(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 604 837**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 47/34 (2006.01)
A61K 9/10 (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.01.2013** **PCT/EP2013/051907**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **08.08.2013** **WO13113820**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.01.2013** **E 13705737 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.08.2016** **EP 2809344**

(54) Título: **Formulación de liberación sostenida que contiene anticuerpos para administración ocular**

(30) Prioridad:

02.02.2012 US 201261594099 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.03.2017

(73) Titular/es:

ESBATECH - A NOVARTIS COMPANY LLC (100.0%)
Wagistrasse 21
8952 Schlieren, CH

(72) Inventor/es:

GRIMSHAW, JOHN;
ASMUS, LUTZ;
MÖLLER, MICHAEL y
GURNY, ROBERT

(74) Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 604 837 T3

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

DESCRIPCIÓN

Formulación de liberación sostenida que contiene anticuerpos para administración ocular

Referencia cruzada a solicitud relacionada

Esta solicitud reivindica prioridad en virtud de 35 U.S.C. §119 sobre la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 61/594,099 presentada el 2 de febrero de 2012, cuyo contenido completo se incorpora al presente documento como referencia.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a formulaciones farmacéuticas de liberación sostenida para administrar proteínas al ojo. En particular, la invención se refiere a formulaciones que comprenden anticuerpos de cadena sencilla y el poliéster hidrófobo poli(ácido láctico) sustituido con hexilo (hexPLA). La invención se refiere además a procedimientos para la producción de formulaciones farmacéuticas de liberación sostenida y a los usos médicos de las mismas.

Antecedentes de la invención

En los últimos años se han investigado y comercializado varios productos farmacéuticos intravítreos de liberación sostenida para moléculas pequeñas. Los implantes iniciales que administraban ganciclovir (Vitrasert®) y fluocinolona (Retisert®) mostraban largos periodos de liberación pero no eran biodegradables (Musch *et al*., 1997, New England Journal of Medicine 337:83; Jaffe *et al*., 2005, Ophthalmology 112:119). Se notificaron varios efectos adversos, problemas con el material y problemas quirúrgicos cuando se retiraban los implantes del ojo (Martin *et al*., 1997, Arch Ophthalmol-Chic 115:1389; Boyer *et al*., 1999, Am J Ophthalmol 127:349). Por tanto, el interés se trasladó hacia implantes biodegradables.

Los implantes degradables aprobados actualmente para la aplicación intravítrea (Ozurdex®) se basan en poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) y liberan dexametasona durante aproximadamente 6 meses (Kuppermann *et al*., 2007, Arch Ophthalmol-Chic 2007, 125:309). Para la preparación de los implantes de PLGA, se usa presión, calor, disolventes o una combinación de los mismos para incorporar el principio activo y para formar el implante (Kimura *et al*., 2001, Ophthalmologica 215:143). Esto implica problemas para la formulación de proteínas debido a su estabilidad intrínsecamente más baja en comparación con muchas moléculas pequeñas.

Una posible solución al problema de formulación de proteínas para liberación sostenida podría ser el uso de excipientes viscosos en lugar de implantes sólidos. Estos pueden mezclarse simplemente con la proteína liofilizada para formar la formulación final. Poli(orto-ésteres) (POE) de tercera generación fueron los primeros líquidos poliméricos, viscosos investigados hacia la liberación intravítrea sostenida (Einmahl *et al*., 2000, J Biomed Mater Res 50:566). Pero debido a la falta de estabilidad en almacenamiento (Merkli *et al*., 1996, Biomaterials 17:897), dificultades con la capacidad de esterilización (Sintzel *et al*., 1998, International Journal of Pharmaceutics 175:165) y dificultades en la síntesis y el aumento de la dosis (Behar-Cohen *et al*., 2006, Advanced Drug Delivery Reviews 58:1182), pronto les siguió una nueva generación de POE.

Los POE de cuarta generación (POE IV) eran más fáciles de sintetizar y fue posible un control de la velocidad de degradación ajustando la razón de los monómeros usados (Gurny *et al*., 1998, Biomaterials 19:791). Los POE IV se evaluaron hasta un estudio clínico de fase II y mostraron buena biocompatibilidad en el ojo humano (Behar-Cohen *et al*., 2006, Advanced Drug Delivery Reviews 58:1182). Sin embargo, su periodo de degradación *in vivo* era mucho más largo que el periodo de liberación del fármaco, trasladando el interés hacia nuevas entidades poliméricas líquidas para la administración de liberación sostenida en el ojo. En consecuencia, existe la necesidad de formulaciones y sistemas de administración de liberación sostenida mejorados para administrar proteínas para tratar enfermedades oculares.

El documento WO2011/015634 da a conocer una formulación de liberación controlada de muteína de lipocalina en la que podría usarse poli(ácido láctico) sustituido con hexilo como polímero. Los documentos WO00/402 y AU 775 778 revelan composiciones que contienen anticuerpos de cadena sencilla.

Sumario de la invención

La invención proporciona formulaciones farmacéuticas de liberación sostenida, que comprenden un fragmento de anticuerpo de cadena sencilla Fv (scFv) y el poliéster hidrófobo poli(ácido láctico) sustituido con hexilo (hexPLA). En un aspecto, una formulación de la invención es para la administración ocular a un sujeto que lo necesita.

En determinados aspectos, una formulación de la invención comprende un scFv presente a un peso molecular final de al menos aproximadamente el 1,25% (p/p).

En otros aspectos, una formulación de la invención comprende hexPLA presente en una concentración de al menos aproximadamente 1500 g/mol.

En un aspecto, se proporciona un depósito intravítreo de liberación sostenida que comprende la formulación de la invención.

En otro aspecto, la invención proporciona un sistema de administración que comprende la formulación farmacéutica de liberación sostenida de un scFv y hexPLA y una jeringa.

La invención proporciona además un procedimiento para la preparación de una formulación farmacéutica de liberación sostenida, comprendiendo el procedimiento someter a criomolienda una scFv y el poliéster hidrófobo poli(ácido láctico) sustituido con hexilo (hexPLA). En determinados aspectos, el procedimiento comprende además calentar la formulación hasta temperatura ambiente a vacío.

La invención también proporciona métodos de tratamiento de un trastorno ocular en un paciente, que comprenden administrar al paciente una cantidad eficaz de la formulación farmacéutica de liberación sostenida de un scFv y hexPLA.

Además, la invención proporciona una formulación de anticuerpo de cadena sencilla estable, que comprende un anticuerpo de cadena sencilla y poli(ácido láctico) sustituido con hexilo (hexPLA), en la que el anticuerpo de cadena sencilla es estable a 37ºC.

Realizaciones preferidas específicas de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción más detallada de determinadas realizaciones preferidas y las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra imágenes de microscopía óptica de una formulación que contiene ESBA903 al 1,25% en hexPLA de 2500 g/mol formulado tras someter a criomolienda.

La figura 2A muestra el cambio en la viscosidad de formulaciones de ESBA903-hexPLA con temperatura creciente y la dependencia de la viscosidad del peso molecular del polímero a una carga de fármaco constante del 2,5%.

La figura 2B muestra el cambio en la viscosidad de formulaciones de ESBA903-hexPLA con temperatura creciente y la dependencia de la viscosidad de la carga de fármaco a un peso molecular constante de 2500 g/mol.

La figura 3A muestra un cromatograma de SEC-HPLC de la referencia de ESBA903.

La figura 3B muestra un cromatograma de SEC-HPLC de ESBA903 tras la extracción de una formulación con hexPLA que se había preparado mediante criomolienda.

La figura 4 muestra la formulación de ESBA903-hexPLA en tampón citrato formando un depósito de gotitas esférico.

La figura 5A muestra la liberación acumulativa de ESBA903 de formulaciones con cargas de fármaco de entre el 1,25% y el 5,0% y un peso molecular de hexPLA de 2500 g/mol.

La figura 5B muestra la liberación del monómero de ESBA903 por día de formulaciones con cargas de fármaco de entre el 1,25% y el 5,0% y un peso molecular de hexPLA de 2500 g/mol.

La figura 6A muestra la liberación acumulativa de ESBA903 de formulaciones con carga de fármaco al 2,5% y diferentes pesos moleculares de hexPLA de entre 1500 g/mol y 5000 g/mol.

La figura 6B muestra la liberación del monómero de ESBA903 por día de formulaciones con carga de fármaco al 2,5% y diferentes pesos moleculares de hexPLA de entre 1500 g/mol y 5000 g/mol.

La figura 7A muestra la liberación acumulativa de ESBA903 de 50 mg y 25 mg de formulación que contiene ESBA903 al 2,5% en hexPLA de 2500 g/mol.

La figura 7B muestra la liberación del monómero de ESBA903 por día de 50 mg y 25 mg de formulación que contiene ESBA903 al 2,5% en hexPLA de 2500 g/mol.

La figura 8 muestra la disminución de concentración del monómero de ESBA903 en tampón citrato en presencia de ácido 2-hidroxioctanoico almacenado a 37ºC a lo largo de 10 semanas.

La figura 9 muestra SDS-PAGE de muestras de liberación de formulaciones de ESBA903-hexPLA tras 14 semanas en comparación con una referencia de ESBA903.

Descripción detallada de la invención

I. Formulación de liberación sostenida

La invención proporciona una formulación de anticuerpo de cadena sencilla estable, que comprende un anticuerpo de cadena sencilla y poli(ácido láctico) sustituido con hexilo (hexPLA), en la que el anticuerpo de cadena sencilla es estable a 37ºC. La invención también proporciona formulaciones farmacéuticas de liberación sostenida de anticuerpos de cadena sencilla y hexPLA. Las formulaciones son estables, con alta concentración de proteínas y una baja viscosidad. Tal como se describe en el presente documento, sorprendentemente los anticuerpos de cadena sencilla son estables en matrices de hexPLA, y pueden liberarse de las matrices de manera sostenida.

Una formulación “estable” dentro del significado de la invención es una en que el anticuerpo en la misma conserva esencialmente su estabilidad e integridad físicas y químicas tras el almacenamiento. Se dispone en la técnica de diversas técnicas analíticas para medir la estabilidad de las proteínas. La estabilidad puede medirse a una temperatura seleccionada durante un periodo de tiempo seleccionado. La estabilidad química puede medirse, por ejemplo, mediante cromatografía en fase inversa (RP), por ejemplo mediante RP-HPLC tras digestión con tripsina. Por ejemplo, tras el almacenamiento de al menos 1 año a aproximadamente 4ºC, el pico que representa el anticuerpo de cadena sencilla no modificado en RP-HPLC tras digestión con tripsina disminuye en no más del 20%, preferiblemente en no más del 10%, más preferiblemente en no más del 5% o incluso en no más del 1%, en comparación con la suspensión del anticuerpo de cadena sencilla antes del almacenamiento. Tal como apreciará fácilmente el experto en la técnica, hay otros métodos adecuados para medir la estabilidad de las suspensiones de la invención. Por ejemplo, la estabilidad química también puede medirse mediante electroforesis capilar.

En los ejemplos en el presente documento se describen determinadas técnicas para medir la estabilidad.

La viscosidad de una formulación estable de la invención a temperatura ambiente es lo suficientemente baja como para permitir la aplicación a través de ajugas estrechas (por ejemplo, una aguja 27 G). Preferiblemente, la viscosidad es de aproximadamente 100 Pa x s o inferior. Más preferiblemente, la viscosidad es de aproximadamente 38 Pa x s o inferior. Una formulación de la invención es adecuada para inyección a temperatura ambiente o a temperaturas ligeramente más calientes (por ejemplo, 25ºC). No son necesarios excipientes (por ejemplo, disolventes o plastificantes) adicionales para la aplicación de una formulación de la invención, pero pueden incluirse si se desea.

