

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 079**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00	(2006.01)	A61K 9/19	(2006.01)
A61K 47/00	(2006.01)	C07K 16/00	(2006.01)
A61K 38/38	(2006.01)		
A61K 39/00	(2006.01)		
A61K 9/00	(2006.01)		
A61K 47/26	(2006.01)		
A61K 9/10	(2006.01)		
A61K 47/42	(2007.01)		
A61K 47/44	(2007.01)		
A61K 9/14	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.03.2011 PCT/US2011/027677**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **15.09.2011 WO11112669**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2011 E 11753982 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2017 EP 2544721**

54 Título: **Formulaciones no acuosas en suspensión de viscosidad reducida a concentración elevada**

30 Prioridad:

09.03.2010 US 311896 P

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

13.03.2018

73 Titular/es:

**JANSSEN BIOTECH, INC. (100.0%)
800/850 Ridgeview Drive
Horsham, PA 19044, US**

72 Inventor/es:

**HILL, BETH y
DAI, WEIGUO**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 659 079 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).

Formulaciones no acuosas en suspensión de viscosidad reducida a concentración elevada**DESCRIPCIÓN**

5

Referencia a solicitudes relacionadas**Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere a formulaciones no acuosas en suspensión de viscosidad reducida a concentración elevada y a métodos para prepararlas y usarlas.

Antecedentes de la invención

15 Los anticuerpos monoclonales (mAb) se han convertido en importantes terapias basadas en proteínas para tratar diversas enfermedades humanas, tales como cáncer, enfermedades infecciosas, inflamación y enfermedades autoinmunes. Actualmente, la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos ha aprobado más de 20 productos de anticuerpos monoclonales y aproximadamente el 20 % de todos los productos biofarmacéuticos que se están evaluando actualmente en ensayos clínicos son mAb (Daugherty et al., Adv. Drug Deliv. Rev. 58:686-706, 2006).

20 Los anticuerpos pueden administrarse, por ejemplo, por vía parenteral, tal como por inyección intravenosa (i.v.), subcutánea (s.c.) o intramuscular (i.m.). La vía s.c. o i.m. reduce el coste del tratamiento y mejora la comodidad para los pacientes y los proveedores sanitarios durante la administración. Para ser eficaces y farmacéuticamente aceptables, las formulaciones parenterales deben ser, preferentemente, estériles, estables, inyectables en jeringuilla, inyectables y no irritantes. Estas características dan como resultado requisitos de fabricación, almacenamiento y uso que hacen que las formulaciones inyectables sean formas de dosificación difíciles de desarrollar, en particular formulaciones que tienen altas concentraciones de proteínas.

25 Al igual que con cualquier proteína terapéutica, los anticuerpos están sujetos a inestabilidad física y química, tal como agregación, desnaturalización, entrecruzamiento, desamidación, isomerización, oxidación y recorte (Wang et al., J. Pharm. Sci. 96:1-26, 2007). Por lo tanto, el desarrollo de formulaciones para identificar factores críticos para la estabilidad del anticuerpo es primordial en el desarrollo de productos farmacéuticos de anticuerpos comercialmente viables.

30 Los pequeños volúmenes requeridos (típicamente 0,5-2 ml) para inyecciones s.c. o i.m. plantean desafíos de formulación adicionales, ya que la dosificación requiere formulaciones de anticuerpos de alta concentración, típicamente entre 100 mg - 1 g de proteína por dosis para alcanzar niveles terapéuticos en un paciente. Las formulaciones de proteínas altamente concentradas a menudo dan como resultado un aumento de la agregación de proteínas, una estabilidad deficiente y una mayor viscosidad, lo que perjudica la inyectabilidad y tiene ramificaciones negativas durante el proceso, la fabricación y el almacenamiento (Shire et al., J. Pharm. Sci. 93:1390-1402, 2004).

35 Los productos de anticuerpos monoclonales comerciales actuales administrados por vía s.c. o i.m. normalmente se formulan en tampones acuosos, tales como tampón fosfato o L-histidina, con excipientes o tensioactivos tales como manitol, sacarosa o polisorbato 80 para evitar la agregación y mejorar la estabilidad. Las concentraciones de anticuerpos notificadas son de hasta 100 mg/ml en formulaciones acuosas (Wang et al., J. Pharm. Sci. 96:1-26, 2007). La viscosidad de las formulaciones acuosas se ha reducido mediante la adición de sales (patente de Estados Unidos n.º 7,666,413) o ácidos orgánicos o inorgánicos (patente de Estados Unidos n.º 7, 740, 842).

40 Se han descrito formulaciones de anticuerpos o proteínas no acuosas. El documento WO2006/071693 describe una suspensión no acuosa de hasta 100 mg/ml de anticuerpo monoclonal en una formulación que tiene un potenciador de la viscosidad (polivinilpirrolidona, PVP) y un disolvente (benzoato de bencilo (BB) o PEG400). El documento WO2004/089335 describe formulaciones no acuosas en suspensión de lisozima de aproximadamente 100 mg/ml que contienen PVP, glicofurol (GF), BB, alcohol bencílico (BA) o PEG400. El documento US2008/0226689A1 describe formulaciones viscosas no acuosas de tres vehículos componentes (polímero, agente tensioactivo y disolvente) de una sola fase de 100 mg/ml de hormona de crecimiento humana (hGH).. La patente de Estados Unidos n.º 6,730,328 describe vehículos no acuosos, hidrofóbicos, no polares de baja reactividad (tales como perfluorodecalina) para formulaciones de proteínas. Estas formulaciones no son óptimas ya que tienen, por ejemplo, una viscosidad alta que deteriora el procesamiento, la fabricación y la inyección, la presencia de múltiples componentes del vehículo en las formulaciones y los potenciales desafíos regulatorios asociados con el uso de polímeros aún no aprobados.

45 Por lo tanto, existe una necesidad de desarrollar formulaciones no acuosas de alta concentración mejoradas.

65

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Estabilidad de formulaciones en suspensión de mAb anti-TNF α a 1 y 4 semanas de almacenamiento a + 40 °C. Las concentraciones de anticuerpos están indicadas en cada formulación como el % en peso (% p/p).

5 Figura 2. La fuerza de inyección (N) de las formulaciones disminuye al aumentar la cantidad de agente reductor de la viscosidad en una formulación. A. BSA; B. Formulaciones de mAb anti-TNF α .

10 Figura 3. La fuerza de inyección y la viscosidad aumentan al aumentar A. y B. mAb anti-TNF α y C. Concentración de BSA en las formulaciones.

Figura 4. Correlación entre la fuerza de inyección y la viscosidad de las formulaciones de mAb anti-TNF α . A. formulaciones con 20 % de mAb anti-TNF α ; B. todas las formulaciones de mAb anti-TNF α estudiadas.

15 Figura 5. Dependencia de la fuerza de inyección sobre la concentración de proteína y el tamaño de partícula en la formulación. Vehículo: Oleato de etilo (EO)/Aceite de sésamo (SO)/50/50.

20 Figura 6. A. El aumento de la velocidad de corte puede reducir la viscosidad de las formulaciones de proteínas de alta concentración. A. La elección del vehículo afecta la dependencia de la viscosidad en la velocidad de corte. B. La concentración de proteína afecta a la dependencia de la viscosidad en la velocidad de corte. Formulaciones mAb anti-TNF α EO/SO/50/50.

25 Figura 7. Efecto de la velocidad de inyección sobre la fuerza de inyección A. Partículas de BSA a diferentes concentraciones en las formulaciones; B. partículas de BSA de diferentes tamaños en el vehículo EO; C. mAb anti-TNF α a diferentes concentraciones en EO/SO/50/50.

Sumario de la invención

30 Una realización de la invención es una formulación no acuosa en suspensión a concentración elevada, que comprende un vehículo que comprende un agente hidrófobo y un agente reductor de la viscosidad; y una molécula bioactiva.

35 Otra realización de la invención es una formulación no acuosa en suspensión a concentración elevada, que comprende un vehículo que comprende aceite de sésamo y oleato de etilo; y una molécula bioactiva.

40 Otra realización de la invención es un método para reducir una fuerza de inyección a aproximadamente 45 Newtons (N) o menos de una formulación que contiene ≥ 50 mg/ml de una proteína en un vehículo que comprende un agente hidrofóbico, que comprende: añadir al menos 28 % en volumen de un agente reductor de la viscosidad en el vehículo, que comprende un agente hidrófobo; o utilizar partículas de proteínas que tienen un tamaño de partícula entre 2 μ m - 13 μ m para preparar la formulación, en el que la fuerza de inyección usando una jeringa de vidrio rígida con protector de aguja de 1 ml que tiene un diámetro interno de 0,25 pulgadas, equipada con una aguja de calibre 26 1/2 a 250 mm/min. velocidad de inyección.

45 Otra realización de la invención es un método para preparar una formulación no acuosa en suspensión a concentración elevada de una molécula bioactiva, que comprende proporcionar una molécula bioactiva; proporcionar un agente hidrofóbico; proporcionar un agente reductor de la viscosidad; mezclar el agente hidrófobo y el agente reductor de la viscosidad para formar un vehículo; y agregar la molécula bioactiva en el vehículo formado.

Descripción detallada de la invención

50 Se entenderá también que la terminología usada en el presente documento es para el propósito de describir solo realizaciones particulares y no se desea que sea limitante. A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que un experto en la técnica a la que la presente invención pertenece entiende habitualmente.

55 Aunque en la práctica para analizar la presente invención se pueden usar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, en el presente documento se describen materiales y métodos de ejemplo. Al describir y reivindicar la presente invención, se usará la siguiente terminología.

60 Un agente hidrofóbico" como se usa en el presente documento se refiere a un material que tiene un valor de equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) de 0-13. Los ejemplos de agentes hidrófobos son aceites vegetales, ácidos grasos que tienen 8-24 carbonos, cera, polímeros biodegradables y materiales anfífilicos. Ejemplos de aceites vegetales son aceite de almendras, aceite de anís, aceite de albaricoque, aceite de cacahuete, aceite de argán, aceite de aguacate, aceite de borraja, aceite de cajuput, aceite de canola, aceite de alcaravea, aceite de cassia, aceite de ricino, aceite de canela, aceite de citronela, aceite de clavo, aceite de coco, aceite de cilantro, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de eucalipto, aceite de onagra, aceite de hinojo, aceite de geranio, aceite de semilla de

uva, aceite de avellana, aceite de cáñamo, aceite de jojoba, aceite de enebro, aceite de lavanda, aceite de limón, aceite de macadamia, aceite de macis, aceite de melaleuca, aceite de neem, aceite de neroli, aceite de niaouli, aceite de nuez moscada, aceite de oliva, aceite de naranja, aceite de palma, aceite de palmiste, aceite de pino, aceite de semilla de amapola, aceite de menta poleo, aceite de semilla de calabaza, aceite de colza, aceite de salvado de arroz, aceite de rosa mosqueta, aceite de romero, aceite de ruda, aceite de cártamo, aceite de sésamo (SO), aceite de menta verde, aceite de soja, aceite de girasol, aceite de tomillo, aceite de nuez o aceite de germen de trigo. Ejemplos de ácidos grasos son ácido caprílico, ácido cáprico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido araquídico, ácido linoleico, ácido miristoleico, ácido palmitoleico, ácido sapiénico, ácido oleico, ácido α -linolénico, ácido araquidónico, ácido eicosapentaenoico, ácido erúcico, ácido docosahexaenoico, ácido eicosapentaenoico, ácido docosahexaenoico, ácido docosapentaenoico y glicérido (monoglicérido, diglicérido, triglicérido) con diferentes longitudes de cadena. Ejemplos de polímeros biodegradables ejemplares son ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), ácido poliláctico co-glicólico (PLGA), poli ϵ -caprolactona (PCL), poliortoésteres, polihidroxibutirato (PHB), polidioxanona, polianhídridos, carbonato de politrimetileno y polifosfacenos. Ejemplos de materiales anfífilos son un aceite de ricino polietoxilado o un derivado del mismo (denominados colectivamente "aceite de ricino polietoxilado"), un éter polioxi-etilenoalquílico, un éster de ácido graso de polioxi-etileno-sorbitano, un estearato de polioxi-etileno, un copolímero de bloque de óxido de polietileno ("PEO")-óxido de polipropileno ("PPO")-PEO, un copolímero de bloque de PPO-PEO-PPO, un copolímero de bloque tetrafuncional de PEO-PPO, como (PEO-PPO)₂- (PPO-PEO)₂, o un copolímero de bloque tetrafuncional de PPO-PEO, tal como (PPO-PEO)₂- (PEO-PPO)₂. Ejemplos de agentes hidrófobos y sus características se muestran en la Tabla 1. Las viscosidades se miden a 25 °C, a menos que se indique entre paréntesis.

