

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 538**

51 Int. Cl.:

A61K 38/23	(2006.01)
A61K 38/38	(2006.01)
A61K 38/48	(2006.01)
A61K 47/24	(2006.01)
A61K 9/00	(2006.01)
A61K 38/28	(2006.01)
A61K 47/06	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.01.2013 PCT/EP2013/051163**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **01.08.2013 WO13110621**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.01.2013 E 13700911 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2017 EP 2806886**

54 Título: **Composiciones de proteínas estabilizadas basadas en alcanos semifluorados**

30 Prioridad:

23.01.2012 EP 12152159

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.07.2017

73 Titular/es:

**NOVALIQ GMBH (100.0%)
Im Neuenheimer Feld 515
69120 Heidelberg, DE**

72 Inventor/es:

**GÜNTHER, BERNHARD;
THEISINGER, BASTIAN;
THEISINGER, SONJA;
SCHERER, DIETER;
WILSON, CLIVE;
PETTIGREW, ANTHONY y
HÜTTIG, ANNETTE**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 625 538 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones de proteínas estabilizadas basadas en alcanos semifluorados

Campo

5 La presente invención pertenece al campo de las composiciones de péptidos y proteínas, en particular composiciones que son útiles como formulaciones farmacéuticas de polipéptidos o proteínas para uso terapéutico o de diagnóstico.

Antecedentes

10 En los últimos años han surgido clases nuevas de agentes biofarmacéuticos terapéuticos basados en péptidos y proteínas dirigidos a enfermedades anteriormente intratables o incurables, como consecuencia de los muchos nuevos avances y desarrollos que han surgido en el campo de la biotecnología.

15 Sin embargo, debido a su deficiente biodisponibilidad oral y en general a sus cortas vidas medias *in vivo*, el método de suministro de muchas de las proteínas y polipéptidos terapéuticos desarrollados hasta ahora ha sido restringido principalmente a la vía parenteral. Todos los anticuerpos monoclonales humanos (una clase rápidamente creciente de agentes terapéuticos dirigidos) que están aprobados actualmente requieren la administración por inyección. Por ejemplo, adalimumab (Humira™, comercializada por Abbott), un anticuerpo monoclonal humano indicado primero para el tratamiento de la artritis reumatoide, se presenta en una jeringa pre-llenada. En la actualidad sólo están disponibles comercialmente unas pocas composiciones terapéuticas orales, mucosales o inhalables, muchas de las cuales incorporan sólo agentes de polipéptido de peso molecular relativamente más bajo. Un ejemplo de un agente terapéutico de proteína de peso molecular más alto suministrado por vía de inhalación es dornase alfa (Pulmozyme™, distribuido por Roche), una disolución de desoxirribonucleasa I humana recombinante, indicada para el tratamiento de la fibrosis quística.

20 El simple peso molecular y complejidad de las proteínas y polipéptidos así como la relativa facilidad para perder su actividad por daño en su integridad estructural, presentan un desafío para el procesamiento, formulación y suministro de estos tipos de agentes terapéuticos.

25 La actividad biológica de una proteína es dictada por su estructura tridimensional de clase α única; por sus estructuras secundaria y terciaria. Lo que contribuye a la estructura final de una proteína plegada en su estado nativo es una combinación específica y equilibrada de interacciones internas, tales como enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas, fuerzas de van der Waals, interacciones hidrofóbicas y enlaces covalentes entre los componentes de la cadena péptidica que abarcan la proteína. Los cambios marginales de estas interacciones pueden tener potencialmente un gran impacto sobre la integridad estructural de una proteína. La función biológica precisa de una proteína se basa en sus interacciones específicas con otras macromoléculas relevantes y/o moléculas pequeñas. Consecuentemente, se perderá la especificidad y por lo tanto la eficiencia terapéutica de una proteína si las características tridimensionales esenciales son interrumpidas de cualquier manera.

30 La pérdida de la estructura de proteína nativa puede ocurrir por varias rutas de degradación. Puede ocurrir agregación por medio de eventos de unión no covalente, tales como la autoasociación de monómeros de proteína nativa, o la asociación de proteínas parcialmente no plegadas para formar oligómeros no nativos. El deterioro y la agregación de una proteína también puede ocurrir mediante eventos químicos covalentes irreversibles, tales como la formación y/o intercambio de enlaces disulfuro de reticulación, hidrólisis de enlaces de péptido, desamidación, u oxidación. El predominio de estos fenómenos no sólo depende de las características inherentes de la proteína, sino también de varias condiciones fisicoquímicas ambientales tales como la temperatura, que incluyen condiciones de estrés relacionadas como los ciclos de congelación-descongelación, pH, concentración de proteína, fuerza iónica, la presencia de aditivos químicos desestabilizadores, sequedad y factores de estrés mecánicos tales como cavitación o cizalla, todos los cuales pueden tener un impacto negativo sobre la estructura plegada nativa de la proteína.

35 La asociación de la proteína en tales formas oligoméricas, frecuentemente de peso molecular alto, presenta un problema importante en la formulación, suministro y almacenamiento a largo plazo de agentes terapéuticos de proteína o polipéptido. La agregación puede llevar a la pérdida del fármaco de proteína activa, resultando en dosificaciones poco fiables e ineficaces. En las formulaciones líquidas, los agregados que pueden ser insolubles pueden precipitar y formar partículas grandes que pueden impedir el flujo, lo que sería muy desfavorable para aplicaciones parenterales. Además, los agregados de proteína pueden exhibir toxicidad y desencadenar respuestas inmunogénicas indeseables (Rosenberg, A.S., AAPS J, 2006, 8, E501). Así, las características del medio elegido para una formulación líquida de proteína o polipéptido pueden tener un impacto importante sobre la practicabilidad y longevidad de una formulación.

40 Se sabe que un medio acuoso es importante en la mayoría de los casos para el mantenimiento de la estructura y bioactividad de la proteína, es decir, las moléculas de agua pueden ser esenciales o incluso la fuerza impulsora para el pliegue, y/o pueden tener una función directa en la actividad enzimática. Por otra parte, un medio acuoso puede tener también un efecto adverso, dependiendo de la naturaleza de la composición de la fase acuosa y varios parámetros tales como el pH y la fuerza iónica. El agua puede actuar como un plastificante o servir como el medio

de reacción, así como directamente como un componente de reacción, tal como en la escisión hidrolítica de enlaces de amida. De esta manera, un método que ha sido usado sustancialmente en el campo de la formulación de agentes terapéuticos de proteína es la liofilización (criodesecado), o el secado por pulverización de la proteína para obtener una forma de polvo en estado sólido. En este caso, la eliminación de agua restringe la flexibilidad conformacional y movilidad difusiva de la macromolécula de proteína para interactuar con otras, disminuyendo así las probabilidades de agregación. Consecuentemente, con las proteínas en estado seco es factible un almacenamiento por un tiempo sustancialmente más largo en comparación con muchas formulaciones acuosas.

Sin embargo, debe señalarse que la degradación y agregación de la proteína puede ocurrir muy fácilmente durante el proceso mismo de liofilización, y así, para disminuir la incidencia de estos eventos, el tiempo invertido y los costes para desarrollar el proceso de liofilización son necesariamente muy altos. También, frecuentemente se añaden a la composición, antes de la liofilización, estabilizadores adicionales tales como sacáridos, polioles y similares, que sirven para compensar el efecto de la pérdida de enlaces de hidrógeno del agua. Estos excipientes, aunque son útiles durante el proceso de liofilización, pueden ser nocivos para la estabilidad en el tiempo de la proteína en estado seco, por ejemplo por separación de fases mediante cristalización. También puede ser necesario incluir otros excipientes estabilizadores después de la liofilización para sostener la mayor duración en almacenamiento de la proteína, añadiéndose al número de componentes que tienen que estar presentes en la formulación final.

También, a pesar de la eliminación de agua, las composiciones de proteína en estado seco no son inmunes a los efectos de los factores ambientales externos, tales como la temperatura y las reacciones de degradación química en donde el agua no es un reactivo clave, tales como desamidación u oxidación. Las temperaturas elevadas producen movilidad aumentada y consecuentemente una probabilidad mayor que reacciones inter-proteína; de esta manera, muchas proteínas liofilizadas todavía tienen que ser almacenadas todo el tiempo en condiciones de refrigeración. También, los excipientes añadidos para hacer el pH y la tonicidad de la formulación más adecuados para el proceso de liofilización, pueden desestabilizar a la proteína en el estado seco final. La introducción de humedad puede ser un problema, y se debe poner atención particular a los medios (y también el material) de almacenamiento de las proteínas en estado sólido seco.

Además, es necesaria la reconstitución de la proteína liofilizada en un medio acuoso como una etapa extra antes de la administración real, y conlleva el riesgo de manejo/dosificación inapropiada y contaminación. La propia etapa de reconstitución puede desencadenar la agregación de proteínas, si el pH o temperatura del medio acuoso no es óptimo, o el tiempo para una rehidratación apropiada es demasiado corto. De esta manera, también es necesario considerar y desarrollar apropiadamente una formulación de un medio de reconstitución adecuado. En general, desde un punto de vista económico, para el desarrollo del proceso y de una formulación de proteína liofilizada se tiene que invertir una cantidad significativamente grande de tiempo, esfuerzo y costes, en comparación con las formulaciones líquidas (Wang, W., *Int. J. Pharm.*, 2000, 203, 1).

El uso de disolventes orgánicos como medios de vehículo es otra opción para formular agentes terapéuticos de proteína. Sin embargo, se debería señalar que dichos disolventes no siempre tienen un efecto estabilizador sobre la estructura de la proteína; en algunos casos es más bien lo opuesto. Por ejemplo, a concentraciones más altas, los disolventes fuertemente polares como DMSO o DMF, y los alcoholes como metanol o etanol, pueden actuar como desnaturalizantes, frecuentemente compitiendo con enlaces de hidrógeno de amida internos, lo que puede llevar a la pérdida de las estructuras terciarias; incluso se puede alterar la proporción de estructuras secundarias, llevando posiblemente a estructuras no nativas (Stevenson, C.L., *Curr. Pharm. Biotech.*, 2000, 1, 165). Consecuentemente, estos disolventes pueden no ser ideales para el almacenamiento a largo plazo de agentes terapéuticos de proteína. Similarmente, la tolerancia fisiológica de estos tipos de disolventes puede ser baja, y es necesario tener en consideración aspectos adicionales en cuanto a la liberación y adsorción de la proteína (también dependiendo del estado de su solubilidad en tales sistemas disolventes).