Una formulación farmacéutica de “liberación sostenida” dentro del significado de la invención es una en que el anticuerpo de cadena sencilla en la misma está protegido a lo largo de un periodo prolongado de la degradación o la eliminación, y se administra localmente a un sitio particular o compartimento corporal disminuyendo así la exposición sistémica global. Preferiblemente, el periodo prolongado es de al menos 6 semanas y de hasta 14 semanas o más (es decir, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o más semanas). Tras la exposición a un entorno acuoso, tal como se describe en el presente documento, el anticuerpo de cadena sencilla se libera lentamente de la formulación de la invención.

En una realización, una formulación de la invención se administra mediante inyección intraocular, tal como inyección intravítrea, a un paciente que lo necesita. En el ojo, una formulación de la invención forma un depósito intravítreo de liberación lenta, del que se libera lentamente el anticuerpo de cadena sencilla a lo largo de un periodo de tiempo prolongado.

La concentración (es decir, la carga de fármaco) del anticuerpo de cadena sencilla en una formulación de la invención es de al menos aproximadamente el 1,0% (p/p), y preferiblemente mayor del 1,0% (un experto en la técnica puede determinar fácilmente una concentración deseada, que puede ser de hasta aproximadamente el 15% o mayor, por ejemplo, el 1,0%, el 1,25%, el 1,50%, el 1,75%, el 2,0%, el 2,25%, el 2,5%, el 2,75%, el 3,0%, el 3,25%, el 3,5%, el 3,75%, el 4,0%, el 4,25%, el 4,5%, el 4,75%, el 5,0%, el 7,5%, el 10%, el 12,5%, el 15%, o mayor), teniendo hexPLA un peso molecular de al menos aproximadamente 1500 g/mol, (por ejemplo, 1500 g/mol, 2000 g/mol, 2500 g/mol, 3000 g/mol, 3500 g/mol, 4000 g/mol, 4500 g/mol, 5000 g/mol, o mayor). Preferiblemente, el peso del polímero es suficiente para mantener una formulación de la invención en forma estable (por ejemplo, una forma esférica) cuando se mezcla con un anticuerpo de cadena sencilla, de manera que la formulación se establecerá en el fondo de un ojo tras la inyección al ojo, no influyendo así en la trayectoria de visión. En determinadas realizaciones, pueden incluirse plastificantes tal como se conoce en la técnica en una formulación de la invención. En determinadas realizaciones, pueden incluirse plastificantes en una formulación de la invención. En tales situaciones, un experto en la técnica reconocerá que el peso molecular del hexPLA para su uso en una

formulación de la invención no tiene límite específico (por ejemplo, el hexPLA puede tener un peso molecular mucho mayor de 5000 g/mol).

Para la administración a un sujeto, pueden seleccionarse diferentes tamaños de gotitas de formulación, dependiendo de la cantidad de anticuerpo de cadena sencilla deseado para un uso particular. En determinadas realizaciones, la masa de formulación para la administración a un sujeto es de 1,0 mg a aproximadamente 100 mg. En una realización preferida, la masa de formulación es de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 100 mg.

El término “anticuerpo”, “anticuerpo de cadena sencilla”, o “scFv” tal como se usa en el presente documento pretende referirse a una molécula que comprende un dominio variable de cadena pesada de anticuerpo (o región; V_H) y un dominio variable de cadena ligera de anticuerpo (o región; V_L) conectados mediante un ligador. Tales moléculas de scFv pueden tener las estructuras generales: NH_2-V_L-ligador-V_H-COOH o NH_2-V_H-ligador-V_L-COOH.

En una realización, el anticuerpo de cadena sencilla es ESBA903, (tal como se define en el documento WO 2009/155724, cuyo contenido completo se incorpora al presente documento como referencia), que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1:

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASEIIHSWLAWYQQKPGKAPKLLIYLASTLASGVPSRFSGSGSGAEFT

LTISSLQPDDFATYYCQNVYLASTNGANFGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGG

GLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIDPDDDPYYATWAKGRFTISRDTSKN

TVYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGTLVTVSS.

II. Dispositivos

La formulación de la invención puede usarse, por ejemplo, con ampollas, viales, jeringas precargadas o sistemas de administración múltiple convencionales. En determinadas realizaciones, una formulación de la invención se administra mediante inyección al tejido ocular tal como inyecciones perioculares, conjuntivales, subtenónicas, intracamerales, intravítreas, intraoculares, subretinianas, subconjuntivales, retrobulbares o intracanaliculares. En una realización preferida, la formulación se administra al paciente mediante administración intravítrea. Por ejemplo, para tales fines, la formulación puede inyectarse usando una jeringa. Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención también proporciona un sistema de administración que contiene la formulación líquida seleccionada del grupo de jeringas de inyección de uso único.

En determinadas realizaciones, un sistema de administración comprende un recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales (por ejemplo viales de doble cámara), jeringas (tales como jeringas de doble cámara) y tubos de ensayo. El recipiente puede estar formado de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene la formulación y la etiqueta en, o asociada con, el recipiente puede indicar orientaciones para su uso. La etiqueta puede indicar por ejemplo que la formulación es útil o se desea para administración intravítrea. El recipiente que contiene la formulación puede ser un vial de múltiples usos, que permite administraciones repetidas (por ejemplo 2-6 administraciones) de la formulación.

Por consiguiente, también se proporciona el uso de la formulación según la invención para la producción de un sistema de administración para su uso en el tratamiento de una enfermedad.

En otra realización de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene la formulación de la presente invención y proporciona instrucciones para su uso. Por tanto, se proporciona un artículo de fabricación en el presente documento que comprende: a) un recipiente que contiene una formulación concentrada de un anticuerpo de cadena sencilla y hexPLA; y b) instrucciones para su uso.

El artículo de fabricación puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones para su uso.

IV. Procedimientos para la preparación

La invención también proporciona un procedimiento para preparar una formulación de liberación sostenida que comprende un anticuerpo de cadena sencilla y hexPLA.

El derivado de poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido láctico) sustituido con hexilo (hexPLA; poli(ácido 2-hidroxioctanoico)), en el que todos los grupos metilo a lo largo de la estructura principal de PLA están sustituidos con grupos hexilo, es un líquido viscoso a temperatura ambiente. Puede sintetizarse mediante polimerización por apertura de anillo (Trimaille *et al*., 2004, Journal of Polymer Science Part A-Polymer Chemistry 42:4379) así como mediante policondensación química sostenible (Asmus *et al*., 2011, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 79:584). La preparación de hexPLA se describe en los ejemplos en el presente documento. HexPLA es estable en condiciones de estilización con calor seco y las formulaciones con moléculas lipófilas pequeñas liberaron el compuesto activo a lo largo de varias semanas.

Antes de la formulación, el anticuerpo de cadena sencilla para la formulación preferiblemente se liofiliza tal como se describe en el presente documento. La liofilización puede llevarse a cabo usando técnicas bien conocidas en la técnica.

En determinadas realizaciones, se prepara una formulación de la invención mediante criomolienda. Por ejemplo, la proteína de anticuerpo de cadena sencilla liofilizada y el polímero de hexPLA se congelan lentamente hasta -80ºC y se muelen juntos en un molino criogénico SPEX 6700 (SPEX Industries, Edison, EE.UU.) bajo nitrógeno líquido durante 5 minutos. El procedimiento de criomolienda reduce simultáneamente el tamaño de partícula del compuesto sólido y lo dispersa homogéneamente en la matriz de polímero para formar una formulación en suspensión. En determinadas realizaciones, tras la molienda, la formulación se calienta lentamente hasta temperatura ambiente en condiciones adecuadas para evitar la condensación de agua en el producto (por ejemplo, vacío, gas inerte o cilindros cerrados herméticamente). En otras realizaciones, el mezclado de un anticuerpo de cadena sencilla y hexPLA se lleva a cabo a una temperatura a la que la proteína de cadena sencilla liofilizada es estable, preferiblemente a temperaturas por debajo de temperatura ambiente, preferiblemente en condiciones enfriadas, preferiblemente a temperaturas por debajo del punto de transición vítrea del polímero de hexPLA, preferiblemente en criomolienda.

Se proporciona además un procedimiento para preparar una formulación de liberación sostenida que comprende un anticuerpo de cadena sencilla y hexPLA para aplicaciones terapéuticas, en el que: se liofiliza un anticuerpo de cadena sencilla, y el anticuerpo liofilizado y hex-PLA se congelan y se muelen juntos para formar una suspensión.

En determinadas realizaciones, la etapa de congelación se lleva a cabo lentamente hasta una temperatura de -80ºC, y la etapa de molienda se lleva a cabo en nitrógeno líquido durante aproximadamente 5 minutos.

En otra realización, el procedimiento comprende además calentar la suspensión resultante hasta temperatura ambiente o una temperatura ligeramente más caliente (por ejemplo, 25ºC).

V. Usos médicos

La presente invención también proporciona la formulación de la invención para su uso en medicina. En particular, se proporciona el uso de la formulación para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad, tal como una enfermedad ocular.

En determinadas realizaciones, la enfermedad ocular es una enfermedad de la retina, tal como una enfermedad asociada con neovascularización ocular. En determinadas realizaciones, la enfermedad ocular es degeneración macular, retinopatía diabética, secuelas asociadas con isquemia de la retina, y neovascularización del segmento posterior, edema de la retina, atrofia geográfica, edema macular diabético, y similares.

La dosificación apropiada del anticuerpo dependerá, por ejemplo, del estado que va a tratarse, de la gravedad y del transcurso del estado, de si la proteína se administra para fines preventivos o terapéuticos, de la terapia anterior, de la historia clínica y la respuesta del paciente a la proteína, del tipo de anticuerpo usado y de la opinión del médico que atiende. El anticuerpo se administra de manera adecuada al paciente de una vez o a lo largo de una serie de tratamientos y puede administrarse al paciente en cualquier momento desde el diagnóstico en adelante. El anticuerpo puede administrarse como el único tratamiento o conjuntamente con otros fármacos o terapias útiles en el tratamiento del estado en cuestión.

Dependiendo de la enfermedad o el trastorno que va a tratarse, puede administrarse al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo.

El contenido de cualquier patente, solicitud de patente y referencias citadas a lo largo de esta memoria descriptiva se incorporan por el presente documento como referencia en su totalidad.

A menos que el contexto requiera otra cosa, los términos en singular usados en el presente documento incluirán pluralidades y los términos en plural incluirán el singular.

Ejemplos

La presente divulgación se ilustra además mediante los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como limitativos adicionalmente. El contenido de todas las figuras y todas las referencias, patentes y solicitudes de patente publicadas citadas a lo largo de esta solicitud se incorpora expresamente en el presente documento como referencia en su totalidad.

