 %; 0,92 %; 0,93 %; 0,94 %; 0,95 %; 0,96 %; 0,97 %; 0,98 %; 0,99 %; 1,0 %; 1,1 %; 1,2 %; 1,3 %; 1,4 %; 1,5 %; 1,6 %;

1,7 %; 1,8 %; 1,9 %; 2,0 %; 2,1 %; 2,2 %; 2,3 %; 2,4 %; 2,5 %;
2,6 %; 2,7 %; 2,8 %; 2,9 %; 3,0 %; 3,1 %; 3,2 %; 3,3 %; 3,4 %;
3,5 %; 3,6 %; 3,7 %; 3,8 %; 3,9 %; 4,0 %; 4,1 %; 4,2 %; 4,3 %;
4,4 %; 4,5 %; 4,6 %; 4,7 %; 4,8 %; 4,9 % o alrededor de 5,0 % de
5 estabilizantes térmicos.

[00074] En un aspecto de la invención, cuando no hay presente
estabilizante térmico en el polvo, el agua residual funciona para
estabilizar la proteína.

10 [00075] La proteína proporcionada en el polvo farmacéutico formulado
objeto no se limita a ninguna entidad proteica particular. Tal como
se usa en la presente, "proteína" incluye proteínas terapéuticas,
proteínas recombinantes utilizadas en investigaciones o terapia,
proteínas trap y otras proteínas de fusión Fc receptor, proteínas
quiméricas, anticuerpos, anticuerpos monoclonales, anticuerpos
15 humanos, anticuerpos biespecíficos, fragmentos de anticuerpos,
nanocuerpos, quimeras de anticuerpos recombinantes, citocina,
quimiocinas, hormonas peptídicas y similares. Las proteínas pueden
producirse mediante el uso de sistemas de producción a base de
células recombinantes, tales como el sistema de baculovirus de
20 insecto, sistemas de levadura (por ejemplo, *Pichia* sp.), sistemas
de mamíferos (por ejemplo, células CHO y derivados de CHO como
células CHO-K1). Ghaderi et ál., "Production platforms for
biotherapeutic glycoproteins: Occurrence, impact, and challenges of
non-human sialylation," 28 Biotechnol Genet Eng Rev. 147-75 (2012)
25 se incorpora a la presente mediante referencia con respecto a las
proteínas terapéuticas y su producción.

[00076] En algunas modalidades, la proteína es una proteína
terapéutica. Las proteínas terapéuticas pueden ser proteínas de
unión al antígeno, tales como, por ejemplo, fragmentos de receptor
soluble, anticuerpos (incluso IgG) y derivados o fragmentos de
30 anticuerpos, otras proteínas que contienen Fc, incluso proteínas de

fusión Fc y proteínas de fusión Fc receptor, que incluyen proteínas de tipo trap, tales como, por ejemplo, aflibercept (una molécula VEGF-trap), rilonacept (una molécula IL1-trap) y etanercept (una molécula TNF-trap). Huang, C., Curr. Opin. Biotechnol. 20: 692-99 (2009) se incorpora a la presente con respecto a las moléculas de tipo trap. Las patentes estadounidenses n.º 7,303,746 B2, 7,303,747 B2 y 7,374,758 B2 se incorporan a la presente con respecto al aflibercept. La patente estadounidense n.º 6,927,044 B2 se incorpora a la presente con respecto al rilonacept. La patente estadounidense n.º 8,063,182 B2 se incorpora a la presente con respecto al etanercept.

[00077] El término "proteína" incluye cualquier polímero de aminoácido que tenga más de alrededor de 50 aminoácidos unidos de forma covalente mediante uniones amida. Las proteínas contienen una o más cadenas poliméricas de aminoácidos, en general conocidas en la técnica como "polipéptidos". Una proteína puede contener uno o múltiples polipéptidos para formar una única biomolécula funcional. Los "polipéptidos" en general contienen más de 50 aminoácidos, mientras que los "péptidos" contienen en general 50 aminoácidos o menos.

[00078] Las proteínas pueden contener diversas modificaciones covalentes y no covalentes. En algunas proteínas, pueden estar presentes puentes disulfuro (es decir, entre residuos de cisteína para formar cistina). Estas uniones covalentes pueden estar dentro de una única cadena polipeptídica o entre dos cadenas polipeptídicas individuales. Por ejemplo, los puentes disulfuro son fundamentales para la estructura y función adecuada de la insulina, inmunoglobulinas, protamina y similares. Para un análisis reciente de la formación de unión de disulfuro, ver Oka y Bulleid, "Forming disulfides in the endoplasmic reticulum", 1833(11) Biochim Biophys Acta 2425-9 (2013).

[00079] Además de la formación de unión de disulfuro, las proteínas pueden someterse a otras modificaciones postraduccionales. Estas modificaciones incluyen lipidación (por ejemplo, miristoilación, palmitoilación, farnesoilación, geranilgeranilación y formación de anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI)), alquilación (por ejemplo, metilación), acilación, amidación, glicosilación (por ejemplo, adición de grupos glicosilo en arginina, asparagina, cisteína, hidroxilisina, serina, treonina, tirosina y/o triptófano) y fosforilación (es decir, la adición de un grupo fosfato a serina, treonina, tirosina y/o histidina). Para un análisis reciente de la modificación postraducciona l de las proteínas producidas en eucariotas, ver Mowen y David, "Unconventional post-translational modifications in immunological signaling", 15(6) Nat Immunol 512-20 (2014); y Blixt y Westerlind, "Arraying the post-translational glycoproteome (PTG)", 18 Curr Opin Chem Biol. 62-9 (2014).

[00080] En una modalidad, la proteína proporcionada en el polvo farmacéutico formulado es una glicoproteína, que abarca cualquier proteína con un grupo glicosilo. Las proteínas de fusión Fc receptor y anticuerpos (es decir, proteínas trap o moléculas trap) son ejemplos de glicoproteínas. Los anticuerpos producidos en sistemas heterólogos de mamífero también se glicosilan en diversos residuos (por ejemplo, en residuos de asparagina) con diversos polisacáridos y pueden diferir de especie en especie, lo que puede afectar la antigenicidad de los anticuerpos terapéuticos (ver Butler y Spearman, "The choice of mammalian cell host and possibilities for glycosylation engineering", 30 Curr Opin Biotech 107-112 (2014)). Los N-glicanos de las moléculas IgG en general incluyen N-acetilglucosamina manosilada, que en algunos casos puede incluir grupos adicionales de galactosa y/o fucosa. Los anticuerpos en general tienen una masa de alrededor de 150 - 170 kD (kg/mol), en donde la glicosilación proporciona alrededor de 2-3 % de la

masa. Ver Plomp et ál., "Recent Advances in Clinical Glycoproteomics of Immunoglobulins (Igs)," Mol Cell Proteomics. jul 2016; 15(7):2217-28.

[00081] Las moléculas trap se N-glicosilan de forma similar dado que
5 contienen un dominio Fc de inmunoglobulina. Las moléculas trap
tienen un intervalo mayor de peso molecular, de alrededor de 50 kD
para etancept, alrededor de 100 kD para aflibercept, a alrededor de
250 kD para rilonacept. Dado el tamaño más pequeño de la cadena
10 polipeptídica de aflibercept, el nivel relativo de contribución de
la glicosilación a la masa de la molécula de aflibercept es mayor
que el de un anticuerpo, es decir, alrededor de 5 % - 16 % de la
masa total o más. Sin desear limitarse a la teoría, la diferencia
en la glicosilación relativa de diferentes proteínas puede afectar
15 la relación óptima del estabilizante térmico y la proteína en el
polvo farmacéutico formulado objeto.

[00082] Por ejemplo, en una modalidad específica en la cual la
proteína es aflibercept, la partícula farmacéutica formulada objeto
comprende alrededor de 62 % de polipéptido, alrededor de 12 % de
glicano, alrededor de 25 % de sacarosa y alrededor de 2 % de
20 fosfato en peso. En otra modalidad específica en la cual la
proteína es aflibercept, la partícula farmacéutica formulada objeto
comprende alrededor de 71 % de polipéptido, alrededor de 13 % de
glicano, alrededor de 2 % de fosfato y alrededor de 14,1 % de
sacarosa en peso.

25 [00083] Por ejemplo, en una modalidad específica en la cual la
proteína es una molécula IgG1, la partícula farmacéutica formulada
objeto comprende alrededor de 81 % de proteína, alrededor de 1,5 %
de histidina, alrededor de 16 % de sacarosa y alrededor de 0,2 % de
polisorbato 80 en peso.

30 [00084] Por ejemplo, en una modalidad específica en la cual la
proteína es molécula IgG4, la partícula farmacéutica formulada

objeto comprende alrededor de 45 % de proteína, alrededor de 0,4 % de acetato, alrededor de 56 % de sacarosa y alrededor de 0,4 % de polisorbato 20 en peso.

[00085] Las inmunoglobulinas (también denominadas "anticuerpos") son ejemplos de proteínas que tienen múltiples cadenas polipeptídicas y grandes modificaciones postraduccionales. La proteína de inmunoglobulina canónica (por ejemplo, IgG) comprende cuatro cadenas polipeptídicas - dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro cistina y las dos cadenas pesadas están unidas entre sí mediante dos enlaces disulfuro cistina. Las inmunoglobulinas producidas en sistemas de mamíferos también se glicosilan en diversos residuos (por ejemplo, en residuos de asparagina) con diversos polisacáridos y pueden diferir de especie en especie, lo que puede afectar la antigenicidad de los anticuerpos terapéuticos. Butler y Spearman, "The choice of mammalian cell host and possibilities for glycosylation engineering", 30 Curr Opin Biotech 107-112 (2014) se incorpora a la presente mediante referencia con respecto a la producción heteróloga de glicoproteínas en sistemas celulares de mamífero.