A menudo las formulaciones terapéuticas de proteína en medios acuosos están disponibles simplemente en forma de una disolución. Por otra parte, las formulaciones que usan disolventes orgánicos requieren una consideración adicional debido a la solubilidad general parcial o no parcial de la proteína en tales medios, dependiendo de la polaridad del disolvente y las propiedades físicas de la proteína. La combinación de disolventes orgánicos hidrófobos y la proteína sin agua (liofilizada) usualmente produce dispersiones o suspensiones. En estos casos, la estabilidad física a largo plazo de la suspensión también es una consideración importante durante el desarrollo de la formulación, junto con la estabilidad a largo plazo de la proteína misma. Se ha informado del uso de disolventes no polares, tales como aceites y lípidos, como vehículos de suspensión para proteínas o polipéptidos para uso parenteral; sin embargo, la estabilidad de estos vehículos a las temperaturas fisiológicas durante periodos prolongados ha sido cuestionada (Knepp, V.M., et al., *Pharm. Res.* 1998, 15, 1090). Además, estos compuestos pueden causar efectos secundarios, tales como dolor en el sitio de la inyección. También, los aceites y lípidos tienden a retardar fuertemente la liberación del agente terapéutico. Esta puede ser una característica útil para hacer formulaciones inyectables de liberación sostenida prolongada o de tipo de depósito, pero no si se desea una biodisponibilidad más rápida e inmediata.

También se han descrito composiciones basadas en polímero, por ejemplo se han reportado formulaciones de suspensión viscosas no acuosas de agentes de proteína o péptido, adecuadas para usarse en conjunto con un dispositivo implantable, que comprende polivinilpirrolidona como componente polimérico y lactado de laurilo (o

alcohol laurílico) como disolvente (documentos de patente US7258869 y EP1152749). Se ha sugerido que estas composiciones son adecuadas para la liberación sostenida de tales agentes terapéuticos.

También se han usado compuestos perfluorados como vehículos líquidos no acuosos de proteínas, polipéptidos y otros agentes biológicamente activos. Por ejemplo, el documento de patente US6458376 describe composiciones propuestas para aplicaciones oftálmicas (tales como gotas oftálmicas aplicadas tópicamente) en las que los compuestos terapéuticos/de diagnóstico, que incluyen oligopéptidos y factores de crecimiento de proteína, se suspenden en perfluorocarburos y en presencia de por lo menos un agente tensioactivo. Sin embargo, no dice nada sobre el sujeto de la elección de agentes tensioactivos particulares que pueden ser adecuados para usarse en las composiciones que contienen compuestos terapéuticos de proteína o péptido, y no hay discusión de la estabilidad química y física a largo plazo de tales compuestos particulares en estas formulaciones en el tiempo.

El documento de patente EP0939655 (y US6730328) revela formulaciones térmicamente estables en las que se usan vehículos no acuosos, hidrófobos, no reactivos, tales como aceite mineral, perfluorodecalina, metoxifluorano, perfluorotributilamina o tetradecano, para composiciones en suspensión que comprenden proteínas, compuestos proteínicos y ácidos nucleicos. Las formulaciones se proponen para métodos de administración parenteral, transdérmica, mucosal, oral y entérica, así como también su uso para la administración continua a largo plazo y suministro por medio de un dispositivo implantable. Sin embargo, no se ha descrito la capacidad de estas composiciones en suspensión para permanecer físicamente estables, es decir, uniformemente dispersas o redispersables después de un periodo de tiempo. Tampoco ha sido demostrada la compatibilidad real tisular de estos tipos de composiciones.

El documento de patente US 2010/0008996 menciona el uso por inhalación o instilación de SFAs como vehículos para el transporte de una sustancia activa a la membrana alveolar/regiones del pulmón de un paciente. Más en detalle, el documento muestra disoluciones coloidales micelares de sustancias activas que exhiben solubilidad suficiente en SFAs, y cuyas moléculas tienen un tamaño en la escala de 1 a 0,1 nm para facilitar el transporte a través de la membrana del pulmón hacia la corriente sanguínea. Describe composiciones basadas en SFA de los fármacos moleculares pequeños, ibuprofeno, alfa-tocoferol, palmitato de retinol, 5-fluorouracilo, bromohexina, oseltamivir y ambroxol, que se describe que son útiles para inhalación o instilación. En contraste, no describe ninguna composición específica de una sustancia activa que sea una molécula más grande, tal como una proteína, o de una sustancia activa que no sea soluble en SFAs.

El documento de patente WO 2011/073134 describe similarmente disoluciones que comprenden ciclosporina, un polipéptido cíclico con peso molecular de 1202,61 en un alcano semifluorado, opcionalmente en presencia de un codisolvente como etanol. Aunque también se mencionan suspensiones y emulsiones como alternativas opcionales, no hay divulgación específica de tales tipos de composición.

Kociok et al. (Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol 2005, 243, 345-358) investigaron si la activación de macrófago por medio de unión a la membrana celular podría ser apoyada por gotitas emulsionadas de taponamiento de un cierto tamaño de vesícula. Para este propósito, prepararon gotitas emulsionadas (referidas como vesículas unilaminares) de F6H8 en una fase continua acuosa mediante la extrusión del alcano semifluorado a través de membranas de filtro de policarbonato hacia una disolución de PBS. Para determinar si la albúmina de suero humano (HSA) tiene influencia sobre la activación de neutrófilos de la sangre, algunas de las gotitas fueron recubiertas con HSA incluyendo HSA en la disolución acuosa de PBS.

Un objeto de la presente invención es presentar composiciones de proteína o polipéptido nuevas que superan las limitaciones y desventajas asociadas con las formulaciones actualmente conocidas.

Compendio de la invención

En un primer aspecto, la invención proporciona composiciones novedosas de polipéptidos o proteínas bioactivas en un vehículo líquido que comprende un alcano semifluorado de la fórmula RFRH, en donde RF es un segmento de hidrocarburo perfluorado lineal de 4 a 12 átomos de carbono, y en donde RH es un grupo alquilo lineal de 4 a 8 átomos de carbono.

El polipéptido o proteína bioactiva tiene un peso molecular de al menos 1.500 Da, en particular al menos aproximadamente 2.000 Da, y se incorpora en la composición para formar una suspensión. El polipéptido o proteína es un agente terapéutico o diagnóstico o una vacuna.

El compuesto bioactivo es preferiblemente un polipéptido o proteína que es sensible a la degradación y/o agregación. Los inventores han encontrado que el uso de un alcano semifluorado produce dispersiones o suspensiones de proteínas más estables tales como insulina, en comparación con otros disolventes orgánicos. En conjunto, también se ha establecido que los alcanos semifluorados tienen un efecto estabilizador notable sobre tales compuestos, y que las proteínas sensibles como la insulina incluso pueden ser sometidas a temperaturas sustancialmente elevadas sin pérdida de bioactividad por agregación y/o degradación.

Los alcanos semifluorados particularmente útiles se seleccionan del grupo que consiste en F4H5, F4H6, F4H8, F6H4, F6H6, F6H8 y F6H10, de acuerdo con la terminología que se define más abajo en la presente memoria. Estos

alcanos semifluorados son bien tolerados por los tejidos, son capaces de disolver una gama amplia de excipientes adicionales que pueden ser requeridos en las composiciones farmacéuticas, y forman – probablemente debido a su anfifilicidad inherente – dispersiones o suspensiones farmacéuticamente ventajosas con polipéptidos y proteínas.

5 En un aspecto, las composiciones de proteína o polipéptido de la presente invención son química y físicamente estables a temperatura ambiente, e incluso a temperatura elevada (por ejemplo a alrededor de 37°C, o temperatura fisiológica), con lo cual es retenida la bioactividad del agente de proteína o péptido y hay una agregación insignificante del agente terapéutico. En un aspecto adicional, las composiciones en suspensión de proteína o polipéptido de la presente invención también permanecen monodispersas y/o pueden ser fácilmente redispersadas después de almacenamiento a temperatura elevada (por ejemplo alrededor de 37°C, o la temperatura fisiológica).

10 Además, la invención provee usos médicos de tales composiciones, así como también métodos para estabilizar polipéptidos o proteínas que son sensibles a la degradación y/o agregación, dichos métodos incluyen la incorporación del polipéptido o proteína en un vehículo líquido que comprende un alcano semifluorado como se define anteriormente.

Descripción detallada de la invención

15 En un primer aspecto, la invención provee una composición que comprende un compuesto bioactivo y un vehículo líquido. El compuesto bioactivo se selecciona de agentes terapéuticos o diagnósticos o vacunas que son polipéptidos y proteínas. Preferiblemente, el polipéptido o proteína tiene un peso molecular de por lo menos aproximadamente 1,500 Da, en particular por lo menos aproximadamente 2,000 Da. El vehículo líquido comprende un alcano semifluorado de la fórmula RFRH, en donde RF es un segmento de hidrocarburo perfluorado lineal de 4 a 20 12 átomos de carbono, y en donde RH es un grupo alquilo lineal de 4 a 8 átomos de carbono. Además, el compuesto bioactivo se incorpora en la composición a fin de formar una dispersión o suspensión; es decir, el compuesto bioactivo se dispersa o suspende en el vehículo líquido.

Los alcanos semifluorados son vehículos muy ventajosos desde la perspectiva farmacéutica: en primer lugar, son sustancialmente no tóxicos, es decir, son bien tolerados por varios tipos de tejido humano y animal después de administración tópica o inyección. En segundo lugar, son químicamente inertes y muestran poca interacción perjudicial con ingredientes activos o inactivos de las formulaciones farmacéuticas. En tercer lugar, probablemente debido a su grado inherente de anfifilicidad son capaces de disolver una amplia gama de compuestos, tales como ingredientes activos moleculares pequeños o muchos excipientes comunes que son útiles en las formulaciones farmacéuticas. En cuarto lugar, cuando se incorporan compuestos que no son solubles o sólo son muy escasamente solubles en alcanos semifluorados (tales como muchos polipéptidos y proteínas), forman dispersiones o suspensiones con propiedades físicas o farmacéuticas muy útiles, es decir, con poca o ninguna tendencia a formar sedimentos sólidos, no dispersables.

