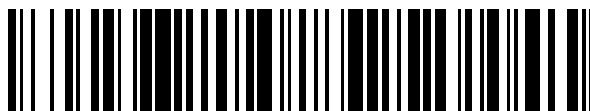


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 687 094**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 47/06 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.07.2014** **PCT/EP2014/065840**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.01.2015** **WO15011199**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.07.2014** **E 14742509 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.06.2018** **EP 3024484**

54 Título: **Composiciones estabilizadas de anticuerpos**

30 Prioridad:

23.07.2013 EP 13177699

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

23.10.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**GÜNTHER, BERNHARD;
SCHERER, DIETER;
PETTIGREW, ANTHONY y
GRAF, GESCHE**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 687 094 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 estabilizadas de anticuerpos

Campo de la invención

5 La presente invención se encuentra en el campo de las composiciones de anticuerpos, en particular composiciones que son útiles como formulaciones farmacéuticas para uso terapéutico o de diagnóstico.

Antecedentes de la invención

Las terapias basadas en anticuerpos han llegado a estar en vanguardia en los últimos años como opciones de tratamiento eficaces para numerosas enfermedades como cáncer o enfermedades autoinmunitarias, junto con muchos nuevos desarrollos en ingeniería y tecnologías de producción de anticuerpos.

10 Uno de los principales desafíos relacionados con la formulación y el suministro de anticuerpos es mantener la estabilidad y la forma de la terapéutica de los anticuerpos, en particular durante el almacenamiento de larga duración y durante el transporte. Los anticuerpos, al igual que otros tipos de productos terapéuticos a base de proteínas, están expuestos a inestabilidad física y química bajo condiciones de estrés tales como cambios de temperatura de congelación-descongelación o durante el transporte, exposición a la luz, oxígeno o productos químicos/disolventes, esfuerzo cortante, y agresión por pH.

15 Pueden experimentar desnaturalización (p. ej., pérdida de estructura terciaria y/o secundaria) o interactuar para formar agregados. Si bien la agregación de anticuerpos puede producirse tanto en estado líquido como sólido, es especialmente problemática en formulaciones líquidas, especialmente a altas concentraciones de anticuerpos. Los anticuerpos son por lo general terapéuticamente eficaces a dosis relativamente altas. Las altas concentraciones de anticuerpos, tales como para minimizar los volúmenes de dosis y para hacer más agradable la administración al paciente (p. ej., inyección subcutánea en lugar de infusión intravenosa, disminución del número de inyecciones) son, por tanto, deseables generalmente en las formulaciones farmacéuticas.

20 La agregación, en efecto, puede conducir a la pérdida de la terapéutica activa de anticuerpos, lo que lleva a una dosificación no fiable e ineficaz. Más significativamente, los agregados también pueden presentar toxicidad y desencadenar respuestas inmunógenas indeseables o graves. La agregación que da como resultado la precipitación de partículas grandes que impiden el flujo es indeseable para cualquier tipo de aplicación parenteral.

25 La modificación y degradación de anticuerpos por vías químicas tales como oxidación, desamidación, isomerización, formación de enlaces disulfuro y otras reacciones de reticulación irreversibles también pueden ocurrir durante el transcurso del tiempo y llevan a la inactivación del anticuerpo, así como a desencadenar agregación. Estas reacciones, junto con la agregación, a menudo se aceleran a temperaturas elevadas; la refrigeración es por consiguiente casi siempre un requisito previo. En muchas de estas reacciones químicas, el agua también desempeña un papel importante, ya sea como mediador o como intermediario reactivo como en la escisión hidrolítica de enlaces amida. La exclusión de agua, tal como por liofilización, o secado por congelación, para formar una formulación en polvo en estado sólido puede ser por tanto una medida eficaz hacia la preparación de una formulación estable de un agente terapéutico de anticuerpo.

30 Algunas de las formulaciones del anticuerpo terapéutico o derivados/fragmentos de anticuerpos comercializados se basan en formulaciones en polvo liofilizadas que necesitan reconstituirse en condiciones estériles con un medio acuoso poco antes de la administración por un médico general o paramédico capacitados. Por ejemplo, omalizumab (p. ej. Xolair®, comercializado por Genentech) está disponible en forma de polvo liofilizado en un vial de un solo uso.

35 La reconstitución del anticuerpo liofilizado en medios acuosos estériles como una etapa adicional antes de la administración real, sin embargo, conlleva el riesgo de una manipulación incorrecta (p. ej. agitación) o dosificación, así como contaminación. La etapa de reconstitución en sí puede desencadenar la agregación si el pH o la temperatura del medio acuoso es subóptimo, el tiempo permitido para la rehidratación es demasiado corto o el vial se agita demasiado energicamente durante la etapa de disolución. La propensión a los residuos es también mayor, como la incapacidad para disolver adecuadamente el producto de anticuerpos liofilizado dentro del período de tiempo recomendado por lo general requiere que la muestra se descarte.

40 Cabe señalar que la propia etapa de proceso de liofilización puede provocar agregación y/o degradación. Los excipientes estabilizantes adicionales tales como sacáridos o polioles con frecuencia se agregan a la composición de liofilización previa, junto con otros excipientes como agentes de esponjamiento. La adición de otros excipientes también puede ser necesaria después de la liofilización con el fin de apoyar la vida útil más larga del anticuerpo, agregando el número de componentes en la formulación final.

45 Las formulaciones líquidas listas para su uso en general son preferidas por los usuarios, debido a la facilidad

de preparación para su administración. Si es estable, una formulación líquida también es atractiva para el fabricante de productos farmacéuticos debido a que evita la liofilización, que requiere mucho tiempo y es costosa, tanto durante el desarrollo del fármaco como en la producción rutinaria. De hecho, muchas formulaciones comercializadas de anticuerpos o derivados de anticuerpos son soluciones acuosas. Con formulaciones acuosas, el pH del medio puede tener un impacto significativo sobre la estabilidad del anticuerpo en cuanto a favorecer o reducir la probabilidad de diversas reacciones químicas de degradación. En consecuencia, siempre se requiere un sistema amortiguador optimizado, junto con otros excipientes de formulación, tales como eliminadores de radicales libres antioxidantes, tensioactivos y otros aditivos contra la agregación, o conservantes a fin de proporcionar estabilización al anticuerpo y contrarrestar los diversos procesos de degradación posibles que pueden ocurrir durante el almacenamiento en un entorno acuoso a lo largo del tiempo.

También se conocen opciones de formulación alternativas a la liofilización y soluciones acuosas, tales como el uso de líquidos no acuosos como vehículos portadores. Por ejemplo, el documento WO2012/121754 describe formulaciones no acuosas de suspensión de alta concentración que comprenden un vehículo hidrófobo como aceite de sésamo, y un agente reductor de viscosidad, como oleato de etilo, y un anticuerpo anti-TNF α . Estas composiciones requieren la adición de un agente reductor de viscosidad que es completamente miscible en el portador, con el fin de hacer que los portadores de aceite sean más susceptibles a la inyección. En general, el uso parenteral de lípidos y aceites puede causar dolor y otros efectos secundarios indeseables en la zona de la inyección. Estos tipos de compuestos también pueden retardar la liberación del agente terapéutico, y no son ideales si se prefiere biodisponibilidad rápida o inmediata.

Los compuestos perfluorados también se han descrito como posibles portadores líquidos no acuosos de agentes biológicamente activos como proteínas y péptidos (véanse p. ej. los documentos WO 2013/110621 y US 2010/008996). Por ejemplo, el documento US6458376 describe composiciones propuestas para aplicaciones oftálmicas (como colirios aplicados por vía tópica) en las cuales los compuestos terapéuticos/de diagnóstico, incluidos oligopéptidos y factores de crecimiento de proteínas se ponen en suspensión en perfluorocarbonos o aceites de silicona fluorada y en presencia de al menos un tensioactivo. No se hace mención, sin embargo, de tales composiciones que comprenden anticuerpos o fragmentos de anticuerpos y derivados.