[00086] Los anticuerpos se utilizan a menudo como biomoléculas terapéuticas. El término "anticuerpo", tal como se utiliza en la presente, incluye moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas mediante enlaces disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente como HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende tres dominios CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente como LCVR o VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de

cadena ligera comprende un dominio, CL. Las regiones VH y VL también se pueden subdividir en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés), intercaladas con regiones más conservadas, denominadas regiones marco (FR, por sus siglas en inglés). Cada VH y VL está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (las CDR de cadena pesada pueden abreviarse como HCDR1, HCDR2 y HCDR3; las CDR de cadena ligera pueden abreviarse como LCDR1, LCDR2 y LCDR3. La expresión anticuerpo de "afinidad elevada" hace referencia a los anticuerpos con una afinidad de unión a su objetivo de al menos 10^{-9} M; al menos 10^{-1} M; al menos 10^{-11} M; o al menos 10^{-12} M tal como se midió mediante resonancia de plasmones superficiales, por ejemplo, BIACORE™ o ELISA de afinidad en solución.

[00087] La expresión "anticuerpo biespecífico" incluye un anticuerpo capaz de unirse de manera selectiva a dos o más epítomos. Los anticuerpos biespecíficos generalmente comprenden dos cadenas pesadas diferentes, en donde cada cadena pesada se une específicamente a un epítomo diferente, ya sea en dos moléculas diferentes (por ejemplo, antígenos) o en la misma molécula (por ejemplo, en el mismo antígeno). Si un anticuerpo biespecífico es capaz de unirse selectivamente a dos epítomos distintos (un primer epítomo y un segundo epítomo), la afinidad de la primera cadena pesada para el primer epítomo generalmente será al menos uno a dos o tres o cuatro órdenes de magnitud menor que la afinidad de la primera cadena pesada para el segundo epítomo, y viceversa. Los epítomos reconocidos por el anticuerpo biespecífico pueden estar en el mismo objetivo o en uno distinto (por ejemplo, en la misma proteína o en una diferente). Los anticuerpos biespecíficos pueden fabricarse, por ejemplo, mediante la combinación de cadenas pesadas

que reconozcan epítomos distintos del mismo antígeno. Por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico que codifican secuencias variables de cadena pesada que reconocen epítomos distintos del mismo antígeno pueden fusionarse a secuencias de ácido nucleico que codifican las regiones constantes de cadena pesada diferentes, y dichas secuencias pueden expresarse en una célula que expresa una cadena ligera de inmunoglobulina. Un anticuerpo biespecífico típico tiene dos cadenas pesadas, cada una con tres CDR de cadena pesada, seguidas por (del extremo N al extremo C) un dominio CH1, una bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3, y una cadena ligera de inmunoglobulina que no confiere especificidad de unión a antígeno pero puede asociarse con cada cadena pesada, o que puede asociarse con cada cadena pesada y puede unirse a uno o más de los epítomos enlazados por las regiones de unión a antígeno de cadena pesada, o que pueden asociarse con cada cadena pesada y permitir la unión de una o ambas de las cadenas pesadas a uno o ambos epítomos.

[00088] La frase "cadena pesada" o "cadena pesada de inmunoglobulina" incluye una secuencia de la región constante de cadena pesada de inmunoglobulina de cualquier organismo, y a menos que se especifique lo contrario, incluye un dominio variable de cadena pesada. Los dominios variables de cadena pesada incluyen tres CDR de cadena pesada y cuatro regiones FR, a menos que se especifique lo contrario. Los fragmentos de cadenas pesadas incluyen CDR, CDR y FR, y combinaciones de estas. Una cadena pesada típica tiene, luego del dominio variable (del extremo N al extremo C), un dominio CH1, una bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. Un fragmento funcional de una cadena pesada incluye un fragmento que puede reconocer específicamente un antígeno (por ejemplo, reconocer el antígeno con una KD en el intervalo micromolar, nanomolar o picomolar), que puede expresar y secretar de una célula y que comprende al menos una CDR.

[00089] La expresión "cadena ligera" incluye una secuencia de región constante de cadena ligera de inmunoglobulina de cualquier organismo y, a menos que se especifique lo contrario, incluye cadenas ligeras kappa y lambda humanas. Los dominios variables de cadena ligera (VL) incluyen típicamente tres CDR de cadena ligera y cuatro regiones marco (FR), a menos que se especifique lo contrario. Generalmente, una cadena ligera de longitud completa incluye, desde el extremo amino al extremo carboxilo, un dominio VL que incluye FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 y un dominio constante de cadena ligera. Las cadenas ligeras que pueden utilizarse con la presente invención incluyen las que, por ejemplo, no se unen de forma selectiva con el primer o segundo antígeno unido de forma selectiva por la proteína de unión al antígeno. Las cadenas ligeras adecuadas incluyen las que pueden identificarse mediante análisis para las cadenas ligeras más comúnmente utilizadas en las bibliotecas de anticuerpos existentes (bibliotecas húmedas o in silico), en donde las cadenas ligeras no interfieren sustancialmente con la afinidad y/o selectividad de los dominios de unión al antígeno de las proteínas de unión al antígeno. Las cadenas ligeras incluyen las que pueden unirse a uno o ambos epítopes que están unidos por las regiones de unión al antígeno de la proteína de unión al antígeno.

[00090] La expresión "dominio variable" incluye una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera o pesada de inmunoglobulina (modificada según se desee) que comprende las siguientes regiones de aminoácidos, en secuencia desde el extremo N al extremo C (a menos que se indique lo contrario): FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Un "dominio variable" incluye una secuencia de aminoácidos capaz de plegarse en un dominio canónico (VH o VL) que tenga una estructura de lámina beta doble, en donde las láminas beta están conectadas por un enlace disulfuro entre un residuo de

una primera lámina beta y una segunda lámina beta.

[00091] La expresión "región determinante de la complementariedad", o el término "CDR", incluye una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico de genes de inmunoglobulina de un organismo que normalmente (es decir, en un animal de tipo salvaje) aparece entre dos regiones marco en una región variable de una cadena ligera o pesada de una molécula de inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo o un receptor de linfocitos T). Una CDR puede ser codificada, por ejemplo, por una secuencia de línea germinal o una secuencia reorganizada o no reorganizada y, por ejemplo, por un linfocito B o un linfocito T maduro o sin tratamiento previo. En algunas circunstancias (por ejemplo, para una CDR3), las CDR pueden ser codificadas por dos o más secuencias (por ejemplo, secuencias de línea germinal) que no sean contiguas (por ejemplo, en una secuencia de ácido nucleico no reorganizada) pero que sean contiguas en una secuencia de ácido nucleico de linfocito B, por ejemplo, como resultado del corte y empalme o la conexión de las secuencias (por ejemplo, la recombinación V-D-J para formar CDR3 de cadena pesada).

[00092] La frase "proteína que contiene Fc" incluye anticuerpos, anticuerpos biespecíficos, inmunoadhesinas y otras proteínas de unión que comprenden al menos una parte funcional de una región CH2 y CH3 de inmunoglobulina. Una "parte funcional" se refiere a una región CH2 y CH3 que puede unirse a un receptor Fc (por ejemplo, un FcγR; o un FcRn, es decir, un receptor Fc neonatal) y/o que puede participar en la activación del complemento. Si la región CH2 y CH3 contiene eliminaciones, sustituciones y/o inserciones u otras modificaciones que la hagan incapaz de unirse a cualquier receptor Fc y tampoco pueda activar el complemento, la región CH2 y CH3 no es funcional.

[00093] Las proteínas que contienen Fc pueden comprender

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

[00094] Por ejemplo, y no de modo taxativo, la proteína de unión es una proteína que contiene Fc y presenta una semivida en suero mejorada (en comparación con la misma proteína que contiene Fc sin las modificaciones mencionadas) y tiene una modificación en la posición 250 (por ejemplo, E o Q); 250 y 428 (por ejemplo, L o F); 252 (por ejemplo, L/Y/F/W o T), 254 (por ejemplo, S o T), y 256 (por ejemplo, S/R/Q/E/D o T); o una modificación en 428 y/o 433 (por ejemplo, L/R/SI/P/Q o K) y/o 434 (por ejemplo, H/F o Y); o una modificación en 250 y/o 428; o una modificación en 307 o 308 (por ejemplo, 308F, V308F), y 434. En otro ejemplo, la modificación puede comprender una modificación de 428L (por ejemplo, M428L) y 434S (por ejemplo, N434S); una modificación de 428L, 259I (por ejemplo, V259I) y una modificación de 308F (por ejemplo, V308F); una modificación de 433K (por ejemplo, H433K) y una modificación de 434 (por ejemplo, 434Y); una modificación de 252, 254 y 256 (por ejemplo, 252Y, 254T y 256E); una modificación de 250Q y 428L (por

ejemplo, T250Q y M428L); una modificación de 307 y/o 308 (por ejemplo, 308F o 308P).

[00095] Algunas proteínas que contienen Fc recombinantes contienen receptores o fragmentos receptores, ligandos o fragmentos de ligandos que tienen compañeros de unión cognatos en sistemas biológicos. Las "proteínas de fusión Fc receptor" se refieren a moléculas recombinantes que contienen un receptor soluble fusionado en un dominio Fc de inmunoglobulina. Algunas proteínas de fusión Fc receptor pueden contener dominios de unión al ligando de múltiples receptores diferentes que afectan a uno determinado. Estas proteínas de fusión Fc receptor se conocen como "traps" o "moléculas trap". Riloncept y aflibercept son ejemplos de traps comercializados que antagonizan IL1R (ver patente estadounidense n.º 7,927,583) y VEGF (ver patente estadounidense n.º 7,087,411), respectivamente. Otras proteínas que contienen Fc recombinantes incluyen las proteínas recombinantes que contienen un péptido fusionado en un dominio Fc, por ejemplo, tecnología MIMETIBODY™ de Centocor. Las proteínas que contienen Fc recombinantes se describen en C. Huang, "Receptor-Fc fusion therapeutics, traps, and MIMETIBODY technology", 20(6) Curr. Opin. Biotechnol. 692-9 (2009).