Los inventores han encontrado que las dispersiones y suspensiones de proteína en alcanos semifluorados son sorprendentemente estables. Permanecen finamente dispersos y homogéneos, y si se produce flotación o sedimentación, generalmente lo hace lentamente, dejando tiempo suficiente para que el paciente o asistente de salud retire una dosis después de agitar el recipiente (por ejemplo, vial) que sostiene la formulación. No se observa la formación de agregados grandes escasamente redispersables, y después de flotación o sedimentación las partículas de proteína se redispersan fácilmente sin pérdida significativa agitando suavemente, y parecen retener en buena parte su distribución de tamaño de partícula original.

40 Esto está en claro contraste con otros vehículos líquidos químicamente inertes, tales como perfluorocarburos, que se han propuesto como vehículos para medicinas, por ejemplo en US 5,518,731 y US 6,458,376. Los inventores han encontrado que cuando se usan compuestos perfluorados como vehículos líquidos, tales como perfluorooctano o perfluorodecalina, u otros disolventes orgánicos como octano, las suspensiones tienden a ser significativamente más inestables, es decir, se separan muy rápidamente por flotación de la fase dispersa, o por su sedimentación, dependiendo de las densidades relativas de la fase dispersa y de la fase continua. Esto va acompañado por una formación rápida de agregados de partículas que pueden ser densos y escasamente redispersables. La flotación o sedimentación rápida hace que la dosificación precisa y reproducible sea un reto, si no imposible. Por ejemplo, si una suspensión inyectable u oftálmica se sedimenta muy rápidamente después de agitar, la primera dosis tomada de un recipiente lleno (por ejemplo, un vial), si no se retira inmediatamente después de la agitación, contendrá un número de partículas de fármaco menor al deseado, a menos que el recipiente se mantenga boca abajo, en cuyo caso se dispensará más de la cantidad deseada de partículas de fármaco. Cuando el mismo recipiente está casi vacío y se dispensan las últimas dosis, la dosis de fármaco retirada por volumen será demasiado alta si fue baja al comienzo, y viceversa.

Además, la formación de agregados de proteínas grandes y escasamente redispersables en vehículos perfluorados u otros disolventes orgánicos como octano conduce potencialmente a la obstrucción de las agujas finas de las inyecciones como las que se usan para inyección subcutánea. Existe el riesgo de que las partículas grandes induzcan reacciones adversas en el cuerpo, en particular procesos de inflamación.

También se observó que las partículas suspendidas en compuestos perfluorados u octano tienden a adherirse a las

paredes del recipiente vial de vidrio y/o la aguja-jeringa usada para retirar una dosis. Esto también llevaría a interferir con la dosificación precisa.

5 Las propiedades ventajosas de las suspensiones basadas en SFA dan como resultado una calidad farmacéutica y características de desempeño superiores. El grado de conveniencia para el paciente y/o proveedor de servicios de salud aumenta considerablemente. Más importante, la exactitud de la dosificación, es decir, la precisión y reproducibilidad de la dosificación, mejoran considerablemente sobre otros tipos de suspensiones farmacéuticas. Esto producirá un efecto terapéutico más fiable y un menor riesgo de efectos adversos resultantes de sobredosificación.

10 Al mismo tiempo, los alcanos semifluorados tienen un efecto estabilizador notable sobre polipéptidos y proteínas. Previenen o inhiben sustancialmente la agregación de proteína y reducen significativamente la degradación química. De hecho, se ha encontrado que algunas proteínas sensibles son estabilizadas a tal grado que, cuando se incorporan dentro de un alcano semifluorado, se pueden exponer a temperaturas altas, tales como 50°C sin pérdida de su bioactividad. Las ventajas clave de la presente invención son producidas por la presencia de un alcano semifluorado en la composición, que funciona como un vehículo líquido. Los alcanos semifluorados son alcanos lineales o ramificados algunos de cuyos átomos de hidrógeno han sido reemplazados por flúor. En los alcanos semifluorados (SFAs) usados en la presente invención, está presente un segmento de hidrocarburo lineal no fluorado y un segmento de hidrocarburo lineal perfluorado. Así, estos compuestos siguen la fórmula general $F(CF_2)_n(CH_2)_mH$. De acuerdo con la presente invención, n se selecciona del intervalo de 4 a 12, y m se selecciona del intervalo de 4 a 8.

20 Una nomenclatura que se usa frecuentemente para SFAs designa un segmento de hidrocarburo perfluorado como RF, y un segmento no fluorado como RH. Alternativamente, los compuestos pueden ser referidos como FnHm y FnHm, respectivamente, en donde F significa un segmento de hidrocarburo perfluorado, H significa un segmento no fluorado. Nuevamente n y m definen el número de átomos de carbono del segmento respectivo. Por ejemplo, F3H3 se usa para perfluoropropilpropano. Además, este tipo de nomenclatura usualmente se utiliza para compuestos que tienen segmentos lineales. Por lo tanto, a menos que se indique de otra manera, se debe asumir que F3H3 significa 1-perfluoropropilpropano, en lugar de 2-perfluoropropilpropano, 1-perfluoroisopropilpropano o 2-perfluoroisopropilpropano.

25 Los SFAs que son útiles en el contexto de la presente invención también se describen en los documentos EP-A 965 334, EP-A 965329 y EP-A 2110126, haciéndose referencia en la presente memoria a la divulgación de tales documentos.

30 Los SFAs preferidos incluyen en particular los compuestos F4H5, F4H6, F4H8, F6H4, F6H6, F6H8 y F6H10. Para realizar la invención se prefiere particularmente F4H5, F4H6, F6H6 y F6H8. En otra realización particularmente preferida, la composición de la invención comprende F6H8.

35 Opcionalmente, la composición puede comprender más de un SFA. Puede ser útil combinar SFAs, por ejemplo para obtener una propiedad objetivo particular, tal como un cierto grado de densidad o viscosidad. Si se usa una mezcla de SFAs, se prefiere adicionalmente que la mezcla comprenda por lo menos uno de F4H5, F4H6, F6H4, F6H6, F6H8 y F6H10, y en particular uno de F4H5, F4H6, F6H6 y F6H8. En otra realización, la mezcla comprende por lo menos dos miembros seleccionados de F4H5, F4H6, F6H4, F6H6, F6H8 y F6H10, y en particular por lo menos dos miembros seleccionados de F4H5, F6H6 y F6H8.

40 Los SFAs líquidos son química y fisiológicamente inertes, incoloros y estables. Sus densidades típicas varían de 1,1 a 1,7 g/cm³, y su tensión superficial puede ser tan baja como 19 mN/m. Los SFAs del tipo RFRH son insolubles en agua pero también un poco anfífilos, con lipofilidad creciente que se correlaciona con un tamaño creciente del segmento no fluorado.

45 Los SFAs líquidos del tipo RFRH se usan comercialmente para desdoblarse y reaplicar una retina, para taponamiento a largo plazo como sustituto del humor vítreo (H. Meinert *et al.*, *European Journal of Ophthalmology*, volumen 10(3), p. 189-197, 2000), y como soluciones de lavado para aceite de silicón residual después de cirugía vítreo-retinal. Experimentalmente, también se han usado como sustitutos de sangre (H. Meinert *et al.*, *Biomaterials, Artificial Cells, and Immobilization Biotechnology*, volumen 21(5), p. 583-95, 1993). Estas aplicaciones han establecido a los SFAs como compuestos fisiológicamente bien tolerados. Por otra parte, los SFAs no se han usado como excipientes en los productos farmacéuticos aprobados hasta la fecha.

50 La composición de la invención comprende un compuesto bioactivo seleccionado del grupo de polipéptidos o proteínas. Los polipéptidos y proteínas representan polímeros de unidades de aminoácido que se unen entre sí mediante enlaces peptídicos. Puesto que los límites de tamaño que se usan frecuentemente para diferenciar entre polipéptidos y proteínas son un poco arbitrarios, las dos expresiones para estas moléculas no deberían entenderse - dentro del contexto de la presente invención - como mutuamente exclusivas: un polipéptido también puede ser referido como una proteína, y viceversa. Típicamente, el término "polipéptido" se refiere solamente a una sola cadena de polímero, mientras que la expresión "proteína" también se puede referir a dos o más cadenas de polipéptido que están unidas entre sí mediante enlaces no covalentes. El compuesto bioactivo de acuerdo con la

invención tiene un peso molecular de al menos 1.500 Da, en particular al menos aproximadamente 2.000 Da.

Como se describe anteriormente con más detalle, la bioactividad de polipéptidos y proteínas no sólo reside en su estructura química primaria, es decir, su secuencia de aminoácidos, sino también en su estructura secundaria y terciaria, a menudo también en su estructura cuaternaria. A menudo la sensibilidad de un polipéptido o proteína a la degradación también está relacionada con su estructura secundaria, terciaria o incluso cuaternaria. Los polipéptidos y proteínas que se beneficiarán de las presentes invenciones incluyen compuestos tanto químicamente inestables, por ejemplo compuestos que son propensos a hidrólisis, como también compuestos que tienen la tendencia de perder rápidamente su estructura secundaria o superior, y/o desnaturalizarse. En particular, la composición comprende un polipéptido o proteína que es sensible a la degradación y/o agregación.

Típicamente tal sensibilidad significa que el compuesto respectivo no puede ser formulado como una formulación líquida en medios acuosos comunes (p. ej., lista para usarse por inyección), incluso cuando se incorporan excipientes estabilizadores (tales como disoluciones tampón, etc.), y almacenarse bajo condiciones normales. De esta manera, las formulaciones farmacéuticas de compuestos sensibles, para tener una duración aceptable (típicamente de al menos 2 años) se deben bien refrigerar durante el almacenamiento o se deben proveer en una forma seca de la que se reconstituyen antes de usarse. En particular, "sensible" significa que el compuesto respectivo pierde al menos aproximadamente 5% de su bioactividad en menos de 1 año de almacenamiento en condiciones normales cuando se formula en un vehículo acuoso optimizado.