El documento US6730328 describe formulaciones térmicamente estables en las cuales se usan vehículos no acuosos, hidrófobos, no reactivos, tales como aceite mineral, perfluorodecalina, metoxiflurano, perfluorotributilamina y tetradecano para composiciones en suspensión que comprenden proteínas, compuestos proteicos y ácidos nucleicos. Se proponen las formulaciones para métodos de administración parenteral, transdérmica, mucosal, oral y enteral, así como su uso para la administración continua de larga duración y el suministro mediante un dispositivo implantable. Sin embargo, no se describe ningún ejemplo específico de una suspensión de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo o derivado en dichos vehículos, ni hay ninguna enseñanza con respecto a la estabilidad de dichas composiciones a temperaturas elevadas más allá de un periodo de tres meses. La compatibilidad real con los tejidos de estos tipos de composiciones no se ha demostrado tampoco.

Kociok *et al.* (*Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* (2005) 243:345-358) describe la influencia sobre la actividad celular mediada por la membrana por vesículas de aceite de silicona o perfluorohexioctano.

El documento WO 2011/073134 describe soluciones de ciclosporina, un polipéptido cíclico con un peso molecular de 1202,31 en un alcano semifluorado, opcionalmente en presencia de un cosolvente como etanol. Mientras las suspensiones y emulsiones se mencionan como alternativas opcionales, no hay ninguna descripción específica de este tipo de composición, o de cualquier composición que comprende especies proteicas de alto peso molecular en el intervalo de kiloDalton tales como anticuerpos o fragmentos de anticuerpos o derivados.

Es por tanto un objeto de la presente invención introducir nuevas composiciones de anticuerpos que superen cualquiera de las limitaciones y desventajas relacionadas con las formulaciones conocidas actualmente en la técnica.

Compendio de la invención

En un primer aspecto, la invención proporciona una nueva composición de un polipéptido o proteína de unión al antígeno, seleccionado de entre un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un fragmento de anticuerpo, una proteína de fusión que comprende un fragmento de anticuerpo, un conjugado anticuerpo-fármaco y una cualquiera de sus combinaciones, y un vehículo líquido que comprende un alcano semifluorado de fórmula RFRH, en donde RF es un segmento de hidrocarburo perfluorado lineal con 4 a 12 átomos de carbono, y en donde RH es un grupo alquilo lineal con 4 a 8 átomos de carbono tal como para formar una dispersión o suspensión y en donde la composición opcionalmente comprende un líquido orgánico no fluorado, en donde la composición conserva al menos el 85% de su actividad de unión al antígeno inicial durante el almacenamiento de 6 meses a una temperatura entre la T.A. y 40°C.

En otra realización, la invención proporciona un método para estabilizar un polipéptido o proteína de unión al antígeno, en donde el polipéptido o proteína de unión al antígeno es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un fragmento de anticuerpo, una proteína de fusión que comprende un fragmento de anticuerpo, un conjugado anticuerpo-fármaco o una cualquiera de sus combinaciones, que comprende la etapa de mezclar el polipéptido o proteína de unión al antígeno con un vehículo líquido que comprende un alcano semifluorado de fórmula RFRH, en donde RF es un segmento de hidrocarburo perfluorado lineal con 4 a 12 átomos de carbono, y en donde RH es un grupo alquilo lineal con 4 a 8 átomos de carbono, para formar una suspensión o dispersión.

Descripción detallada de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona composiciones que comprenden un polipéptido o proteína de unión al antígeno seleccionado de entre un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un fragmento de anticuerpo, una proteína de fusión que comprende un fragmento de anticuerpo, un conjugado anticuerpo-fármaco o una cualquiera de sus combinaciones, y un vehículo líquido que comprende un alcano semifluorado de fórmula RFRH, en donde RF es un segmento de hidrocarburo perfluorado lineal con 4 a 12 átomos de carbono, y en donde RH es un grupo alquilo lineal con 4 a 8 átomos de carbono en donde el polipéptido o proteína de unión al antígeno está incorporado en la composición como para formar una dispersión o una suspensión; es decir, el polipéptido o proteína de unión al antígeno está dispersado o en suspensión en el vehículo líquido, y en donde la composición opcionalmente comprende un líquido orgánico no fluorado, en donde la composición conserva al menos el 85% de su actividad de unión al antígeno inicial durante el almacenamiento de 6 meses a una temperatura entre la T.A. y 40°C.

Los alcanos semifluorados proporcionan una serie de ventajas desde el punto de vista farmacéutico. Son sustancialmente atóxicos y se ha descubierto que son bien tolerados por varios tipos de tejido humano y animal cuando se administran por vía tópica o parenteral. Además, son químicamente inertes y son generalmente compatibles con principios activos e inactivos en las formulaciones farmacéuticas. También son capaces de disolver una amplia gama de compuestos, tales como principios activos de pequeñas moléculas y muchos excipientes corrientes farmacéuticamente aceptables, probablemente debido a su inherente carácter anfífilo. Además, los alcanos semifluorados, cuando actúan como vehículos para los compuestos que insolubles o poco solubles (como proteínas o polipéptidos de unión al antígeno), 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 descubierto que la presencia de un alcano semifluorado como vehículo líquido en una composición que comprende una proteína o polipéptido de unión al antígeno seleccionado de entre un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un fragmento de anticuerpo, una proteína de fusión que comprende un fragmento de anticuerpo, un conjugado anticuerpo-fármaco y una cualquiera de sus combinaciones, tiene un notable efecto estabilizador sobre estos componentes. En particular, las composiciones que comprenden alcano semifluorado como vehículo líquido son capaces de prevenir o inhibir sustancialmente su agregación y reducir la degradación química durante un período sustancial de tiempo, a temperatura ambiente e incluso a temperaturas más altas como 40°C, sin pérdida de actividad biológica.

También se ha descubierto que las dispersiones y suspensiones de proteínas de unión al antígeno en alcanos semifluorados presentan un notable grado de estabilidad física. La aparición de la flotación o la sedimentación tiene lugar lentamente, dejando tiempo suficiente para que la retirada de una dosis después de una suave agitación o formación de remolinos del recipiente (p. ej., un vial) con la dispersión o suspensión. Las partículas de proteína de unión al antígeno en alcano semifluorado parecen retener en gran medida su distribución de tamaño de partícula original, y son fácilmente redispersables; agregados poco redispersables no parecen formarse. Es importante destacar que esto proporciona un mayor nivel de precisión de dosificación en cuanto a precisión y reproducibilidad.

Por el contrario, las suspensiones o dispersiones en otros vehículos químicamente inertes tienden a ser inestables, dando lugar a la formación de agregados densos y poco redispersables, y haciendo desafiante la dosificación precisa, o en algunos casos, imposible, como dando lugar a la obstrucción de las agujas de fino calibre normalmente usadas para inyecciones subcutáneas. Las partículas agregadas de proteínas también presentan un alto riesgo de desencadenar reacciones inmunógenas adversas.

Las suspensiones o dispersiones que son inestables tienden a separarse 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. Tal comportamiento viene acompañado por lo general por una rápida formación de agregados densos y poco redispersables. La rápida flotación o sedimentación hace desafiante, si no imposible la dosificación precisa y reproducible. Por ejemplo, si una suspensión inyectable u oftálmica sedimenta rápidamente después de la agitación, y si una primera dosis del recipiente lleno no se retira inmediatamente después de la agitación, una dosis que se retira puede contener un número menor de lo previsto de partículas de fármaco (o si el recipiente está boca abajo, una dosis mayor de la prevista se dispensará). Las dosis posteriores retiradas del mismo recipiente también contendrán entonces ya sea demasiado alta o demasiado

baja de una dosis de fármaco por volumen. La agitación vigorosa de polipéptidos y proteínas de unión al antígeno en un intento de redispersar agregados poco redispersables también pueden desencadenar además su agregación y deterioro adicionales.