El término "viscosidad" como se usa en el presente documento es una medida de la resistencia del fluido al flujo. La viscosidad puede ser "viscosidad cinemática" o "viscosidad absoluta". La "viscosidad cinemática" es una medida del flujo resistivo de un fluido bajo la influencia de la gravedad. Cuando dos fluidos de igual volumen se colocan en viscosímetros capilares idénticos y se dejan fluir por gravedad, un fluido viscoso tarda más que un fluido menos viscoso en fluir a través del capilar. La dimensión de la viscosidad cinemática es L²/T donde L es una longitud y T es un tiempo. Habitualmente, la viscosidad cinemática se expresa en centistokes (cSt). La unidad de viscosidad cinemática del Sistema Internacional de Unidades (SI) es mm²/ s, que es 1 cSt. La "viscosidad absoluta", a veces llamada "dinámica" o "viscosidad simple", es el producto de la viscosidad cinemática y la densidad del fluido. La viscosidad absoluta se expresa en unidades de centipoise (cP). La unidad en el SI de la viscosidad absoluta es el milipascal-segundo (mPa-s), donde 1 cP = 1 mPa-s. La viscosidad puede medirse utilizando, por ejemplo, un viscosímetro a una velocidad de corte dada. viscosidad también se puede evaluar al correlacionar positivamente la viscosidad con la fuerza de inyección como se muestra en la Figura 4.

Tabla 1

Nombre genérico	Viscosidad (cP)		Vía de administración
	Literatura	Medida	
Caprilcaproil polioxil-8 glicéridos	89		oral
Aceite de ricino, etoxilado	722		i.v.
Aceite de maíz		44,9	i.m.
Aceite de semilla de algodón		47,7	i.m.
Monooleato de glicerilo	30-40		tópica, oral, transdérmica
Triglicéridos de cadena media	30	27,12 (20 °C), 22,64	i.v. oral, tópica
Polioxi-etileno oleico triglicéridos	80		
Propilenglicol dicaprilcaprato	12	11,16 (20 °C), 9,66	tópica
Monocaprilato de propilenglicol	20	14,49 (20 °C), 12,05	
Monolaurato de propilenglicol	25	26,80 (20 °C), 21,91	transdérmica
Aceite de sésamo		51.3	i.m., s.c., oral
Simeticona	400	482,63 (20 °C), 448,37	i.m., i.v.
Aceite vegetal fino	25,4	22,7	oral, tópica

La "velocidad de corte", como se usa en el presente documento, significa la velocidad con la que se deforma un material. Para los fluidos Newtonianos clásicos, la viscosidad no depende de la velocidad de corte. Para fluidos no newtonianos, la viscosidad disminuye o aumenta al aumentar la velocidad de corte, por ejemplo, los fluidos son "de comportamiento pseudoplástico" o "no pseudoplástico", respectivamente.

"Fuerza de inyección" como se usa en el presente documento significa la fuerza medida en Newtons (N) requerida para empujar el vehículo o formulación a través de una jeringa rígida de vidrio con protector de aguja de 1 ml que tiene un diámetro interno de 0,25 pulgadas, equipado con una aguja de calibre 26 ½ a una velocidad de inyección de 250 mm/min utilizando un instrumento de prueba Zwick/Roell (modelo 2005) (Zwick Roell, Kennesaw, GA). Una jeringa de ejemplo es una jeringa BD (Becton, Dickinson and Company, NJ) (BD Hypak SCF™ Jeringa precargable de vidrio de aguja rígida de 1 ml con protector equipada con una aguja de calibre 26 ½ de 0,5 pulgadas (designación de producto PIR6-001 SCF1MLL 26GA1/2 RNSFM27 EB LTP. 8268589).

"Inyectabilidad" como se usa en el presente documento se refiere al rendimiento de inyección de la formulación no acuosa en suspensión a concentración elevada a través de una jeringa equipada con una aguja de calibre durante la inyección. La inyectabilidad incluye factores tales como la presión o la fuerza requerida para la inyección, la uniformidad del flujo, las cualidades de aspiración y la ausencia de obstrucciones. La inyectabilidad de las formulaciones de la invención se evalúa comparando la fuerza de inyección de una formulación que contiene un agente reductor de la viscosidad con la misma formulación pero que carece del agente reductor de la viscosidad. La reducción en la fuerza de inyección de la formulación que contiene el agente reductor de la viscosidad refleja la inyectabilidad mejorada de esa formulación. La formulación que contiene agente reductor de viscosidad tiene inyectabilidad mejorada cuando la fuerza de inyección se reduce en al menos 10 %, por ejemplo 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % cuando se compara con la misma formulación pero que carece del agente reductor de la viscosidad.

"Un agente reductor de la viscosidad" como se usa en el presente documento se refiere a un agente que, cuando está presente en un vehículo o formulación, reduce la viscosidad o la fuerza de inyección del vehículo o formulación en comparación con la viscosidad o fuerza de inyección de un vehículo o formulación que carece del agente reductor de la viscosidad. La cantidad de agente reductor de la viscosidad presente en los vehículos o formulaciones de viscosidad reducida de la invención puede variar de aproximadamente 0,2 % a 99,9 % por volumen del agente reductor de la viscosidad en el agente hidrófobo, por ejemplo 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %. El agente reductor de la viscosidad puede reducir la viscosidad o la fuerza de inyección de un vehículo o una formulación en al menos 10 %, por ejemplo 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 % o 90 %. Ejemplos de agentes reductores de la viscosidad son sebacato de dietilo, éter monoetílico de dietilenglicol, alcohol etílico, oleato de etilo (EO), alcohol isopropílico (IPA), miristato de isopropilo, ácido linoleico, ácido propiónico, citrato de trietilo, propilenglicol, etanol, propanol, isopropanol, polietileno glicol, poliperfluoroéteres, fluorocarbono (halotano, metoxiflurano, enflurano, isoflurano, sevoflurano y desflurano, etc.), cetona fluorada, perfluorodecalina, perfluoroacrilato, perfluorometacrilato, alcohol bencílico, alcohol laurílico, perfluorodecalina, N-metil-2-pirrolidona, glicofurol, polietilenglicol (PEG), alquilcetona, éster de alquilo inferior de ácido cítrico, benzoato de bencilo, benzoato de metilo, benzoato de metilo, benzoato de n-propilo, benzoato de isopropilo, benzoato de butilo, benzoato de isobutilo, benzoato de sec-butilo, benzoato de terc-butilo e isoamilo benzoato. Las características de los agentes reductores de la viscosidad de ejemplo se muestran en la Tabla 2.

Cuando la adición del agente reductor de la viscosidad da como resultado la reducción de la viscosidad o fuerza de inyección del vehículo en comparación con un vehículo correspondiente que no contiene el agente reductor de la viscosidad, el vehículo que contiene el agente reductor de la viscosidad es un "vehículo de viscosidad reducida". La formulación que comprende un vehículo de viscosidad reducida es "una formulación de viscosidad reducida". Independientemente del método utilizado para determinar y medir la viscosidad o la fuerza de inyección, el porcentaje de reducción en viscosidad o fuerza de inyección en el vehículo o formulación de viscosidad reducida en comparación con el mismo vehículo o formulación sin el agente reductor de la viscosidad permanecerá aproximadamente igual a una velocidad de corte dada.

El término "estabilidad química" significa que se forma un porcentaje aceptable de productos de degradación producidos por vías químicas tales como oxidación, desamidación o hidrólisis. Una formulación se considera químicamente estable si no se forman más del 5 % de productos de degradación después de 18 meses a 4 °C.

El término "estabilidad física" significa que el agente bioactivo forma un porcentaje aceptable de agregados (por ejemplo, dímeros, trímeros u otros agregados multiméricos). Una formulación se considera físicamente estable si no se forman más del 5 % de productos de degradación después de 18 meses a 4 °C.

El término "formulación estable" o "estable", tal como se usa en el presente documento, significa que al menos aproximadamente 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de molécula bioactiva físicamente estable permanece en una formulación después de 18 meses de almacenamiento en + 4 °C o condiciones equivalentes a una temperatura elevada, como un almacenamiento de 1 mes a + 40 °C. Una formulación estable de ejemplo es una formulación de

30 % de mAb anti-TNF α EO/SO/50/50 que retiene al menos 98 % del anticuerpo en forma de monómero después de un mes de almacenamiento a + 40°C.

5 El término "molécula bioactiva" incluye proteínas, anticuerpos, péptidos, nucleótidos y similares. Se incluyen en este término restos producidos sintéticamente, derivados naturalmente o producidos de forma recombinante. Las moléculas bioactivas pueden ser análogos, derivados, agonistas, antagonistas o sales farmacéuticamente aceptables de moléculas bioactivas.

10 El término "proteína" significa una molécula que comprende al menos dos restos de aminoácidos unidos por un enlace peptídico para formar un polipéptido. Las proteínas pequeñas de menos de 50 aminoácidos se pueden denominar "péptidos". Las proteínas también pueden denominarse "polipéptidos".

Tabla 2

15

Nombre genérico	Viscosidad (cP)		Vía de administración
	Literatura	Medida	
Sebacato de dietilo	3,9	5,59	tópica
Éter monoetílico de dietilenglicol	20	4,89	i.v., tópica, transdérmica
Alcohol etílico (EtOH)	1,2	1,48	i.v., i.m., s.c.
25 Oleato de etilo (EO)	5,9	5,96	Transdérmica, i.m.
Alcohol isopropílico (IPA)	2,43	2,35	i.v. oral, transdérmica
Miristato de isopropilo	7	5,1	tópica
30 Ácido linoleico		18,67	
Ácido propiónico	1	1,65	
Citrato de trietilo		25,65	oral

35

El término "anticuerpo" incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de los mismos. Los fragmentos de anticuerpos comprenden al menos una porción de una molécula de inmunoglobulina, tal como una región determinante de la complementariedad (CDR), una región variable (V), una región constante (C) o una región marco (FR) de cualquier cadena pesada o ligera de anticuerpo. Las inmunoglobulinas se pueden asignar a cinco clases principales, a saber, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio C de la cadena pesada. IgA e IgG se subclasifican después como los isotipos IgA₁, IgA₂, IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄.

40

Un anticuerpo puede ser un Fab, F(ab'), F(ab')₂, scFv, dsFv o diabody. Un anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal (mAb), anticuerpo quimérico, humanizado o humano, dímérico, tetramérico o multimérico. Las estructuras de los fragmentos de anticuerpos mencionados anteriormente, y las técnicas para la preparación y uso de los anticuerpos y fragmentos de los mismos son bien conocidos en la técnica (Ausubel, et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY 1987-2001; Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Edición, Cold Spring Harbor, NY, 1989; Harlow and Lane, Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY, 1989; Colligan, et al., ed., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY 1994-2001; Colligan et al., Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, 1997-2001; Kohler et al., Nature, 256:495-7, 1975; Queen et al., Proc Natl Acad Sci USA, 86:10029-33, 1989; patente de Estados Unidos n.º 4,816,567).