En una realización preferida, el polipéptido o proteína es un compuesto terapéutico o diagnóstico o una vacuna. Como se usa en este documento, un compuesto terapéutico es un compuesto que es útil para prevenir una enfermedad o afección, aliviar cualquier síntoma de una enfermedad o afección, mejorar cualquier enfermedad o afección, retrasar el avance de una enfermedad o afección, o similares. Un compuesto diagnóstico es útil para determinar el estado de un organismo, o para diagnosticar una enfermedad, afección, síntoma o fenotipo de un paciente. El compuesto terapéutico se debe administrar al paciente, mientras que el agente diagnóstico se puede usar *in vivo* o *in vitro*, dependiendo del caso específico. Para evitar dudas, el compuesto terapéutico o diagnóstico se incorpora dentro de la composición de la invención en una cantidad terapéuticamente o diagnósticamente eficaz.

Los inventores también han encontrado que el efecto estabilizador de los alcanos semifluorados sobre la actividad química o biológica es muy pronunciado si el compuesto bioactivo es un polipéptido o proteína en el intervalo de tamaño molecular de bajo a medio para agentes terapéuticos y diagnósticos de esta clase. En una realización específica, el peso molecular del agente bioactivo está en el intervalo de aproximadamente 2.000 Da a aproximadamente 100.000 Da. En una realización adicional, el peso molecular está en la escala de aproximadamente 1.000 Da a aproximadamente 60.000 Da. En realizaciones adicionales, está en la escala de aproximadamente 2.000 Da a aproximadamente 60.000 Da, o de aproximadamente 5.000 Da a aproximadamente 50.000 Da, respectivamente. Por otra parte, el beneficio de estabilidad física y/o fácil redispersabilidad de la dispersión o suspensión también se obtiene fácilmente con polipéptidos y proteínas de peso molecular relativamente grande, tales como albúmina de suero (aproximadamente 67 kDa), o incluso con proteínas de más de 100.000 Da. En una realización específica adicional, el agente bioactivo es una proteína de solo dominio o una proteína de dos dominios. Esto se basa en el descubrimiento de los inventores de que el efecto estabilizador de los alcanos semifluorados también es muy pronunciado en combinación con tales proteínas que tienen sólo uno o dos dominios. Como se usa en la presente memoria, un dominio de proteína es una parte de la secuencia de aminoácidos de la proteína que forma una estructura compacta tridimensional que puede evolucionar, funcionar y existir un poco independientemente del resto de la cadena de proteína. Los dominios pueden variar sustancialmente de longitud; sin embargo, en la mayoría de los casos comprenden de aproximadamente 25 a aproximadamente 500 monómeros de aminoácido.

Opcionalmente, el agente bioactivo puede ser una enzima, hormona o factor de crecimiento, o una proteína estructural. La composición puede comprender una hormona terapéutica que sirve para reemplazar o complementar una hormona natural deficiente en un paciente. Además, opcionalmente la composición puede comprender más de un polipéptido o proteína bioactiva.

En una realización opcional adicional, el agente bioactivo puede ser una proteína que es recombinante o una proteína que puede ser de una fuente derivada naturalmente o un péptido sintetizado. La proteína también puede ser un conjugado de proteína o un análogo de una proteína natural y/o endógena.

De acuerdo con una realización adicional, la composición comprende una insulina como agente bioactivo, en particular una insulina humana recombinante. Se encontró sorprendentemente que la insulina dispersa en un alcano semifluorado es muy estable y no se agrega incluso cuando se almacena a temperaturas sustancialmente elevadas, tales como aproximadamente 50°C.

Como se mencionó, el polipéptido o proteína se incorpora en la composición para formar una dispersión o suspensión. En otras palabras, el polipéptido o proteína se suspende en el vehículo líquido. Que se forme una suspensión dispersando la proteína en el vehículo líquido depende por ejemplo de la naturaleza de la proteína, su concentración en el vehículo y los SFAs seleccionados.

Como se usa en el presente documento, una suspensión se puede definir como un tipo de dispersión, es decir, un sistema que tiene al menos una fase continua (o coherente) y al menos una fase discontinua (o interna) que se dispersa en la fase continua. En una suspensión, la fase dispersa está en estado sólido. Las suspensiones útiles para poner en práctica la invención son líquidas, por lo menos a la temperatura fisiológica, lo que significa que la fase continua es un líquido. Típicamente, las suspensiones también son líquidas a temperatura ambiente. Aparte de las suspensiones, se entiende que el término dispersión incluye sistemas coloidales en los cuales una proteína y polipéptido está finamente disperso en la fase líquida. En algunas realizaciones, el polipéptido o proteína también al menos parcialmente está solvatado.

En una realización particular, la composición comprende sólo el polipéptido o proteína bioactiva y uno o más SFAs, es decir, la composición consiste en el polipéptido o proteína bioactiva y uno o más de los SFAs que se definen anteriormente.

En contraste con algunas otras suspensiones conocidas de la técnica anterior, las formulaciones de la invención no requieren agente tensioactivo, o sólo cantidades pequeñas de agente tensioactivo para su estabilización física. Esta es una ventaja significativa, ya que los agentes tensioactivos tienen un potencial sustancial de irritación y toxicidad local, especialmente cuando se administran por inyección subcutánea o intramuscular o por instilación en el ojo. De acuerdo con una de las realizaciones preferidas, las composiciones de la invención están sustancialmente libres de agente tensioactivo. En una realización adicional, la cantidad total de agente o agentes tensioactivos, si se incorpora más de uno, no es mayor que aproximadamente 10% en peso, en particular no mayor que aproximadamente 5% en peso, o de preferencia no mayor que aproximadamente 2% en peso, respectivamente. En realizaciones preferidas adicionales, la cantidad es no mayor que aproximadamente 1% en peso, o no mayor que aproximadamente 0,5% en peso, respectivamente. En este contexto, se entiende que los SFAs descritos en la presente memoria, aunque tienen algunas propiedades anfífilas debido a su estructura química que incluye grupos alquilo (o alquileo) fluorados o no fluorados caracterizados por diferentes grados de lipofilidad, no se consideran dentro de los agentes tensioactivos.

Los agentes tensioactivos que están ausentes o sólo están presentes en pequeñas cantidades incluyen agentes tensioactivos no iónicos, catiónicos, aniónicos y zwitteriónicos, usados comúnmente como excipientes en varios tipos de composiciones farmacéuticas, por ejemplo como agentes de humectación, emulsionantes, agentes dispersantes, solubilizantes y similares. Ejemplos de agentes tensioactivos que se consideran potencialmente útiles incluyen tiloxapol, poloxámeros tales como Pluronic F68LF o Lutrol F68, Pluronic L-G2LF y Pluronic L62D, polisorbato 20 y polisorbato 80, derivados de aceite de ricino de polioxietileno, ésteres de sorbitán, estearatos de polioxilo, lecitinas, fosfolípidos purificados o sintéticos, y mezclas de dos o más de los mismos.

Las composiciones de la invención pueden comprender opcionalmente un líquido orgánico no fluorado, por ejemplo para modificar las propiedades del vehículo líquido, tales como la viscosidad. Este otro líquido puede ser un aceite seleccionado de aceites de glicérido, ceras líquidas y parafina líquida, o un disolvente orgánico que exhibe un alto grado de biocompatibilidad, o una mezcla de más de un excipiente líquido.

Ejemplos de excipientes oleosos potencialmente útiles que se pueden usar en combinación con uno o más SFAs incluyen aceites de triglicérido (es decir, aceite de soja, aceite de oliva, aceite de cártamo, aceite de algodón, aceite de ricino, aceite de almendras dulces), aceite mineral (es decir, petrolato y parafina líquida), triglicéridos de cadena media (MCT), ácidos grasos oleosos, miristato de isopropilo, alcoholes grasos oleosos, ésteres de sorbitol y ácidos grasos, ésteres de sacarosa oleosos, o cualquier otra sustancia oleosa que sea fisiológicamente tolerada por el ojo.

Ejemplos de disolventes orgánicos potencialmente útiles incluyen glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y etanol. Preferiblemente, la concentración del codisolvente debería ser baja con respecto a la del SFA o la mezcla de SFA. Si se usa un disolvente orgánico como etanol, es recomendable mantenerla por debajo de un nivel de aproximadamente 5% en peso. Más preferiblemente, el contenido de etanol es de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 2% en peso, y lo más preferiblemente no mayor que aproximadamente 1% en peso.

Desde luego, la composición puede comprender excipientes farmacéuticos adicionales según se requiera o sea de utilidad. Los excipientes potencialmente útiles incluyen ácidos, bases, antioxidantes, estabilizadores, agentes sinérgicos, agentes colorantes, agentes espesantes, y - si se requiere en un caso particular - un conservante. Generalmente, sin embargo, la invención provee un medio para formular composiciones no acuosas que son microbiológicamente estables. Esto se debe al hecho de que los SFAs normalmente no son susceptibles de contaminación microbiana. Por lo tanto, es posible formular composiciones sin conservantes para llenar recipientes de uso múltiple. Las composiciones son conservantes son mejor toleradas por muchos pacientes y permiten reducir los costos de los productos finales.

Las suspensiones líquidas de la invención se pueden preparar mediante métodos convencionales. En principio, las partículas sólidas que comprenden el ingrediente activo se pueden dispersar en el vehículo líquido que comprende el SFA. Alternativamente, las partículas se pueden precipitar *in situ* añadiendo al vehículo basado en SFA una solución -típicamente orgánica - del ingrediente activo (y opcionalmente uno o más excipientes sólidos), en condiciones controladas.