Las principales ventajas de la presente invención son provocadas por la presencia de un alcano semifluorado en la composición, que funciona como un vehículo líquido. Las propiedades ventajosas de suspensiones a base en alcano semifluorado dan como resultado una calidad farmacéutica y características de rendimiento superiores, y también aumentan la conveniencia de uso por el paciente y/o el profesional sanitario.

Los alcanos semifluorados son alcanos lineales o ramificados, algunos de cuyos átomos de hidrógeno han sido sustituidos por flúor. En los alcanos semifluorados (SFA) usados en la presente invención, están presentes un segmento de hidrocarburo no fluorado lineal y un segmento de hidrocarburo perfluorado lineal. Por consiguiente, estos compuestos siguen la fórmula general $F(CF_2)_n(CH_2)_mH$. Según la presente invención, n se selecciona del intervalo de 4 a 12, y m se selecciona del intervalo de 4 a 8.

Una nomenclatura que se usa frecuentemente para alcanos semifluorados designa un segmento de hidrocarburos perfluorados como RF y un segmento no fluorado como RH. Alternativamente, los compuestos pueden ser denominarse F_nH_m y F_nH_m , respectivamente, en donde F significa un segmento de hidrocarburo perfluorado, H significa un segmento no fluorado, y n y m definen el número de átomos de carbono del segmento respectivo. Por ejemplo, se usa F_3H_3 para perfluoropropilpropano, $F(CF_2)_3(CH_2)_3H$. Por otra parte, este tipo de nomenclatura se usa generalmente para compuestos que tienen segmentos lineales. Por lo tanto, a menos que se indique lo contrario, debe suponerse que F_3H_3 significa 1-perfluoropropilpropano, en lugar de 2-perfluoropropilpropano, 1-perfluoroisopropilpropano o 2-perfluoroisopropilpropano.

Los alcanos semifluorados preferidos incluyen, en particular, los compuestos F_4H_5 , F_4H_6 , F_4H_8 , F_6H_4 , F_6H_6 , F_6H_8 y F_6H_{10} . Los particularmente preferidos para realizar la invención son F_4H_5 , F_4H_6 , F_6H_6 y F_6H_8 . En otra realización particularmente preferida, la composición de la invención comprende F_6H_8 .

Opcionalmente, la composición puede comprender más de un SFA. Puede ser útil para combinar los SFA, por ejemplo, a fin de lograr una propiedad objetivo específica como una determinada densidad o viscosidad. Si se usa una mezcla de SFA, se prefiere además que la mezcla comprenda al menos uno de F_4H_5 , F_4H_6 , F_6H_4 , F_6H_6 , F_6H_8 y F_6H_{10} , y en particular uno de F_4H_5 , F_4H_6 , F_6H_6 y F_6H_8 . En otra realización, la mezcla comprende al menos dos miembros seleccionados de F_4H_5 , F_4H_6 , F_6H_4 , F_6H_6 , F_6H_8 y F_6H_{10} , y en particular al menos dos miembros seleccionados de F_4H_5 , F_6H_6 y F_6H_8 .

Los SFA líquidos son química y fisiológicamente inertes, incoloros y estables. Sus densidades típicas oscilan entre 1,1 y 1,7 g/cm³, y su tensión superficial pueden ser como mínimo 19 mN/m. Los SFA del tipo RFRH son insolubles en agua, pero también algo anfífilos, con aumento de lipofilia que se correlaciona con un aumento de tamaño del segmento no fluorado.

Los SFA líquidos del tipo RFRH se están usando comercialmente para desplegar y reaplicar una retina, para el taponamiento de larga duración como sustituto del humor vítreo (H. Meinert *et al.*, *European Journal of Ophthalmology*, Vol. 10(3), págs. 189-197, 2000), y como soluciones de lavado para aceite de silicio residual después de la intervención quirúrgica vítreo-retiniana. Experimentalmente, que también se han usado como sustitutos de sangre (H. Meinert *et al.*, *Biomaterials, Artificial Cells, and Immobilization Biotechnology*, Vol. 21(5), págs. 583-95, 1993). Estas aplicaciones han demostrado que los SFA son compuestos fisiológicamente bien tolerados. Por otro lado, los SFA no han sido usados como excipientes en productos farmacéuticos aprobados a partir de hoy.

La composición de la invención comprende un polipéptido o proteína de unión al antígeno seleccionado de entre un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un fragmento de anticuerpo, una proteína de fusión que comprende un fragmento de anticuerpo, un conjugado anticuerpo-fármaco y una cualquiera de sus combinaciones. Los polipéptidos y proteínas en general representan polímeros de unidades de aminoácidos que están unidos entre sí por enlaces peptídicos. Dado que los límites de tamaño que a menudo se usan para diferenciar entre polipéptidos y proteínas son un tanto arbitrarios, las dos expresiones para estas moléculas deberían – dentro del contexto de la presente invención – no entenderse como mutuamente excluyentes: Un polipéptido también puede referirse a una proteína, y viceversa. Por lo general, el término "polipéptido" se refiere únicamente a una cadena de polimérica simple, mientras que la expresión "proteína" también puede referirse a dos o más cadenas de polipéptidos que están enlazadas entre sí por enlaces no covalentes.

Más específicamente, y como se emplea dentro del contexto de la presente invención, los polipéptidos o proteínas de unión al antígeno se refieren a anticuerpos completos y enteros (también conocidos como inmunoglobulinas) en su monómero, o a formas poliméricas y cualquiera de los fragmentos, cadenas, dominios o cualquiera de las modificaciones derivadas de un anticuerpo completo capaz de unirse específicamente a un antígeno. Los polipéptidos o proteínas de unión al antígeno pueden pertenecer a cualquiera de los isotipos o clases de inmunoglobulinas IgG, IgA, IgD, IgE o IgM. Las proteínas de fusión que comprenden un fragmento de anticuerpo capaz de unirse específicamente a un antígeno y conjugados

anticuerpo-fármaco están también dentro de la definición de polipéptidos o proteínas de unión al antígeno, como se usa en la presente memoria.

Un anticuerpo completo es una glucoproteína en forma de Y que consiste en una estructura general con un dominio Fc (fragmento cristizable) y un dominio Fab (unión del antígeno al fragmento). Estos están estructuralmente compuestos de dos cadenas pesadas (H) y dos estructuras polipeptídicas de cadena ligera (L) interenlazadas por enlaces disulfuro para formar la estructura en forma de Y. Cada tipo de cadena comprende una región variable (V) y una región constante (C); la cadena pesada comprende una región de cadena variable (V_H) y diversas regiones constantes (p. ej. C_{H1} , C_{H2} , etc.) y la cadena ligera comprende una región de cadena variable (V_L) y una región constante (C_L). Las regiones V pueden caracterizarse además en otros subdominios/regiones, es decir, regiones estructurales (FR) que comprenden restos más conservados de aminoácidos y la hipervariable (HV) o regiones determinantes de complementariedad (CDR) que se compone de las regiones de variabilidad aumentada en cuanto a restos de aminoácidos. Las regiones variables de las cadenas determinan la especificidad de unión del anticuerpo y forman los dominios Fab de unión al antígeno de un anticuerpo.

Las composiciones de la invención comprenden un polipéptido o proteína de unión al antígeno, en donde el polipéptido o proteína de unión al antígeno se selecciona de entre un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un fragmento de anticuerpo, una proteína de fusión que comprende un fragmento de anticuerpo, un conjugado anticuerpo-fármaco, o una cualquiera de sus combinaciones.