[00096] Las "proteínas de fusión Fc" comprenden parte o la totalidad de dos o más proteínas, una de las cuales es una parte Fc de una molécula de inmunoglobulina, que no se fusionan en su estado natural. Se ha descrito la preparación de proteínas de fusión que comprenden determinados polipéptidos heterólogos fusionados a varias partes de los polipéptidos derivados del anticuerpo (incluso el dominio Fc), por ejemplo en Ashkenazi et ál., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10535, 1991; Byrn et ál., Nature 344:677, 1990; y Hollenbaugh et ál., "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", in Current Protocols in Immunology, Suppl. 4, páginas 10.19.1 - 10.19.11, 1992. Las "proteínas de fusión Fc receptor"

comprenden uno o más dominios extracelulares de un receptor acoplado a un resto Fc que, en algunas modalidades, comprende una región bisagra seguida por un dominio CH2 y CH3 de una inmunoglobulina. En algunas modalidades, la proteína de fusión Fc contiene dos o más cadenas receptoras diferentes que se unen a un ligando único o más de un ligando. Por ejemplo, una proteína de fusión Fc es un trap, tal como, por ejemplo, un IL-1 trap (por ejemplo, Rilonacept, que contiene la región de unión de ligando IL-1RAcP fusionada a la región extracelular IL-1R1 fusionada en Fc de hIgG1; ver patente estadounidense n.º 6,927,004, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia), o un VEGF Trap (por ejemplo, Aflibercept, que contiene el dominio Ig 2 del receptor VEGF Flt1 fusionado en el dominio Ig 3 del receptor VEGF Flk1 fusionado en el Fc de hIgG1; por ejemplo, SEQ ID NO:1; ver patentes estadounidenses n.º 7,087,411 y 7,279,159, que se incorporan a la presente en sus totalidades mediante referencia).

[00097] "Antagonista de VEGF" se refiere a todo y cualquier fármaco, medicamento u otra molécula que antagonice o reduzca de otro modo la actividad de un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés). VEGF es un miembro de la familia PDGF de los factores de crecimiento. Funciona predominantemente en células endoteliales para promover la mitogénesis y migración celular y, por tanto, estimular la vasculogénesis y angiogénesis. VEGF puede utilizarse de forma ectópica para tratar la isquemia, particularmente la cardiopatía isquémica. Por el contrario, los antagonistas de VEGF pueden utilizarse para inhibir la angiogénesis. Los agentes antiangiogénicos son útiles para el tratamiento del cáncer, dado que los tumores requieren la neovascularización para continuar a crecer y hacer metástasis, y para el tratamiento de neovascularización coroidal que conduce a la degeneración macular relacionada con la edad húmeda. Para un

análisis de VEGF y los fármacos utilizados para promover o inhibir la actividad de VEGF, ver Wu et ál., "A systems biology perspective on sVEGFR1: its biological function, pathogenic role and therapeutic use," 14(3) J. Cell Mol. Med. 528-52 (2010); Yadav et ál., "Tumour Angiogenesis and Angiogenic Inhibitors: A Review," 9(6) J. Clin. Diagn. Res. XE01-XE05 (2015); y I. Zachary, "VEGF signalling: integration and multi-tasking in endothelial cell biology," 31(Pt 6) Biochem. Soc. Trans. 1171-7 (2003).

[00098] Los inhibidores de VEGF incluyen pequeñas moléculas que inhiben las cinasas de tirosina estimuladas por VEGF, que incluyen, por ejemplo, lapatinib, sunitinib, sorafenib, axitinib y paxopanib (Yadav, 2015). Los inhibidores macromoleculares de VEGF incluyen el anticuerpo monoclonal bevacizumab, el fragmento Fab ranibizumab, el trap afibercept y el aptámero pegilado pegaptanib (Id).

[00099] Otros factores de crecimiento implicados en la angiogénesis y que funcionan como neovascularización de objetivos terapéuticos incluyen, entre otros, angiopoyetina-2 (Ang2) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, por sus siglas en inglés). Ang2 es un componente en la vía Angiopoyetina-Tie (AT) y, como tal, está implicado en la remodelación vascular. La vía AT, en la cual la angiopoyetina-1 se une y agoniza el receptor cognado Tie2, promueve la supervivencia celular endotelial y la construcción, maduración y mantenimiento de vasos sanguíneos. Ang2 también está implicado en la linfangiogénesis. Ang2 también se une y modula la señalización de Tie2 y parece funcionar como un antagonista de Tie2 en presencia de Ang1. Ver Thurston y Daly, "The Complex Role of Angiopietin-2 in the Angiopietin-Tie Signaling Pathway," 2(9) Cold Spring Harb. Perspect. Med. a006650 (2012), y Chintharlapalli et ál., "Angiopietin-2: an attractive target for improved antiangiogenic tumor therapy," 73(6) Cancer Res. 1649-57 (2013).

[000100] Ang2 está implicado en el cáncer y la inflamación. Está

regulado por aumento en diversos carcinomas, citomas y sarcomas, así como en la sepsis y enfermedades inflamatorias. Ang2 desempeña un papel en la incorporación de leucocitos. El bloqueo de Ang2 tiene como resultado la inhibición parcial del crecimiento de xenoinjertos de tumores humanos. (Thurston, 2012). Los anticuerpos de Ang2 y otros inhibidores peptídicos que se unen a Ang2 se encuentran en desarrollo para el tratamiento de enfermedades y afecciones provocadas o exacerbadas por la angiogénesis. Los anticuerpos anti-Ang2 se describen, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.º 6,166,185; 7,521,053; 7,205,275; y las solicitudes de publicación de patente estadounidense n.º 2006/0018909; 2006/0246071; 2006/068953; 2007/0154482; y 2011/0027286.

[000101] El sistema PDGF contiene una familia de ligandos de factor de crecimiento dimérico y tirosinas cinasa del receptor. Comprende cinco (5) isoformas de ligando: PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-CC, PDGF-DD y PDGF-AB; y dos (2) receptores: PDGFRA (receptor alfa) y PDGFRB (receptor beta). PDGF está implicado en la división celular embriónica y la remodelación de tejido y angiogénesis en un desarrollo posterior. Los inhibidores de cinasa, por ejemplo, sorafenib, nilotinib, dasatinib, sunitinib, nintedanib e imatinib son inhibidores de PDGF útiles para el tratamiento del cáncer. Diversos anticuerpos anti-PDGFR también están en desarrollo para antagonizar la señalización de PDGF para el tratamiento del cáncer y otras enfermedades relacionadas con la angiogénesis. Ver Kono et ál., "Adding to the mix: fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor receptor pathways as targets in non-small cell lung cancer," 12(2) Curr. Cancer Drug Targets 107-23 (2012); Bauman et ál., "Antagonism of Platelet-Derived Growth Factor Receptor in Non-Small Cell Lung Cancer: Rationale and Investigations," 13 Clin. Cancer Res. 4632s (2007); y Stock et ál.,

"Platelet-derived growth factor receptor- α : a novel therapeutic target in human hepatocellular cancer," 6 Mol. Cancer Ther. 1932-41 (2007); patentes estadounidenses n.º 5,468,468; 7,740,850; 8,425,911; y 8,574,578; y solicitudes de patente estadounidense n.º 2009/0053241; 2011/0177074; 2012/0009199; 2012/0027767; y 2014/0193402.

[000102] El polvo farmacéutico formulado objeto puede fabricarse a partir de una materia prima de solución acuosa (precursora). Por tanto, la proteína proporcionada puede incluirse en la materia prima a determinadas concentraciones. La concentración de la proteína así como la concentración de soluto total en la materia prima puede afectar el tamaño de la micropartícula de proteína que constituye el polvo resultante, por lo tanto, el tamaño de las micropartículas puede controlarse mediante el ajuste de la concentración de la proteína o la concentración de otros solutos en la materia prima. Sin desear limitarse a la teoría, menores concentraciones de proteína u otros solutos en la materia prima puede producir un polvo más fino que contenga micropartículas de proteína constituyentes más pequeñas. Mayores concentraciones de proteína u otros solutos en la materia prima puede producir un polvo más grueso que contenga micropartículas de proteína constituyentes más grandes.

[000103] La concentración de proteína en la solución acuosa precursora puede variar desde 1 mg/mL o menos hasta cuanto sea posible, tal como alrededor de 175-200 mg/mL o más. En algunas modalidades, la solución acuosa precursora contiene la proteína objeto a una concentración de alrededor de 1 mg/mL a alrededor de 500 mg/mL de proteína; alrededor de 5 mg/mL a alrededor de 400 mg/mL de proteína; alrededor de 5 mg/mL a alrededor de 200 mg/mL de proteína; alrededor de 25 mg/mL a alrededor de 180 mg/mL de proteína; alrededor de 25 mg/mL a alrededor de 150 mg/mL de

proteína; o alrededor de 50 mg/mL a alrededor de 180 mg/mL de proteína. En algunas modalidades, la solución acuosa precursora contiene la proteína objeto a una concentración de alrededor de 1 mg/mL; alrededor de 2 mg/mL; alrededor de 5 mg/mL; alrededor de 10 mg/mL; alrededor de 15 mg/mL; alrededor de 20 mg/mL; alrededor de 25 mg/mL; alrededor de 30 mg/mL; alrededor de 35 mg/mL; alrededor de 40 mg/mL; alrededor de 45 mg/mL; alrededor de 50 mg/mL; alrededor de 55 mg/mL; alrededor de 60 mg/mL; alrededor de 65 mg/mL; alrededor de 70 mg/mL; alrededor de 75 mg/mL; alrededor de 80 mg/mL; alrededor de 85 mg/mL; alrededor de 86 mg/mL; alrededor de 87 mg/mL; alrededor de 88 mg/mL; alrededor de 89 mg/mL; alrededor de 90 mg/mL; alrededor de 95 mg/mL; alrededor de 100 mg/mL; alrededor de 105 mg/mL; alrededor de 110 mg/mL; alrededor de 115 mg/mL; alrededor de 120 mg/mL; alrededor de 125 mg/mL; alrededor de 130 mg/mL; alrededor de 131 mg/mL; alrededor de 132 mg/mL; alrededor de 133 mg/mL; alrededor de 134 mg/mL; alrededor de 135 mg/mL; alrededor de 140 mg/mL; alrededor de 145 mg/mL; alrededor de 150 mg/mL; alrededor de 155 mg/mL; alrededor de 160 mg/mL; alrededor de 165 mg/mL; alrededor de 170 mg/mL; alrededor de 175 mg/mL; alrededor de 180 mg/mL; alrededor de 185 mg/mL; alrededor de 190 mg/mL; alrededor de 195 mg/mL; alrededor de 200 mg/mL; alrededor de 205 mg/mL; alrededor de 210 mg/mL; alrededor de 215 mg/mL; alrededor de 220 mg/mL; alrededor de 225 mg/mL; alrededor de 230 mg/mL; alrededor de 235 mg/mL; alrededor de 240 mg/mL; alrededor de 245 mg/mL; alrededor de 250 mg/mL; alrededor de 255 mg/mL; alrededor de 260 mg/mL; alrededor de 265 mg/mL; alrededor de 270 mg/mL; alrededor de 275 mg/mL; alrededor de 280 mg/mL; alrededor de 285 mg/mL; alrededor de 290 mg/mL; alrededor de 295 mg/mL; alrededor de 300 mg/mL; o alrededor de 300 mg/mL.