45

"Concentración alta" tal como se usa en el presente documento significa una concentración final igual o superior a 50 mg/ml de una molécula bioactiva en una formulación. La concentración de la molécula bioactiva puede estar entre 50 - 1000 mg/ml, entre 50 - 500 mg/ml, o entre 50 - 250 mg/ml.

55

"No acuoso" como se usa en el presente documento significa que el vehículo tiene baja solubilidad en agua de menos de 0,1 mg/g a pH fisiológico (aproximadamente 7,4) y a aproximadamente 25 °C.

60

"Formulación de suspensión" como se usa en el presente documento significa que la molécula bioactiva es insoluble en el vehículo.

65

"Tamaño de partícula" como se usa en el presente documento significa el diámetro promedio (D50) de las partículas de la molécula bioactiva en una formulación determinada usando instrumentos de tamaño de partícula bien conocidos, por ejemplo un analizador de tamaño de partículas por difracción láser.

La presente invención describe formulaciones no acuosas en suspensión de viscosidad reducida a concentración elevada que se pueden usar para la administración de moléculas bioactivas tales como anticuerpos por vía parenteral. La alta viscosidad característica de las formulaciones de alta concentración de proteínas puede dificultar la inyección de la dosis requerida en un paciente a partir de la jeringa. Las formulaciones de la invención tienen inyectabilidad mejorada medida por la fuerza de inyección de las formulaciones, mientras se mantiene una alta concentración de molécula bioactiva que proporcionará la dosis requerida para lograr una eficacia terapéutica aceptable. Las formulaciones de la invención tienen fuerzas de inyección iguales o inferiores a 45 Newton (N), una fuerza máxima que la mayoría de los profesionales de la salud y pacientes sin discapacidad manual son capaces de ejercer sobre una jeringa usando inyección manual. El nivel de fuerza de inyección aceptable depende de la aplicación de fármaco específica y de los dispositivos de administración utilizados en los productos. Algunos dispositivos pueden generar una fuerza de inyección mayor que otros.

La concentración de la molécula bioactiva en las formulaciones se muestra como % en peso (% p/p) y la cantidad de agente reductor de la viscosidad en un vehículo se muestra como % de volumen (% v/v) a menos que se indique específicamente lo contrario. Las composiciones del vehículo se indican como % de relaciones de volumen (% v/v) del agente reductor de la viscosidad y un agente hidrofóbico. Por ejemplo, un EO/SO/50/50 es un vehículo que tiene 50 % de oleato de etilo (EO) y 50 % de aceite de sésamo (SO) en volumen.

Una realización de la invención es una formulación no acuosa en suspensión a concentración elevada, que comprende:

- a. un vehículo, que comprende un agente hidrófobo y un agente reductor de la viscosidad; y
- b. una molécula bioactiva.

El vehículo puede fabricarse combinando un agente hidrófobo y un agente reductor de la viscosidad en formas líquidas, y la mezcla se calienta para formar un material de una sola fase. Se pueden usar métodos estándar tales como calorimetría de barrido diferencial para verificar que los componentes incluidos en el vehículo se hayan combinado de manera que se forme un material monofásico. Los ejemplos de agentes hidrófobos y reductores de la viscosidad se describen anteriormente. Ejemplos de vehículos basados en aceite de sésamo se muestran en la Tabla 4. El aceite de sésamo puede reemplazarse con otros agentes hidrófobos ejemplares siempre que el agente reductor de la viscosidad sea miscible con el agente hidrófobo elegido.

Se puede usar cualquier método de formación de partículas adecuado para proporcionar la molécula bioactiva particulada incluida en las formulaciones de la invención. Los métodos ejemplares conocidos incluyen secado por pulverización, secado por congelación por pulverización, liofilización, desecación, granulación, trituración, molienda, precipitación, tecnología de fluido supercrítico o procesos de homogeneización. Las partículas preparadas mediante estos métodos se pueden triturar adicionalmente en un mezclador Waring y pasar a través de una serie de tamices con tamaños de malla determinados. El tamaño de las partículas resultantes de moléculas bioactivas puede ser, por ejemplo, entre 0,2-250 μm , 0,2-100 μm , 0,2-50 μm , 0,2-20 μm o 2-13 μm . El tamaño de partícula se puede expresar como un diámetro promedio (D50) de las partículas de la molécula bioactiva en una formulación determinada usando instrumentos de tamaño de partículas bien conocidos, por ejemplo el analizador de tamaño de partículas por difracción láser (Malvern Mastersizer 2000, Malvern) o como un diámetro de la malla del tamiz a través del cual las partículas no pasan.

La molécula bioactiva se puede proporcionar en forma pura o se puede formular con excipientes que no interfieren con la eficacia terapéutica de la molécula bioactiva. Por ejemplo, puede ser deseable usar excipientes para mitigar la agregación y la oxidación de la molécula bioactiva en las formulaciones no acuosas, para mejorar la transición de la molécula bioactiva del vehículo no acuoso a un entorno de uso, o para mejorar la capacidad de formación de la molécula bioactiva en partículas. Tales excipientes son, por ejemplo, hidratos de carbono, tensioactivos no iónicos, tampones, sales, antioxidantes y/o aminoácidos, conservantes y similares. La molécula bioactiva se puede formular, por ejemplo, con un carbohidrato, un tensioactivo no iónico y un tampón como excipientes. Ejemplos de carbohidratos son sacarosa, trehalosa, manitol y dextrano. Los tensioactivos no iónicos ejemplares son polisorbato 20 (PS-20), polisorbato 80 (PS-80), Triton X-100, Brij-35, Brij-30 y Pluronic F127. La molécula bioactiva puede formularse en un tampón que tenga un pH deseable antes de que las partículas de proteína se preparen para evitar la oxidación, desamidación, hidrólisis, desnaturalización o agregación y mantener la actividad biológica de la molécula bioactiva durante el proceso de formulación y almacenamiento. Los tampones ilustrativos son tampones de acetato, citrato, formiato, histidina, succinato, fosfato, carbonato, malato, HEPPSO, HEPES, borato y glicina. La molécula bioactiva y el excipiente se pueden disolver en una solución que, por ejemplo, se liofiliza, se seca por pulverización o se liofiliza para producir partículas de la molécula bioactiva.

Para crear una formulación en suspensión de una molécula bioactiva, el material particulado seco de una molécula bioactiva en estado sólido (por ejemplo, en polvo, cristalino o amorfo) con o sin excipientes se dispersa mediante agitación dentro de un vehículo. La cantidad de molécula bioactiva particulada incluida en la formulación puede variar dependiendo de, por ejemplo, la potencia de la molécula bioactiva y la vía de administración. Por ejemplo, la

molécula bioactiva puede representar entre aproximadamente 0,1 % y 70 % (% p/p) de una formulación, representando el vehículo entre aproximadamente 30 % y 99,9 % (% p/p). La molécula bioactiva puede estar en suspensión en un vehículo a una concentración entre aproximadamente 50 mg/ml - 1000 mg/ml, 50 mg/ml - 500 mg/ml, o 50 mg/ml - 250 mg/ml. La formulación de ejemplo consiste en 40 % (% p/p) de partículas de mAb anti-TNF α preparadas mediante secado por pulverización de mAb anti-TNF α 65 mg/ml, sacarosa 55 mg/ml, L-histidina 10 mM, PS-80 0,01 %, pH 5,5 solución y 60 % (% p/p) de vehículo que tiene aceite de sésamo y oleato de etilo (relación 50:50 en volumen). Dado que la molécula bioactiva está presente a una concentración tan alta, la formulación en suspensión no acuosa se puede usar para liberar una molécula bioactiva que tiene una baja potencia. Dado que la molécula bioactiva se mantiene en su forma sólida, se espera una larga estabilidad de vida útil.

La viscosidad de los vehículos y las formulaciones de la invención se pueden medir usando instrumentos reológicos bien conocidos, tales como un reómetro. La viscosidad de un vehículo o una formulación puede medirse en función de la velocidad de corte entre, por ejemplo, 200-500 s⁻¹ a 25 °C mediante el uso de un reómetro AR2000 (TA Instruments), y el cálculo de la viscosidad promedio entre las velocidades de corte medidas, o en función de una velocidad de cizalladura definida, por ejemplo, 250 s⁻¹. La viscosidad de los vehículos y las formulaciones de las invenciones también se puede evaluar midiendo su fuerza de inyección, que se correlaciona positivamente con la viscosidad (Figura 4). La fuerza de inyección se puede medir, por ejemplo, cargando formulaciones preparadas en una jeringa de vidrio rígido de 1 mm para proteger la aguja con un diámetro interno de 0,25 pulgadas, equipado con una aguja de calibre 26 1/2 de 0,5 pulgadas y ajustando la velocidad de inyección a 250 mm/minuto y registrando la fuerza de desplazamiento del pistón utilizando un instrumento de prueba Zwick/Roell (Modelo 2005) (Zwick Roell, Kennesaw, GA). Una jeringa de ejemplo es una jeringa BD (Becton, Dickinson and Company, NJ) (BD Hypak SCF™ Jeringa de vidrio sellado de aguja rígida de 1 ml equipada con una aguja de calibre 26 1/2 de 0,5 pulgadas (designador de producto PIR6-001 SCF1MLL 26GA1/2 RNSFM27 EB LTP 8268589). Se mide la reducción porcentual (%) en la viscosidad o fuerza de inyección para evaluar el efecto de los agentes reductores de la viscosidad en la viscosidad y la inyectabilidad de las formulaciones de la invención. Por ejemplo, las formulaciones de proteínas de alta concentración no acuosas de la invención puede tener un 81 % de reducción en la viscosidad o un 76 % de reducción de la fuerza de inyección cuando se compara con las formulaciones sin el agente reductor de la viscosidad.

La viscosidad de las formulaciones en suspensión de alta concentración no acuosa de la invención se puede reducir aún más y, por lo tanto, la inyectabilidad de las formulaciones se mejora modificando la velocidad de cizallamiento. Las formulaciones de la invención se pueden analizar para determinar sus características newtonianas o no newtonianas analizando la dependencia de la viscosidad a la velocidad de cizalladura. Las características no newtonianas de las formulaciones pueden depender de la concentración de proteína y la cantidad de agente reductor de la viscosidad en una formulación. El aumento de la concentración de proteína en las formulaciones de la invención puede desplazar las características de la formulación a un aclareo por cizallamiento no newtoniano, y así aumentar la tasa de compartición durante la fabricación puede reducir la viscosidad y mejorar el procesamiento de estas formulaciones. El aumento de la cantidad de agente reductor de la viscosidad en una formulación puede desplazar las características de la formulación a newtoniano, en cuyo caso la modulación de la tasa de acción tiene poco o ningún efecto sobre la viscosidad. La preparación de las formulaciones de la invención incluye evaluar el efecto de la velocidad de cizallamiento sobre la viscosidad, y ajustar la velocidad de cizallamiento a, por ejemplo, entre 10 - 1000 l/so 50 - 500 l/s para obtener formulaciones con valores de viscosidad apropiados.

Las formulaciones de moléculas bioactivas de la presente invención demuestran una estabilidad mejorada frente a formulaciones acuosas, y retienen al menos el 95 % de la molécula bioactiva en una forma estable después del almacenamiento durante un mes a + 40°C. La estabilidad de las formulaciones se puede medir usando métodos bien conocidos. Por ejemplo, la cantidad de agregación de proteínas puede medirse mediante observación visual de la turbidez, midiendo la absorbancia a una longitud de onda específica, mediante cromatografía de exclusión por tamaño (en la que los agregados de una proteína se eluirán en diferentes fracciones en comparación con la proteína en su estado activo nativo), HPLC u otros métodos cromatográficos. Se pueden usar otros métodos para medir el cambio conformacional, que incluyen el uso de calorimetría de barrido diferencial (DSC), p. para determinar la temperatura de desnaturalización, o dicroísmo circular (CD), que mide la elipticidad molar de la proteína.