En una realización particularmente preferida de la invención, las composiciones comprenden un polipéptido o proteína de unión al antígeno seleccionada de entre un anticuerpo monoclonal (mAb). Un anticuerpo monoclonal se refiere a un anticuerpo obtenido de una población homogénea de anticuerpos que son específicos para un solo epítipo o sitio de unión en un antígeno. Los anticuerpos monoclonales pueden producirse usando técnicas de ingeniería de anticuerpos conocidas en la técnica, como mediante hibridoma o métodos de ADN recombinado.

Asimismo dentro del alcance de los polipéptidos y proteínas de unión al antígeno, y de los anticuerpos monoclonales están los fragmentos de anticuerpos. Como se define en la presente memoria, los fragmentos de anticuerpos incluyen cualquier región, cadena, dominio de un anticuerpo, o cualquiera de sus montajes o conjugados que pueden interactuar y unirse específicamente a un antígeno, y pueden ser monovalentes, bivalentes o incluso poliivalentes, con respecto a la capacidad de unión. Dichos fragmentos de anticuerpos pueden producirse a partir de métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, disección (p. ej., por proteólisis) de un anticuerpo natural completo, a partir de la síntesis de proteínas, ingeniería genética/procesos de ADN recombinado, reticulación química o una cualquiera de sus combinaciones. Los fragmentos de anticuerpos proceden normalmente de la combinación de diferentes dominios o regiones destacados en la región variable V de un anticuerpo completo.

En una realización de la invención, las composiciones comprenden un polipéptido o proteína de unión al antígeno seleccionada de entre un fragmento de anticuerpo, en donde el fragmento de anticuerpo es un fragmento de unión al antígeno (Fab), un fragmento variable monocatenario (scFv), un anticuerpo monodominio, un minicuerpo o un diacuerpo.

Los fragmentos de anticuerpos particularmente preferidos son los dominios del fragmento de unión al antígeno (Fab, también denominados Fab') o dímeros de Fab que comprenden dos fragmentos de Fab enlazados por un enlace disulfuro. Ejemplos de los Fab son abciximab, certolizumab, digifab y ranibizumab. Un Fab preferido es certolizumab (también conocido como certolizumab pegol), que es un conjugado de fragmento de Fab' de anticuerpo humanizado recombinado con polietilenglicol. El certolizumab tiene una masa molecular de 91 kDa y es dirigido contra el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α).

En aún otra realización de la invención, las composiciones pueden comprender un fragmento variable monocatenario (scFv), como los compuestos de dominios variables de cadena pesada (V_H) y ligera (V_L) unidos por un enlazador o uno de sus montajes poliméricos/polivalentes complejados, por ejemplo, diacuerpos (dímero bivalente), triacuerpos (trímero trivalente), o tetracuerpos (tetrámero tetravalente). Los fragmentos de anticuerpos poliméricos también pueden ser multiespecíficos, por ejemplo, un diacuerpo biespecífico puede comprender dos fragmentos, cada uno con especificidad para un antígeno diferente. Los fragmentos de anticuerpos preferidos adicionales incluyen anticuerpos monodominio (dAB), como los que comprenden un monodominio V_H o V_L capaz de unirse específicamente a un antígeno. Los fragmentos de anticuerpos también dentro del alcance de la invención incluyen montajes de dímero scFv- C_H es decir, un minicuerpo.

Según una realización adicional, la composición comprende un polipéptido o una proteína de unión al antígeno con una masa molecular seleccionada de entre al menos 10 kDa, al menos 15 kDa, al menos 35 kDa, al menos 50 kDa, al menos 70 kDa, o al menos 90 kDa. También se prefiere un polipéptido o proteína de unión al antígeno con una masa molecular de al menos 100 kDa, como 100-150 kDa, o incluso mayor de 150 kDa. Particularmente se prefieren los polipéptidos o proteínas de unión al antígeno con una masa molecular

comprendida en el intervalo de 70 kDa a 160 kDa.

En una realización adicional de la invención, el polipéptido o proteína de unión al antígeno puede seleccionarse de una proteína de fusión que comprende un fragmento de anticuerpo. Un fragmento de anticuerpo puede fusionarse a otro fragmento de proteína o polipéptido bioactivo, por ejemplo, una toxina polipeptídica, enzima, citocina, proteína de membrana, etc. Los ejemplos de una proteína de fusión que comprende un fragmento de anticuerpo incluyen etanercept y atacicept. Etanercept es una proteína humana biotecnológica con una masa molecular de 150 kDa, que comprende la porción de unión a ligando del receptor de factor de necrosis tumoral (TNFR) de 75 kDa fusionado a la porción Fc de IgG1.

En otra realización de la invención, el polipéptido o proteína de unión al antígeno puede seleccionarse de un conjugado anticuerpo-fármaco, en donde el polipéptido o proteína de unión al antígeno está ligado por enlace covalente, por ejemplo, mediante un enlazador o reticulando químicamente a un fármaco de molécula pequeña o un componente radiomarcado como radionúclidos. Ejemplos de conjugados anticuerpo-fármaco incluyen gemtuzumab ozogamicina, brentuximab vedotina, ibritumomab tiuxetan marcado con ⁹⁰Y, tositumomab marcado con ¹³¹I, arcitumomab marcado con ^{99m}Tc. Como se usa en la presente memoria, el término conjugado anticuerpo-fármaco también puede referirse a un polipéptido o proteína de unión al antígeno que está sustancialmente modificado químicamente, por ejemplo, por PEGilación (p. ej., certolizumab pegol, un fragmento de Fab' PEGilado de un anticuerpo monoclonal de inhibidor de TNF humanizado) o lipidación.

Como se entiende en la presente memoria, los polipéptidos y proteínas de unión al antígeno pueden ser híbridos, humanizados o humanos. Los anticuerpos monoclonales híbridos, por ejemplo, se refieren a anticuerpos monoclonales híbridos que comprenden dominios o regiones de las cadenas pesadas o ligeras procedentes de secuencias de anticuerpos de más de una especie, por ejemplo, de secuencias de anticuerpos murinos y humanos. Los anticuerpos monoclonales humanizados se refieren a los que mayoritariamente proceden estructuralmente de secuencias de anticuerpos humanos, en general, con una contribución de al menos 85-95% de secuencias derivadas de humanos, mientras que el término humano se refiere a los que proceden exclusivamente de secuencias de anticuerpos de línea germinal humana. En una realización preferida, las composiciones comprenden un polipéptido o proteína de unión al antígeno seleccionado de un anticuerpo monoclonal, en donde el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo híbrido, humanizado o humano.

En otra realización, la composición puede comprender un anticuerpo policlonal, o una mezcla heterogénea de anticuerpos capaces de reconocer más de un epítipo de un antígeno.

En una realización preferida, el polipéptido o proteína de unión al antígeno seleccionado de entre un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un fragmento de anticuerpo, una proteína de fusión que comprende un fragmento de anticuerpo, un conjugado anticuerpo-fármaco y una cualquiera de sus combinaciones es un compuesto terapéutico o de diagnóstico o una vacuna. Como se emplea en la presente memoria, 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 la evolución de una enfermedad o afección o similares. Un compuesto para diagnóstico es útil para determinar el estado de un organismo, o para diagnosticar una enfermedad, afección, síntoma, o fenotipo del paciente. El compuesto terapéutico debe administrarse al paciente, mientras que el agente para diagnóstico puede usarse *in vivo* o *in vitro*, dependiendo del caso específico. Para evitar dudas, el compuesto terapéutico o para diagnóstico se incorpora dentro de la composición de la invención en una cantidad terapéuticamente o para el diagnóstico eficaz.