Materiales

Se produjo el fragmento de anticuerpo humanizado ESBA903 y se liofilizó de manera interna por ESBATech, una unidad de investigación de Alcon Biomedical (Schlieren, Suiza). Se añadieron tres ml de ESBA903 (10 mg/ml en citrato de sodio 20 mM, pH 6,25) a viales de tipo tubular de 10 ml, se cubrieron con tapones de bromobutilo que son adecuados para la liofilización. La liofilización se realizó usando un liofilizador VirTis Advantage Plus (controlador del procedimiento Wizard 2.0, SP Scientific, Warminster, EE.UU.), equipado con un mecanismo de taponamiento integrado y una bomba de vacío de alto rendimiento Leybold Trivac B (D4B/D6B, Oerlikon Corporate, Suiza). El procedimiento se controló usando la temperatura de almacenamiento real, y se registraron los datos del procedimiento (Mentor/Wizard Synoptic 6.0, SP Scientific, Warminster, EE.UU.). Se registró la temperatura del producto usando termopares que se habían colocado en los viales de liofilización. Se congelaron los viales hasta -55ºC; tras la evacuación de la cámara de liofilización (0,15 mbar), se aumentó la temperatura de almacenamiento hasta -10ºC en el transcurso de varias horas. Se realizó un secado secundario a 25ºC bajo vacío completo. Se introdujo gas nitrógeno en el liofilizador antes de taparlo para evitar la nueva introducción de humedad y para minimizar los posibles procedimientos de degradación oxidativa. Tras la reconstitución, la proteína demostró ser completamente monomérica.

Se sintetizó poli(ácido láctico) sustituido con hexilo (hexPLA) mediante la policondensación de ácido 2-hidroxioctanoico tal como está publicado (Asmus *et al*., 2011, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 79:584), ENREF 20. Brevemente, los polímeros de 2500 g/mol y 5000 g/mol se sintetizaron calentando el monómero hasta 120ºC usando ácido sulfúrico al 0,5% en moles (Acros Organics, New Jersey, EE.UU.) como catalizador de policondensación. Las reacciones se realizaron bajo un vacío de bomba de aceite de 0,001 bar hasta que se obtuvo el peso molecular apropiado. Se purificaron los polímeros mediante precipitación con acetona en $NaHCO_3$ acuoso 0,1 M, entonces se disolvieron en acetona, se filtraron sobre Celite® 545 grueso y se retiró el disolvente a vacío. Los polímeros de hexPLA de 1500 g/mol y 3500 g/mol se prepararon mediante un método mejorado, sin el uso de catalizador. Simplemente se calentó el monómero hasta 150ºC y se agitó la masa fundida bajo un vacío de 0,001 bar. No se realizaron etapas de síntesis o purificaciones adicionales en estos polímeros de hexPLA debido a la ausencia de cualquier sustancia adicional como catalizadores o disolventes. Los cuatro polímeros se esterilizaron usando un método de esterilización con calor seco convencional de la Farmacopea Europea calentándolos hasta 180ºC durante 30 min. Se determinó el peso molecular mediante cromatografía de permeación en gel (GPC) usando una bomba de HPCL Waters 515, un inyector Waters 410, columnas Styragel HR 1-4 y un detector de GPC Waters 717 (Waters Corporation, Milford, EE.UU.). La fase continua fue THF. Se usaron patrones de poliestireno (PSS, Mainz, Alemania) para la calibración. Todos los productos químicos y disolventes se usaron según se recibieron.

Ejemplo 1

Preparación y caracterización de la formulación

La proteína ESBA903 liofilizada y el polímero de hexPLA se congelaron lentamente hasta - 80ºC y se molieron juntos en un molino criogénico SPEX 6700 (SPEX Industries, Edison, EE.UU.) bajo nitrógeno líquido durante 5 min. Este procedimiento de criomolienda redujo simultáneamente el tamaño de partícula del compuesto sólido y lo dispersó homogéneamente en la matriz de polímero para formar una formulación en suspensión. Tras la molienda, la formulación se calentó lentamente hasta temperatura ambiente a vacío para evitar la condensación de agua en el producto.

En total, se prepararon siete formulaciones con cargas de fármaco en el intervalo de entre el 1,25% y el 5,0% (p/p) de proteína en polímero, con pesos moleculares promedio en peso de desde 1500 g/mol hasta 5000 g/mol (tabla 1). El tamaño de partícula del liofilizado incorporado y la distribución homogénea dentro del hexPLA se verificaron mediante microscopía óptica usando un microscopio Optiphot-2 (Nikon, Tokio, Japón).

Tabla 1

		Peso molecular del polímero M_w			
		1500 g/mol	2500 g/mol	3500 g/mol	5000 g/mol
Carga de proteína [w/w]	1,25%	-		-	-
	2,50%				

		Peso molecular del polímero M_w			
	5,00%	-		-	

El ESBA903 liofilizado formó suspensiones con el polímero lipófilo viscoso poli(ácido láctico) sustituido con hexilo (hexPLA). Por consiguiente, el tamaño de partícula del liofilizado de proteína incorporado fue un factor clave para la estabilidad de las formulaciones de ESBA903-hexPLA como inyectables para aplicación oftálmica, ya que es necesario que las partículas sólidas del liofilizado sean lo suficientemente pequeñas y estén dispersadas homogéneamente como para permitir buena capacidad de inyección a través de agujas estrechas, estabilidad física de la suspensión y liberación controlada de la matriz. Para las proteínas, el procedimiento de formulación es crítico porque la tensión de corte y el calentamiento del compuesto activo pueden alterar la estructura de la proteína y por tanto su actividad. Por tanto, es necesario un método de preparación que limite estas influencias. La criomolienda del liofilizado de ESBA903 junto con la matriz de polímero fue el método de elección porque permitía la molienda simultánea de partículas sólidas y la distribución en el polímero. El nitrógeno líquido evitó la formación de puntos de calor durante el procedimiento de molienda, reduciendo el riesgo de desnaturalización de la proteína.

La figura 1 presenta una imagen de microscopía óptica de una formulación obtenida mediante el método de criomolienda (figura 1). El tamaño de partícula se redujo eficazmente durante el procedimiento desde hasta 200 m de diámetro hasta menos de 10 m, siendo la mayoría de las partículas más pequeñas de 2 m. El tamaño de partícula pequeño permitió la inyección de la formulación en suspensión a través de agujas estrechas con un diámetro interno de aproximadamente 210 m, como las agujas hipodérmicas 27 G. Este procedimiento de micronización y formulación en una sola etapa rápido y sencillo fue adecuado para preparar formulaciones en suspensión de ESBA903 con hexPLA.

Ejemplo 2

Reología y capacidad de inyección de la formulación

Se prepararon siete formulaciones de ESBA903-hexPLA (tabla 1) para investigar la influencia de la carga de fármaco y el peso molecular del polímero sobre las características de reología y capacidad de inyección. El comportamiento reológico de las formulaciones de proteína es importante para la capacidad de inyección y la estabilidad de la suspensión. Se estudiaron por separado dos factores inherentes que influyen en la viscosidad, el peso molecular de hexPLA y la razón del fármaco incorporado, dependiendo de la temperatura de la formulación.

Se investigó el comportamiento reológico de las formulaciones usando un reómetro de tensión RheoStress 1 Haake (Vreden, Alemania), un cono-placa configurado con una separación de hueco de 0,10 mm, ángulo de 2º y un diámetro de placa de 35 mm. Las mediciones se realizaron a una velocidad de corte de 0,1 s^{-1} y un ciclo de calentamiento de 10 min que oscilaba desde 15ºC hasta 37ºC.

Las figuras 2A y 2B muestran que la viscosidad de todas las formulaciones resultó influida significativamente por la temperatura, mostrando viscosidades más bajas a temperaturas más altas. Este comportamiento se debió a una mejor flexibilidad de las cadenas de polímero a las temperaturas más altas dando como resultado menos interacción entre las macromoléculas. La alta viscosidad a bajas temperaturas puede aumentar la estabilidad en almacenamiento de la suspensión porque la sedimentación del compuesto activo puede reducirse en medios altamente viscosos, además del efecto del tamaño de partícula pequeño, tal como se expresa por la ley de Stokes. Además, el calentamiento hasta temperatura ambiente o corporal dio como resultado formulaciones de las que podían inyectarse dosis terapéuticas incluso a través de agujas 27 G finas, aplicadas normalmente en tratamientos oftálmicos.

Sin embargo, la facilidad de la inyección fue altamente dependiente del peso molecular del polímero, un factor importante que influye en la viscosidad de la formulación, tal como puede observarse en la figura 2A. El aumento desde 1500 g/mol hasta 2500 g/mol dio como resultado un aumento de 5 veces de la viscosidad. Para pesos moleculares por encima de 2500 g/mol, la diferencia fue menos pronunciada. El polímero de 3500 g/mol mostró una viscosidad ligeramente inferior, debido a su polidispersidad (PD) ligeramente superior. El polímero de 2500 g/mol tenía una PD de 1,55 y el polímero de 3500 g/mol, una PD de 1,62 atribuida al método de síntesis simplificado libre de catalizador usado para este último polímero. Debido al uso directo sin purificación, una gran cantidad de las cadenas de polímero pequeñas permanecieron en la matriz. Estas cadenas de polímero pequeñas u oligómeros presentes en el hexPLA actúan como plastificantes internos puesto que son demasiado pequeños como para enmarañarse y por tanto disminuir la viscosidad.

Tal como se esperaba, las cargas de fármaco más altas dieron como resultado un aumento en la viscosidad de las formulaciones porque las partículas incorporadas obstaculizan el flujo libre del polímero de hexPLA líquido. Tal como se muestra en la figura 2B, la adición de liofilizado de ESBA903 al 0,5% al polímero de 2500 g/mol dio como resultado un aumento de la viscosidad del 35% a 37ºC en comparación con el polímero puro. Por tanto, las formulaciones de proteína-hexPLA se comportaron como suspensiones típicas y la facilidad de inyección resultó

influida por la carga de fármaco. Sin embargo, fue posible una carga de fármaco del 5,0% con respecto a la capacidad de inyección.

En el intervalo investigado de entre 15 y 37ºC, la correlación entre la temperatura y la viscosidad puede expresarse mediante una ecuación exponencial sencilla para todas las formulaciones con coeficientes de correlación mayores de 0,99 en la forma: $y = m \times e^{(n \times x)}$.

El factor exponencial (n) se determina por el tipo de polímero y por tanto, por el peso molecular, mientras que el factor de multiplicación (m) depende de la velocidad de carga de fármaco. Por tanto, puede calcularse la viscosidad de una formulación de ESBA903-hexPLA para una determinada carga de fármaco y temperatura definida si se caracterizó previamente la reología del polímero puro.

Se examinó la capacidad de inyección de formulaciones parenterales con longitud de aguja fijada a 12 mm tal como se usa generalmente para inyecciones intraoculares y el diámetro interno a 0,210 mm, correspondiente a una aguja 27 G. Dependiendo de la carga de fármaco, una cantidad de 50 l de formulación debe ser suficiente para un periodo de tratamiento de 3 a 6 meses. Para permitir una inyección rápida y práctica por parte del oftalmólogo, el procedimiento de aplicación debe durar menos de 15 segundos. Una jeringa de 0,5 ml adecuada para la aplicación de 50 l de ESBA903-hexPLA tiene un diámetro de émbolo interno típico de aproximadamente 4,0 mm. Finalmente, la fuerza aplicable máxima para una buena capacidad de inyección se fijó a 50 N. Usando estos parámetros, una viscosidad por debajo de 38 Pa X s permite una inyección fácil, según la ley de Hagen-Poiseuille. Tal como se muestra en la figura 2, todas las formulaciones investigadas con pesos moleculares de polímero por debajo de 3500 g/mol pudieron inyectarse por tanto a temperatura ambiente o tras ligero calentamiento hasta 25ºC, y no fueron necesarios excipientes adicionales como disolventes o plastificantes para la aplicación.