[000104] Tal como se describió anteriormente, la proteína terapéutica puede ser una proteína de unión al antígeno, tal como un

anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una molécula trap u otra proteína de fusión Fc receptor, receptores solubles y similares. En una modalidad en particular, la proteína terapéutica es aflibercept, una molécula trap antagonista de VEGF. Las soluciones de materia prima para la formación de micropartículas que contienen aflibercept pueden contener desde alrededor de 1 mg/mL a alrededor de 100 mg/mL de aflibercept, alrededor de 2 mg/mL, alrededor de 3 mg/mL, alrededor de 4 mg/mL, alrededor de 5 mg/mL, alrededor de 6 mg/mL, alrededor de 7 mg/mL, alrededor de 8 mg/mL, alrededor de 9 mg/mL, alrededor de 10 mg/mL, alrededor de 15 mg/mL, alrededor de 20 mg/mL, alrededor de 25 mg/mL, alrededor de 30 mg/mL, alrededor de 35 mg/mL, alrededor de 40 mg/mL, alrededor de 45 mg/mL, alrededor de 50 mg/mL, alrededor de 55 mg/mL, alrededor de 60 mg/mL, alrededor de 65 mg/mL, alrededor de 70 mg/mL, alrededor de 75 mg/mL, alrededor de 80 mg/mL, alrededor de 85 mg/mL, alrededor de 90 mg/mL, alrededor de 95 mg/mL, o alrededor de 100 mg/mL de proteína trap VEGF. Las soluciones pueden contener uno o más amortiguadores de alrededor de 5 mM a alrededor de 50 mM. En una modalidad, el amortiguador es fosfato de alrededor de 10 mM a un pH de alrededor de $6 \pm 0,5$.

[000105] En algunas modalidades, las micropartículas de proteína del polvo farmacéutico formulado objeto están recubiertas con un polímero. El término "polímero" incluye macromoléculas que comprenden monómeros de repetición conectados por enlaces químicos covalentes. Los polímeros útiles para las micropartículas terapéuticas son biocompatibles y biodegradables. Un polímero biocompatible o biodegradable puede ser natural o sintético. Los polímeros naturales incluyen polinucleótidos, polipéptidos, tales como proteínas de origen natural, proteínas recombinantes, gelatina, colágenos, fibrinas, fibroínas, poliaspartatos, poliglutamatos, polileucina, copolímeros de leucina-glutamato; y

polisacáridos, tales como alginatos de celulosa, dextrano y polímeros de hidrogel de dextrano, amilosa, inulina, pectina y goma guar, quitosano, quitina, heparina y ácido hialurónico. Los polímeros biocompatibles o biodegradables sintéticos incluyen ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), copolímero poliláctico-poliglicólico (PLGA), poli-D,L-lactida-co-glicolida (PLGA), PLGA-etilen óxido fumarato, PLGA-alfa-tocoferil succinato esterificado como polietilenglicol 1000 (PLGA-TGPS), polianhídrido poli[1,6-bis(p-carboxifenoxi)hexano] (pCPH), ácido poli(hidroxbutírico-ácido cohidroxivalérico) (PHB-PVA), copolímero de polietilenglicol-ácido poli(láctico) (PEG-PLA), poli- ϵ -caprolactona (PCL), poli-alquil-ciano-acrilato (PAC), poli(etil)cianoacrilato (PEC), poliisobutil cianoacrilato, poli-N-(2-hidroxipropil)metacrilamida (poli(HPMA)), poli- β -R-hidroxi butirato (PHB), poli- α -R-hidroxi alcanato (PHA), ácido poli- β -R-málico, polímeros fosfolípido-colesterol, 2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina/ polietilenglicol-distearoilfosfatidiletanolamina (DOPC/PEG-DSPE)/Colesterol, etilcelulosa, polirotaxanos y polipseudorotaxanos a base de ciclodextrina (CD), succinato de polibutileno (PBS), poliortoésteres, copolímeros poliortoéster-poliamidina, copolímeros poliortoéster-diamina, poliortoésteres que incorporan ácidos latentes para controlar las velocidades de degradación y, entre otros, copolímeros poli(etilenglicol)/poli(butilentereftalato).

[000106] Etilcelulosa (EC) es un biomaterial conocido y fácilmente disponible utilizado en las ciencias farmacéuticas y de la alimentación. Es un derivado de celulosa en el cual algunos de los grupos hidroxilo de glucosa se remplazan con etil éter. Martinac et ál., 22(5) J. Microencapsulation 549-561 (2005) se incorpora a la presente con respecto al uso de etilcelulosa como un polímero biocompatible en la fabricación de microesferas. US 4,210,529 se

incorpora a la presente con respecto a etilcelulosa y derivados de etilcelulosa.

[000107] Poli-D,L-lactida-co-glicolida (PLGA) también es un polímero biocompatible y biodegradable conocido aprobado por la Administración de Fármacos y Alimentos (FDA) utilizado en la modificación genética de tejidos y los sistemas de administración farmacéutica. PLGA es un poliéster que comprende ácido glicólico y monómeros de ácido láctico. Astete y Sabliov, 17(3) Biomater. Sci. Polym. Ed. 247-89 (2006) se incorpora a la presente con respecto a la síntesis de PLGA y la fabricación de nanopartículas de PLGA.

[000108] Poli- ϵ -caprolactona (PCL) es otro polímero biocompatible y biodegradable aprobado por la FDA para su uso en humanos como un dispositivo de administración de fármaco. PCL es un poliéster de ϵ -caprolactona, que se hidroliza rápidamente en el cuerpo para formar un ácido hidroxicarboxílico no tóxico o de baja toxicidad. Labet y Thielemans, 38 Chemical Society Reviews 3484-3504 (2009) se incorpora a la presente con respecto a la fabricación de PCL. Sinha et ál., 278(1) Int. J. Pharm. 1-23 (2004) se incorpora a la presente con respecto a la fabricación de nanoesferas y microesferas a base de PCL.

[000109] El poliortoéster (POE) es un polímero bioerosionable diseñado para la administración de fármacos. Es en general un polímero de ceteno acetal, preferentemente un diceteno acetal cíclico, tal como, por ejemplo, 3,9-dimetilen-2,4,8,10-tetraoxa spiro[5,5]-undecano, que se polimeriza mediante condensación de glicol para formar los enlaces de ortoéster. Los poliortoésteres pueden modificarse para controlar su perfil de liberación de fármaco y las velocidades de degradación mediante el intercambio de diversos dioles y polioles hidrofóbicos, tal como, por ejemplo, remplazar un hexanotriol con un decanotril, así como agregar ácidos latentes, tal como, por ejemplo, ácido octanodioico o similares, en

la estructura principal para aumentar la sensibilidad al pH. Otras modificaciones al poliortoéster incluyen la integración de una amina para aumentar la funcionalidad. US 5,968,543; US 4,764,364; US 4,304,767; Heller y Barr, 5(5) Biomacromolecules 1625-32 (2004); y Heller, 57 Adv. Drug. Deliv. Rev. 2053-62 (2005) se incorporan a la presente con respecto a los poliortoésteres.

[000110] El polietilenglicol (PEG) puede reticularse para formar un gel, en el cual se incorporan las micropartículas de proteína. Gibas y Janik, "Review: synthetic polymer hydrogels for biomedical applications," 4(4) Chemistry & Chemical Technology 297-304 (2010) se incorpora a la presente con respecto a los geles PEG reticulados.

[000111] Los polímeros que se prefieren para las aplicaciones que aplican calor cuando se secan por aspersión tienen temperaturas de transición vítrea altas. En algunas modalidades, una temperatura de transición vítrea alta es $\geq 10^{\circ}\text{C}$, $\geq 15^{\circ}\text{C}$, $\geq 20^{\circ}\text{C}$, $\geq 25^{\circ}\text{C}$, $\geq 30^{\circ}\text{C}$, $\geq 35^{\circ}\text{C}$, $\geq 45^{\circ}\text{C}$ o $\geq 30^{\circ}\text{C}$.