En una realización particularmente preferida, las composiciones de la invención comprenden un anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo que es terapéuticamente eficaz o que pueden administrarse para el tratamiento de una enfermedad o afección, tal como una enfermedad autoinmunitaria o afección inflamatoria, un trastorno neurológico, o cáncer. Los ejemplos de anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpos para el tratamiento de cáncer incluyen alemtuzumab, bevacizumab, cetuximab, gemtuzumab, ipilimumab, ibritumomab, nimotuzumab, ofatumumab, panitumumab, rituximab, tositumomab y trastuzumab. Los ejemplos de anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpos para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias o afecciones inflamatorias incluyen adalimumab, alemtuzumab, belimumab, briakinumab, canakinumab, ecilizumab, epratuzumab, efalizumab, golimumab, infliximab, mepolizumab, natalizumab, ofatumumab, ocrelizumab, otelixizumab, omalizumab, reslizumab, rituximab, teplizumab, tocilizumab, ustekinumab, y vedolizumab. Los ejemplos adicionales de anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpos que pueden administrarse para el tratamiento, prevención o diagnóstico de una enfermedad o afección incluyen basiliximab, daclizumab, denosumab, ecilizumab, palivizumab y motavizumab.

Las composiciones en suspensión o dispersión según la invención pueden comprender en particular un agente terapéutico para el cáncer seleccionado de un polipéptido o proteína de unión al antígeno tal como un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un fragmento de anticuerpo, una proteína de fusión que comprende un fragmento de anticuerpo, un conjugado anticuerpo-fármaco, o una cualquiera de sus

combinaciones y un vehículo líquido que comprende un alcano semifluorado de fórmula RFRH en donde RF es un segmento de hidrocarburo perfluorado lineal con 4 a 12 átomos de carbono, y en donde RH es un grupo alquilo lineal con 4 a 8 átomos de carbono. Los polipéptidos o proteínas de unión al antígeno que actúan como inhibidores de angiogenia o que son capaces de inhibir la proliferación celular tumoral (agente antiproliferativo) son particularmente adecuados. El fragmento de anticuerpo puede ser un fragmento de unión al antígeno (Fab), un anticuerpo variable monocatenario (scFv), un anticuerpo de monodominio, un minicuerpo o un diacuerpo.

Por ejemplo, una composición según la invención puede comprender bevacizumab y un vehículo líquido, en donde el vehículo líquido comprende un alcano semifluorado de fórmula RFRH, en donde RF es un segmento de hidrocarburo perfluorado lineal con 4 a 12 átomos de carbono, y en donde RH es un grupo alquilo lineal con 4 a 8 átomos de carbono; y en donde bevacizumab se incorpora en la composición en la forma de una dispersión o suspensión. También se contemplan fragmentos de unión al antígeno de bevacizumab. Bevacizumab (nombre comercial Avastin®) es un anticuerpo murino humanizado que se dirige a VEGF-A (factor de crecimiento vascular endotelial A) y que actúa como un inhibidor de angiogenia. Las composiciones de la invención que comprenden bevacizumab pueden usarse para el tratamiento o la prevención de enfermedades y afecciones tales como el cáncer colorrectal, pulmonar, de mama, renal o de cerebro (glioblastoma), así como las afecciones de los ojos como la degeneración macular por la edad (AMD).

Otras composiciones pueden comprender los anticuerpos conocidos bajo el nombre de producto en fase de desarrollo como Fsn0503 y Fsn1006. Fsn1006 es un anticuerpo doblemente específico que puede unirse a los ligandos de EGFR humano (receptor del factor de crecimiento epidérmico) anfirregulina y HB-EGF (factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina), y que puede actuar para inhibir la proliferación celular. Fsn1006 es un isotipo IgG1/kappa humanizado. Se ha demostrado que Fsn1006 funciona independientemente del estado mutacional K-ras de la célula y por lo tanto tiene ventajas significativas sobre las propiedades dirigidas a EGFR actuales, como cetuximab. Fsn0503 es también un anticuerpo IgG1/kappa humanizado que dirige e inhibe la actividad proteolítica de la cathepsina S humana. Fsn0503 puede usarse en el tratamiento del cáncer, y otras enfermedades relacionadas con la angiogenia, en determinadas enfermedades en donde está involucrada la remodelación mediada por cathepsina S de la matriz extracelular.

Aún en otra realización preferida, las composiciones en suspensión o dispersión según la invención pueden comprender un inhibidor de TNF seleccionado de un polipéptido o proteína de unión al antígeno tal como un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un fragmento de anticuerpo, una proteína de fusión que comprende un fragmento de anticuerpo, un conjugado anticuerpo-fármaco, o una cualquiera de sus combinaciones, y un vehículo líquido que comprende un alcano semifluorado de fórmula RFRH en donde RF es un segmento de hidrocarburo perfluorado lineal con 4 a 12 átomos de carbono, y en donde RH es un grupo alquilo lineal con 4 a 8 átomos de carbono. Ejemplos de inhibidores de TNF ejemplares son infliximab, etanercept y certolizumab y sus biosimilares. Las composiciones de la invención pueden comprender estos inhibidores de TNF y un vehículo líquido, en donde el vehículo líquido consiste en alcano semifluorado seleccionado de F₄H₅, F₄H₆, F₄H₈, F₆H₄, F₆H₆, F₆H₈ y F₆H₁₀. En particular, estas composiciones pueden usarse en la terapia de enfermedades autoinmunitarias que afectan al sistema gastrointestinal tales como enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, o afecciones que afectan a las articulaciones y la piel tales como la artritis reumatoide, artritis soriásica, espondilitis anquilosante y soriasis en placas.

En aún otra realización, las composiciones de la invención comprenden un polipéptido o proteína de unión al antígeno en una concentración de preferiblemente al menos 0,5 mg/ml, tal como 0,5-10 mg/ml. En realizaciones preferidas adicionales, la concentración es de al menos 1 mg/ml, al menos 5 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 15 mg/ml, al menos 25 mg/ml o al menos 35 mg/ml.

En un aspecto adicional, la presente invención presenta un método para estabilizar un polipéptido o proteína de unión al antígeno, en donde el polipéptido o proteína de unión al antígeno es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un fragmento de anticuerpo, una proteína de fusión que comprende un fragmento de anticuerpo, un conjugado anticuerpo-fármaco y una cualquiera de sus combinaciones que comprende la etapa de mezclar el polipéptido o proteína de unión al antígeno con un vehículo líquido que comprende un alcano semifluorado de fórmula RFRH, en donde RF es un segmento de hidrocarburo perfluorado lineal con 4 a 12 átomos de carbono, y en donde RH es un grupo alquilo lineal con 4 a 8 átomos de carbono tal como para formar una suspensión o una dispersión. Dicho método para estabilizar un polipéptido o proteína de unión al antígeno puede ser útil para la preparación de una composición para uso como medicamento, tal como en el tratamiento, prevención o diagnóstico de una enfermedad o afección en un paciente necesitado del mismo. Opcionalmente, dicho método de estabilización también puede usarse para la preparación, fabricación o síntesis de un polipéptido o proteína de unión al antígeno.

Como se emplea en la presente memoria, el término estabilidad se define como el mantenimiento de la integridad química o física y/o la bioactividad del polipéptido o proteína de unión al antígeno durante un período de tiempo. La estabilización de un polipéptido o proteína de unión al antígeno incluye la prevención o el retraso de la degradación o el deterioro del polipéptido o proteína de unión al antígeno a partir de su forma biológica y/o terapéuticamente activa a una forma inactiva. La inestabilidad puede surgir de eventos como la

agregación, la desnaturalización, la fragmentación, o modificaciones químicas como oxidación, reticulación, desamidación y reacciones con otros componentes que aparecen en la composición que comprende el polipéptido o proteína de unión al antígeno.

La estabilidad de la proteína o polipéptido de unión al antígeno en la composición puede caracterizarse usando métodos conocidos en la técnica, incluidos pero no limitados a, medición de actividad biológica como actividad de unión al antígeno con técnicas de inmunoanálisis tal como ELISA, u otras técnicas para determinar la pureza o cambios físicos/químicos a la proteína o polipéptido de unión al antígeno tales como cromatografía de exclusión por tamaño, electroforesis en gel capilar, dicroísmo circular o espectrometría de masas. La estabilidad se determina mediante la comparación de las mediciones obtenidas por estos tipos de métodos de caracterización en un punto de tiempo inicial, tal como en el momento de la formulación o preparación de la composición (es decir, como puede ser el caso, la suspensión o dispersión), y los obtenidos en un punto de tiempo posterior, es decir, después del almacenamiento en un entorno o condición dado.