Ejemplo 3

Compatibilidad de ESBA903-hexPLA

Se analizó la influencia del procedimiento de formulación sobre la conformación de la proteína mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC), con lo que pudieron separarse y cuantificarse monómeros de ESBA903 de dímeros y otros oligómeros. Por tanto, la proteína se extrajo de dos formulaciones que contenían proteína al 5,0% en hexPLA de 2500 g/mol y 5000 g/mol inmediatamente después del procedimiento de preparación de criomolienda, y se compararon los extractos con el fragmento de anticuerpo de cadena sencilla puro del liofilizado original.

Se cuantificó el VEGF-fragmento de anticuerpo ESBA903 humanizado y se evaluó la razón de monómero de la proteína usando cromatografía de exclusión molecular (SEC). Los análisis se realizaron en un sistema de HPLC Dionex Ultimate 3000 (Sunnyvale, CA, EE.UU.) equipado con columnas de 4,6 mm x 30 cm de TSK-Gel Super SW2000 (Tosoh Bioscience, Yamaguchi, Japón). Se usó un método isocrático con una velocidad de flujo de 0,35 ml/min de tampón de transferencia de PBS (Na_2HPO_4 25 mM, NaCl 0,1 M, pH 6,5). La temperatura de la columna se mantuvo a 30ºC, y la proteína se detectó mediante absorción UV a 214 nm. Se prepararon disoluciones patrón de calibración de ESBA903 en tampón citrato (citrato de sodio 20 mM, NaCl 125 mM, valor de pH 6,25), y se analizaron las disoluciones de muestra como tales. El método aplicado permitió la separación de los monómeros de ESBA903 de oligómeros de orden inferior y agregados solubles.

Se dispersaron 10 mg de las dos formulaciones que contenían ESBA903 al 5,0% en hexPLA de 2500 g/mol y 5000 g/mol, respectivamente en tres tubos Eppendorf cada una. Se añadieron 0,7 ml de tampón citrato (citrato de sodio 20 mM, NaCl 125 mM, pH 6,25) y se extrajo la proteína durante 1,5 horas. Se usaron tres métodos de extracción diferentes para eliminar la influencia de la manipulación durante el procedimiento de extracción sobre la conformación de la proteína: i) agitación suave, ii) incubación a 37ºC y agitación a 60 rpm (condiciones de liberación *in vitro*), iii) agitación con vórtex intensa. Después se analizaron las muestras de sobrenadante en cuanto a la razón de monómero con respecto a multímero mediante SEC-HPLC.

Tal como se muestra en la figura 3, la SEC-HPLC no reveló diferencia significativa en los cromatogramas de SEC entre la referencia de ESBA903 (figura 3A) y la proteína extraída de las formulaciones de hexPLA (figura 3B). Las moléculas de proteína existían principalmente como monómeros con menos del 3% de dímeros y otros oligómeros presentes, independientemente del método de extracción. Puesto que no se formaron oligómeros durante el procedimiento de preparación, mientras que se incorporaban en el polímero lipófilo o durante la extracción, hexPLA no indujo la formación de oligómeros de ESBA903. Esto se debe presumiblemente a la incorporación de la proteína en la matriz como un liofilizado sólido, en que el ESBA903 es estable, y las interacciones con el excipiente líquido se limitan a la superficie del liofilizado. El procedimiento de criomolienda también mostró idoneidad para la micronización y distribución de ESBA903 en la matriz de polímero puesto que la proteína permaneció en su forma de monómero activo tras el procedimiento. La molienda en nitrógeno líquido evitó eficazmente el calentamiento del principio activo y la degradación relacionada con la temperatura de la proteína. Finalmente, se liberó ESBA903 de la matriz de hexPLA en tampón citrato sin experimentar aparentemente modificaciones conformacionales. Estos

resultados demostraron la idoneidad de hexPLA como excipiente para formulaciones de liberación sostenida de ESBA903 debido a su compatibilidad con el fragmento de anticuerpo de cadena sencilla. Además, la criomolienda es un método factible para micronizar eficazmente la preparación de proteína liofilizada y preparar simultáneamente formulaciones en suspensión homogéneas sin alterar la conformación de la proteína.

Ejemplo 4

Estabilidad en almacenamiento de ESBA903 en hexPLA

Se evaluó la estabilidad en almacenamiento de ESBA903 en la matriz de hexPLA con formulaciones en suspensión que contenían ESBA903 al 5,0% en hexPLA de 2500 g/mol y 5000 g/mol. Se cargaron 50 mg en tubos Eppendorf y se almacenaron a 4ºC y 37ºC, respectivamente con protección de la luz. Tras 4 semanas y 10 semanas, se extrajo la proteína de 10 mg de las formulaciones de muestra mediante agitación con vórtex con tampón citrato, tal como se describió anteriormente. Se analizó el sobrenadante mediante SEC-HPLC en cuanto al porcentaje del área de pico del monómero de ESBA903 con respecto al área de pico total.

La estabilidad a lo largo de largos periodos de tiempo es un problema para las formulaciones de proteínas. Generalmente se almacenan en condiciones refrigeradas para evitar la desnaturalización incluso como liofilizados. Por tanto, se realizó un estudio de estabilidad de formulaciones de ESBA903-hexPLA. Se almacenaron muestras que contenían ESBA903 al 5,0% en hexPLA de 2500 g/mol y 5000 g/mol a 4ºC. Tras 4 y 10 semanas, se extrajo la proteína del polímero y se analizó mediante SEC-HPLC.

La tabla 2 resume las áreas de pico relativas del monómero ESBA903 en comparación con el área de pico de la proteína extraída total. Ambas formulaciones mostraron resultados similares en iguales condiciones de almacenamiento, independientemente del peso molecular de hexPLA. Puesto que el peso molecular determinaba el número de cadenas de polímero presentes y por tanto de los grupos de extremo de polímero, una influencia considerable de los restos hidroxilo y carboxilo sobre la proteína fue mínima, si no excluible. A 4ºC, la tasa del monómero de proteína permaneció por encima del 97% durante todo el periodo de estudio, demostrando que ESBA903 era no sólo compatible con hexPLA sino también estable dentro del polímero. Por tanto, las formulaciones listas para aplicación de ESBA903-hexPLA podían almacenarse en condiciones de refrigerador convencionales tal como se define por la ICH. Puesto que los valores de monómero permanecieron por encima del 97% sin mostrar tendencia negativa, parecen factibles tiempos de almacenamiento que superan 10 semanas tal como sería necesario para la manipulación conveniente.

Tabla 2

Formulación que contiene ESBA903 al 5,00% en:	Temperatura de almacenamiento [ºC]	Área relativa, monómero de ESBA903 [%]		
		0 semanas	4 semanas	10 semanas
hexPLA 2500 g/mol	4	97,4	98,4	97,5
	37	97,4	94,8	94,5
hexPLA 5000 g/mol	4	97,7	98,0	98,3
	37	97,7	96,0	92,5

Ejemplo 5

Efecto protector de hexPLA sobre ESBA903

Para investigar la estabilidad de ESBA903 a la temperatura corporal, se almacenaron las formulaciones a 37ºC y se analizaron tras 4 y 10 semanas mediante SEC-HPLC (tabla 2).

Ambas formulaciones con hexPLA de 2500 g/mol y 5000 g/mol, mostraron respectivamente una ligera tendencia de disminución de monómeros, mientras que se formaron dímeros y multímeros de ESBA903 en la matriz. No obstante, la fracción monomérica permaneció por encima del 90% tras 10 semanas, lo que sugiere que las suspensiones de ESBA903-hexPLA eran bastante estables a 37ºC, y que aparentemente no tuvieron lugar alteraciones significativas en la conformación de la proteína. De manera más interesante, con más del 90% de contenido en monómero activo, la proteína era más estable en estado liofilizado en la matriz de polímero de hexPLA a esta temperatura que en la disolución tampón, de la que sólo se recuperó el 71% de la proteína activa tras 10 semanas. La proteína liofilizada estaba protegida por la matriz hidrófoba, que evitó el contacto con el entorno acuoso hasta su liberación.

Ejemplo 6

Estabilidad de la formulación de ESBA903 en disolución tampón para liberación *in vitro*

Se almacenaron muestras en disolución tampón citrato que contenía ESBA903 0,12 mg/ml a 37ºC durante 10 semanas. En un segundo enfoque en las mismas condiciones de almacenamiento, se añadió ácido 2-hidroxioctanoico 2,2 mg/ml como el producto de degradación final para investigar la influencia del polímero en degradación sobre la estabilidad de la proteína. Todos los experimentos se realizaron por duplicado. Las cantidades del monómero de ESBA903 se determinaron mediante SE-HPLC tras 2 y 10 semanas.

Un examen previo de diferentes sistemas tampón reveló al tampón citrato con un pH de 6,5 como la mejor elección para este fragmento de anticuerpo. En este trabajo, se evaluó la estabilidad en esta disolución tampón mediante SEC-HPLC, cuantificando la concentración de monómero de ESBA903, en presencia y ausencia de ácido 2-hidroxioctanoico como el producto de degradación final de hexPLA. En la disolución tampón pura en condiciones de liberación, la concentración de monómero de ESBA903 disminuyó hasta el 84% de su valor inicial tras 10 semanas debido a la agregación. En la disolución tampón con producto de degradación de polímero añadido, el contenido en monómero fue ligeramente inferior en un 71% tras 10 semanas, lo que se supone relacionado con la disminución en el valor de pH. Para el estudio de viabilidad deseado de las características de la liberación sostenida, la estabilidad del monómero por encima del 70% se calificó como suficiente para una prueba de liberación que cubría varias semanas. Sin embargo, la cantidad decreciente dependiente del tiempo de fragmentos de anticuerpo monoméricos dio como resultado una subestimación de la concentración de ESBA903 liberado en experimentos de liberación *in vitro*, especialmente para los puntos de tiempo posteriores.

Tras colocar las formulaciones de ESBA903-hexPLA en la disolución tampón acuosa, las formulaciones formaron gotitas individuales de forma esférica (figura 4) debido a la alta hidrofobicidad del polímero y a su tendencia a minimizar su superficie en el entorno hidrófilo. Todas las formulaciones con pesos moleculares de polímero de 1500 g/mol a 3500 g/mol mantuvieron la forma esférica a lo largo de los tres meses de investigación. Sólo las formulaciones más viscosas en hexPLA de 5000 g/mol se disgregaron bastante rápido durante las primeras 72 horas dando como resultado gotitas de formulación pequeñas. Esto se debió presumiblemente a un arrastre de disolvente a la formulación producido por la preparación de proteína liofilizada, por lo que el influjo continuo de agua formó canales que estiraban la gotita de formulación hasta que divergió. En cambio, las formulaciones menos viscosas con hexPLA de peso molecular inferior fueron más flexibles, lo que podría compensar un arrastre de disolvente inicial, y manteniéndose por tanto la forma.

Ejemplo 7

Liberación de ESBA903 *in vitro*

Para verificar en primer lugar la idoneidad del sistema de liberación, se sometió a prueba el comportamiento de la formulación y la proteína en el entorno de liberación acuoso. Después, se realizó un estudio *in vitro* que cubría la influencia sobre las características de liberación de la carga de fármaco, el peso molecular del polímero y la cantidad de formulación aplicada para identificar buenos candidatos de formulación para aplicaciones oftálmicas de liberación sostenida.

Se pesaron 50 0,5 mg de las formulaciones en viales de vidrio sellables de 20 ml. Se investigó adicionalmente la formulación que contenía fármaco al 5,0% en hexPLA de 2500 g/mol con 25 0,5 mg de formulación. Se añadieron 20 ml de tampón citrato (citrato de sodio 50 mM, NaCl 72 mM, NaN_3 8 mM, valor de pH 6,25) como medio de liberación. Se incubaron las muestras a 37ºC y se agitaron a 60 rpm. Se tomó 1 ml de la disolución de liberación de cada vial tras 1 y 3 días, tras 1, 2, 3 y 4 semanas, seguido por toma de muestras cada dos semanas hasta la semana 14. Cada vez se volvió a llenar el mismo volumen de tampón citrato recién preparado para mantener constante el volumen de tampón. Se determinó la concentración de ESBA903 en las muestras de liberación mediante SEC-HPLC.