Otra realización de la invención es una formulación no acuosa en suspensión a concentración elevada, que comprende un vehículo que comprende aceite de sésamo y oleato de etilo; y una molécula bioactiva.

Otra realización de la invención es un método para reducir una fuerza de inyección a aproximadamente 45 Newton (N) o menos de una formulación que contiene \geq 50 mg/ml de una proteína en un vehículo que comprende un agente hidrofóbico, que comprende: añadir al menos 28 % mediante volumen de un agente reductor de la viscosidad en el vehículo que comprende un agente hidrofóbico; o utilizando partículas de proteína que tienen un tamaño de partícula entre 2 μ m - 13 μ m para preparar la formulación, midiendo la fuerza de inyección usando una jeringa de vidrio rígida con protector de aguja de 1 ml que tiene un diámetro interno de 0,25 pulgadas, equipada con una aguja de calibre 26 1/2 a 250 mm/min. velocidad de inyección.

4

Se pueden cambiar varios parámetros para mantener la fuerza de inyección de las formulaciones en suspensión de alta concentración no acuosa de la invención a o por debajo de 45 Newton (N). Estos parámetros son, por ejemplo,

la concentración de proteína, el tamaño de partícula y la cantidad de agente reductor de la viscosidad en la formulación, y la velocidad de inyección utilizada para una jeringa seleccionada con un calibre de aguja especificado. La cantidad de agente reductor de la viscosidad en las formulaciones que tienen una fuerza de inyección igual o inferior a 45 N puede ser, por ejemplo, entre 0,2 % -99,9 %, la cantidad de proteína puede estar entre 1-40 % (% p/p) y el tamaño de partícula puede ser de aproximadamente 2 μm - 13 μm . Las formulaciones no acuosas ejemplares que contienen un agente hidrofóbico, un agente reductor de la viscosidad y una molécula bioactiva, y que tienen fuerzas de inyección por debajo de 45 N son formulaciones que tienen al menos 20 % (% p/p) de concentración de proteína con un tamaño de partícula de aproximadamente 2 μm 13 μm , y al menos 28 % de EO en un vehículo; Suspensiones de partículas BSA al 20 % (% p/p) 2 μm en EO/SO/28/72, EO/SO/50/50 o en 100 % EO; Suspensiones de mAb anti-TNF α al 20 % (% p/p) en EO/SO/50/50, EO/SO/73/30, EO/SO/85/15, o en 100 % de OE; 30 % y 40 % (% p/p) de suspensiones de mAb anti-TNF α en EO/SO/50/50; Suspensiones de partículas BSA 40 % 13 μm en EO/SO/50/50; Suspensiones de partículas BSA al 50 % (% p/p) 2 μm en EO al 100 % con velocidad de inyección de 50 mm/min; y 50 % (% p/p) de suspensiones de partículas BSA de 13 μm con velocidad de inyección entre 50-250 mm/min.

Otra realización de la invención es un método para preparar una formulación no acuosa en suspensión a concentración elevada de una molécula bioactiva, que comprende proporcionar una molécula bioactiva; proporcionar un agente hidrofóbico; proporcionar un agente reductor de la viscosidad; mezclar el agente hidrófobo y el agente reductor de la viscosidad para formar un vehículo; y agregar la molécula bioactiva en el vehículo formado en el paso d. a una concentración igual o superior a 50 mg/mL.

Las formulaciones de la invención se pueden precargar en una jeringa o en cualquier recipiente adecuado de pequeño volumen usando métodos bien conocidos y, por lo tanto, están listos para la inyección sin mezcla, reconstitución o cualquier preparación adicional. Las formulaciones de la invención en la jeringa precargada pueden inyectarse a mano o alternativamente usando un autoinyector tal como un bolígrafo de inyección automático, un autoinyector, varias bombas de inyección automáticas que incluyen una bomba de parche y dispositivos de inyección sin aguja. Las formulaciones de la invención se pueden introducir en un huésped mediante rutas parenterales, tales como por inyección subcutánea (s.c.) o intramuscular (i.m.). Las formulaciones se pueden administrar a través de agujas de aproximadamente media a dos pulgadas de largo, entre 20-31 de calibre, con un diámetro interno en el rango de 133 a 604 micras. La formulación no acuosa en suspensión a concentración elevada lista para inyección de la invención puede tener una tolerancia local (o biocompatibilidad) favorable, baja fuerza de inyección y flexibilidad de formulación. La alta concentración de la molécula bioactiva en la formulación de suspensión no acuosa lista para inyección puede lograrse independientemente de la estructura molecular y el peso molecular de la molécula bioactiva.

La presente invención se describirá ahora con referencia a los siguientes ejemplos específicos, no limitantes.

Ejemplo 1

Cribado de agentes reductores de la viscosidad para vehículos no acuosos

Se añadieron agentes reductores de la viscosidad al aceite de sésamo en una concentración de 0,2 % - 50 % en volumen. Todos los agentes reductores de viscosidad fueron de material GRAS (Generalmente reconocido como seguro). La mezcla se colocó en un vial cerrado de centelleo de 20 ml y se sometió a agitación vorticial durante 30 segundos, y se inspeccionó visualmente para determinar si era inmiscible. Se descubrió que algunos de los agentes reductores de la viscosidad no eran miscibles con el aceite de sésamo y no se exploraron más. La Tabla 3 muestra miscibilidad de agentes reductores de la viscosidad a modo de ejemplo con aceite de sésamo. Y y N indican que el agente reductor de la viscosidad ensayado era miscible o no miscible, respectivamente, con aceite de sésamo a la concentración analizada.

Tabla 3

	Agente reductor de la viscosidad	Agente reductor de viscosidad % (v/v)								
		0,2	0,7	1,7	3,1	5,4	9,7	17,2	30,0	50,0
5										
	Diacetilo	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	N
	Etanol	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	N	N
10	Oleato de etilo	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	Isopropanol	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N/A
	Ácido láctico	N	N	N	N	N	N	N	N	N
15	Ácido linoleico	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N/A
	Ácido propiónico	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N/A
	Propilenglicol	N	N	N	N	N	N	N	N	N
20	Citrato de trietilo	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	N	N

Algunos agentes reductores de la viscosidad tales como oleato de etilo, isopropanol, ácido linoleico y ácido propiónico eran miscibles con aceite de sésamo en el intervalo de concentraciones probadas, mientras que el propilenglicol no era miscible en absoluto. Algunos agentes eran miscibles con aceite de sésamo solo a ciertas proporciones de agente reductor de la viscosidad y aceite de sésamo.

Para la medición de la viscosidad del vehículo, una vez que se formó la solución homogénea, se pipetearon 290 µl de cada vehículo a probar en el reómetro AR2000 (TA Instruments)

30

35

40

45

50

55

60

65

Tabla 4

	Agente reductor de la viscosidad	Agente reductor de viscosidad (% v/v)	Aceite de sésamo de (%)	Viscosidad media (cP)	DE*	Disminución de viscosidad** (cP)
5	Oleato de etilo	0	100	51,25	0,32	
		0,2	99,8	50,14	0,06	-1,11
		0,7	99,3	50,09	0,22	-1,16
10		1,5	98,5	48,15	0,1	-3,1
		3	97	45,85	0,81	-5,4
		5,5	94,5	43,01	0,05	-8,24
15		9,5	90,5	38,8	0,36	-12,45
		17	83	32,65	0,15	-18,6
		28	72	25,64	0,14	-25,61
20		50	50	16,7	0,09	-34,55
		75	25			
		85	15			
25	100	0	5,96	0,19	-45,29	
	Ácido linoleico	3	97	50,21	1,26	-1,04
		9,5	90,5	46,98	0,38	-4,27
30		17	83	42,3	0,74	-8,95
		28	72	38	0,33	-13,25
	Ácido propiónico	3	97	42,48	0,91	-8,77
35		9,5	90,5	30,99	0,49	-20,26
		17	83	21,06	0,14	-30,19
		28	72	12,83	0,22	-38,42
40	Sebacato de dietilo	3	97	46,33	0,8	-4,92
		9,5	90,5	38,82	0,2	-12,43
		17	83	30,85	0,42	-20,4
		28	72	23,59	0,23	-27,66
45	Miristato de isopropilo	3	97	45,92	1,3	-5,33
		9,5	90,5	38,55	0,53	-12,7
		17	83	31,88	0,2	-19,37
50		28	72	24,09	0,18	-27,16
	Alcohol isopropílico (IPA)	3	97	43,95	0,73	-7,3
55		9,5	90,5	33,14	0,13	-18,11
		17	83	25	0,4	-26,25
		28	72	13,81	0,05	-37,44
	Etanol (EtOH)	3	97	41,96	0,42	-9,29
60		9,5	90,5	31,25	1,58	-20
	Citrato de trietilo	3	97	49,76	0,09	-1,49
		9,5	90,5	45,36	0,74	-5,89
65	*desviación estándar **Comparación con el vehículo SO equipado con una geometría de cono acrílico de 40 mm de 1°. El esfuerzo cortante se registró en función de la velocidad de corte hasta 500 s ⁻¹ a 25 °C. La viscosidad se calculó automáticamente por el software y se notificó el promedio de la viscosidad entre 200 y 500 s ⁻¹ ,					

5 Cada muestra se analizó por triplicado. Se usó aceite de sésamo sin el agente reductor de la viscosidad como control. La Tabla 4 muestra los valores medios de viscosidad para vehículos ejemplares generados.

10 La disminución de la viscosidad del vehículo resultante fue proporcional al volumen o fracción en peso de los agentes reductores de la viscosidad añadidos. Como el aceite de sésamo (SO), el oleato de etilo (EO), el etanol (EtOH) y el alcohol isopropílico (IPA) se han usado en productos parenterales comercializados, se seleccionaron para pruebas adicionales.

Ejemplo 2

Preparación de formulaciones no acuosas de baja viscosidad a concentración alta

Preparación de partículas de moléculas bioactivas

Liofilización:

20 Se disolvieron albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) Y anticuerpo monoclonal humano anti-TNF α (mAb) en tampón de fosfato de sodio 6,5 mM, pH 6,0, a una concentración de proteína de 65 mg/ml. Los excipientes farmacéuticamente aceptables tales como sacarosa y Tween 80 (o polisorbato 80, PS-80) se añadieron opcionalmente a la solución de proteína con la concentración de sacarosa y Tween 80 en la solución final de 0-9,0 % y 0-0,01 % (% w/v), respectivamente. La solución de proteína se liofilizó usando protocolos estándar.

25 La proteína liofilizada o mAb en polvo se molió adicionalmente en un mezclador Waring y se pasó a través de una serie de tamices con tamaños de malla determinados. El proceso de molienda/captura produjo partículas de proteína o mAb con un tamaño de partícula de 0.2-250 μ m.

Secado por pulverización:

30 Se prepararon partículas de albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) y anticuerpos monoclonales humanos anti-TNF α usando un proceso de secado por pulverización. Las formulaciones (Tabla 5) se secaron por pulverización usando un secador Yamato Mini Spray en los siguientes parámetros del proceso: aire de atomización: 2 psi, temperatura de entrada: 120 °C, dial del aspirador: 7,5, bomba de solución: 2-4, válvula de aire principal: 40-45 psi. El diámetro promedio (D50) de las partículas de moléculas bioactivas secadas por pulverización se midió mediante un analizador de tamaño de partícula por difracción láser (Malvern Mastersizer 2000, Malvern), y se obtuvieron partículas con un intervalo de tamaño de 1~20 μ m. Ejemplos de preparaciones se muestran en la Tabla 5.