Los inventores han descubierto que una proteína de unión al antígeno en un vehículo líquido que comprende un alcano semifluorado permanece estable a 25°C durante al menos 6 meses. De manera más sorprendente, la proteína de unión al antígeno fue comparativamente estable cuando se almacenaba a una temperatura de 40°C durante el mismo período de tiempo. Es decir, la composición que comprende la proteína de unión al antígeno conserva eficazmente la misma o similar actividad de unión al antígeno para su actividad inicial de unión al antígeno.

En una realización preferida, las composiciones de la invención conservan al menos 85% o al menos 90%, como 90-95%, o incluso más de 95% de su actividad inicial de unión al antígeno durante el almacenamiento de 3 meses a 25°C o a temperatura ambiente, o a una temperatura entre la temperatura ambiente y 40°C. En otra realización preferida, las composiciones de la invención conservan al menos 90%, como 90-95%, o incluso más de 95% de su actividad de unión al antígeno inicial, durante el almacenamiento de 6 meses a 25°C, o a temperatura ambiente (T.A.), o a una temperatura entre T.A. y 40°C. En aún otra realización, las composiciones de la invención conservan al menos 85% de su actividad de unión al antígeno inicial, durante el almacenamiento de 6 meses entre la T.A. y 40°C y una humedad relativa de entre 50-75%. En otras realizaciones, el período de tiempo de almacenamiento puede ser de 4-6 semanas, 6-12 semanas, o 3-6 meses o 6-12 meses. En realizaciones adicionales, la humedad (HR) durante el almacenamiento puede ser al menos 40% o al menos 50%, o al menos 65% o al menos 75%.

Como se ha mencionado, el polipéptido o proteína de unión al antígeno se incorpora en la composición tal como para formar una dispersión o suspensión. En otras palabras, el polipéptido o proteína de unión al antígeno se dispersa o pone en suspensión en el vehículo líquido que comprende un alcano semifluorado. Si se forma una suspensión después de dispersar la proteína de unión al antígeno en el portador líquido depende, p. ej. de la naturaleza de la proteína de unión al antígeno, de su concentración en el portador y de los SFA seleccionados.

Como se emplea en la presente memoria, una suspensión puede definirse 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 interior) 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, al menos a temperatura fisiológica, lo que significa que la fase continua es un líquido. Por lo general, las suspensiones también son líquidas a temperatura ambiente. Más allá de las suspensiones, el término dispersiones se entiende que incluye sistemas coloidales en los que una proteína y polipéptido de unión al antígeno se dispersan finamente en la fase líquida. En algunas realizaciones, el polipéptido o proteína de unión al antígeno está también, al menos parcialmente solvatado.

Una suspensión o dispersión estabilizada de un polipéptido o proteína de unión al antígeno se prepara por un método que comprende la etapa de mezclar el polipéptido o proteína de unión al antígeno con un vehículo líquido que comprende un alcano semifluorado. La estabilidad de la suspensión o dispersión resultante puede caracterizarse por la medición de diversos atributos físicos, incluidos pero sin limitarse a, por ejemplo, la redispersión de las partículas en suspensión, la distribución del tamaño de partícula y el crecimiento del tamaño de partícula a lo largo del tiempo, usando métodos como los conocidos en la técnica.

En una realización determinada, la composición comprende sólo el polipéptido o proteína de unión al antígeno y uno o más SFA, es decir, la composición consiste en el polipéptido o proteína de unión al antígeno y uno o más SFA como se ha definido anteriormente. En otra realización preferida, la composición que comprende un polipéptido o proteína de unión al antígeno y uno o más SFA está efectiva o sustancialmente exenta de agua, es decir, la composición no contiene agua, excepto quizás en cantidades residuales de agua introducidas mediante otros componentes sólidos o líquidos o el propio polipéptido o proteína de unión al antígeno. En otros casos, las composiciones en suspensión o dispersión que comprenden un polipéptido o proteína de unión al antígeno y un vehículo líquido que comprende un alcano semifluorado pueden estar exentas de agua.

En comparación con algunas otras suspensiones o dispersiones conocidas en la técnica anterior, las

formulaciones de la invención no requieren tensioactivo, o sólo pequeñas cantidades de tensioactivo, para su estabilización física. Esta es una ventaja significativa ya que los tensioactivos tienen un potencial considerable para la irritación y toxicidad local, especialmente cuando se administran mediante inyección subcutánea o intramuscular o mediante instilación en los ojos. Según una de las realizaciones preferidas, las composiciones de la invención están sustancialmente exentas de tensioactivos. En una realización adicional, la cantidad total de tensioactivo o tensioactivos, si se incorpora más de un tensioactivo, es inferior a aproximadamente 10% en peso, en particular inferior a aproximadamente 5% en peso, o preferiblemente inferior a aproximadamente 2% en peso, respectivamente. En otras realizaciones preferidas, la cantidad es inferior a aproximadamente 1% en peso, o inferior a aproximadamente 0,5% en peso, respectivamente. En este contexto, los SFA descritos en la presente memoria, a pesar de que poseen algunas propiedades anfífilas debido a su estructura química, que incluye grupos alquilo (o alquilenos) fluorados y no fluorados caracterizados por diferentes grados de lipofilia, no se entienden como que esté dentro del campo de los tensioactivos.

Los tensioactivos que está ausentes o presentes sólo en pequeñas cantidades incluyen tensioactivos no iónicos, catiónicos, aniónicos e iónicos dipolares como los normalmente usados como excipientes en diversos tipos de composiciones farmacéuticas, p. ej. como agentes humectantes, emulsionantes, agentes dispersantes, disolventes y similares. Los ejemplos de tensioactivos que se consideran potencialmente útiles incluyen tiloxapol, poloxámeros, tales como Pluronic F68LF o Lutrol F68, Pluronic L-G2LF y Pluronic L62D, polisorbatos tales como polisorbato 20 y polisorbato 80, derivados de aceite de ricino polioxi-etilenado, ésteres de sorbitán, polioxilestearatos, 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 con el fin de modificar las propiedades del vehículo líquido, como la viscosidad. Dicho otro líquido puede ser un aceite seleccionado de aceites de glicéridos, ceras líquidas y parafina líquida, o un disolvente orgánico que presenta un alto grado de biocompatibilidad, o una mezcla de más de uno de los excipientes líquidos.

Los ejemplos de excipientes oleosos potencialmente útiles que pueden usarse en combinación con uno o más SFA incluyen aceites de triglicéridos (es decir, aceite de soja, aceite de oliva, aceite de ajonjolí, aceite de semilla de algodón, aceite de ricino, aceite de almendra dulce), aceite mineral (es decir, vaselina y parafina líquida), triglicéridos de cadena media (MCT), ácidos grasos oleosos, miristato de isopropilo, alcoholes grasos oleosos, ésteres de sorbitol y ácidos grasos, ésteres oleosos de sacarosa, o cualquier otra sustancia oleosa que sea fisiológicamente tolerada por los ojos.

Ejemplos de disolventes orgánicos potencialmente útiles incluyen glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y etanol. La concentración del cosolvente debería ser preferiblemente baja con relación a la del SFA o la mezcla de SFA. Si se usa un disolvente orgánico como etanol, es recomendable mantenerlo 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 más preferiblemente no más de aproximadamente 1% en peso.