[000112] En un aspecto, la invención proporciona un método para fabricar el polvo farmacéutico formulado objeto mediante el "secado por aspersión" de la solución acuosa precursora que contiene la proteína objeto y cualquier excipiente adicional (denominada también "materia prima" tal como se describió en la presente). La expresión "secar por aspersión" significa un método para producir un polvo que comprende partículas con tamaño micrométrico de una solución o suspensión mediante el uso de un secador por aspersión. Los secadores por aspersión emplean un atomizador o boquilla pulverizadora para dispersar la suspensión en un aerosol de tamaño de gota controlado. Los tamaños de gota de 10 a 500 μm pueden generarse mediante secado por aspersión. A medida que el solvente (agua o solvente orgánico) se seca, la sustancia de proteína se seca en una partícula de tamaño micrométrico (es decir,

micropartícula de proteína), lo que forma una sustancia similar al polvo; o, en el caso de una suspensión de polímero-micropartícula de proteína, formar una cubierta endurecida de polímero alrededor de la carga de proteína. El secado por aspersión puede llevarse a cabo en equipos tales como, por ejemplo, un minisecador por aspersión BÜCHI B-290 (Büchi Labortechnik AG, Flawil, CH). Elversson & Millqvist-Fureby, "Aqueous two-phase systems as a formulation concept for spray-dried protein," 294(1,2) International Journal of Pharmaceutics 73-87 (2005) se incorpora a la presente mediante referencia con respecto al secado por aspersión.

[000113] En una modalidad en particular, la materia prima se bombea en el secador por aspersión a una velocidad de alrededor de 2 mL/min a alrededor de 15 mL/min o alrededor de 7 mL/min. En una modalidad, la presión de boquilla es de alrededor de 35 psi a alrededor de 100 psi. En una modalidad, la presión de boquilla es de alrededor de 75 psi. La temperatura de entrada del secador por aspersión se configura a una temperatura del punto de ebullición del agua, o por encima de esta, tal como, por ejemplo, a alrededor de 100 °C a alrededor de 130 °C. La temperatura de salida se encuentra a una temperatura por debajo del punto de ebullición del agua y por encima de la temperatura ambiente, tal como, por ejemplo, alrededor de 55 °C. En una modalidad específica, una solución de proteína (por ejemplo, solución trap VEGF o solución IgG) se bombea en un minisecador por aspersión BÜCHI B-290 a alrededor de 7 mL/min, con una temperatura de entrada de alrededor de 100 °C, 110 °C, 120 °C o 130 °C y una temperatura de salida de alrededor de 55 °C, con el aspirador configurado a 33 m³/h y el gas de pulverización a 530 L/h.

[000114] En una modalidad, el polvo farmacéutico formulado se forma al someter la materia prima objeto a la atomización para formar una

niebla de gotas rociadas y luego aplicar calor a la niebla de gotas rociadas para formar el polvo farmacéutico formulado que comprende la proteína. En algunas modalidades, el polvo farmacéutico formulado resultante se somete a un secado adicional (denominado también "secado secundario"). El secado adicional incluye el horneado, la liofilización y el flujo de aire de nitrógeno. En otras modalidades, el polvo farmacéutico formulado resultante no se somete al secado adicional. En algunas modalidades, el polvo farmacéutico formulado resultante no se somete a un horneado posterior. En algunas modalidades, el polvo farmacéutico formulado resultante no se somete a una liofilización posterior. En algunas modalidades, el polvo farmacéutico formulado resultante no se somete al secado posterior mediante flujo de aire de nitrógeno.

[000115] En una modalidad, la materia prima comprende un estabilizante térmico y una glicoproteína con una relación de masa de 1:50-2:5 o entre estos. En una modalidad, por cada 5 partes de proteína en peso, la materia prima contiene ≤ 2 partes de estabilizante térmico en peso. Por ejemplo, si la materia prima contiene 5 mg/ml de proteína, por consiguiente, se incluiría la totalidad del estabilizante térmico a ≤ 2 mg/ml para mantener la relación de 5 partes de proteína a ≤ 2 partes de estabilizante térmico en el polvo farmacéutico formulado objeto, tal como se describió anteriormente en la presente. En una modalidad, por cada 5 partes de proteína en peso, la materia prima contiene ≤ 1 parte de estabilizante térmico en peso. Por ejemplo, si la materia prima contiene 5 mg/ml de proteína, por consiguiente, se incluiría la totalidad del estabilizante térmico a ≤ 1 mg/ml para mantener la relación de 5 partes de proteína en peso a 1 parte de estabilizante térmico en peso en el polvo farmacéutico formulado objeto, tal como se describió anteriormente en la presente. En algunas modalidades, la relación peso a peso de la proteína y estabilizante térmico es

5:2 - 100:1, 5:2 - 10:3, 20:7 - 4:1, 10:3 - 5:1, 4:1 - 20:3, 5:1 - 10:1, 20:3 - 20:1, 10:1 - 40:1, 20:1 - 50:1 o 40:1 - 100:1.

[000116] En otra modalidad, para cada mol de proteína, la materia prima contiene < 300 moles de estabilizante térmico. Por ejemplo, si la materia prima contiene 1 mM de proteína, por consiguiente, se incluiría la totalidad del estabilizante térmico a < 300 mM para mantener la relación molar de estabilizante térmico y proteína de < 300:1 en el polvo farmacéutico formulado objeto resultante, tal como se describió anteriormente en la presente. En algunas modalidades, la relación molar de estabilizante térmico y proteína es 350:1 - 1:1, 350:1 - 300:1, 325:1 - 275:1, 300:1 - 250:1, 275:1 - 225:1, 250:1 - 200:1, 225:1 - 175:1, 200:1 - 150:1, 175:1 - 125:1, 150:1 - 100:1, 125:1 - 75:1, 100:1 - 50:1, 75:1 - 25:1 o 50:1 - ≤ 1:1.

[000117] En aun otra modalidad, la materia prima contiene la proteína objeto sin un estabilizante térmico.

[000118] En una modalidad, el polvo farmacéutico formulado resultante está completamente seco, tal como se describió anteriormente en la presente.

[000119] En otra modalidad, el polvo farmacéutico formulado resultante no está completamente seco, tal como se describió anteriormente en la presente. En algunas modalidades, el polvo farmacéutico formulado no completamente seco comprende entre alrededor de 3 % y alrededor de 10 % (p/p) de agua, 3,5 %-10 % (p/p) de agua, 4 %-10 % (p/p) de agua, 4,5 %-10 % (p/p) de agua, 5 %-10 % (p/p) de agua, 5,5 %-10 % (p/p) de agua, 6 %-10 % (p/p) de agua, 6,5 %-10 % (p/p) de agua, 7 %-10 % (p/p) de agua, 7,5 %-10 % (p/p) de agua, 8 %-10 % (p/p) de agua, 8,5 %-10 % (p/p) de agua, 9 %-10 % (p/p) de agua, 9,5 %-10 % (p/p) de agua, >3 %-9 % (p/p) de agua, >3 %-9 % (p/p) de agua, >3 %-8,5 % (p/p) de agua, >3 %-8 % (p/p) de agua, >3 %-7,5 % (p/p) de agua, >3 %-7 % (p/p) de agua,

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

[000120] En algunas modalidades, el estabilizante térmico de la materia prima objeto comprende sacarosa o trehalosa o una combinación de trehalosa y sacarosa.

[000121] En otras modalidades, el estabilizante térmico de la materia prima objeto no comprende una molécula con una masa molecular mayor que 200 g/mol. En algunas modalidades, el estabilizante térmico de la materia prima objeto se selecciona del grupo que consiste en manitol, isoleucina, prolina y combinaciones de estos.

[000122] En otras modalidades, el estabilizante térmico de la materia prima objeto comprende trehalosa o sacarosa combinada con manitol, isoleucina o prolina.

[000123] En una modalidad, la materia prima objeto también contiene un amortiguador. Los amortiguadores preferidos incluyen fosfato, acetato e histidina. En una modalidad, la materia prima comprende 0,5 mM - 10 mM de un amortiguador.

[000124] En una modalidad, la materia prima objeto no contiene un amortiguador. En este caso, la materia prima se amortigua mediante la propia proteína objeto y el agua.

[000125] En una modalidad, la materia prima objeto también contiene un detergente no iónico. Los detergentes no iónicos incluyen

polisorbatos tales como polisorbato 20 y polisorbato 80. En una modalidad, el tensioactivo no iónico está presente en la materia prima a una concentración de 0,01 - 0,2 % (p/v).

[000126] En algunas modalidades, la materia prima objeto contiene la proteína objeto, uno o más de entre (i) amortiguadores, (ii) estabilizantes térmicos, (iii) y/o tensioactivos. En una modalidad, la solución acuosa contiene 2 - 200 mg/ml de la proteína, 0,5 - 2 % (p/v) de estabilizantes térmicos, 1 - 10 mM de amortiguadores y 0,005 - 0,3 % (p/v) de tensioactivos. En una modalidad específica, la solución acuosa comprende 50 mg/ml de la proteína, 2 % p/v de uno o más estabilizantes térmicos, amortiguador 10 mM y 0,015 % a 0,1 % p/v de uno o más tensioactivos no iónicos. En otra modalidad específica, la solución acuosa comprende 5 mg/ml de la proteína, 0,2 % p/v de uno o más estabilizantes térmicos, amortiguador 1 mM y 0,015 % a 0,1 % p/v de uno o más tensioactivos no iónicos.

[000127] En otra modalidad, las micropartículas de proteína que constituyen el polvo formadas a partir de la materia prima objeto se recubren posteriormente con un polímero biodegradable. En algunas modalidades, el polvo farmacéutico formulado objeto se encuentra en una suspensión en una solución de polímero. En una modalidad, la solución de polímero se forma al disolver el polímero en un polímero orgánico, tal como cloruro de metileno, tetrahidrofurano, acetato de etilo, diclorometano, etanol o algún otro solvente útil. El acetato de etilo se conoce como un solvente seguro y a menudo se utiliza en la preparación de fármacos, implantes y productos alimenticios.