40 Tabla 5

Molécula bioactiva	Molécula bioactiva (mg/ml)	Sacarosa (% p/v)	TWEEN® 80 (% p/v)
BSA	65	5,5	0,0065
BSA	65	3	0,0065
BSA	100	4,5	0,0065
mAb anti-TNF α	100	8,5	0,0065

Preparación de vehículos no acuosos

55 El aceite de sésamo se limpió con polvo de óxido de aluminio para reducir el nivel de peróxido, y luego se filtró a través de filtros de PTFE estériles de 0,2 μ m. Se añadieron agentes reductores de la viscosidad al aceite de sésamo en una concentración de 0,2-85 % en volumen (% v/v), o en algunos casos se usaron sin aceite de sésamo. Para algunas formulaciones, se añadió etanol en el vehículo a aproximadamente 0,2-10 % en volumen. La mezcla se colocó en un recipiente cerrado y se mezcló durante 1 hora a temperatura ambiente para formar una solución homogénea. La Tabla 4 muestra los vehículos no acuosos preparados.

Preparación de formulaciones

65 Los vehículos no acuosos preparados se mezclaron con partículas de moléculas bioactivas preparadas por liofilización o secado por pulverización. Se usó un agitador con una espátula de acero inoxidable para mezclar las partículas en el vehículo a 50 - 1000 rpm durante 5 - 30 minutos a temperatura ambiente. La carga de partículas fue

de aproximadamente 1 - 50 % en peso, conduciendo a la concentración de proteína en la formulación final de aproximadamente 10 - 500 mg/ml. Después de que se formó una suspensión homogénea, las formulaciones se cargaron en una jeringa de inyección de vidrio. Las formulaciones se almacenaron a temperatura refrigerada (4 °C) antes de la inyección. La Tabla 6 muestra las formulaciones preparadas.

5

Ejemplo 3

Estabilidad de moléculas bioactivas liofilizadas en vehículos no acuosos

10 Se añadió oleato de etilo (EO) o triglicérido de cadena media (MCT; LABRAFAC™ Lipophile WL 1349, Gattefossé, Francia) al aceite de sésamo (SO) en una concentración de 2 - 50 % en volumen. La mezcla se colocó en un vial cerrado de centelleo de 20 ml y se sometió a agitación vorticial durante 30 minutos. Después de una mezcla completa, se pesaron polvos de anticuerpo anti-TNFα liofilizados en un tubo vacutainer de 3 ml y se añadió una cantidad adecuada de vehículo al tubo hasta un contenido de proteína final de 10 o 20 % (% p/p), que correspondió a 53,6 o 107,2 mg/ml de concentración de anticuerpo anti-TNFα, respectivamente.

15

La suspensión se hizo homogénea mediante breve vórtice; los tubos fueron sellados. Las suspensiones se almacenaron a 37 °C. Después de una y cuatro semanas de almacenamiento, las muestras se extrajeron.

20 Tabla 6

	Composición del vehículo (% v/v)	Vehículo (% p/p)	Proteína	Concentración de proteínas (% p/p)	Concentración de proteínas mg/ml *
25	SO (100)	60	IL-12p40 mAb	40	216,7
	EO (100)	60	MAb de TNFα	40	214,4
30	EO (100)	70	MAb de TNFα	30	160,8
	EO (100)	80	MAb de TNFα	20	107,2
35	EO (100)	90	MAb de TNFα	10	53,6
	MCT (100)	80	MAb de TNFα	20	107,2
40	MCT (100)	90	MAb de TNFα	10	53,6
	SO (100)	60	MAb de TNFα	40	214,4
45	SO (100)	70	MAb de TNFα	30	160,8
	SO (100)	80	MAb de TNFα	20	107,2
50	SO (100)	90	MAb de TNFα	10	53,6
	SO/EO (50/50)	60	MAb de TNFα	40	214,4
55	SO/EO (50/50)	70	MAb de TNFα	30	160,8
	SO/EO (50/50)	80	MAb de TNFα	20	107,2
60	SO/EO (50/50)	90	MAb de TNFα	10	53,6
	SO/EO (50/50)	95	MAb de TNFα	5	26,8
65	SO/EO (50/50)	99	MAb de TNFα	1	5,4

(Continua)

5	SO/EO (72/28)	80	MAB de TNF α	20	107,2
	SO/EO (72/28)	90	MAB de TNF α	10	53,6
	SO/EO(15/85)	80	MAB de TNF α	20	107,2
	SO/EO(25/75)	80	MAB de TNF α	20	107,2
10	SO (100)	50	BSA	50	500,0
	SO (100)	60	BSA	40	400,0
	SO (100)	70	BSA	30	300,0
15	SO (100)	80	BSA	20	200,0
	SO (100)	90	BSA	10	100,0
	SO (100)	95	BSA	5	50,0
20	SO (100)	99	BSA	1	10,0
	SO/EO (50/50)	50	BSA	50	500,0
	SO/EO (50/50)	60	BSA	40	400,0
	SO/EO (50/50)	70	BSA	30	300,0
25	SO/EO (50/50)	80	BSA	20	200,0
	SO/EO (50/50)	90	BSA	10	100,0
	SO/EO (50/50)	95	BSA	5	50,0
30	SO/EO (50/50)	99	BSA	1	10,0
	SO/EO (72/28)	80	BSA	20	200,0
35	EO (100)	50	BSA	50	500,0
	EO (100)	60	BSA	40	400,0
	EO (100)	70	BSA	30	300,0
	EO (100)	80	BSA	20	200,0
40	EO (100)	90	BSA	10	100,0
	EO (100)	95	BSA	5	50,0
	EO (100)	99	BSA	1	10,0
45	MCT	80	BSA	20	200,0
	*concentración final en la formulación de la suspensión				

50 Brevemente, se añadió 1 ml de mezcla 1: 1 de acetona/diclorometano enfriada a -20 °C al tubo y el contenido se mezcló en un agitador a 4 °C durante 20 min. El tubo se centrifugó durante 4 min a 2900 g, y se retiró el sobrenadante. El proceso de extracción se repitió dos veces, y el sedimento de proteína se secó durante 2 horas usando un SpeedVac. El sedimento se disolvió en la fase móvil (tampón de fosfato 0,2 M, pH 6,8) hasta una concentración de trabajo de 10 mg/ml. Se inyectaron 20 μ l de la solución en un sistema Agilent SEC-HPLC con un caudal de 1 ml/min. Las formas nativas, agregadas y fragmentadas de anticuerpos anti-TNF α se separaron mediante una columna BioSil SEC250 (BioRad, Hercules, CA) y se monitorizaron a longitudes de onda de 214 y 280 nm en un cromatógrafo de exclusión por tamaño (SEC).

60 La estabilidad de almacenamiento de las formulaciones de suspensión probadas que contienen partículas de anticuerpo anti-TNF α se muestra en la Figura 1, y se midió como el % de contenido de monómero (por ejemplo, mAb nativo) retenido en una muestra. Como control, se prepararon y analizaron formulaciones acuosas que contenían mAb anti-TNF α en PBS pH 7,4. Cada formulación de suspensión no acuosa mostró una mayor estabilidad en comparación con la formulación acuosa y fueron comparables a la proteína en polvo liofilizada en términos de contenido de monómero de proteína en la misma condición de estrés. La adición de oleato de etilo (EO) reductor de la viscosidad en aceite de sésamo o sustitución de aceite de sésamo con triglicérido de cadena media (MCT) como Labrafac TM Lipophile WL 1349 (Gattefossé) no tuvo efecto sobre la estabilidad de la proteína dentro de las 4 semanas del tiempo de almacenamiento.

Ejemplo 4**La inyectabilidad de las formulaciones de alta concentración se ve afectada por la composición del vehículo, la concentración de proteínas y el tamaño de las partículas**

La medición de la fuerza de desplazamiento del pistón (por ejemplo, la fuerza de inyección) se usó como una evaluación para medir los efectos de diversos parámetros sobre la inyectabilidad de formulaciones no acuosas en suspensión a concentración elevada de la invención.

Efecto de la composición del vehículo

Se evaluaron la inyectabilidad de 20 % (% p/p) de BSA y 20 % (% p/p) de formulaciones de anticuerpos anti-TNF α midiendo la fuerza requerida para empujar la suspensión a través de una aguja de calibre usando una prueba Zwick/Roell (Modelo 2005) de instrumento. Las partículas de BSA se prepararon mediante secado por pulverización de 100 mg/ml de BSA en agua y se prepararon partículas de amAb anti-TNF mediante secado por pulverización de 65 mg/ml de proteína, 55 mg/ml de sacarosa, 10 mM de L-histidina, 0,01 % de PS-80, pH 5,5. Las formulaciones de proteína se prepararon mezclando partículas de proteína como se ha descrito anteriormente con aceite de sésamo que contiene cantidades crecientes en volumen de oleato de etilo reductor de la viscosidad (0 %, 3 %, 9,5 %, 17 %, 20 %, 25 %, 28 %, 30 %, 40 %, 50 %, 75 %, 85 % o 100 % (% v/v)). Las formulaciones preparadas se cargaron luego en jeringas BD (Becton, Dickinson and Company, NJ) (BD Hypak SCF™ Jeringa precargable de vidrio de aguja rígida de 1 ml equipada con una aguja de calibre 26 ½ de 0,5 pulgadas (designación de producto PIR6-001 SCF1MLL 26GA1/2 RNSFM27 EB LTP. 8268589). Las jeringas se llenaron con aproximadamente 0,5 cc de las formulaciones, la velocidad de inyección se ajustó a aproximadamente 250 mm/minuto a menos que se indique específicamente lo contrario, y se registró la fuerza de desplazamiento del pistón. La prueba de inyección se realizó a temperatura ambiente.

El aumento de la cantidad de oleato de etilo (EO) en aceite de sésamo (SO) redujo significativamente la fuerza de inyección y, por lo tanto, mejoró la inyectabilidad de las formulaciones en suspensión de partículas proteicas de 2 μ m y 13 μ m de tamaño. La fuerza de inyección para la suspensión al 20 % (p/p) (200 mg/ml) de partícula BSA de 2 μ m en EO/SO/28/72 fue 35,3 N, y en EO/SO/50/50 21,5 N, siendo esta última una 67 % de disminución en comparación con el control de aceite de sésamo sin agente reductor de la viscosidad (64,65 N) (Figura 2A). Usando 100 % de vehículo EO se redujo aún más la fuerza de inyección a 12,1 N. Se demostró una reducción similar en la fuerza de inyección con formulaciones de mAb anti-TNF α con una cantidad creciente de oleato de etilo en aceite de sésamo. Por ejemplo, la fuerza de inyección para una suspensión del 20 % (p/p) (108,6 mg/ml) con partículas de mAb anti-TNF α de 3,1 μ m en EO/SO/50/50 se redujo a 29,5 N, y en EO/SO/70/30 a 21.1 N de la fuerza de inyección de 71.3 N para 20 % (p/p) de mAb anti-TNF α en SO (Figura 2B). Los resultados demuestran que la adición de agente reductor de la viscosidad en un vehículo mejoró significativamente la inyectabilidad de las formulaciones no acuosas en suspensión a concentración elevada reduciendo la fuerza de inyección. Por lo tanto, se puede fabricar una formulación no acuosa en suspensión a concentración elevada que tenga una fuerza de inyección igual o inferior a aproximadamente 45 N aumentando la cantidad de oleato de etilo en formulaciones que contienen vehículo de aceite de sésamo hasta 28 % en volumen o más.