La composición puede comprender por supuesto otros excipientes farmacéuticos como se requiera o sea útil. Los excipientes potencialmente útiles incluyen ácidos, bases, antioxidantes, estabilizadores, sinergistas, agentes colorantes, agentes espesantes, y - si se requiere en un caso concreto - un conservante. Generalmente, sin embargo, la invención proporciona un medio para formular composiciones no acuosas que son microbiológicamente estables. Esto es debido al hecho de que los SFA no son normalmente propensos a la contaminación microbiana. Por lo tanto, es posible formular composiciones sin conservantes para rellenar en envases multifuncionales. Las composiciones sin conservantes son mejor toleradas por muchos pacientes y permiten reducir los costos de los artículos finales.

Las suspensiones líquidas de la invención pueden prepararse por métodos convencionales. En principio, las partículas sólidas que comprenden el principio activo pueden dispersarse en el vehículo líquido que comprende el SFA. Alternativamente, las partículas pueden precipitarse *in situ* añadiendo una solución - normalmente orgánica - del principio activo (y, opcionalmente, uno o más excipientes sólidos) en condiciones controladas al vehículo con SFA.

Las partículas sólidas pueden prepararse por liofilización o secado por atomización de una solución de las proteínas o partículas de unión al antígeno. La solución puede ser acuosa o no acuosa y puede comprender además excipientes farmacéuticos en la medida en que pueda ser útil o se requiera.

El tamaño de partícula de la fase dispersada también puede ajustarse antes o después de que las partículas se combinen con el vehículo líquido. En una de las realizaciones preferidas, las partículas del principio activo que se proporcionan tienen ya el tamaño de partícula seleccionado apropiadamente. Los polvos que tienen dicho tamaño de partícula seleccionado pueden obtenerse directamente de la síntesis del compuesto respectivo por ingeniería cristalina, o después de la síntesis por métodos de trituración o molienda convencionales usando un equipo convencional como un molino de bolas, molino de martillos, molino de rodillos, molino coloidal, molino de chorro o similar. Si el tamaño de partícula ha de reducirse después de la

preparación de una suspensión, pueden usarse exposición a ultrasonidos, así como diversos tipos de homogeneizadores, como molinos coloidales u homogenizadores a alta presión.

Las propiedades físicas superiores de las suspensiones según la invención hacen a estas composiciones particularmente útiles para la administración tópica a los ojos de un paciente, al oído, la nariz o el pulmón, o por vía parenteralmente por inyección. Por ejemplo, las composiciones de la invención pueden administrarse a los ojos de un paciente mediante aplicación tópica o inyección. Los modos preferidos de inyección incluyen inyección dérmica, subcutánea, intramuscular, y locorregional. Las más preferidas son las vías de administración subcutánea e intramuscular.

Ejemplos

Ejemplo 1

La estabilidad de un anticuerpo monoclonal anti-ECSCR (regulador de la quimiotaxia específico para células endoteliales) (clon id 13G11 1A31 A7, un anticuerpo murino IgG/k expresado en células de hibridoma que se une al marcador endotelial ECSCR) en F6H8 a 25°C y a 40°C se estudió durante un período de 6 meses.

Muestras liofilizadas de 0,25 mg del anticuerpo monoclonal anti-ECSCR (almacenado originalmente a -80°C en amortiguador PBS) se reconstituyeron a una concentración de 1 mg/ml en F6H8. Se almacenaron las muestras reconstituidas en viales de vidrio traslúcidos a 25°C/60% de H.R. y a 40°C/75% de H.R. Las actividades de unión de estas muestras se determinaron después de 3 meses y 6 meses de almacenamiento.

Para servir como primera referencia, otras muestras de anticuerpos liofilizados se almacenaron en forma liofilizada a -80°C. Estas se reconstituyeron en PBS simplemente antes del análisis. Una segunda referencia consistió en muestras del anticuerpo en PBS que nunca se liofilizaron, pero se mantuvieron bajo refrigeración a 4°C.

Las actividades de unión de las muestras de anticuerpos a antígeno ECSCR se determinaron por ELISA usando el siguiente protocolo:

Se preparó una placa para ELISA de fondo plano Nunc MaxiSorp™ recubriendo con antígeno ECSCR y un antígeno negativo no citado. Se diluyeron los antígenos en un amortiguador de recubrimiento a una concentración de 1 mg/ml y se incubaron con las placas durante la noche a 4°C. Se bloquearon las placas a continuación con 200 µl de solución de bloqueo al 3% y se incubaron a T.A. en un agitador durante 1-2 horas, seguido de tres lavados con solución de PBS-Tween 20 y se transfirieron en seco. Se diluyeron las muestras de anticuerpos a 1 µg/ml en PBS. Se agregaron 100 ng o 10 ng de cada muestra diluida a un pocillo cubierto con el antígeno ECSCR y un pocillo cubierto con el antígeno de referencia negativa. Se incubó la placa a T.A. durante 1 h en un agitador, a continuación se lavó con PBS-Tween 20 y se transfirió en seco. Se sondaron las alícuotas de anticuerpos con conjugado de anticuerpo secundario anti-ratón IgG-HRP de cabra (Biorad, nº 170-6516 en catálogo) a una dilución de 1:5.000 en PBS. Se incubaron las placas durante 1 h a T.A. en un agitador, seguido de tres lavados con solución de PBS-Tween 20 y se transfirieron en seco. Se incubó la placa a 37°C durante 10 min con 100 µl de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina), seguido de adición de 50 µl/pocillo de HCl 1 M. Se midió la absorbancia a 450 nm con un espectrofotómetro.

La comparación con las actividades de unión determinadas en el punto de tiempo inicial de la reconstitución y las muestras de referencia demuestran que la actividad de unión (determinada a partir del promedio de tres muestras) del anticuerpo en F6H8 almacenado a 25°C o incluso a la temperatura más alta de 40°C se mantiene después de almacenamiento durante un período de 6 meses (figura 1). La actividad de unión es comparable a la observada para las muestras de anticuerpos monoclonales anti-ECSCR liofilizadas almacenadas a -80°C (referencia 1, figura 1) y para una muestra nunca liofilizada almacenada a 4°C en PBS (referencia 2, figura 1).

Ejemplo 2

Se estudió la estabilidad de bevacizumab, Fsn1006 y Fsn0503 a 25°C, 50°C y 70°C durante un período de 4 semanas.

Protocolo de liofilización: Se obtuvieron las soluciones madre de cada uno de los anticuerpos enumerados anteriormente; Fsn1006 y Fsn0503 como soluciones en PBS, bevacizumab (nombre comercial Avastin®) en su amortiguador de almacenamiento comercial. Se transfirió un equivalente de 80 mg de bevacizumab a más de 7000 tubos de diálisis MWCO y se dializó durante 72 horas frente a 3 x volúmenes de 2 l de PBS. Se diluyeron las soluciones de anticuerpos a 0,5 mg/ml en PBS y 500 µl de cada solución se dividieron en alícuotas en viales de vidrio de calidad farmacéutica de color ámbar de 5 ml individuales para liofilización. La liofilización se realizó en un ciclo de 48 horas.

Resuspensión de los anticuerpos liofilizados: Se volvieron a poner en suspensión los anticuerpos liofilizados en F4H5, F6H8, 50% vol F4H5 en F6H8, PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na2HPO4 10 mM, KH2PO4 1,8 mM, pH

= 7,4) a una concentración de 0,5 mg/ml con agitación cuidadosa en remolino. La resuspensión de los anticuerpos liofilizados en PBS forma soluciones, mientras que se formaron suspensiones con los alcanos semifluorados. Las suspensiones y soluciones resultantes se almacenaron en viales de vidrio de color ámbar a 25°C y 50°C durante 4 semanas (28 días) después del día 23, las muestras a 50°C se sometieron a condiciones a 70°C.