Para investigar la influencia de la carga de fármaco de formulación sobre el comportamiento de liberación, se prepararon tres formulaciones usando el mismo polímero de hexPLA de 2500 g/mol y cargas de ESBA903 del 1,25%, el 2,5% y el 5,0%. La figura 5 muestra la liberación acumulativa *in vitro* del monómero de ESBA903 y la liberación diaria de estas formulaciones a lo largo de 6 semanas analizada mediante SEC-HPLC. Las tres formulaciones mostraron un perfil de liberación similar, que difería sólo en la cantidad de monómero liberado del fragmento de anticuerpo de cadena sencilla. Durante las primeras 2 a 3 semanas, el monómero de ESBA903 se liberó más rápido de la matriz de polímero, y posteriormente, la liberación fue constante a velocidades inferiores hasta la semana 6.

Observando las curvas de liberación en más detalle, la liberación rápida en las 3 primeras semanas puede explicarse por la liberación de moléculas de proteína próximas a la superficie del depósito. De manera más interesante, no se observó liberación repentina pronunciada para las formulaciones de ESBA903-hexPLA tal como se conoce para muchas formulaciones de liberación sostenida, por ejemplo con poli(ácido láctico) (Maincent *et al*., 2009, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 73:337). Presumiblemente, el polímero de hexPLA líquido cubrió completamente la preparación de proteína liofilizada incorporada, protegiéndola de la disolución

inmediata. Tras 3 semanas, la velocidad de liberación disminuyó, debido presumiblemente a que el principio activo era menos accesible por la disolución acuosa.

Una diferencia en la velocidad de liberación relativa entre las tres formulaciones de carga de fármaco sólo fue detectable durante las primeras 2 a 3 semanas. Con cargas de fármaco mayores, la liberación del monómero de proteína aumentó en el intervalo de entre el 1,25% y el 5,0%. Puesto que es necesario que se degrade menos cantidad del polímero al comienzo y que la disolución de la preparación de fármaco liofilizado facilita la infiltración de agua adicional, la formulación con ESBA903 al 5,0% se liberó más rápido en la fase inicial.

En estas pruebas *in vitro* clásicas fue detectable una liberación sostenida durante 6 semanas para las formulaciones de ESBA903-hexPLA. Esta larga duración es una mejora significativa en comparación con las formulaciones de liberación inmediata comercializadas actualmente.

La figura 6 resume los datos de liberación del monómero de anticuerpo de un estudio de 6 semanas para cuatro formulaciones con la misma carga de fármaco del 2,5% pero con diferentes pesos moleculares de hexPLA de 1500 g/mol, 2500 g/mol, 3500 g/mol y 5000 g/mol. El perfil de liberación de la formulación con hexPLA de 5000 g/mol difirió con su liberación pronunciada considerablemente de las formulaciones con los pesos moleculares más pequeños. Podía esperarse una liberación más lenta para las formulaciones con pesos moleculares mayores puesto que sería necesario que se hidrolizaran más enlaces éster antes de que el polímero se degradara y que el fármaco se liberara. Sin embargo, la disgregación del depósito esférico de la formulación de 5000 g/mol en la disolución tampón tal como se describió anteriormente, conduce a un aumento significativo en la superficie de la formulación dando como resultado una liberación más rápida.

Las suspensiones de 3500 g/mol y 2500 g/mol liberaron la proteína tal como se esperaba, mostrando liberación más lenta para la formulación con el peso molecular mayor. Además, el periodo de liberación pronunciada fue más largo para la formulación con 3500 g/mol alcanzando 4 semanas. En la última fase a las 6 semanas, ambas formulaciones dieron como resultado velocidades de liberación similares.

La formulación de ESBA903-hexPLA con el polímero de 1500 g/mol mostró una liberación más rápida en comparación con el polímero de 2500 g/mol y 3500 g/mol durante el primer día, pero después la liberación diaria se ralentizó más rápidamente. Las concentraciones mayores al comienzo se debieron a la menor viscosidad y a la disolución más rápida de los oligómeros de hexPLA solubles en agua accesibles, lo que podría conducir a una intrusión de agua y liberación del principio activo más fáciles. Entonces, presumiblemente, se formó una capa de polímero libre de proteínas sobre la superficie del depósito, disminuyendo rápidamente la velocidad de liberación. No obstante, esta formulación también mostró un periodo de liberación de al menos 6 semanas.

En la figura 7 se muestran los perfiles de liberación de dos muestras que contenían ESBA903 al 2,5% en el polímero de hexPLA de 2500 g/mol, que diferían en la masa de la gotita de formulación. Ambas muestras mostraron un perfil de liberación similar a lo largo de la totalidad de las 6 semanas, mostrando que las características de liberación no resultaron afectadas por la cantidad de formulación.

Investigación de la liberación de ESBA903 que supera 6 semanas

Un problema general para las pruebas de liberación sostenida *in vitro* de proteínas es su estabilidad limitada en disolución tampón acuosa, dando como resultado potencialmente degradación, oligomerización y precipitación del principio activo liberado. Para ESBA903, en la figura 8 se muestra la disminución en la concentración de monómero en el tampón citrato durante 10 semanas 8. A lo largo del tiempo, cada vez se degrada más cantidad de la proteína liberada en disolución, contrarrestando la nueva liberación de la matriz, lo que da como resultado una subestimación de la liberación de proteína real. Por tanto, el periodo de liberación estudiado de desde 6 hasta 14 semanas se comenta en el presente documento por separado desde las primeras 6 semanas debido a las concentraciones decrecientes de ESBA903 con el tiempo

La tabla 3 resume las concentraciones de monómero de ESBA903 en el medio de liberación de las siete muestras de liberación entre las semanas 6 y 14. Todas las muestras mostraron concentraciones casi constantes, pese a la estabilidad limitada conocida del monómero de proteína en la disolución tampón tras la disolución. Las concentraciones de monómero constantes pueden explicarse por el hecho de que la agregación de monómeros de proteína en la disolución tampón llega al equilibrio con su liberación adicional de la matriz de polímero. Por tanto, el periodo de liberación global de estas formulaciones es probablemente mucho más largo de 6 y 8 semanas, respectivamente.

Tabla 3

Cantidad de formulación [mg]	Cantidad de composición de muestra de ESBA903 en hexPLA de peso molecular determinado	Concentración de monómero de ESBA903 en el medio de liberación [g/ml]				
		6 semanas	8 semanas	10 semanas	12 semanas	14 semanas
50	1,25%-2500 g/mol	9,0	8,4	7,7	7,4	7,3
50	2,50%-2500 g/mol	17,0	17,4	16,2	15,2	14,7
50	5,00%-2500 g/mol	43,7	44,0	41,7	39,8	37,2
50	2,50%-1500 g/mol	9,3	9,2	8,5	8,6	8,4
50	2,50%-3500 g/mol	12,4	12,4	12,0	11,6	10,8
50	2,50%-5000 g/mol	28,5	28,8	26,8	26,6	26,1
25	5,00%-2500 g/mol	25,4	25,7	25,7	27,3	27,9

La muestra con 25 mg de la formulación que contenía ESBA903 al 5,0% en hexPLA de 2500 g/mol liberó la proteína de manera continua a lo largo de todo el periodo de 14 semanas, mostrando concentraciones de monómero de ESBA903 crecientes de manera constante. La liberación más pronunciada de la formulación de 25 mg se debió probablemente a la mayor razón de superficie con respecto a volumen, lo que facilita la degradación del polímero y da como resultado una predominancia de la liberación de proteínas. No obstante, pueden ser ventajosas pequeñas cantidades de formulación de ESBA903-hexPLA en cuanto a la facilidad de aplicación y a su perfil de liberación.

Ejemplo 8

Integridad y actividad de las proteínas tras la liberación *in vitro*

Junto a los perfiles de liberación sostenida, se evaluaron la estabilidad y la actividad del fragmento de anticuerpo de cadena sencilla liberado para evaluar la calidad de la proteína liberada. Por tanto, se analizaron muestras de los experimentos de liberación usando electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) para controlar la integridad del monómero de proteína liberado, y análisis de resonancia de plasmón superficial para investigar su actividad. Las muestras de liberación *in vitro* del punto de tiempo final en la semana 14 se compararon con una referencia de ESBA903 recién preparada. Se separaron las especies de proteínas en gel Bis-Tris al 12% NuPAGE Novex (Life Technologies Corporation, Grand Island, EE.UU.) usando los tampones y reactivos facilitados por el fabricante. Entonces se tiñeron las bandas de proteínas usando azul de Coomassie.

En la figura 9 se muestra el gel de SDS-PAGE resultante. Tanto la muestra de referencia como la de liberación mostraron sólo una banda a 25 kDa en el peso molecular calculado del fragmento de anticuerpo. Esto confirmó los datos obtenidos anteriormente mediante SEC e indicó que la estructura química del fragmento de anticuerpo liberado se mantenía durante la incorporación en la matriz de hexPLA y la liberación en el tampón.

Se midió la afinidad del monómero de ESBA903 liberado hacia VEGF humano usando un análisis de resonancia de plasmón superficial en comparación con una referencia de ESBA903 recién preparada. Para la evaluación de la cinética de unión, se realizaron mediciones de resonancia de plasmón superficial usando un software BIAcore T100. Se activaron chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM4, GE HealthCare, Uppsala, Suecia) con clorhidrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida y *N*-hidroxisuccinimida según las instrucciones del proveedor. Se inmovilizó $VEGF_{165}$ humano recombinante (PeproTech EC Ltd., Londres, RU) sobre un chip de sensor CM4 usando un procedimiento de acoplamiento de amina convencional para lograr una respuesta de aproximadamente 500 unidades de resonancia. Se inyectaron diluciones en serie de 2 veces (2,5-20 nM) de patrón de ESBA903 y muestras de formulación en tampón HBS-EP (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM y tensioactivo P20 al 0,05%, pH 7,4) en las células de flujo a una velocidad de flujo de 30 µl/min durante 5 minutos. Se permitió que la disociación del scFv anti-VEGF de VEGF en el chip CM4 continuara durante 10 minutos. Tras cada ciclo de inyección, se regeneraron las superficies con 2 inyecciones de NaOH 100 mM.

Se calcularon las constantes de disociación (k_d) y asociación (k_a) aparentes y la constante de equilibrio de disociación aparente (K_D) con el software de evaluación BIAcore T100 versión 2.0.1 usando un modelo de unión de Langmuir 1:1 (Biacore Inc., Uppsala, Suecia).

Se analizaron tres formulaciones, incluyendo las formulaciones con ESBA903 al 2,5% y al 5,0% en hexPLA de 2500 g/mol y 2,5% en el polímero de 3500 g/mol. La tabla 4 resume los datos de afinidad obtenidos para los puntos de tiempo investigados tras 3 días, 4 semanas y en la semana 14 final.