- 5 El tamaño de partícula de la fase dispersa se puede ajustar antes o después que las partículas se combinen con el vehículo líquido. En una de las realizaciones preferidas, se proveen partículas del ingrediente activo que ya tienen el tamaño de partícula seleccionado apropiadamente. Los polvos que tienen tal tamaño de partícula seleccionado se pueden obtener directamente de la síntesis del compuesto respectivo mediante ingeniería cristalina, o después de síntesis mediante métodos convencionales de molienda y pulverización usando equipo estándar tal como un molino de bolas, molino de martillo, molino de rodillos, molino coloidal, molino de chorro, o similares. Si el tamaño de partícula se va a reducir después de la preparación de una suspensión, se puede usar ultrasonidos así como también diversos tipos de homogeneizadores, tales como los molinos coloidales u homogeneizadores de alta presión.
- 10 Las propiedades físicas superiores de las suspensiones de acuerdo con la invención hacen a estas composiciones particularmente útiles para su administración tópica en el ojo, oído, nariz o pulmón de un paciente, o parenteralmente por medio de inyección. Los modos de inyección preferidos incluyen la inyección dérmica, subcutánea, intramuscular y locorregional. Las vías de administración más preferidas son la subcutánea e intramuscular.
- 15 Las realizaciones adicionales se harán obvias a partir de los siguientes ejemplos que ilustran la invención en algunos de sus aspectos principales.

Ejemplo 1: estabilización de α -quimotripsinógeno A

20 Se prepararon 30 viales con alícuotas de α -quimotripsinógeno A liofilizado (CHY) a partir de una solución madre de la proteína. A cada una de 10 alícuotas se le agregaron 2,5 mL de solución amortiguadora de fosfato de potasio (PPB, 50 mM, pH 8,0); a cada una de otras 10 alícuotas se le añadieron 2,5 mL de F6H8. Los 10 viales restantes sirvieron como control. Los viales se purgaron con nitrógeno, se agitaron suavemente y se guardaron a 50°C. Los viales se retiraron a intervalos predeterminados, su contenido se extrajo y se analizó por medio de dicroísmo circular y un ensayo enzimático.

25 Como resultado, se encontró que la actividad enzimática de las muestras almacenadas en la solución amortiguadora se redujo notablemente ya después de un tiempo de almacenamiento de 1 día. La aglomeración era visible. En contraste, la muestra de SFA retuvo actividad enzimática sustancial durante un periodo de semanas. De hecho, la bioactividad de CHY almacenado en F6H8 fue muy similar a los viales de control. La tabla 1 muestra la actividad enzimática encontrada en unidades/mL para cada muestra ensayada.

30 Con respecto a los resultados de dicroísmo circular, las muestras de CHY almacenadas en F6H8 fueron muy similares a los controles en todos los tiempos, mientras que las muestras de CHY almacenadas en PPS mostraron cambios significativos que indican desnaturalización sustancial.

Tabla 1

Días de almacenamiento	CHY en PPB	CHY en F6H8	Controles de CHY
1	0,9	19,0	21,4
7	1,3	21,9	22,2
14	0,0	11,0	12,0
28	0,4	14,8	16,9
42	0,2	9,1	7,9
56	0,6	13,0	12,4
80	0,3	8,4	10,5

35 A alícuotas de 2,5 mg de insulina bovina, se le agregaron 2,5 mL de F6H8 o 2,5 mL de ácido clorhídrico acuoso muy diluido (0,04 M) y se agitaron suavemente. Las muestras se purgaron con nitrógeno u oxígeno y después se almacenaron a 37°C o 50°C, respectivamente. Los viales se retiraron a intervalos predeterminados, su contenido se extrajo y se analizó por dicroísmo circular y un ensayo de HPLC.

Ejemplo 2: estabilización de insulina bovina

40 Como resultado se encontró que la insulina era muy inestable cuando se almacenaba en ácido clorhídrico acuoso, pero sustancialmente estable a ambos niveles de temperatura cuando se almacenaba en F6H8, sin importar si las muestras habían sido purgadas con nitrógeno u oxígeno. Esto se confirmó mediante ambos métodos analíticos. Los resultados del ensayo de HPLC (en % de insulina recuperada) se dan en la tabla 2 (almacenamiento a 37°C), y la tabla 3 (almacenamiento a 50°C).

Tabla 2

Días de almacenamiento	Gas	Insulina en HCl	Insulina en F6H8
0		94,0	84,8
1	Nitrógeno	86,2	89,3
1	Oxígeno	95,1	92,5
22	Nitrógeno	1,5	84,9
22	Oxígeno	1,5	91,5

Tabla 3

Días de almacenamiento	Gas	Insulina en HCl	Insulina en F6H8
0		94,0	84,8
1	Nitrógeno	1,1	87,9
1	Oxígeno	2,2	88,8
16	Nitrógeno	2,2	88,4
16	Oxígeno	5,5	86,7
22	Nitrógeno	2,5	95,4
22	Oxígeno	2,7	92,3

5 Ejemplo 3: estabilidad física y redispersabilidad de suspensiones de insulina humana

En esta serie de experimentos se evaluó la estabilidad física y redispersabilidad de suspensiones de insulina humana (HI) en un SFA y otros líquidos no acuosos. Como se ha mencionado, el grado de estabilidad física y en particular la redispersabilidad son criterios importantes que determinan la conveniencia de un medio de suspensión, por ejemplo para una composición farmacéutica inyectable o tópica.

- 10 Se determinó fotométricamente la retención de turbidez de suspensiones de insulina humana (HI) en F6H8, perfluorodecalina (PFD), perfluorooctano (PFO) y octano (OCT), midiendo la transmitancia a 350 nm a varios intervalos de tiempo durante un periodo total de 24 horas (figura 1).

15 La insulina humana (Sigma, 12643) se suspendió en cada uno de los líquidos a una concentración de 0,91 mg/mL. Las suspensiones se agitaron con vórtice durante 3 segundos, después se sometieron a sonicación en un baño en hielo durante 5 minutos. Inmediatamente después de la sonicación, las suspensiones se transfirieron mediante pipeta a celdas de cuarzo de 3 mL con tapón. Se midió la transmitancia de cada una de las suspensiones a 350 nm usando un espectrofotómetro UV, a intervalos de tiempo durante un periodo de 16 horas. Después, las suspensiones se redispersaron durante 15 minutos usando un agitador de tubo de ensayo (Labinco) fijado a 10 rpm y un ángulo de 45 grados. Después de la redispersión se midió la transmitancia durante un periodo adicional de 8 horas. Los datos de transmitancia medidos a 350 nm se normalizaron contra una solución de insulina humana a 0,91 mg/mL en HCl 0,04M, pH 1,6.

20 Como resultado, se observó que la separación de fase ocurrió significativamente más lentamente en la insulina humana suspendida en F6H8 (figura 1). Fue evidente una mayor estabilidad de la suspensión de insulina humana en F6H8, en comparación con las muestras en los disolventes perfluorados y octano a valores de turbidez más altos (que se correlacionaban con valores más bajos de % de transmitancia) retenidos durante un periodo más largo. En contraste, las suspensiones en los disolventes perfluorados y el disolvente hidrocarburo octano, perdieron turbidez rápidamente y mostraron separación de fases (p. ej., por flotación o sedimentación), como lo muestran los claros aumentos rápidos de transmitancia. Se podía observar heterogeneidad en las celdillas de muestra de estos disolventes, incluso en la suspensión formada inicialmente, haciéndose rápidamente evidente con el tiempo una sedimentación y/o flotación adicional hacia la interfaz líquido-aire.

30 Después de un tiempo de reposo de 16 horas, la suspensión redispersada de insulina humana en F6H8 también recuperó aproximadamente el mismo grado de turbidez que cuando se formó inicialmente la suspensión. En contraste, no se pudo recuperar el mismo grado de turbidez de las suspensiones de perfluorodecalina, perfluorooctano y octano después de redispersión. De esta manera, solamente la suspensión de la proteína en SFA, pero no las suspensiones en PFD, PFO y OCT, mostraron propiedades físicas adecuadas para uso farmacéutico.

35

Ejemplo 4: estabilidad física y redispersabilidad de suspensiones de α -quimotripsina

La retención de turbidez de suspensiones de α -quimotripsina (CHY) en F6H8, perfluorodecalina (PFD), perfluorooctano (PFO) y octano (OCT), se determinó fotométricamente midiendo la transmitancia a 350 nm a varios intervalos de tiempo durante un periodo total de 24 horas.

- 5 Se suspendió α -quimotripsina (Sigma, C4129) en cada uno de los disolventes a una concentración de 2 mg/mL. Las suspensiones se agitaron con vórtice durante 3 segundos, después se sometieron a sonicación en un baño en hielo durante 5 minutos. Inmediatamente después de la sonicación, las suspensiones se transfirieron mediante pipeta a celdas de cuarzo de 3 mL con tapón. Se midió la transmitancia de cada una de las suspensiones a 350 nm usando un espectrofotómetro UV, a intervalos de tiempo durante un periodo de 16 horas. Después, las suspensiones se redispersaron durante 15-20 minutos usando un agitador de tubo de ensayo (Labinco) fijado a 10 rpm y un ángulo de 45 grados. Después de la redispersión se midió la transmitancia durante un periodo adicional de 8 horas. Los datos de transmitancia a 350 nm se normalizaron contra una solución de α -quimotripsina (2 mg/mL) en solución amortiguadora de fosfato de potasio 50 mM, pH 8.

- 15 Desde el principio, se observaron valores de transmitancia sustancialmente más bajos para la suspensión de α -quimotripsina en F6H8 en comparación con las suspensiones respectivas en perfluorodecalina (figura 3), perfluorooctano (figura 4) y octano (figura 2), indicando una homogeneidad prolongada de esta suspensión y una separación de fases más lenta (p. ej., por flotación o sedimentación) en el caso de la suspensión de SFA. En particular, se observó que la α -quimotripsina suspendida en octano sedimenta rápidamente en el fondo de la celda de cuarzo, indicando características de suspensión muy malas o ausentes (cerca de 100% de transmitancia).
20 También, después de redispersión después de dejar reposar durante un periodo de 16 horas, la suspensión de α -quimotripsina en F6H8 fue claramente superior a las otras suspensiones ya que su turbidez original de la suspensión (a $t = 0$) fue recuperada mayormente, en contraste con las otras suspensiones.