Efecto de la concentración de proteínas

La fuerza de inyección se vio afectada por la concentración de proteína en las formulaciones no acuosas en suspensión. La Figura 3A muestra el efecto combinado de una concentración de anticuerpo de partícula de anti-TNF α aumentada de 8,2 μ m (20 - 40 % (% p/p); 108,3 - 216,7 mg/ml) y una mayor cantidad de agente reductor de la viscosidad en la fuerza de inyección de las formulaciones. El eje X indica la concentración de anticuerpo anti-TNF α usado en cada experimento. El uso de hasta 30 % de concentración de mAb en EO/SO/50/50 dio como resultado una fuerza de inyección de 42,8 N. La fuerza de inyección a esta concentración de anticuerpo podría reducirse a 20,5 N utilizando 100 % de OE como vehículo. La Figura 3B muestra el efecto del aumento de la concentración de mAb anti-TNF α (0-40 % (% p/p) de 0216,7 mg/ml en formulaciones de EO/SO/50/50 en la fuerza de inyección y la viscosidad. La Figura 3C muestra el efecto de aumento de la concentración de BSA (tamaño de partícula 2 μ m, 0-40 % (% p/p); 0-400 mg/ml) en 100 % SO, EO/SO/50/50 y en vehículos 100 % EO. Para reducir fuerza de inyección igual o inferior a aproximadamente 45 N, las formulaciones pueden contener aproximadamente 20 % (% p/p) o menos de proteína y al menos 28 % de EO en un vehículo, 30 % o menos de proteína y al menos 50 % de EO en un vehículo, o una concentración de proteínas de aproximadamente 40 % o menos de proteína en 100 % de EO. Los experimentos realizados también demostraron que la fuerza de inyección y la viscosidad de las formulaciones no acuosas en suspensión a concentración elevada se correlacionan. La Figura 4a demuestra la correlación en 20 % (% p/p) de formulaciones de suspensión de mAb anti-TNF α . La Figura 4b demuestra la correlación en todas las formulaciones en suspensión de mAb anti-TNF α probadas. Por lo tanto, la fuerza de inyección puede ser nosotros tanto como una medida de viscosidad como de inyectabilidad. La modificación apropiada tanto de la concentración de proteínas como de la cantidad de agente reductor de la viscosidad en las formulaciones no acuosas en suspensión a concentración elevada repercute positivamente en la inyectabilidad de las formulaciones.

Efecto del tamaño de partícula

El efecto del tamaño de partícula sobre la inyectabilidad se evaluó midiendo el efecto de diferentes tamaños de partículas sobre la fuerza de inyección de las formulaciones analizadas. Se prepararon formulaciones que contenían partículas de BSA de 2 μm y 13 μm sobre el intervalo de concentración 1-50 % (% p/p) (10-500 mg/ml) en un vehículo EO/SO/50/50. En estas formulaciones, la fuerza de inyección aumentó al aumentar la concentración de proteína y disminuyó al aumentar el tamaño de partícula (Figura 5). Por ejemplo, para lograr una fuerza de inyección igual o inferior a 45 N, se puede usar una formulación de proteínas al 40 % (% p/p) con un tamaño de partícula de 13 μm en EO/SO/50/50. Manteniendo una masa constante de partículas en una suspensión mientras se aumenta el tamaño de partícula de la fase sólida conduce a la reducción del número de partículas en el sistema. Por lo tanto, las suspensiones con un tamaño de partícula creciente tenían menos interacciones partícula-partícula y una menor resistencia al flujo, lo que conduce a una menor fuerza de inyección. Los resultados demuestran que a una mayor concentración de proteína, tal como al 40 % (% p/p), la elección del tamaño de partícula en formulaciones no acuosas en suspensión tiene un efecto significativo sobre la fuerza de inyección y, por lo tanto, la inyectabilidad de las formulaciones. Por ejemplo, formulaciones con 40 % (5 p/p) de partículas de proteínas de 13 μm tienen una fuerza de inyección de 40.5 N, mientras que las mismas formulaciones con partículas de proteína de 2 μm tienen una fuerza de inyección de 57 N. Por lo tanto, la inyectabilidad de formulaciones de suspensión de la invención puede mejorarse optimizando tanto la concentración de proteína como el tamaño de partícula, así como la cantidad de agentes reductores de la viscosidad en las formulaciones.

Ejemplo 5**La viscosidad de formulaciones no acuosas en suspensión a concentración elevada se puede reducir aumentando la velocidad de corte**

Se estudió el efecto de la elección del vehículo y la concentración de proteína sobre la viscosidad con tasas de intercambio variables. Se pipetearon 290 μl de formulaciones que contenían 1-40 % (% p/p) de anticuerpo anti-TNF α en EO/SO/50/50 o en SO en el reómetro AR2000 (TA Instruments) equipado con una 1^a geometría del cono acrílico de 40 mm. El barrido de viscosidad para cada formulación se midió a 25 °C cuando la velocidad de corte aumentó de $\sim 8 \text{ s}^{-1}$ a 5000 s^{-1} .

Dependiendo de un vehículo utilizado, formulaciones al 20 % (% p/p) de mAb de anti-TNF α demostraron comportamiento pseudoplástico newtoniano (mAb anti-TNF α en EO/SO/50/50) o no newtoniano (mAb anti-TNF α en SO) (Figura 6a). A concentraciones de proteínas del 30 % (% p/p) o mayores, las formulaciones mAb anti-TNF α EO/SO50/50 cambiaron su comportamiento pseudoplástico Newtoniano a no Newtoniano (Figura 6b).

La evaluación del comportamiento pseudoplástico de las formulaciones de la invención es fundamental para su procesamiento y fabricación posteriores. Las formulaciones de proteínas altamente concentradas a menudo dan como resultado un aumento de la viscosidad que plantea un desafío significativo durante el proceso, la fabricación y el almacenamiento. Como se muestra en la figura 6a y 6b, evaluar el efecto de la velocidad de corte sobre la viscosidad y aumentar la velocidad de corte de forma apropiada durante el procesamiento y la fabricación de las formulaciones en la invención puede reducir significativamente la viscosidad y, por lo tanto, mejorar la procesabilidad de las formulaciones.

Ejemplo 6**Ajuste de la velocidad de inyección para modificar la fuerza de inyección**

Se evaluó la fuerza de inyección para 40-50 % (% p/p) (400-500 mg/ml) de partículas de 2 μm y 13 μm de BSA en EO (Figura 7A, 7B) y para 20-40 % (% p/p) (108,33 - 216,67 mg/ml) de anticuerpo anti-TNF α en EO/SO/50/50 (Figura 7C) usando varias velocidades de inyección. La velocidad de inyección afectó a la fuerza de inyección de una forma dependiente de la concentración de proteínas. A 40 % (% p/p) de BSA, la fuerza de inyección fue menos dependiente de la velocidad de inyección. Sin embargo, al 50 % (% p/p) de concentración de BSA, disminuyendo la velocidad de inyección desde 250 mm/min. a 50 mm/min se redujo significativamente la fuerza de inyección de 111,4 N a 32,4 N (Figura 7A). El efecto sobre la fuerza de inyección por velocidad de inyección también se vio afectado por el tamaño de partícula. La velocidad de inyección de formulaciones con tamaños de partícula mayores se vio menos afectada por la inyección, mientras que la fuerza de inyección de formulaciones con tamaños de partícula más pequeños se vio significativamente afectada por la velocidad de la inyección (Figura 7B). Utilizando partículas de BSA de 13 μm con velocidades de inyección entre 50-250 mm/min se produjeron velocidades de inyección iguales o menores que 45 N. La velocidad de inyección también afectó a la fuerza de inyección de las formulaciones de anticuerpos anti-TNF α , redujo las velocidades de inyección reduciendo la fuerza de inyección (Figura 7C).

Reivindicaciones

1. Una formulación no acuosa en suspensión a concentración elevada, que comprende:
- 5 a. un vehículo que comprende aceite de sésamo y oleato de etilo; y
- b. una molécula bioactiva, en la que dicha molécula bioactiva es una proteína, anticuerpo, péptido o nucleótido.
2. La formulación de la reivindicación 1, en la que la cantidad de oleato de etilo en el vehículo está entre 0,2 % - 85
- 10 % en volumen (% v/v) del vehículo.
3. La formulación de la reivindicación 1, en la que la molécula bioactiva está presente a aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 50 % en peso (% p/p) de la formulación.
- 15 4. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la fuerza de inyección de la formulación es igual o menor que 45 Newton (N), en la que la fuerza de inyección se mide utilizando una jeringa de vidrio con protector de aguja rígida de 1 ml que tiene 0,25 pulgadas de diámetro interno, equipada con una aguja de calibre 26 ½ de 0,5 pulgadas a una velocidad de inyección de 250 mm/min.
- 20 5. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que el tamaño de partícula de la molécula bioactiva está entre 2 µm - 13 µm.
6. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que la molécula bioactiva es un anticuerpo monoclonal.
- 25 7. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6, en la que dicha formulación es estable a 40 °C durante al menos un mes.
8. Un método para reducir una fuerza de inyección a aproximadamente 45 Newtons (N) o menos de una formulación que contiene ≥ 50 mg/ml de una proteína en un vehículo que comprende aceite de sésamo, que comprende:
- 30 a. añadir al menos 28 % en volumen de oleato de etilo en el vehículo que comprende aceite de sésamo; o
- b. utilizar partículas de proteína con tamaño de partícula entre 2 µm - 13 µm para preparar la formulación, en la que la fuerza de inyección se mide utilizando una jeringa de vidrio con protector de rígida de 1 ml que tiene un diámetro interno de 0,25 pulgadas equipada con una aguja de 0,5 pulgadas de calibre 26½ una velocidad de inyección de 250 mm/min.
- 35 9. Un método para preparar la formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende
- 40 a. proporcionar una molécula bioactiva;
- b. proporcionar aceite de sésamo;
- 45 c. proporcionar oleato de etilo;
- d. mezclar el aceite de sésamo y el oleato de etilo para formar un vehículo; y
- 50 e. añadir la molécula bioactiva al vehículo formado en la etapa d.
10. El método de la reivindicación 9, en el que la molécula bioactiva se añade al vehículo formado en la etapa d a una concentración igual o superior a 50 mg/ml.