Tabla 4

Cantidad de muestra de ESBA903 en hexPLA de determinado peso molecular	Tiempo	Ka [1/Ms]	kd [1/s]	KD [M]
ESBA903 al 100% en tampón	0	$9,56 \times 10^{5}$	$2,45 \times 10^{-5}$	$2,56 \times 10^{-11}$
2,5%-2500 g/mol	3 días	$5,29 \times 10^{5}$	$2,59 \times 10^{-5}$	$4,89 \times 10^{-11}$
	4 semanas	$4,24 \times 10^{5}$	$2,34 \times 10^{-5}$	$5,52 \times 10^{-11}$
	14 semanas	$4,07 \times 10^{5}$	$3,11 \times 10^{-5}$	$7,62 \times 10^{-11}$
5,0%-2500 g/mol	3 días	$4,65 \times 10^{5}$	$2,77 \times 10^{-5}$	$5,94 \times 10^{-11}$
	4 semanas	$5,54 \times 110^{5}$	$3,56 \times 10^{-5}$	$6,43 \times 10^{-11}$
	14 semanas	$4,21 \times 110^{5}$	$2,78 \times 10^{-5}$	$6,60 \times 10^{-11}$
2,5%-3500 g/mol	3 días	$4,39 \times 110^{5}$	$3,00 \times 10^{-5}$	$6,85 \times 10^{-11}$
	4 semanas	$5,82 \times 10^{5}$	$3,03 \times 10^{-5}$	$5,21 \times 10^{-11}$
	14 semanas	$4,08 \times 10^{5}$	$3,37 \times 10^{-5}$	$8,26 \times 10^{-11}$
Se comparan las muestras de tres formulaciones a los 3 días, 4 semanas y 14 semanas con una referencia de ESBA903 (ka = constante de velocidad de asociación; kd = constante de velocidad de disociación; KD = constante de disociación en equilibrio)				

Todas las muestras, independientemente de la formulación y el punto de tiempo, mostraron resultados similares para la constante de velocidad de asociación y disociación y por tanto también para la constante de disociación en equilibrio. Las muestras de liberación mostraron constantes comparables para la referencia de scFv.

Junto con la constante de disociación baja, las altas constantes de asociación de más de 10^{5} $M^{-1}s^{-1}$ reflejan la alta afinidad del monómero de fragmento de anticuerpo por el VEGF humano, lo que subraya su potencia para rastrear la molécula de factor de crecimiento. Las constantes de asociación ligeramente inferiores de las muestras en comparación con la referencia se debieron lo más probablemente a la imprecisión en la cuantificación de monómero de proteína. Esta suposición la apoyó el hecho de constantes de velocidad de disociación similares entre las muestras y la referencia, que son independientes de la concentración. Las constantes de velocidad de disociación medidas dieron como resultado constantes de disociación en equilibrio bajas para las muestras de liberación en todos los puntos de tiempo hasta 14 semanas. Por tanto, los monómeros de fragmento de anticuerpo liberados de la matriz de hexPLA estaban en su forma biológicamente activa a lo largo de todo el periodo de liberación sostenida de más de 3 meses. Ni la carga de fármaco ni el peso molecular del polímero tenían influencia significativa sobre la constante de disociación en equilibrio, por tanto no afectan a la estructura de la proteína, que de otro modo daría como resultado una disminución de la actividad. Esto demostró adicionalmente que hexPLA mostraba idoneidad *in vitro* como excipiente de liberación sostenida parenteral para ESBA903, porque conservaba y liberaba el monómero farmacéuticamente activo del fragmento de anticuerpo

Lista de secuencias

<110> ESBATech - a Novartis Company GmbH

<120> FORMULACIÓN INYECTABLE DE LIBERACIÓN SOSTENIDA DE PROTEÍNAS

<130> PCT86409FZpau

<140> todavía no asignado
<141> adjunto

<150> Documento US 61/594.099
<151> 02-02-2012

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 251
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> scFv de péptido sintético

<400> 1

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ile Ile His Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Tyr Leu Ala Ser Thr
85 90 95

Asn Gly Ala Asn Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
130 135 140

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu
145 150 155 160

Thr Asp Tyr Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
165 170 175

Leu Glu Trp Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala
180 185 190

Thr Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn
195 200 205

Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
210 215 220

Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile
225 230 235 240

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
245 250

REIVINDICACIONES

1. Formulación farmacéutica de liberación sostenida para administración ocular a un sujeto, que comprende un anticuerpo de cadena sencilla (scFv) y poli(ácido láctico) sustituido con hexilo (hexPLA).

2. Formulación según la reivindicación 1, en la que el scFv está presente en una concentración final de al menos aproximadamente el 1,25% (p/p).

3. Formulación según la reivindicación 1, en la que el scFv está presente en una concentración final de al menos aproximadamente el 2,5% (p/p).

4. Formulación según la reivindicación 1, en la que el scFv está presente en una concentración final de al menos aproximadamente el 5,0% (p/p).

5. Formulación según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que el hexPLA está presente a un peso molecular de al menos aproximadamente 1500 g/mol.

6. Formulación según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que el hexPLA está presente a un peso molecular de al menos aproximadamente 2500 g/mol.

7. Formulación según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que el hexPLA está presente a un peso molecular de al menos aproximadamente 3500 g/mol.

8. Depósito intravítreo de liberación sostenida que comprende la formulación según cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

9. Sistema de administración que comprende la formulación farmacéutica de liberación sostenida según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 y una jeringa.

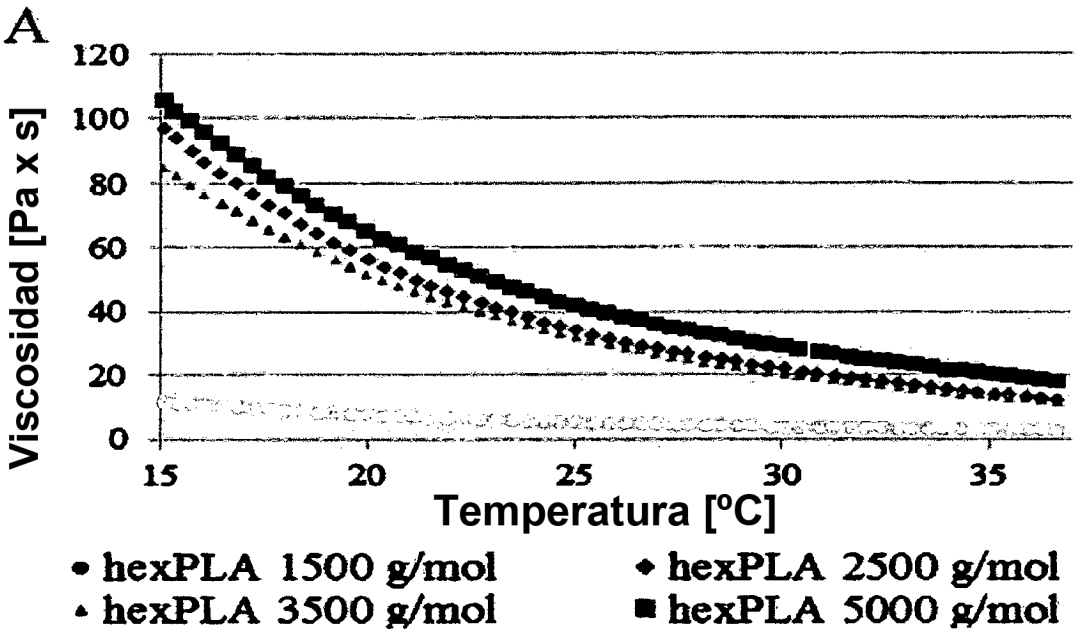
10. Formulación farmacéutica de liberación sostenida según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para su uso en el tratamiento de un trastorno ocular en un paciente.

11. Formulación para su uso según la reivindicación 10, en la que el trastorno ocular es un trastorno de retina.

12. Procedimiento para la preparación de una formulación farmacéutica de liberación sostenida, comprendiendo el procedimiento someter a criomolienda un anticuerpo de cadena sencilla y poli(ácido láctico) sustituido con hexilo (hexPLA).

13. Formulación de anticuerpo de cadena sencilla estable, que comprende un anticuerpo de cadena sencilla y poli(ácido láctico) sustituido con hexilo (hexPLA), en la que el anticuerpo de cadena sencilla es estable a 37ºC.

Fig. 1


A
Viscosidad [Pa x s]
120
100
80
60
40
20
0
15
20
25
30
35
Temperatura [ºC]
hexPLA 1500 g/mol
hexPLA 2500 g/mol
hexPLA 3500 g/mol
hexPLA 5000 g/mol

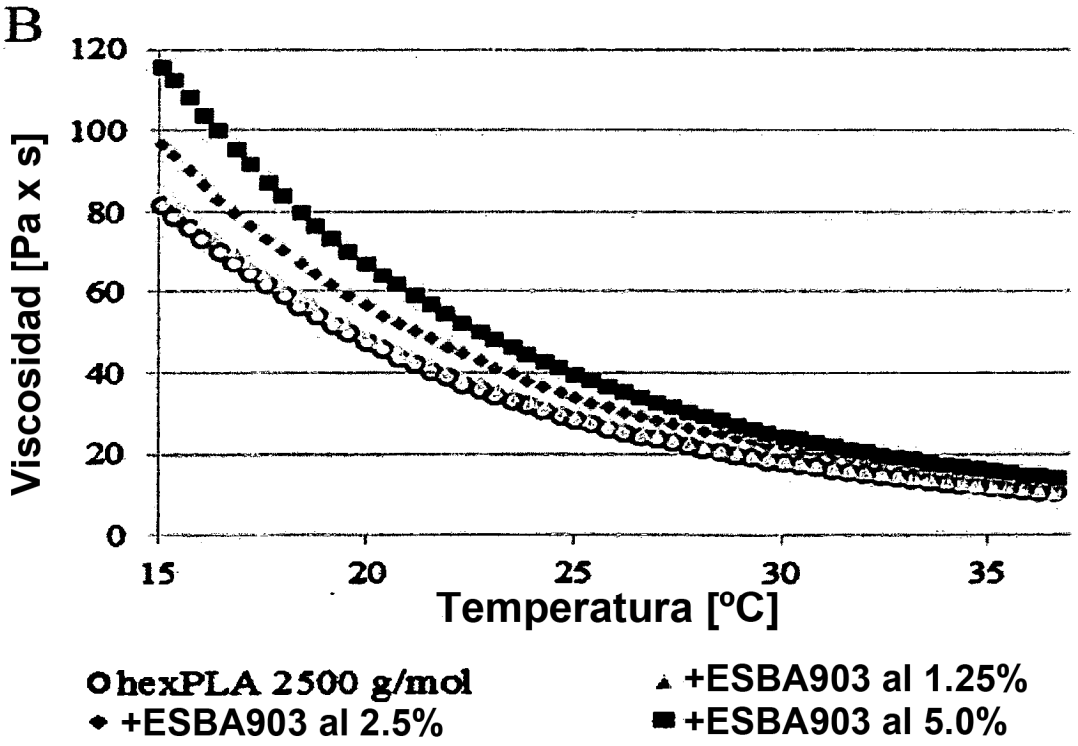

B
Viscosidad [Pa x s]
120
100
80
60
40
20
0
15
20
25
30
35
Temperatura [ºC]
hexPLA 2500 g/mol
+ESBA903 al 1.25%
+ESBA903 al 2.5%
+ESBA903 al 5.0%