Ejemplo 5: cinética de suspensión de las suspensiones de albúmina de suero bovino

- 25 De una manera similar a los ejemplos 3 y 4, se evaluó la cinética de suspensión de albúmina de suero bovino (BSA) en F6H8, perfluorodecalina (PFD), perfluorooctano (PFO) y octano (OCT), midiendo la transmitancia a 350 nm a varios intervalos de tiempo durante un periodo de 2 horas.

- 30 La BSA se suspendió en cada uno de los disolventes a una concentración de 5 mg/mL. Las suspensiones se agitaron con vórtice durante 3 segundos, después se sometieron a sonicación en un baño en hielo durante 5 minutos. Inmediatamente después de la sonicación, las suspensiones se transfirieron por medio de una pipeta a celdas de cuarzo de 3 mL con tapón. Se midió la transmitancia a 350 nm usando un espectrofotómetro UV en cada una de las suspensiones a intervalos de tiempo durante un periodo de 2 horas. Los datos de transmitancia a 350 nm se normalizaron contra una solución de BSA (5 mg/mL) en solución amortiguadora de fosfato de sodio, pH 7.

- 35 Como resultado, se observó que la suspensión de BSA en F6H8 tenía el valor de transmitancia inicial más bajo (figura 5). Además, el aumento de transmitancia dentro de los primeros intervalos del análisis (5 y 10 minutos) fue relativamente bajo para la suspensión basada en SFA, en comparación con las otras suspensiones que ya estaban cercanas a sus valores estables en estos puntos temporales. Desde el punto de vista farmacéutico, estas diferencias se traducen en un tiempo prolongado disponible para administrar convenientemente una dosis de esta suspensión de BSA en el SFA, p. ej., por inyección subcutánea, que típicamente se realiza en el transcurso de algunos minutos.

Ejemplo 6: cinética de suspensión de las suspensiones de calcitonina de salmón

- 40 La retención de turbidez de suspensiones de calcitonina de salmón (sCT) en F6H8, perfluorodecalina (PFD), perfluorooctano (PFO) y octano (OCT) se determinó fotométricamente midiendo la transmitancia a 350 nm a varios intervalos de tiempo durante un periodo de 2 horas.

- 45 Se suspendió calcitonina de salmón en cada uno de los disolventes a una concentración de 5 mg/mL. Las suspensiones se agitaron con vórtice durante 3 segundos, después se sometieron a sonicación en un baño en hielo durante 5 minutos. Inmediatamente después de la sonicación, las suspensiones se transfirieron mediante pipeta a celdas de cuarzo de 3 mL con tapón. Se midió la transmitancia de cada una de las suspensiones a 350 nm usando un espectrofotómetro UV, a intervalos de tiempo durante un periodo de 2 horas. Los datos de transmitancia a 350 nm se normalizaron contra una solución de calcitonina de salmón (5 mg/mL) en solución salina amortiguadora de fosfato, pH 7,4.

- 50 Se observó que la suspensión de sCT en F6H8 tenía el valor de transmitancia inicial más bajo, y también durante un periodo de 2 horas, indicando nuevamente propiedades de suspensión sustancialmente superiores en comparación con las suspensiones en PFD, PFO y OCT (figura 6).

Ejemplo 7: distribución de tamaño de la insulina humana en F6H8

- 55 Se tomaron mediciones de dispersión de luz dinámica (DLS) de muestras de insulina humana (Sigma Aldrich 10908) en F6H8 usando un instrumento Nanostar™ Wyatt Technology DLS. Las mediciones se tomaron usando cubetas

desechables de 4 μ L. Las muestras se prepararon a concentraciones de 1 mg/mL y 10 mg/mL, y no se filtraron antes de tomar las mediciones.

5 Los resultados de las muestras a ambas concentraciones demuestran que hay algo de solvatación de insulina humana en F6H8, con una fracción significativa con un tamaño de partícula que se correlaciona con las formas monoméricas de la proteína (figura 7 –distribución de tamaño de insulina humana en la muestra de 1 mg/mL (corrida #1), y figura 8 –distribución de tamaño de insulina humana en la muestra de 10 mg/mL). Los inventores creen que la capacidad del SFA para solvatar la proteína contribuye a las propiedades favorables de dispersión o suspensión, e impide la formación de agregados gruesos que no son redispersables.

Tabla 4

Muestra	Radio promedio (nm)	% de masa de monómero de pico
1 mg/mL, ensayo #1	2,6	98,4
1 mg/mL, ensayo #2	3,5	100
10 mg/mL	4,3	99,4

10

Ejemplo 8

Distribución de tamaño de la calcitonina humana en F6H8

15 Se tomaron mediciones de dispersión de luz dinámica (DLS) de muestras de calcitonina humana (Bachem AG 4014409.00005) en F6H8 usando un instrumento Nanostar™ Wyatt Technology DLS. Las mediciones se tomaron usando cubetas desechables de 4 μ L. Se preparó una muestra a una concentración de 1 mg/mL. La muestra no se filtró antes de tomar las mediciones.

20 Los resultados de la muestra demuestran que hay algo de solvatación de calcitonina humana en F6H8, con una fracción detectable con un tamaño de partícula que se correlaciona con las formas monoméricas de la proteína (figura 9). También se detectaron agregados pequeños. Nuevamente, se cree que la solvatación de la proteína por SFA contribuye a las propiedades favorables de dispersión o suspensión, e impide la formación de agregados gruesos irreversibles.

REIVINDICACIONES

1.- Composición que comprende un compuesto bioactivo y un vehículo líquido, en donde el vehículo líquido comprende un alcano semifluorado de la fórmula:

RFRH

- 5 en donde RF es un segmento de hidrocarburo perfluorado lineal de 4 a 12 átomos de carbono y en donde RH es un grupo alquilo lineal de 4 a 8 átomos de carbono; y en donde el compuesto bioactivo es un agente terapéutico o de diagnóstico o una vacuna, seleccionado de polipéptidos y proteínas que tienen un peso molecular de al menos 1.500 Da, en donde el compuesto bioactivo se suspende en el vehículo líquido y en donde la composición está en forma de una suspensión.
- 10 2.- La composición de la reivindicación 1, en donde el compuesto bioactivo es sensible a la degradación y/o agregación.
- 3.- La composición de cualquier reivindicación precedente, en donde el compuesto bioactivo es una proteína de un solo dominio o una proteína de dos dominios.
- 4.- La composición de cualquier reivindicación precedente, en donde el compuesto bioactivo es una insulina.
- 15 5.- La composición de cualquier reivindicación precedente, en donde el alcano semifluorado se selecciona de F4H5, F4H6, F4H8, F6H4, F6H6, F6H8 y F6H10.
- 6.- La composición de cualquier reivindicación precedente, que está sustancialmente libre de agua.
- 7.- La composición de cualquier reivindicación precedente para uso como una medicina.
- 8.- La composición para uso como una medicina de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la medicina es para administración parenteral por medio de inyección subcutánea, dérmica, intramuscular o locorregional.
- 20 9.- La composición para uso como una medicina de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la medicina es para administración tópica en el ojo, oído, pulmón, piel o nariz de un paciente.
- 10.-Método de preparación de una composición que comprende un agente bioactivo terapéutico o de diagnóstico o una vacuna seleccionado de un polipéptido o proteína que tiene un peso molecular de al menos 1.500 Da, que comprende la etapa de incorporar el polipéptido o proteína bioactiva dentro de un vehículo líquido que comprende un alcano semifluorado de la fórmula:
- 25

RFRH

en donde RF es un segmento de hidrocarburo perfluorado lineal de 4 a 12 átomos de carbono y en donde RH es un grupo alquilo lineal de 4 a 8 átomos de carbono para formar una dispersión o suspensión.

- 30 11.- El método de la reivindicación 10, en donde el polipéptido o proteína bioactiva es sensible a la degradación y/o agregación.
- 12.- El método de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11, en donde la composición es estabilizada química y/o físicamente.