[000128] En algunas modalidades, el polímero puede ser etilcelulosa ("EC"), ácido poliláctico ("PLA"), poliortoéster ("POE"), poli-D,L-lactida-co-glicolida ("PLGA") o poli-ε-caprolactona ("PCL"). En algunas modalidades, el polímero es ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), polietilenglicol reticulado (PEG), poli-D,L-

lactida-co-glicolida (PLGA), PLGA-etilen óxido fumarato, PLGA-alfa-tocoferil succinato esterificado como polietilenglicol 1000 (PLGA-TGPS), polianhídrido poli[1,6-bis(p-carboxifenoxi)hexano] (pCPH), ácido poli(hidroxbutírico-ácido cohidroxivalérico) (PHB-PVA), copolímero de polietilenglicol-ácido poli(láctico) (PEG-PLA), poli-ε-caprolactona (PCL), poli-alquil-ciano-acrilato (PAC), poli(etil)cianoacrilato (PEC), poliisobutil cianoacrilato, poli-N-(2-hidroxipropil)metacrilamida (poli(HPMA)), poli-β-R-hidroxi butirato (PHB), poli-β-R-hidroxi alcanato (PHA), ácido poli-β-R-málico, polímeros fosfolípido-colesterol, 2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina/ polietilenglicol-distearoilfosfatidiletanolamina (DOPC/PEG-DSPE)/Colesterol, polisacáridos, celulosa, etilcelulosa, metilcelulosa, alginatos, dextrano y polímeros de hidrogel de dextrano, amilosa, inulina, pectina y goma guar, quitosano, quitina, heparina, ácido hialurónico, polirotaxanos y polipseudorotaxanos a base de ciclodextrina (CD), poliaspartatos, poliglutamatos, polilucina, copolímeros de leucina-glutamato, succinato de polibutileno (PBS), gelatina, colágenos, fibrinas, fibroínas, poliortoésteres, copolímero poliortoéster-poliamidina, copolímeros poliortoéster-diamina, poliortoésteres que incorporan ácidos latentes, copolímero poli(etilenglicol)/poli(butilentereftalato) y combinaciones y copolímeros de estos.

[000129] El polímero puede disolverse en el solvente (por ejemplo, acetato de etilo) a una concentración de alrededor de 10 mg/mL a alrededor de 300 mg/mL (es decir, 1 % - 30 % [p/v]), de alrededor de 15 mg/mL a alrededor de 295 mg/mL, de alrededor de 20 mg/mL a alrededor de 290 mg/mL, de alrededor de 25 mg/mL a alrededor de 280 mg/mL, de alrededor de 30 mg/mL a alrededor de 270 mg/mL, de alrededor de 35 mg/mL a alrededor de 265 mg/mL, de alrededor de 40 mg/mL a alrededor de 260 mg/mL, de alrededor de 45 mg/mL a

alrededor de 260 mg/mL, de alrededor de 50 mg/mL a alrededor de 255 mg/mL, de alrededor de 55 mg/mL a alrededor de 250 mg/mL, alrededor de 20 mg/mL, alrededor de 25 mg/mL, alrededor de 30 mg/mL, alrededor de 35 mg/mL, alrededor de 40 mg/mL, alrededor de 45 mg/mL, alrededor de 50 mg/mL, alrededor de 75 mg/mL, alrededor de 100 mg/mL, alrededor de 125 mg/mL, alrededor de 150 mg/mL, alrededor de 175 mg/mL, alrededor de 200 mg/mL, alrededor de 225 mg/mL, o alrededor de 250 mg/mL. En una modalidad, la concentración del polímero en la alimentación interna del secador por aspersión es ≤ 10 % (p/v) y la concentración del polímero de la alimentación externa es ≤ 25 % (p/v).

[000130] El polvo de proteína formulado objeto luego se agrega a la solución de polímero a alrededor de 10 mg/mL a alrededor de 100 mg/mL, alrededor de 15 mg/mL a alrededor de 95 mg/mL, alrededor de 20 mg/mL a alrededor de 90 mg/mL, alrededor de 25 mg/mL a alrededor de 85 mg/mL, alrededor de 30 mg/mL a alrededor de 80 mg/mL, alrededor de 35 mg/mL a alrededor de 75 mg/mL, alrededor de 40 mg/mL a alrededor de 70 mg/mL, alrededor de 45 mg/mL a alrededor de 65 mg/mL, alrededor de 50 mg/mL a alrededor de 60 mg/mL, a alrededor de 25 mg/mL, a alrededor de 30 mg/mL, a alrededor de 35 mg/mL, a alrededor de 40 mg/mL, a alrededor de 45 mg/mL, o a alrededor de 50 mg/mL. El polvo y la solución de polímero se mezclan para formar una suspensión que luego se somete a dispersión y secado para formar el polvo farmacéutico formulado recubierto con polímero. La solución de polímero preferida contiene el polímero disuelto en un solvente que no disuelve las partículas de proteína suspendidas o sus excipientes. Por ejemplo, en las modalidades en las que el polvo contiene sacarosa como excipiente, no se prefiere etanol dado que la sacarosa puede disolverse en etanol y dejar la proteína en la partícula que es insoluble.

[000131] En una modalidad, el polvo y la suspensión de polímero se

somete a secado por aspersión, que se lleva a cabo en una manera similar al método para fabricar el polvo farmacéutico formulado objeto, pero con una temperatura de ingreso reducida (T_{in}) para proteger de la ignición del solvente orgánico o polímero. Por ejemplo, cuando el solvente orgánico es diclorometano, la T_{in} puede ser 40 °C; cuando el solvente es acetato de etilo, la T_{in} puede ser 77 °C; y cuando el solvente es etanol, la T_{in} puede ser 78 °C. En resumen, la suspensión de polvo y polímero se bombea en el secador por aspersión a una velocidad de alrededor de 0,5 mL/min a alrededor de 20 mL/min, alrededor de 1,2 mL/min, alrededor de 2,6 mL/min o alrededor de 12,5 mL/min. En una modalidad, se utiliza un secador por aspersión con boquilla de alimentación doble para rociar la suspensión. En una modalidad, la viscosidad de la solución polímero es < 20 cPoise a 20 °C. En una modalidad, la concentración de polímero en la alimentación interna es $\leq 10\%$ (p/v) y la concentración del polímero de la alimentación externa es $\leq 25\%$. En una modalidad, las micropartículas están suspendidas en la solución de polímero a < 10 % (p/v). En una modalidad, la T_{in} depende del solvente, por ejemplo, 40 °C para diclorometano, 77 °C para acetato de etilo y 78 °C para etanol. En una modalidad, la T_{ext} es menor que la temperatura de transición vítrea del polvo farmacéutico formulado objeto y depende de T_{in} , la velocidad de flujo, el solvente y el aspirador. En una modalidad, la $T_{m\acute{a}x}$ de la boquilla es < 150 °C. En una modalidad, la velocidad de flujo máxima del canal externo es alrededor de 1,2 mL/min y la velocidad de flujo máxima del canal interno es alrededor de 2,6 mL/min. En una modalidad, la potencia del sonicador del secador por aspersión es alrededor de 0,5 - 2 W y el aspirador está configurado a alrededor de 80 %.

[000132] El polvo farmacéutico formulado recubierto con polímero resultante contiene micropartículas de proteína constituyentes

rodeadas por una corteza de polímero. Dichas micropartículas de proteína recubiertas con polímero pueden tener una variedad de arquitecturas. En una modalidad, algunas micropartículas de proteína recubiertas con polímero contienen entre 1 y 50, entre 1 y 40, entre 1 y 30, entre 1 y 20, entre 1 y 10 o entre 1 y 5 micropartículas de proteína incrustadas en una única micropartícula de proteína recubierta con polímero. En algunas modalidades, una micropartícula de proteína recubierta con polímero individual contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 micropartículas de proteína. En algunas modalidades, el polvo farmacéutico formulado contiene una micropartícula de proteína recubierta con polímero modo con 1-2, 2-3 o 3-4 micropartículas de proteína.

[000133] En algunas modalidades, las micropartículas de proteína recubiertas con polímero tienen un intervalo de diámetro de alrededor de 2 μm a alrededor de 70 μm , alrededor de 5 μm a alrededor de 65 μm , alrededor de 10 μm a alrededor de 60 μm , alrededor de 15 μm a alrededor de 55 μm , alrededor de 20 μm a alrededor de 50 μm , alrededor de 15 μm , alrededor de 20 μm , alrededor de 25 μm , o alrededor de 30 μm . La variación de tamaño refleja en gran parte el espesor de la corteza de polímero, si bien el diámetro del núcleo de proteína puede contribuir en alguna medida a la variación del tamaño. Manipular la concentración de partida de la solución de polímero o el polímero en sí mismo puede ser útil para controlar el diámetro de la partícula con tamaño micrométrico final.

[000134] En algunas modalidades, el polvo farmacéutico formulado recubierto con polímero resultante se somete a un secado adicional (denominado también "secado secundario"). El secado adicional

incluye el horneado, la liofilización y el flujo de aire de nitrógeno. En otras modalidades, el polvo farmacéutico formulado recubierto con polímero resultante no se somete al secado adicional. En algunas modalidades, el polvo farmacéutico formulado recubierto con polímero resultante no se somete a un horneado posterior. En algunas modalidades, el polvo farmacéutico formulado recubierto con polímero resultante no se somete a una liofilización posterior. En algunas modalidades, el polvo farmacéutico formulado recubierto con polímero resultante no se somete al secado posterior mediante flujo de aire de nitrógeno.

[000135] Las micropartículas recubiertas con polímero de la invención en cuestión son útiles en la liberación en tiempo o la liberación prolongada de agentes terapéuticos de proteína. Por ejemplo, se contempla que las micropartículas de aflibercept son útiles en la liberación prolongada de aflibercept en el vítreo para el tratamiento de trastornos oculares vasculares o implantes subcutáneos para la liberación prolongada de trap VEGF para tratar el cáncer u otros trastornos.

[000136] La solicitud de patente estadounidense publicada n.º US 2013/0129830 A1, que se publicó el 23 de mayo de 2013 y la solicitud provisional estadounidense n.º 62/405,610, que se presentó el 7 de octubre de 2016, se incorporan a la presente en sus totalidades mediante referencia.

[000137] EJEMPLOS

[000138] Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la técnica una descripción completa de cómo usar y elaborar los métodos y composiciones de la invención, y no se pretende que limiten el alcance de lo que los inventores consideran es su invención.