Fig. 2

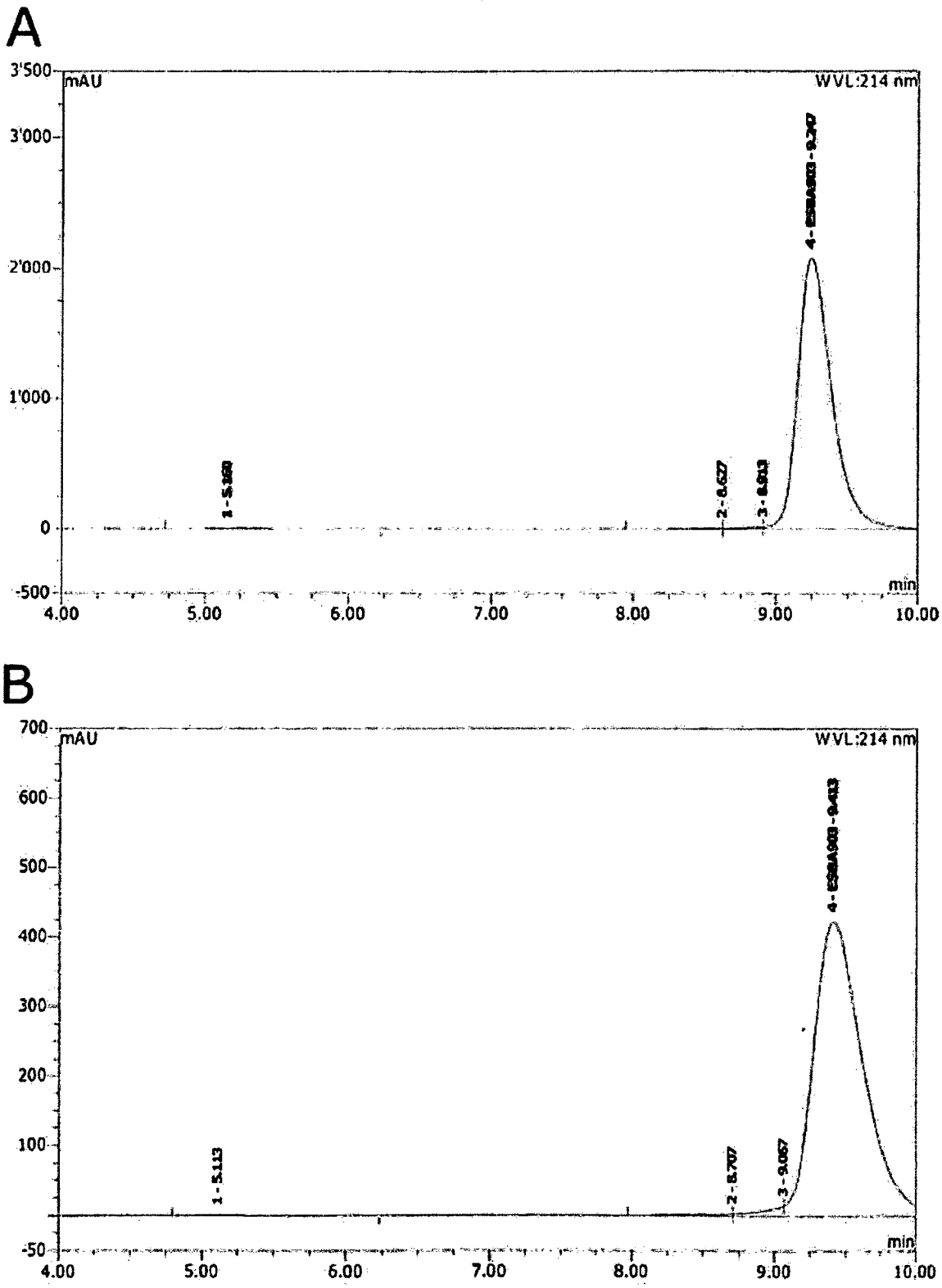

A
mAU
WVL:214 nm
3'500
3'000
2'000
1'000
0
-500
min
4.00
5.00
6.00
7.00
8.00
9.00
10.00
B
mAU
WVL:214 nm
700
600
500
400
300
200
100
-50
1 - 5.113
2 - 8.707
3 - 9.067
min
4.00
5.00
6.00
7.00
8.00
9.00
10.00

Fig. 3

Fig. 4

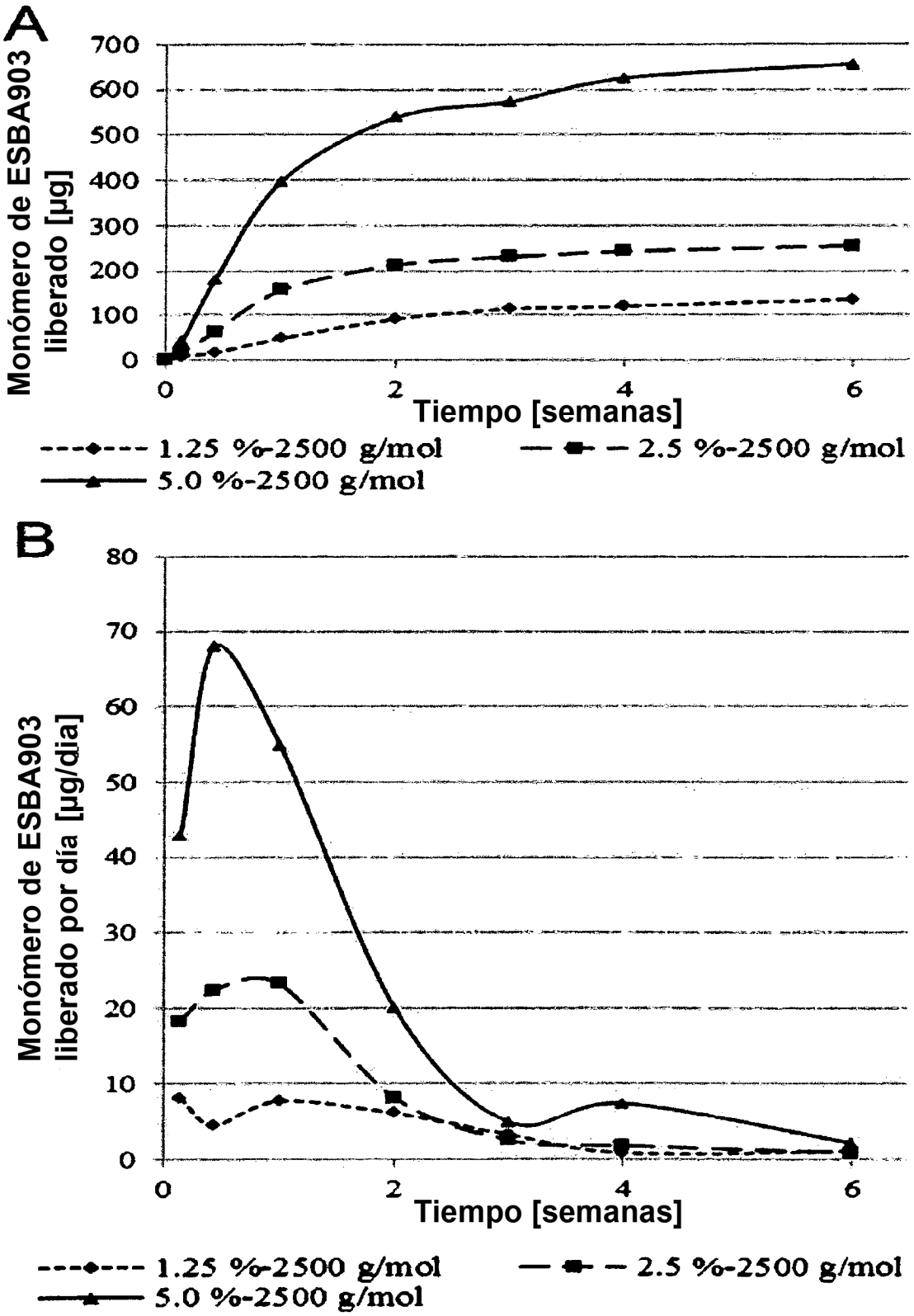

A
Monómero de ESBA903 liberado [µg]
700
600
500
400
300
200
100
0
0
2
4
6
Tiempo [semanas]
1.25 %-2500 g/mol
2.5 %-2500 g/mol
5.0 %-2500 g/mol
B
Monómero de ESBA903 liberado por día [µg/día]
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
2
4
6
Tiempo [semanas]
1.25 %-2500 g/mol
2.5 %-2500 g/mol
5.0 %-2500 g/mol

Fig. 5

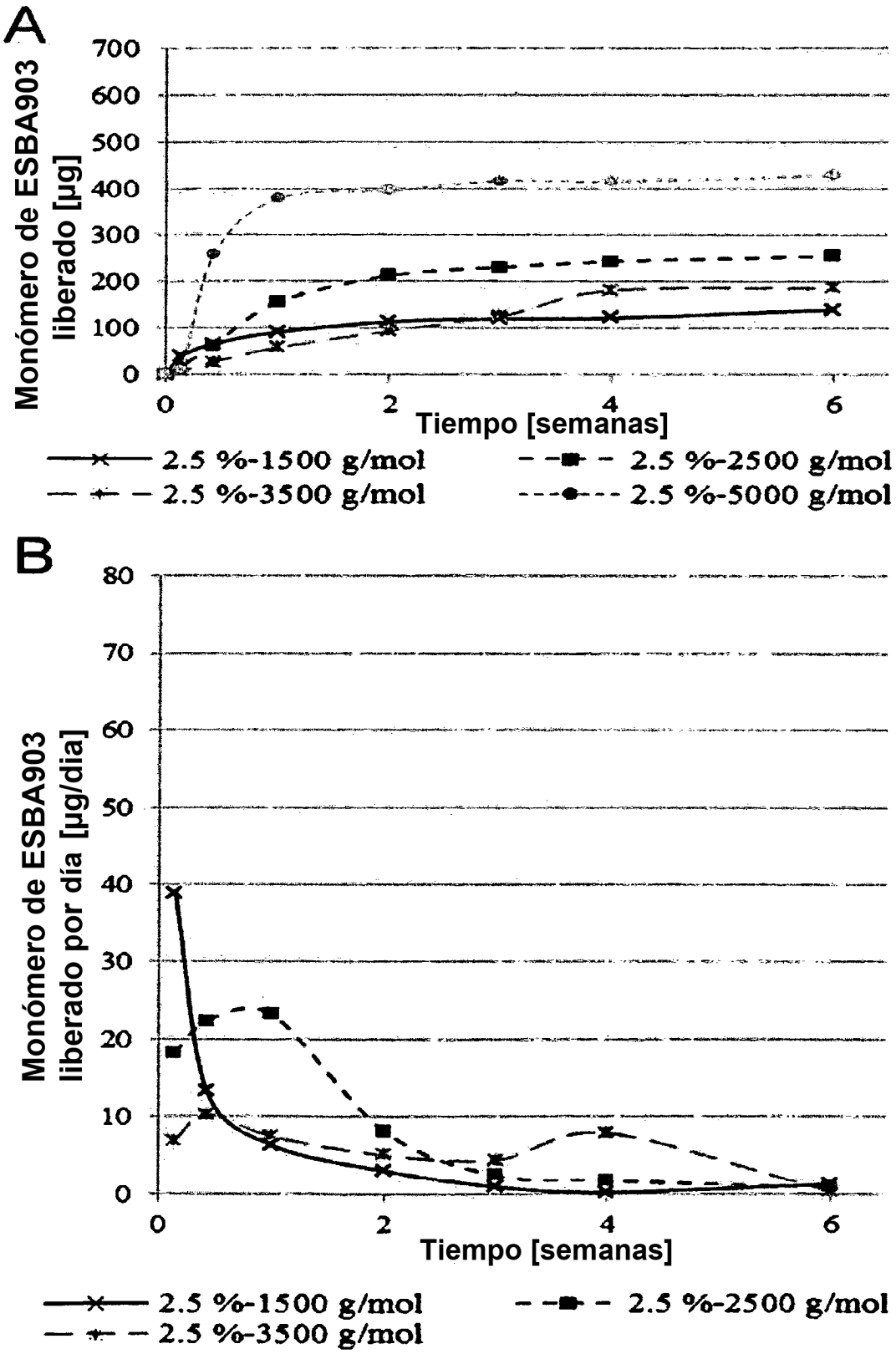

A
Monómero de ESBA903 liberado [µg]
700
600
500
400
300
200
100
0
0
2
4
6
Tiempo [semanas]
2.5 %-1500 g/mol
2.5 %-2500 g/mol
2.5 %-3500 g/mol
2.5 %-5000 g/mol
B
Monómero de ESBA903 liberado por día [µg/día]
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
2
4
6
Tiempo [semanas]
2.5 %-1500 g/mol
2.5 %-2500 g/mol
2.5 %-3500 g/mol