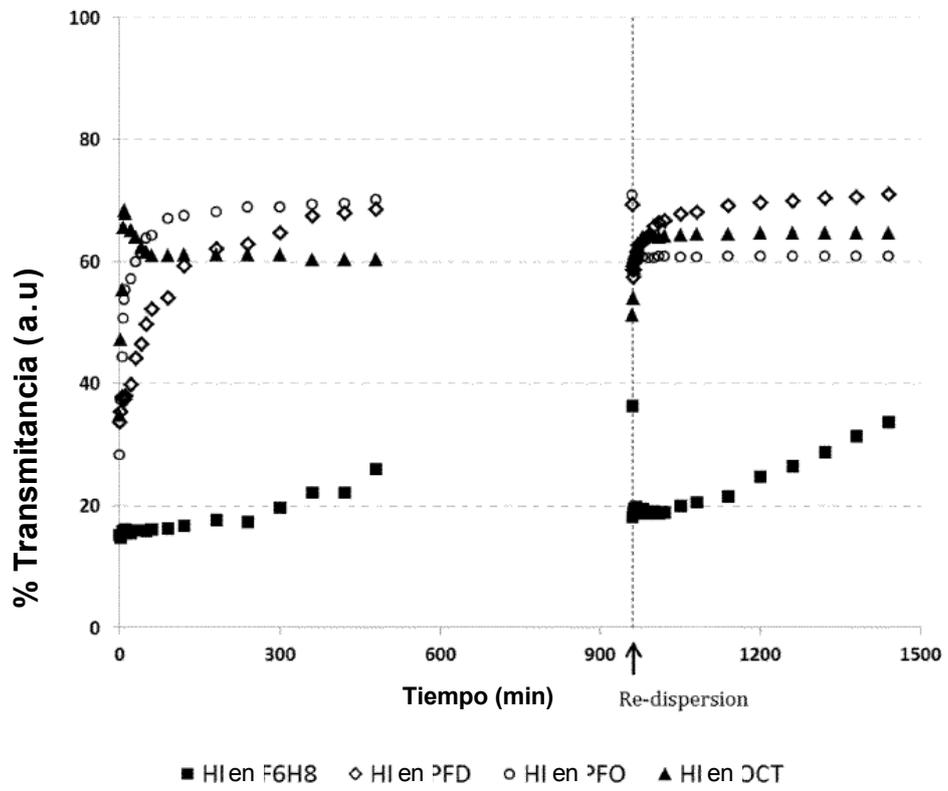


Fig. 1

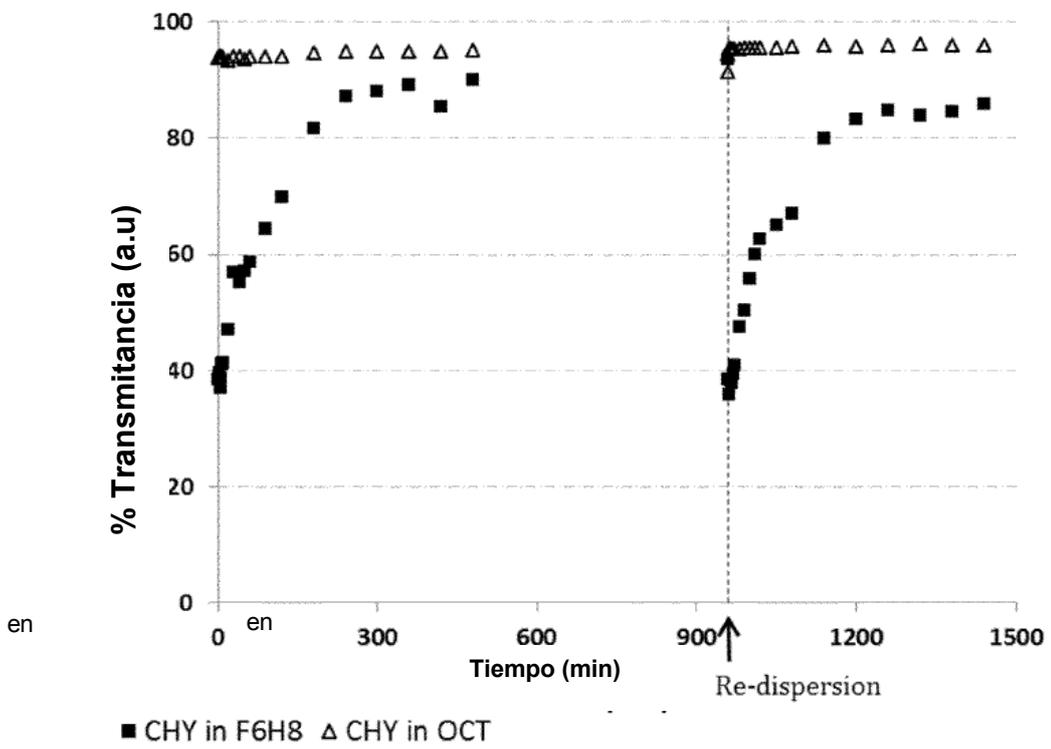


Fig. 2

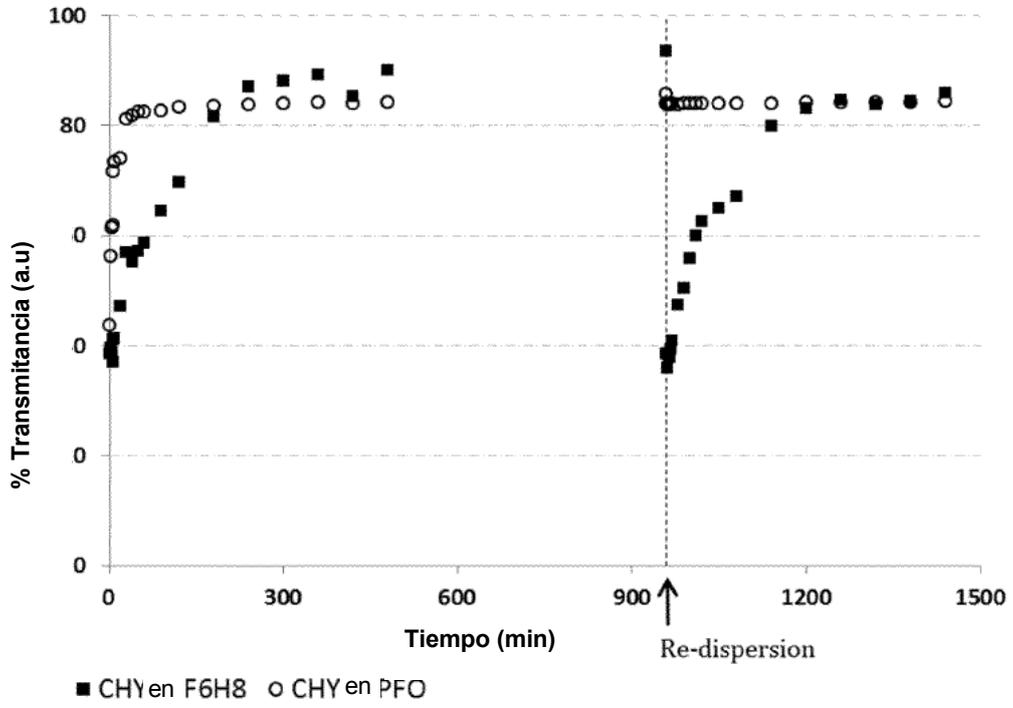


Fig. 3

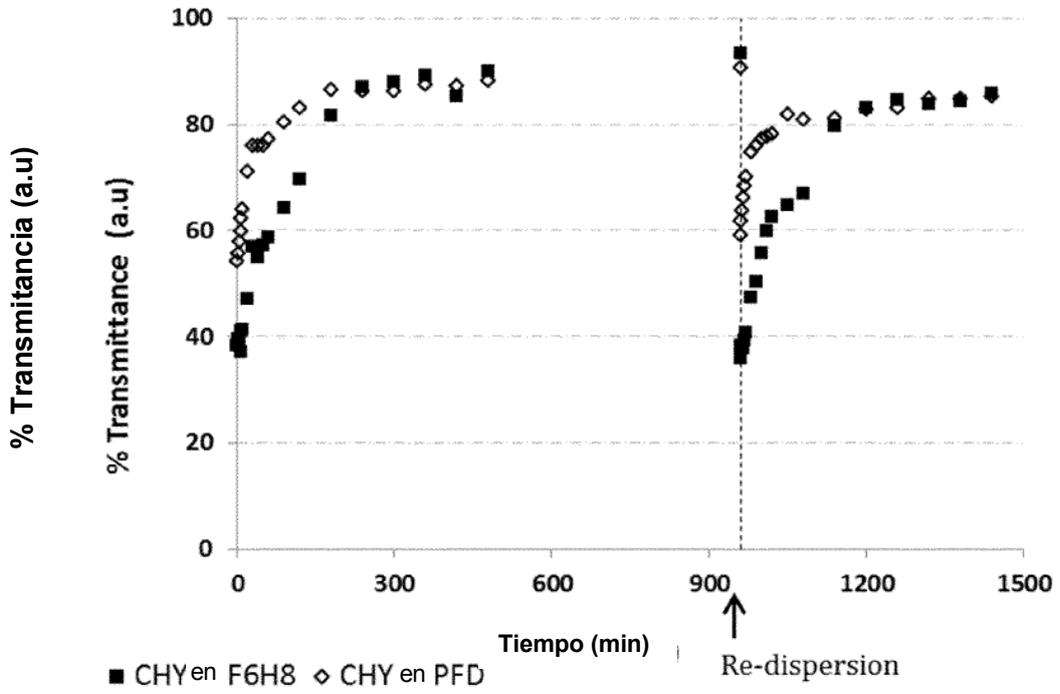


Fig. 4

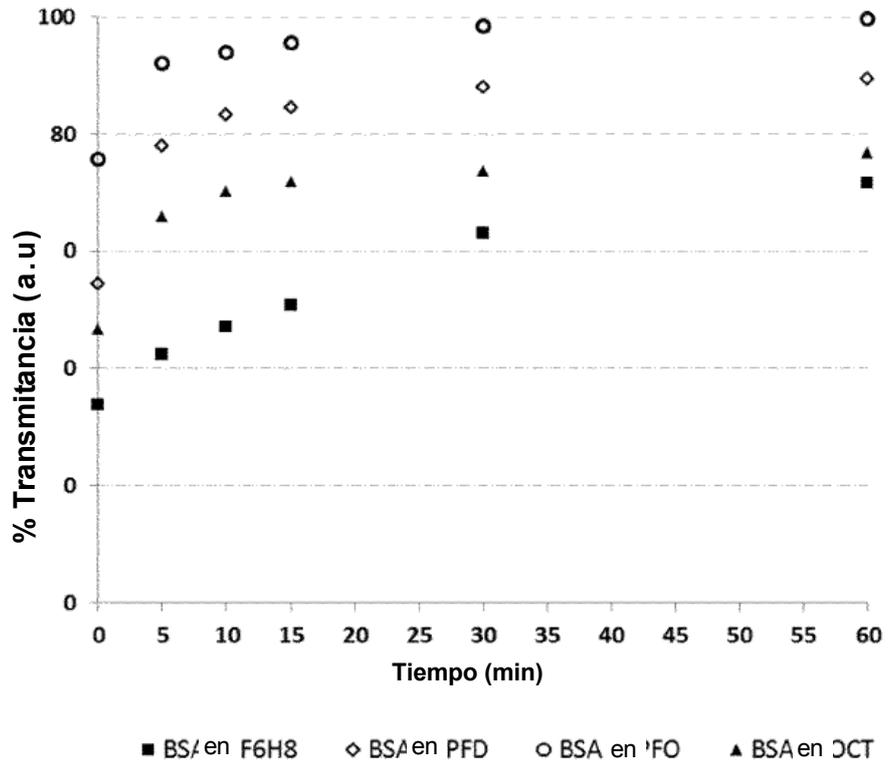