[000139] Ejemplo 1: Parámetros de secado por aspersión

[000140] Se describe un método para producir un polvo farmacéutico formulado que contiene una proteína mediante el empleo de una etapa de secado por aspersión de una solución acuosa de materia prima que contiene la proteína. Una solución de materia prima que contiene 50 mg/mL de aflibercept, fosfato 10 mM (pH 6,2) y 2 % p/v de sacarosa se sometió a secado por aspersión mediante el uso de un minisecador por aspersión BUCHI B-290 (Flawil, CH). En este caso, la temperatura de entrada se varió de 100 °C a 130 °C en aumentos de 10 grados y el ECD de las partículas resultantes se determinó mediante MFI. Tal como se muestra en la Figura 1, la temperatura de entrada del gas de secado no afectó la distribución de tamaño ni la morfología de las micropartículas de proteína.

[000141] En cada temperatura de entrada, menos de uno por ciento de las partículas resultantes fueron mayores que 10 micrones de tamaño. La exposición transitoria a altas temperaturas y el enfriamiento por evaporación impidieron que la proteína de aflibercept se degradara durante el secado por aspersión.

[000142] Ejemplo 2: Estabilidad e integridad de la proteína

[000143] Se evaluó la integridad molecular de aflibercept en el polvo farmacéutico formulado posterior al secado por aspersión. El polvo de aflibercept reconstituido se comparó con una formulación de aflibercept líquida para inyección oftálmica y con la formulación de materia prima precursora que contenía aflibercept. La formulación oftálmica comprendía 40 mg/mL de aflibercept, 5 % (p/v) de sacarosa, 0,03 % (p/v) de polisorbato 20, NaCl 40 mM y fosfato 10 mM, pH 6,2. La formulación de materia prima previa al secado por aspersión y la formulación secada por aspersión reconstituida comprendían 50 mg/mL de aflibercept, 2 % (p/v) de sacarosa y fosfato 10 mM, pH 6,2. El aflibercept en el polvo farmacéutico

formulado posterior al secado por aspersión mantuvo su natividad y su potencia biológica (ver Tabla 5).

[000144] La estabilidad del aflibercept en el polvo secado por aspersión se evaluó mediante la medición de la formación de especies con alto peso molecular. La formación de especies con alto peso molecular (HMW) a 37 °C a los 3 meses, 6 meses y 12 meses, se determinó mediante SE-UPLC de la proteína reconstituida. El polvo de aflibercept secado por aspersión se incubó a 37 °C en condiciones secas y luego se reconstituyó a 50 mg/mL de aflibercept para su análisis. La velocidad de formación de las especies HMW se determinó mediante regresión lineal de la raíz cuadrada del tiempo para los puntos de tiempo recopilados hasta 3 meses, 6 meses o 12 meses a 37 °C. Los resultados, que se representan en la Tabla 6, indican que la velocidad de agregación del aflibercept secado por aspersión se encuentra dentro de parámetros farmacéuticamente aceptables.

TABLA 5: Integridad del aflibercept secado por aspersión

		Formulación oftálmica Aflibercept	Aflibercept previo al secado por aspersión	Aflibercept secado por aspersión reconstituido
% recuperación (RP-HPLC)		99	100	96
Pureza (SE-UPLC)	% natural	99,3	99,1	99,0
Análisis de variante de carga	% principal	79,5	79,9	79,8

(iCIEF)				
Pureza mediante SDS-PAGE (Sin reducir)	% principal	97,0	97,5	96,9
Pureza mediante SDS-PAGE (Reducido)	% principal	99,0	99,0	99,0
mDSC	T _{m1} (°C)	67,6	–	67,3
	T _{m2} (°C)	85,3	–	85,6
FTIR	% hélice α	8,3	–	8,3
	% lámina β	39,2	–	39,5
% potencia relativa (Bioensayo)		84	109	103

TABLA 6: Estabilidad del polvo formulado secado por aspersión de aflibercept

Tamaño de Partícula	Estabilizantes térmicos + Formulación base (50 mg/mL de aflibercept, fosfato 10mM, pH 6,2)	Velocidad de formación de especies HMW de aflibercept a 37 °C (% HMW/ $\sqrt{\text{mes}}$ mediante SE-UPLC)
5 μm	1 % p/v sacarosa	5,7 %
5 μm	2 % p/v sacarosa	3,7 %

Ejemplo 3: Estabilizantes térmicos

[000145] Se mostró que agregar excipientes a la materia prima mejoró la estabilidad térmica de la proteína microparticulada. Aflibercept secado por aspersión y liofilizado (es decir, partículas de 2,5 micrones elaboradas a partir de 5 mg/mL de materia prima de aflibercept) se incubaron a 50 °C en condiciones secas y se reconstituyeron a 5 mg/mL de aflibercept para su análisis. Los resultados se describen en la Tabla 7. La fluidez del polvo de las formulaciones que contenían manitol e isoleucina pareció similar a la fluidez de las formulaciones que contenían únicamente sacarosa o trehalosa. La inclusión de manitol e isoleucina mejoró la estabilidad térmica de las formulaciones secadas por aspersión que comprendían las partículas más pequeñas, es decir, de 2,5 µm.

15 Tabla 7: Estabilidad térmica de micropartícula de proteína de 2,5 micrones

Formato	Tamaño de Partícula	Estabilizantes térmicos + Formulación base (5 mg/mL de aflibercept, fosfato 1 mM, pH 6,2)	Velocidad de formación de especies HMW de aflibercept a 50 °C (% HMW/√mes mediante SE-UPLC)
Secado por aspersión	2,5 µm	0,2 % p/v sacarosa	8,5 %
Secado por aspersión	2,5 µm	0,2 % p/v de trehalosa	8,8 %
Secado por aspersión	2,5 µm	0,1 % p/v sacarosa 0,05 % p/v de manitol	5,9 %

		0,05 % p/v de Ile	
Secado por aspersión	2,5 µm	0,1 % p/v de trehalosa 0,05 % p/v de manitol 0,05 % p/v de Ile	5,7 %
Secado por aspersión	2,5 µm	0,1 % p/v de manitol 0,1 % p/v de Ile	7,0 %

Ejemplo 4: Tamaño y forma de la partícula

[000146] Se evaluó la temperatura de entrada de boquilla, la inclusión de tensioactivos, la concentración del soluto de aflibercept y la inclusión de estabilizantes térmicos con respecto a su efecto en el tamaño o forma de la partícula. La concentración de proteína y la inclusión de tensioactivo resultaron en micropartículas más pequeñas - y en el caso del tensioactivo, más redondas. Estos resultados se resumen en la Tabla 8.

Tabla 8: Tamaño y forma de la partícula

Parámetro de secado por aspersión	Efecto en el tamaño de la partícula	Efecto en la morfología de la partícula	Efecto en la estabilidad de la proteína
Temperatura de entrada (110-130 °C)	Ninguno	Ninguno	Ninguno
+ Polisorbato 20 (<0,1 % p/v)	Disminuyó	Más esférica	Ninguno

↓ Concentración de soluto	Disminuyó	Ninguno	Aumentaron las especies HMW (~0,3 %) después del secado por aspersión
+ Estabilizante térmico	Ninguno	Ninguno	Disminución de velocidad de formación de HMW en condiciones de estrés térmico secas. La magnitud depende de la cantidad y el tipo de estabilizante térmico.

[000147] Tal como se describió en el Ejemplo 1, la temperatura de entrada se varió de 100 °C a 130 °C en aumentos de diez grados y el ECD de las partículas resultantes se determinó mediante MFI. Tal como se muestra en la Figura 1, la temperatura de entrada del gas de secado no afectó la distribución de tamaño de partícula ni la morfología. En cada temperatura de entrada, menos de uno por ciento de las partículas resultantes fueron mayores que 10 micrones de tamaño.

[000148] La adición de 0,03 %-0,1 % p/v de polisorbato 20 a la materia prima produjo más partículas pequeñas cuando se secó por aspersión en comparación con las soluciones de materia prima que no contenían polisorbato 20 (Figura 2). El polvo de formulaciones que contenían más de 0,1 % p/v de polisorbato 20 presentó más aglomerados y era menos fluido (es decir, más pegajoso). Los polvos de bajo flujo son difíciles de manipular en procesos posteriores.

Por lo tanto, se prefieren las formulaciones que contienen menos de 0,1 % p/v de polisorbato 20. También se descubrió que la adición de 0,03 % p/v de polisorbato 20 a la solución de materia prima produce partículas más esféricas (es decir, una relación de aspecto mayor [eje menor/eje mayor]) cuando se secó por aspersión (ver Figura 3).

[000149] Una concentración de soluto menor en la solución de materia prima redujo el tamaño de partícula de aflibercept secado por aspersión a alrededor de 2,5 μm (en comparación con 5 μm). El método de secado por aspersión que usa 50 mg/mL de aflibercept, fosfato 10 mM (pH 6,2), 2 % de sacarosa (p/v) como la solución de materia prima produjo partículas de ~5 μm de diámetro. Disminuir la concentración de soluto de 10x en la solución de materia prima (es decir, 5 mg/mL de aflibercept, fosfato 1 mM, [pH 6,2], 0,2 % de sacarosa [p/v]) redujo a la mitad el tamaño de micropartícula de proteína a ~2,5 μm (ver Figura 4). Esto representa una disminución de 8 veces en el volumen de la partícula (2³). Secar por aspersión la materia prima más diluida necesitó 10 veces más de tiempo (~1 h/g) para producir la misma cantidad de polvo que las formulaciones de mayor concentración. La mayor relación de superficie y volumen de las micropartículas de proteína más pequeñas junto con una exposición más prolongada a la temperatura de salida durante el secado por aspersión puede esforzar la proteína y en alguna medida comprometer la estabilidad.