Fig. 6

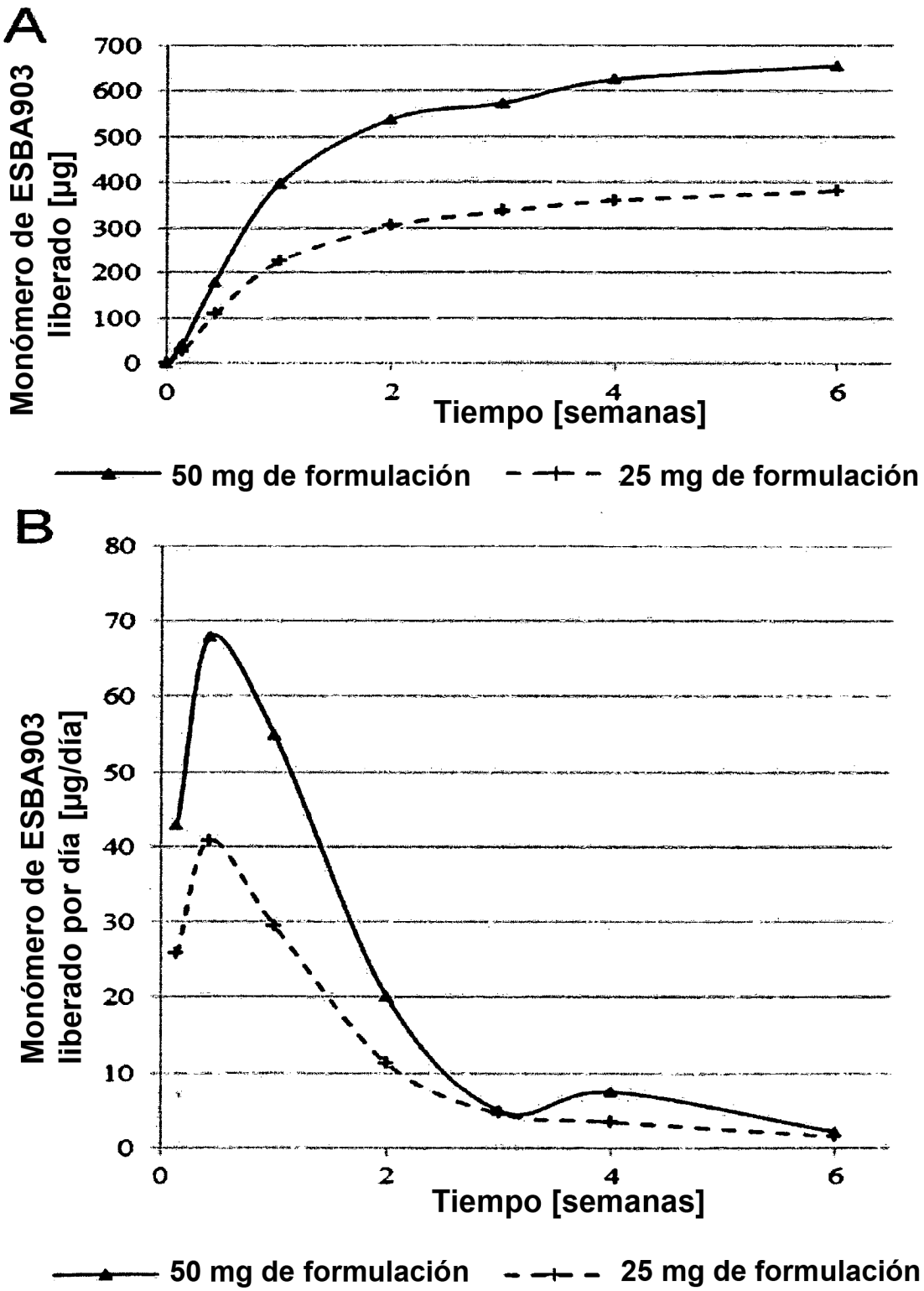

A
Monómero de ESBA903 liberado [µg]
700
600
500
400
300
200
100
0
0
2
4
6
Tiempo [semanas]
50 mg de formulación
25 mg de formulación
B
Monómero de ESBA903 liberado por día [µg/día]
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
2
4
6
Tiempo [semanas]
50 mg de formulación
25 mg de formulación

Fig. 7

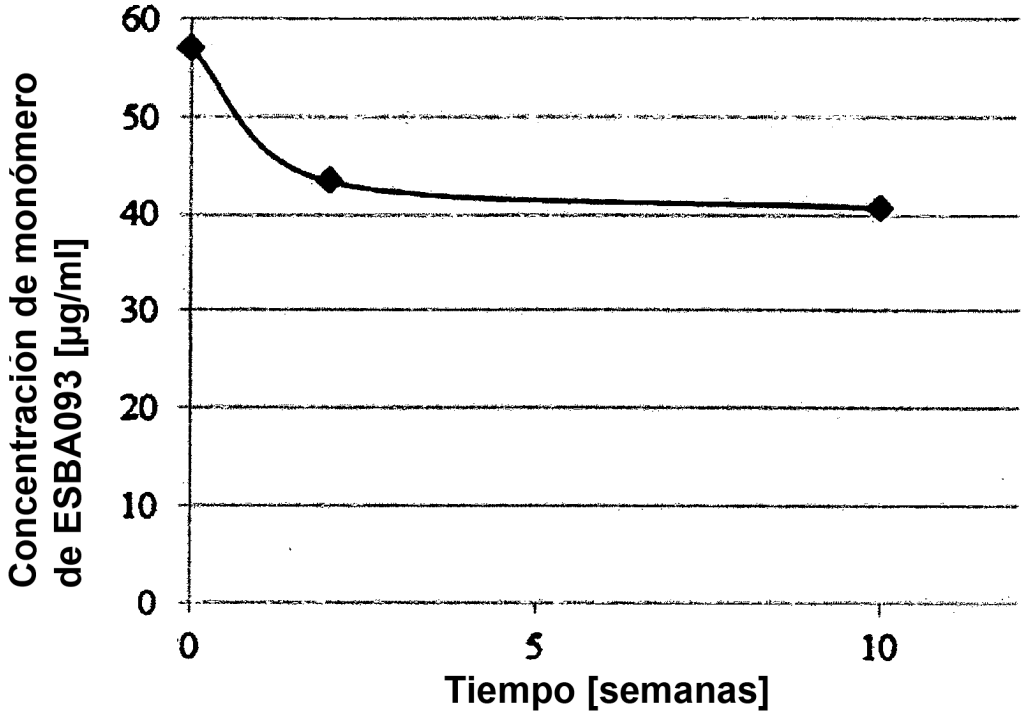

Concentración de monómero de ESBA093 [µg/ml]
60
50
40
30
20
10
0
0
5
10
Tiempo [semanas]

Fig. 8

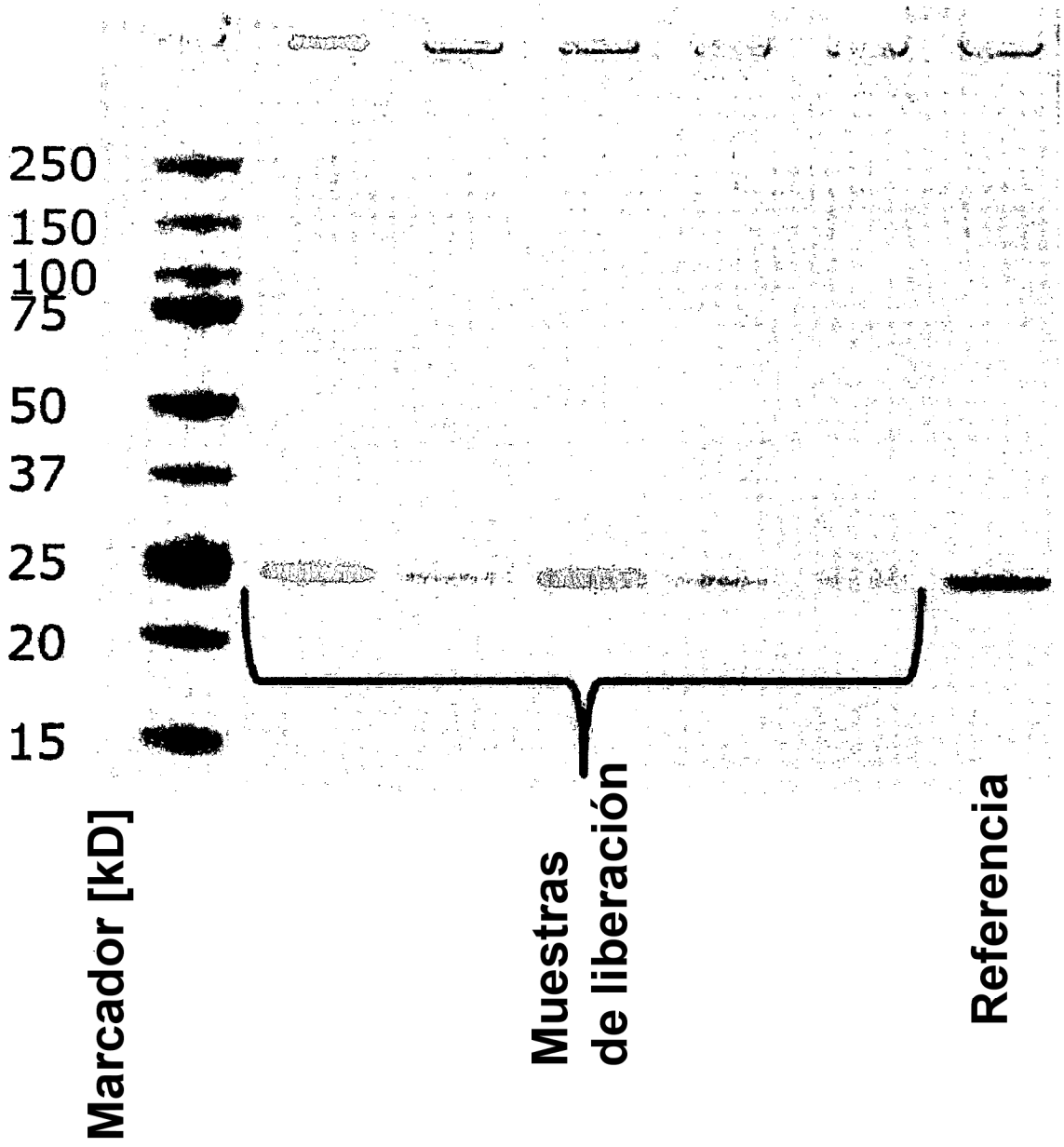

250
150
100
75
50
37
25
20
15
Marcador [kD]
Muestras de liberación
Referencia

Fig. 9