55

60

65

Figura 1

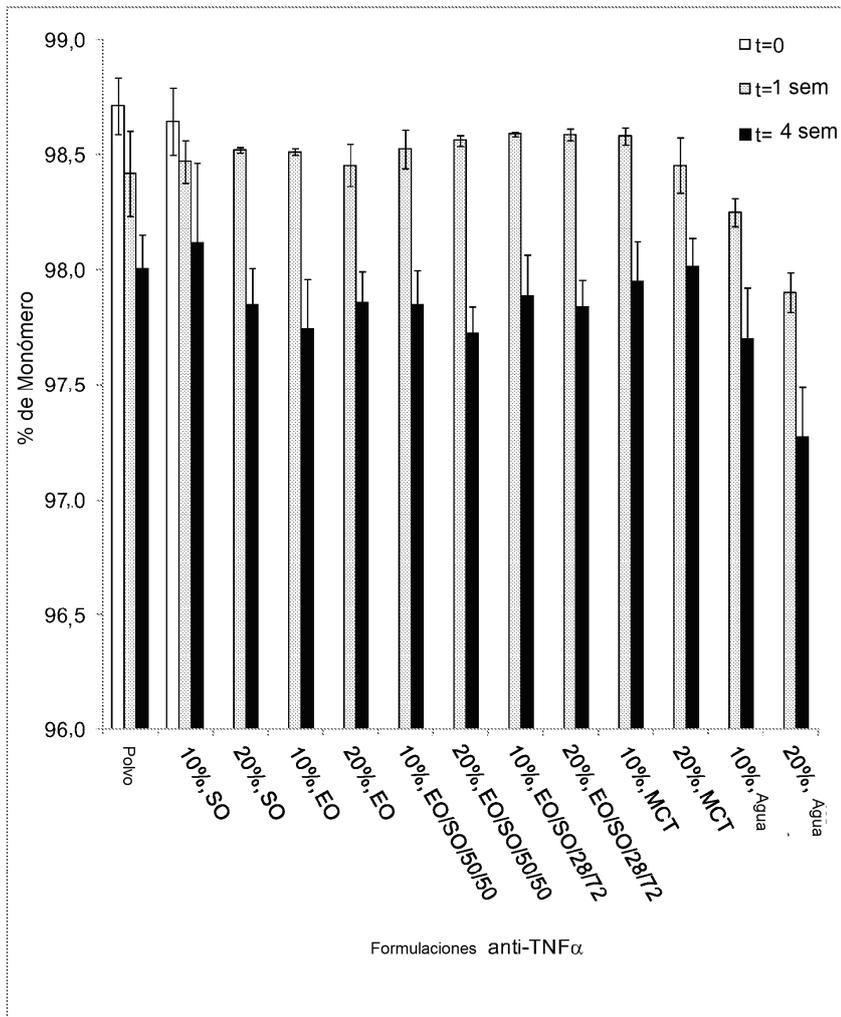


Figura 2A

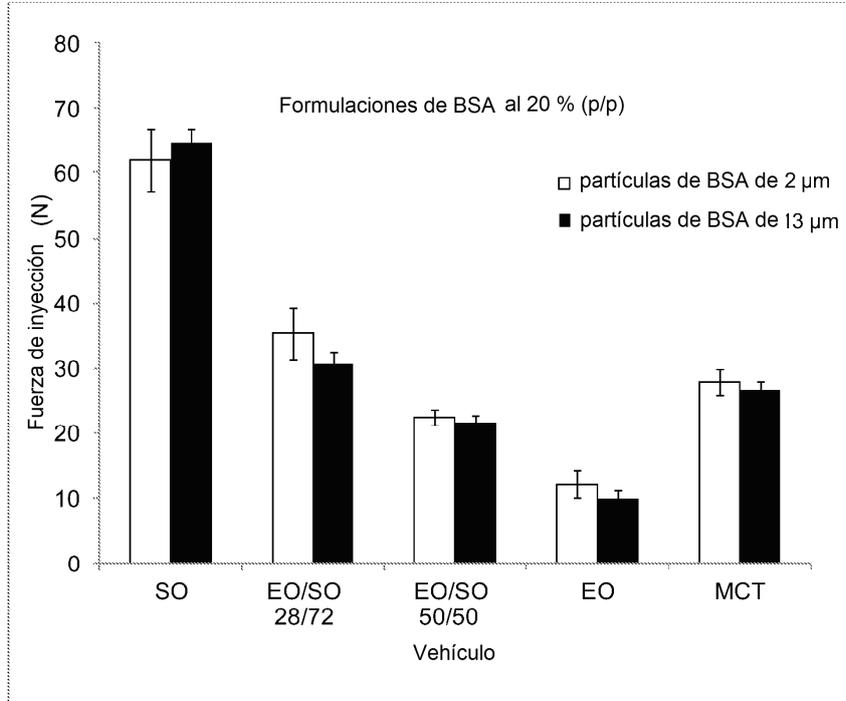


Figura 2B

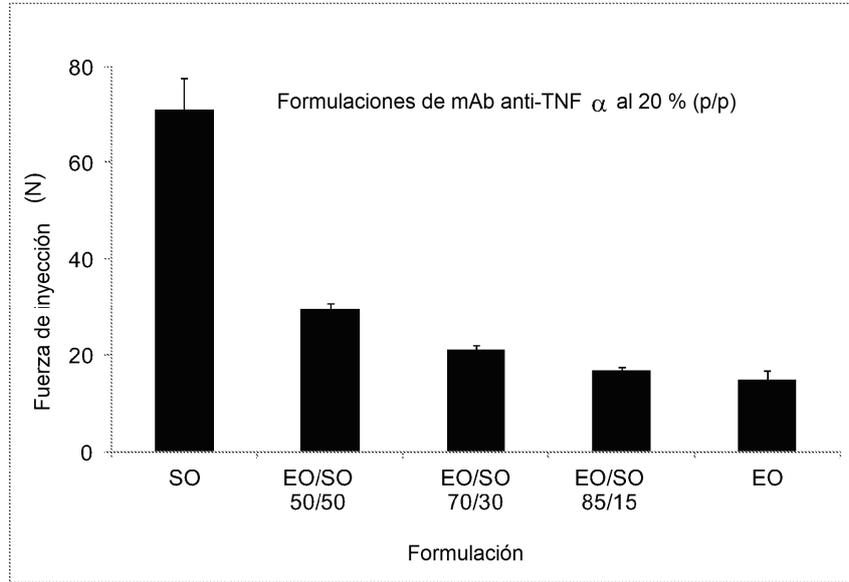


Figura 3A

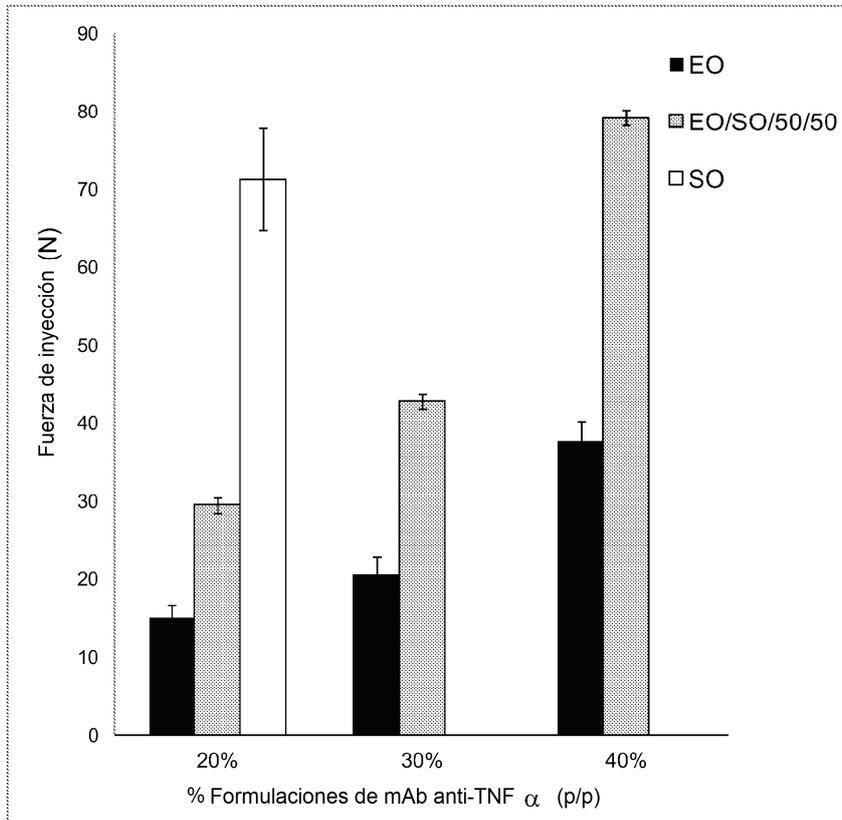


Figura 3B

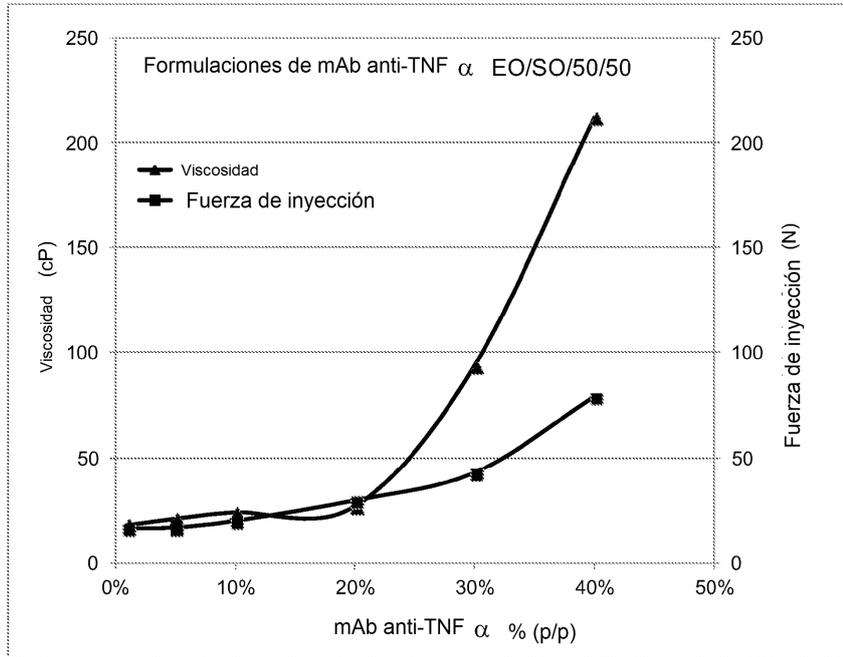


Figura 3C

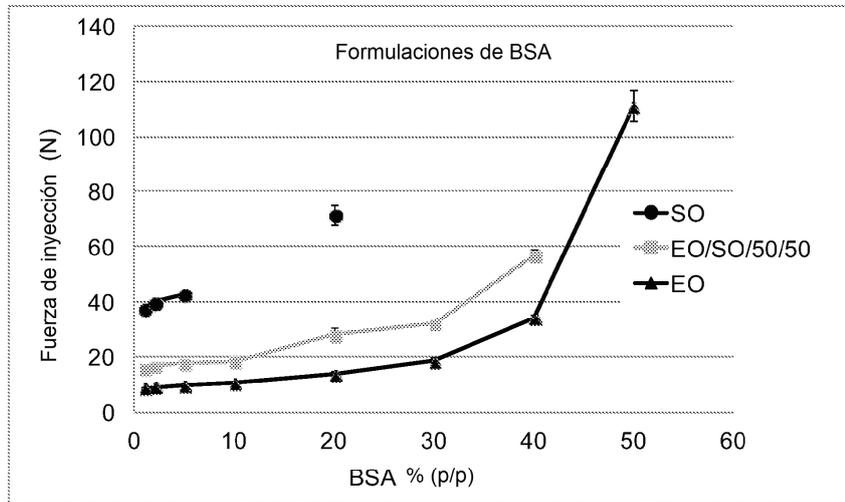


Figura 4A