25 Ejemplo 5: Recubrimiento con polímero

[000150] Las micropartículas de proteína de la presente invención pueden recubrirse con un polímero. Este proceso puede denominarse "recubrimiento por pulverización". En resumen, un poliortoéster se disolvió en diclorometano, acetato de etilo o etanol a una viscosidad de alrededor de < 20 cP a 20 °C. Dado que se utilizó una boquilla de alimentación doble (minisecador por aspersión BUCHI B-

290 (Flawil, CH)), la concentración de polímero en la alimentación interna fue ≤ 10 % (p/v) y en la alimentación externa ≤ 25 % (p/v). Las micropartículas se suspendieron en la solución de polímero en menos de 10 % p/v. La T_{in} fue 40 °C cuando el solvente fue diclorometano, 77 °C cuando el solvente fue acetato de etilo y 78 °C cuando el solvente fue etanol. La T_{ext} se mantuvo por debajo de la temperatura de transición vítrea (T_g) mediante el uso de una camisa térmica rellena con hielo en circulación para enfriar el ciclón. La T_{ext} dependió de T_{in} , la velocidad de flujo, la naturaleza del solvente y el aspirador. La $T_{m\acute{a}x}$ de la boquilla se mantuvo debajo de 150 °C. Las velocidades de flujo máximas del canal externo y del canal interno de la boquilla de alimentación doble fueron 1,2 mL/min y 2,6 mL/min, respectivamente. La potencia del sonicador fue de 0,5 W a 2 W; y el aspirador se configuró a 80 %.

[000151] Se observó un cambio significativo en la distribución de tamaño de las partículas más grandes después del recubrimiento por pulverización de las micropartículas de proteína con poliortoéster (POE) mediante MFI (ver Figura 5).

Ejemplo 6: Comparación de la especificación de proteína

[000152] La proteína (aflibercept) de las micropartículas de proteína reconstituidas (Recon DP) se comparó con la proteína previa al secado por aspersión (Pre-SD FDS) y aflibercept se prepararon como una formulación líquida (EYLEA® DP) para determinar efectos perjudiciales del secado por aspersión. En un experimento, cada una de las tres formulaciones se sometió a velocidad de sedimentación - ultracentrifugación analítica (SV-AUC). Este método se utiliza para detectar y cuantificar los agregados de proteína (ver Arthus et ál., "Detection of protein aggregates by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation (SV-AUC): sources of variability and

their relative importance," 98(10) J. Pharm. Sci. 3522-39, 2009). La SV-AUC mostró que todos los lotes son comparables en términos de las especies HMW (Tabla 9). EYLEA® DP puede tener un contenido agregado ligeramente menor, mientras que aflibercept secado por aspersión reconstituido puede tener agregados modificados a especies más grandes. Dada la variabilidad entre muestras duplicadas, ninguna de esas tendencias es claramente significativa y, en general, estos resultados no proporcionan pruebas claras o convincentes de que las tres muestras no sean comparables.

Tabla 9: Agregación de proteína determinada por SV-AUC

	Coeficiente de sedimentación de monómero, S (Media $\pm$ SD)	% dímero putativo (7,5-8,0 S) (Media $\pm$ SD)	% agregados total (Media $\pm$ SD)
EYLEA® DP	5,161 $\pm$ 0,004	1,3 $\pm$ 0,7	1,7 $\pm$ 1,2
Pre-SD FDS	5,181 $\pm$ 0,014	1,5 $\pm$ 0,5	2,2 $\pm$ 1,2
Recon DP	5,174 $\pm$ 0,002	1,5 $\pm$ 0,5	2,3 $\pm$ 1,2

[000153] En otro experimento, cada una de las tres formulaciones se sometió a cromatografía de exclusión por tamaño - dispersión de luz láser en ángulos múltiples (SEC-MALLS). Este método también se utiliza para detectar y cuantificar los agregados de proteína así como proteínas con mal plegamiento (ver P. J. Wyatt, "Light scattering and the absolute characterization of macromolecules," 272 Anal. Chim. Acta 1-40, 1993; Odaka et ál., "Ligand-Binding Enhances the Affinity of Dimerization of the Extracellular Domain of the Epidermal Growth Factor Receptor1," 122 J. Biochem. 116-121, 1997; J. S. Philo, "Is any measurement method optimal for all aggregate sizes and types?" 8(3) AAPS J. E564-71, 2006). SEC-MALLS

mostró que todos los lotes eran comparables con respecto a los porcentajes de área pico y la masa calculada para cada especie (ver Tabla 10).

5 Tabla 10: Agregación de proteína determinada por SEC-MALLS

Muestra	Pico 1 (HMW)		Pico 2 (Principal - Natural)	
	MW (kDa)	% área pico	MW (kDa)	% área pico
EYLEA® DP	264,2 (0,0)	1,0 (0,4)	119,6 (1,0)	99,0 (0,0)
Pre-SD FDS	264,9 (3,0)	0,5 (0,0)	119,9 (0,0)	99,5 (0,0)
Recon DP	268,1 (6,0)	1,2 (0,0)	120,4 (1,0)	98,8 (0,0)

[000154] Las tres formulaciones de aflibercept se sometieron también a electroforesis capilar (CE)-obtención de la huella genética de oligosacárido (ver Chen et ál., "Profiling glycoprotein n-linked oligosaccharide by capillary electrophoresis," 19(15) Electrophoresis 2639-44, 1998) y la obtención de huella genética de fragmento triptico mediante cromatografía líquida de ultrarendimiento - espectroscopía de masas (UPLC-MS) (ver Sinha et ál., "Comparison of LC and LC/MS methods for quantifying N-glycosylation in recombinant IgGs," 19(11) J. Am. Soc. Mass. Spectrom. 1643-54, 2008) para evaluar la glicosilación y otras modificaciones postraduccionales, así como la secuencia primaria. CE-obtención de la huella genética de oligosacárido mostró que todos los lotes son comparables (Tabla 11).

20 Tabla 11: Modificaciones postraduccionales

Modificaciones postraduccionales		EYLEA® DP	Pre-SD FDS	Recon DP
Péptidos de	Sin Lys ⁴³²	96,2 %	96,4 %	96,5 %

extremo C con y sin Lys ⁴³²	Con Lys ⁴³²	3,8 %	3,6 %	3,5 %
Nivel de desamidación (isoAsp) en motivo de Asn ⁸⁴ -Gly	Asn ⁸⁴	78,9 %	79,5 %	79,3 %
	isoAsp ⁸⁴	21,1 %	20,5 %	20,7 %
Nivel de oxidación en Met ¹⁰	Met ¹⁰	97,6 %	97,5 %	97,0 %
	Met (O) ¹⁰	2,4 %	2,5 %	3,0 %
Nivel de oxidación en Met ¹⁹²	Met ¹⁹²	96,6 %	96,6 %	96,4 %
	Met (O) ¹⁹²	3,4 %	3,4 %	3,6 %
Nivel de oxidación en Met ²³⁷	Met ²³⁷	97,2 %	97,2 %	97,2 %
	Met (O) ²³⁷	2,8 %	2,8 %	2,8 %
Nivel de péptido DYLTHR (relacionado con la banda NR1)	⁹¹ DYLTHR ⁹⁶	0,29 %	0,34 %	0,33 %
Glicación de péptido de extremo N en Arg ⁵	Extremo N modificado	9,2 %	9,0 %	9,0 %
Nivel de no	Glicosilado	64,3 %	63,8 %	64,6 %

glicosilación Asn ⁶⁸	No glicosilado	35,7 %	36,2 %	35,4 %
------------------------------------	-------------------	--------	--------	--------

[000155] Los cromatogramas de mapa peptídico en condiciones reductoras y no reductoras fueron visualmente comparables entre las tres muestras de aflibercept. No se observaron picos únicos o
 5 significativos que correspondieran a las secuencias mutadas en la muestra secada por aspersión. Todas las modificaciones postraduccionales estaban presentes en todas las muestras: remoción de lisina en extremo C, desamidación de asparagina, oxidación de metionina y glicación de asparagina. Los perfiles de glicosilación
 10 específicos al sitio en los sitios de glicosilación enlazados a 5N se muestran en las tres muestras. Los patrones de los péptidos enlazados con disulfuro en las tres muestras se ajustan a los patrones de unión de disulfuro esperados para aflibercept. No se identificaron niveles significativos de péptidos que contenían
 15 cisteína libres o desalineados en los mapas peptídicos sin reducir en las tres muestras analizadas. Los análisis de mapa peptídico de aflibercept secado por aspersión se ajustaron al estándar de referencia EYLEA® DP.

20 Ejemplo 7: Efecto de la humedad en la estabilidad de la proteína en polvos farmacéuticos formulados

[000156] Se elaboraron formulaciones secadas por aspersión de tres proteínas diferentes de acuerdo con el proceso establecido en el Ejemplo 1. Se elaboraron cuatro polvos formulados para cada una de
 25 las tres proteínas con diversas cantidad de humedad. Las tres proteínas fueron una molécula IgG1, IgG4 y una molécula trap (aflibercept). Cada polvo de aflibercept contenía 83,8 % (p/p) de aflibercept, 2,1 % (p/p) de fosfato y 14,1 % (p/p) de sacarosa con cantidades de agua que variaban de < 0,5 % a > 6 %. Cada polvo IgG1

contenía 80,9 % (p/p) de IgG1, 1,5 % (p/p) de histidina, 16,4 % (p/p) de sacarosa y 0,2 % de polisorbato 80 con cantidades de agua que variaban de < 0,5 % a > 6 %. Cada polvo de IgG4 contenía 44,5 % (p/p) de IgG1, 0,4 % (p/p) de acetato, 56,3 % (p/p) de sacarosa y 0,4 % de polisorbato 20 con cantidades de agua que variaban de < 0,5 % a > 6 %.

[000157] Los polvos se almacenaron a 50 °C durante hasta 6 semanas. Las muestras se obtuvieron a las tres semanas, un mes y seis semanas. Se reconstituyeron las muestras y se evaluaron las proteínas con respecto al cambio en las especies con alto peso molecular mediante SE-UPLC. La velocidad de agregación se calculó en función de los valores HMW obtenidos de las muestras reconstituidas. Los resultados se presentan en la Tabla 12.

Tabla 12: Efecto de la humedad en el polvo farmacéutico formulado en la estabilidad de proteína

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