Fig. 5

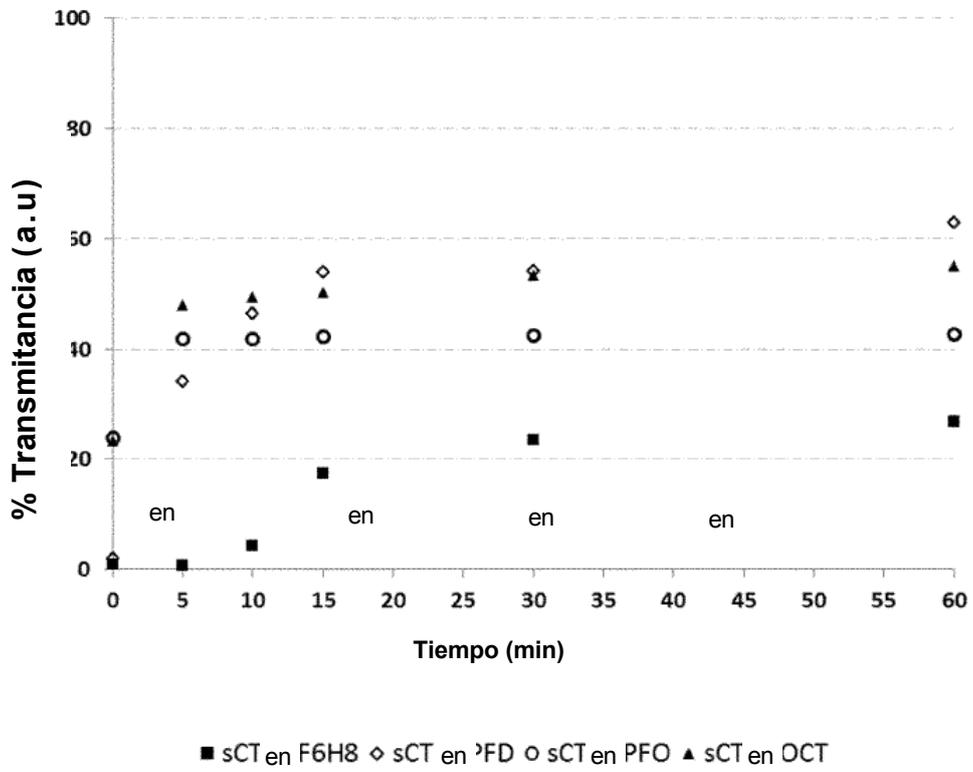


Fig. 6

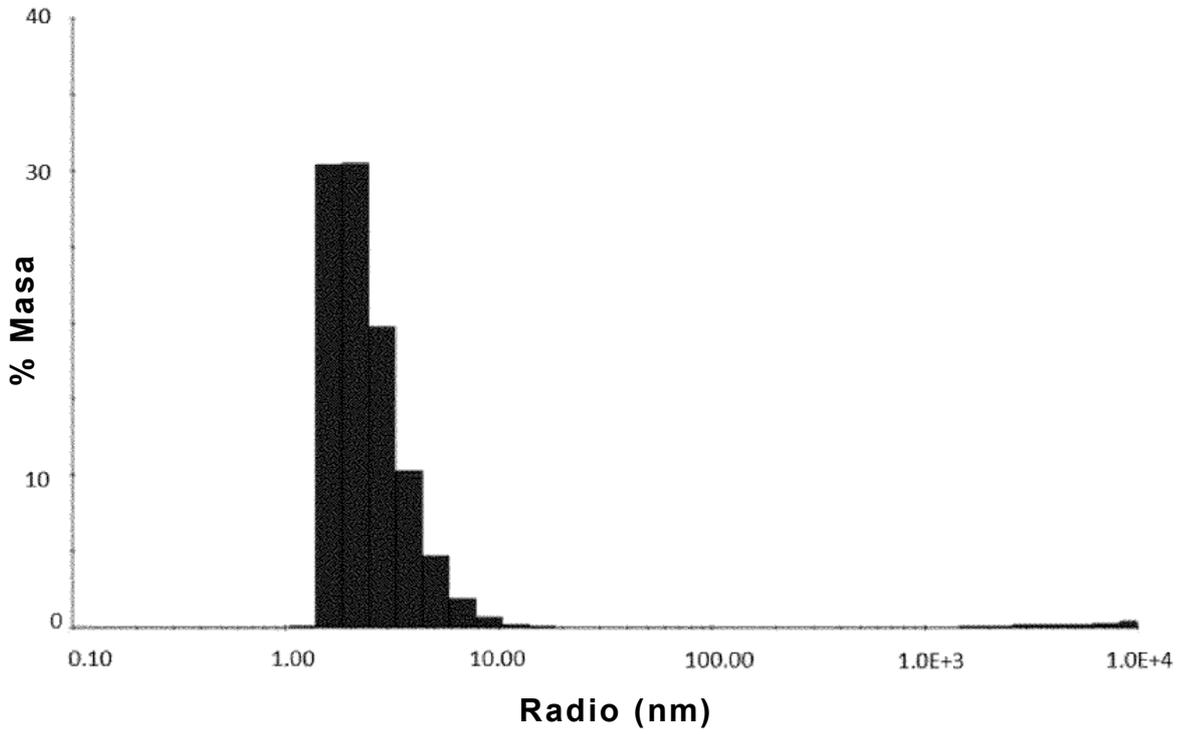


Fig. 7

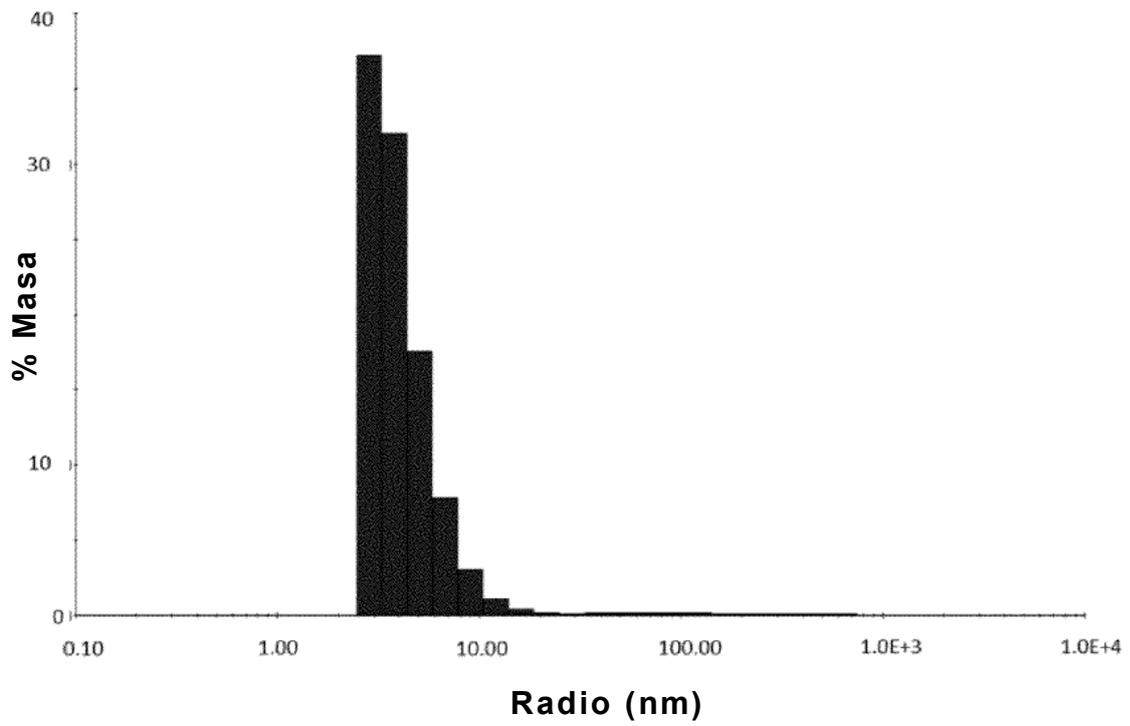


Fig. 8

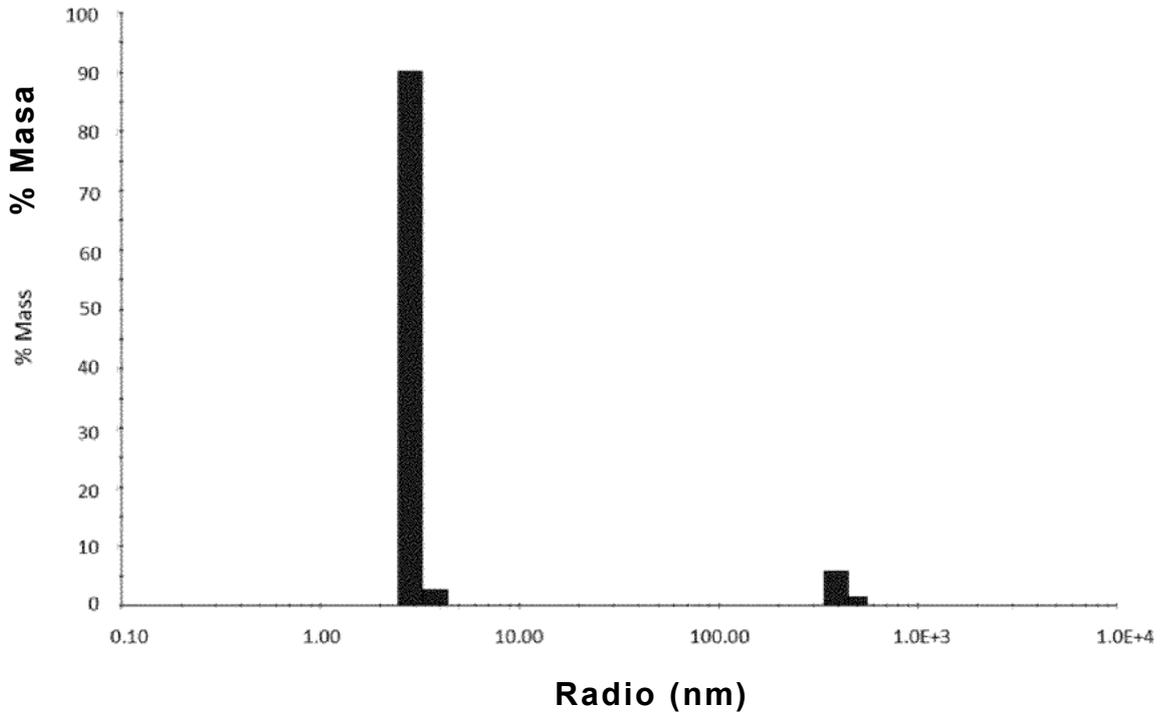


Fig. 9