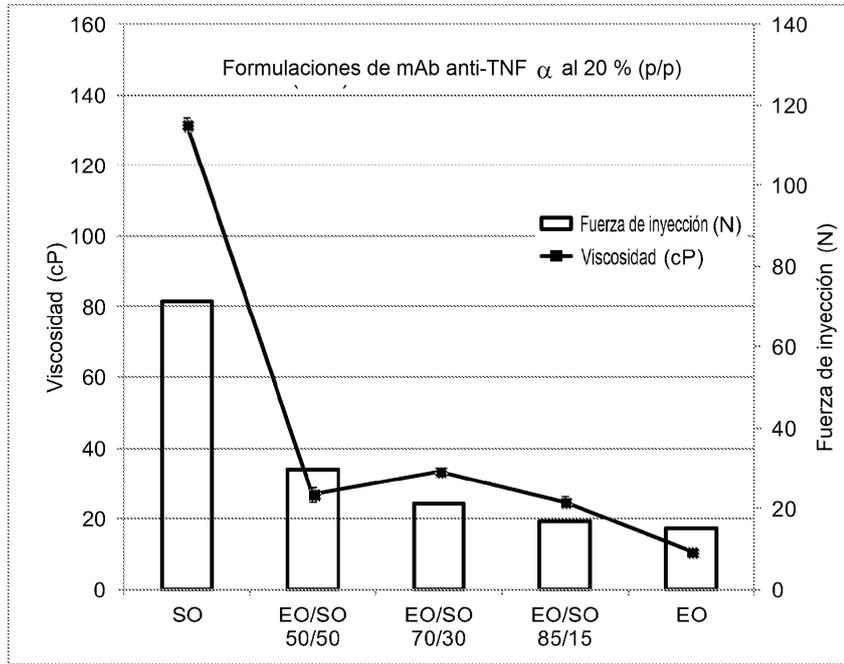


Figura 4B

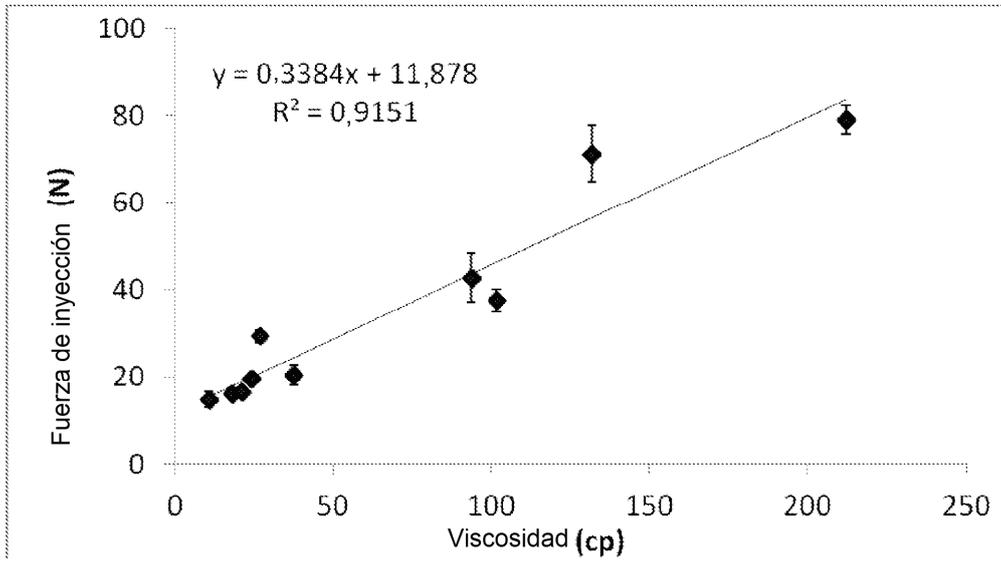


Figura 5

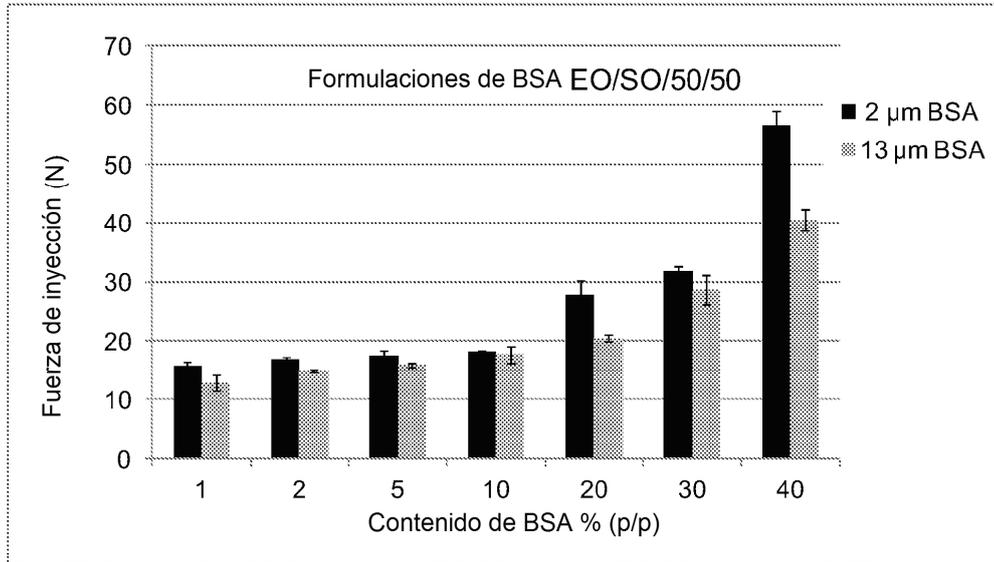


Figura 6A

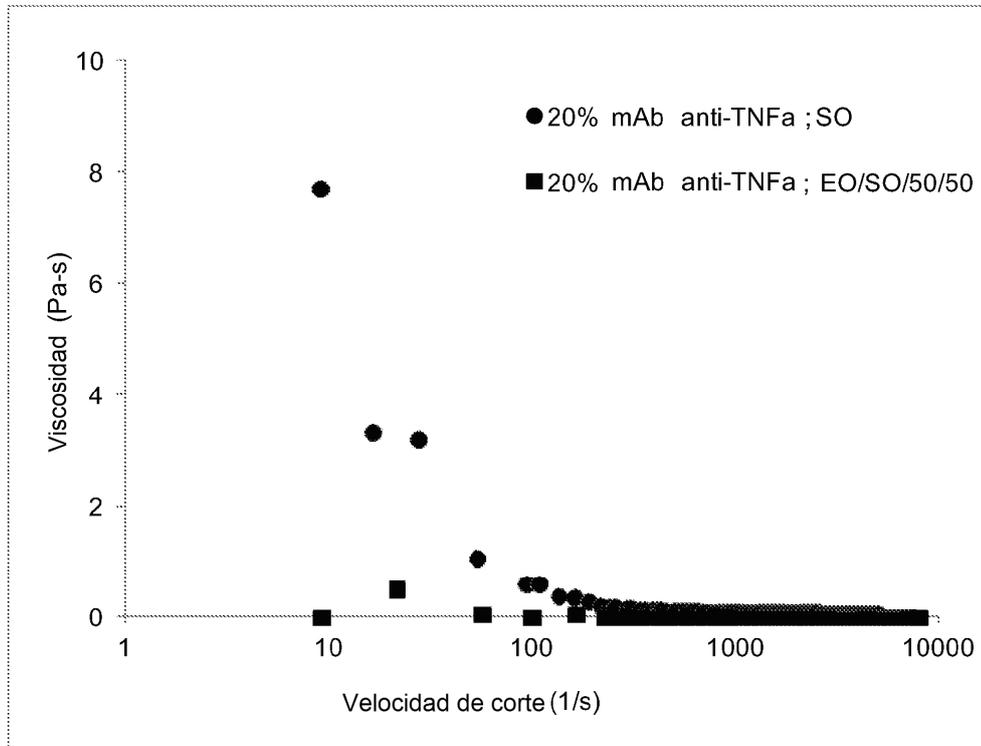


Figura 6B

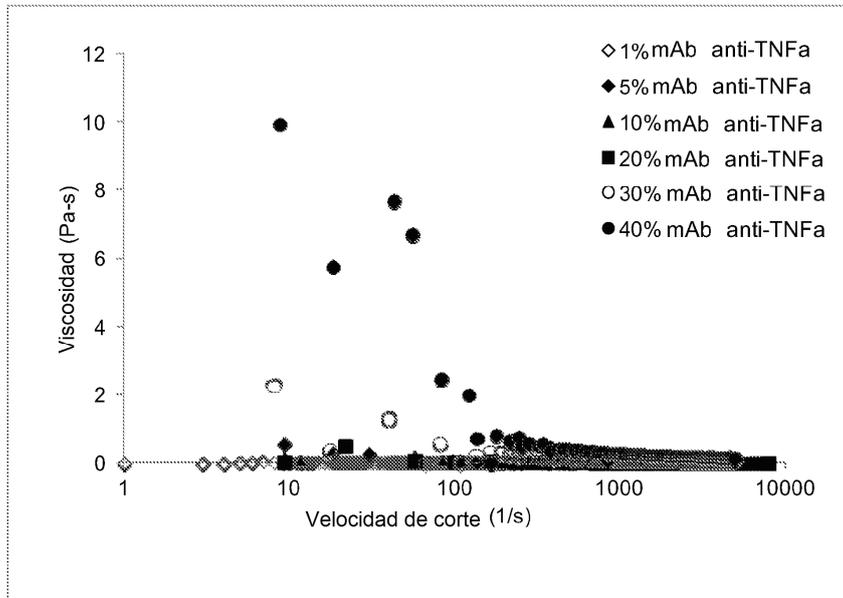


Figura 7A

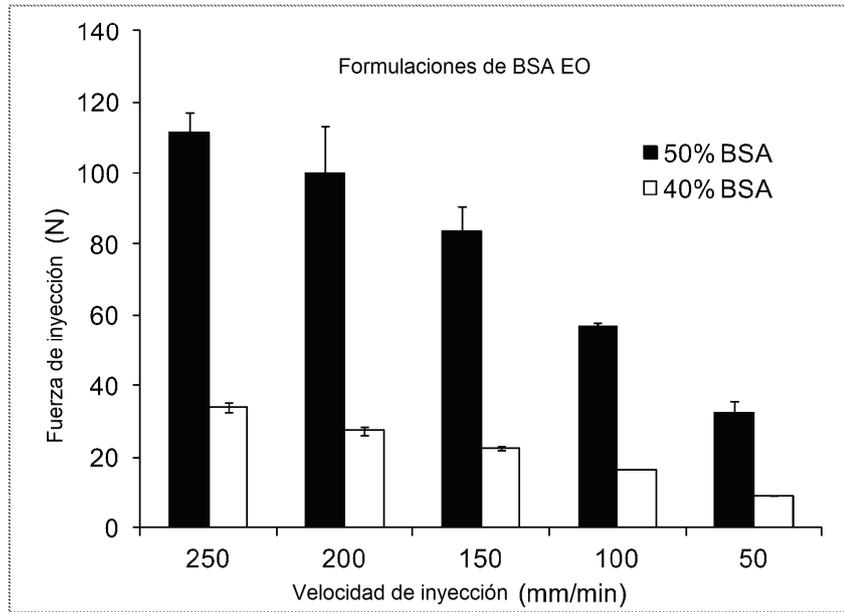


Figura 7B

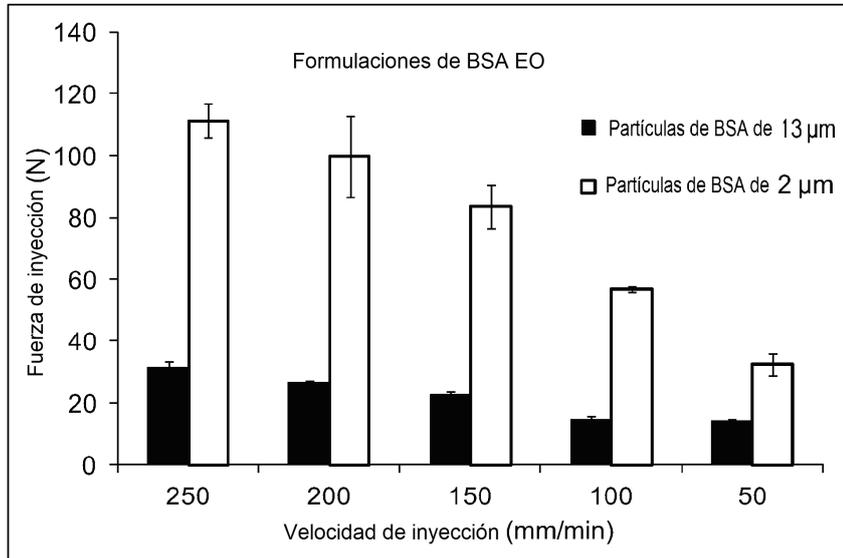


Figura 7C