Se determinaron las actividades de unión de las muestras de anticuerpo mediante la prueba de ELISA a $t = 0$ (inmediatamente después de la resuspensión), $t = 2$ semanas y $t = 4$ semanas. Como referencia, se usaron muestras de anticuerpos liofilizados que nunca se volvieron a poner en suspensión (almacenadas a -80°C) y soluciones de los anticuerpos en PBS que nunca se liofilizaron (almacenadas a 4°C).

Protocolo de ELISA: Para el ensayo de ELISA de cada anticuerpo, una placa de 90 pocillos Nunc Maxisorp se cubrió con el antígeno objetivo añadiendo 100 ng/pocillo del antígeno apropiado en 100 μ l de amortiguador carbonato 0,2 M, pH 9,5 y se incubó durante 1 hora a 37°C. Después de lavar con PBS que contiene 0,1% de Tween 20 (PBS-T), la placa se bloqueó añadiendo 200 μ l en polvo al 4% de leche en PBS y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas en agitación. Después de lavado adicional, se aplicaron las muestras de anticuerpo. Se agregó 1 ml de x0,5 PBS a cada vial no acuoso. Se extrajo el anticuerpo en la solución mediante lento balanceo durante 5 minutos. Se transfirió a continuación 1 μ l de la capa acuosa a un vial que contenía 999 μ l de PBS (para dar un valor nominal de 50 ng/pocillo). 100 μ l de cada vial de muestra se sembraron en placas en 6 repeticiones de 100 μ l. Se incubaron las placas durante la noche a 4°C. Después del lavado, el anticuerpo secundario se aplicó (conjugado de HRP anti-humano de cabra) a una dilución 1:60.000 en PBS; se agregaron 100 μ l a cada pocillo y se incubó la placa durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. A continuación, las placas se lavaron con 3 volúmenes de PBS-T, seguido de 2 volúmenes de PBS. 100 μ l de solución de TMB se aplicaron a continuación y se incubó la placa durante 10 minutos a 37°C. La reacción se detuvo mediante la adición de 50 μ l de HCl 1 M. Se leyó la absorbancia a $\lambda = 450$ nm para cada pocillo.

Tabla 1 Actividad de Bevacizumab (D.O. media $\pm$ 2 D.T. a 450 nm)

25°C				
Semana	F ₄ H ₅	F ₆ H ₈	50% vol. F ₄ H ₅ en F ₆ H ₈	PBS
0	3,15 $\pm$ 0,19	3,26 $\pm$ 0,11	3,12 $\pm$ 0,12	3,04 $\pm$ 0,03
2	3,23 $\pm$ 0,05	2,34 $\pm$ 0,09	3,05 $\pm$ 0,10	2,12 $\pm$ 0,07
4	2,16 $\pm$ 0,36	2,23 $\pm$ 0,46	2,03 $\pm$ 0,56	0,30 $\pm$ 0,54

50°C (70°C últimos 5 días)				
Semana	F ₄ H ₅	F ₆ H ₈	50% vol. F ₄ H ₅ en F ₆ H ₈	PBS
0	3,16 $\pm$ 0,01	3,26 $\pm$ 0,11	3,14 $\pm$ 0,05	3,00 $\pm$ 0,05
2	3,27 $\pm$ 0,09	3,19 $\pm$ 0,10	3,06 $\pm$ 0,19	3,16 $\pm$ 0,08
4	1,63 $\pm$ 0,62	1,69 $\pm$ 0,34	1,64 $\pm$ 0,54	0,05 $\pm$ 0,003

Tabla 2 Actividad de Fsn1006 (D.O. media $\pm$ 2 D.T. a 450 nm)

25°C				
Semana	F ₄ H ₅	F ₆ H ₈	50% vol. F ₄ H ₅ en F ₆ H ₈	PBS
0	2,57 $\pm$ 0,20	2,47 $\pm$ 0,94	2,12 $\pm$ 0,21	2,63 $\pm$ 0,21
2	3,27 $\pm$ 0,13	3,32 $\pm$ 0,15	3,26 $\pm$ 0,10	2,99 $\pm$ 0,10
4	2,54 $\pm$ 0,30	2,43 $\pm$ 0,45	2,45 $\pm$ 0,38	0,62 $\pm$ 1,26

50°C (70 °C últimos 5 días)				
Semana	F ₄ H ₅	F ₆ H ₈	50% vol. F ₄ H ₅ en F ₆ H ₈	PBS
0	2,56 ± 0,27	2,47 ± 0,94	2,26 ± 0,20	2,56 ± 0,24
2	3,32 ± 0,04	3,28 ± 0,04	2,81 ± 0,04	2,79 ± 0,13
4	2,01 ± 0,40	1,97 ± 0,24	1,80 ± 0,91	0,05 ± 0,01

Tabla 3 Actividad de Fsn0503 (D.O. media ± 2D.T. en 450 nm)

25°C				
Semana	F ₄ H ₅	F ₆ H ₈	50% vol. F ₄ H ₅ en F ₆ H ₈	PBS
0	3,07 ± 0,10	3,06 ± 0,08	2,98 ± 0,22	3,11 ± 0,16
2	3,22 ± 0,23	3,22 ± 0,09	3,20 ± 0,08	2,01 ± 1,23
4	2,70 ± 0,19	2,43 ± 0,19	2,87 ± 0,24	0,72 ± 1,98

50°C (70°C últimos 5 días)				
Semana	F ₄ H ₅	F ₆ H ₈	50% vol. F ₄ H ₅ en F ₆ H ₈	PBS
0	3,09 ± 0,08	3,06 ± 0,08	3,07 ± 0,08	3,11 ± 0,07
2	3,26 ± 0,10	3,22 ± 0,12	3,18 ± 0,14	3,10 ± 0,21
4	2,64 ± 0,22	2,19 ± 0,18	2,73 ± 0,19	0,65 ± 1,91

- 5 La actividad de bevacizumab, Fsn1006 y Fsn0503 almacenados como suspensiones en F₄H₅, F₆H₈ y 50% en volumen de F₄H₅ en F₆H₈ fue sustancialmente constante durante un período de 4 semanas a 25°C y a 50°C, incluido el aumento a una temperatura de almacenamiento de 70°C para la muestra de 50°C durante los últimos cinco días del período. Por el contrario la actividad de unión demostrada por las soluciones de estos anticuerpos en amortiguador PBS se deterioró de manera significativa al final del período de cuatro semanas independientemente de la temperatura de almacenamiento.

Ejemplo 3

Se examinó la actividad de unión de bevacizumab, Fsn1006, y Fsn0503 almacenados en SFA y amortiguador de PBS a temperaturas entre 50°C y 80°C.

- 15 Los anticuerpos liofilizados bevacizumab, Fsn1006, y Fsn0503 (preparados anteriormente en el Ejemplo 2) se volvieron a poner en suspensión en F₄H₅, F₆H₈ y PBS a una concentración de 0,5 mg/ml con agitación en remolino cuidadosa. La resuspensión de estos anticuerpos liofilizados en PBS produce soluciones, mientras se formaron suspensiones con los SFA.

- 20 Las muestras de suspensión/disolución se mantuvieron a temperaturas de 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C y 80°C respectivamente durante un periodo de 2 h y después se enfrió a 10°C antes de la extracción del amortiguador PBS y el ensayo de actividad usando el método de ELISA como se describe anteriormente en el ejemplo 2. Cada experimento se realizó por triplicado. Las muestras calentadas a 40°C se usaron como referencia.

- 25 Se descubrió que las suspensiones de bevacizumab (Fig. 2), Fsn1006 (Fig. 3) y Fsn0503 (Fig. 4) en F₄H₅ y F₆H₈ demostraron estabilidad significativa hacia la desnaturalización térmica en comparación con las muestras en amortiguador acuoso. La actividad de unión se mantuvo bastante constante entre 50°C y 80°C para los anticuerpos formulados en estos alcanos semifluorados. Por el contrario, la actividad de estos anticuerpos almacenados en amortiguador PBS acuoso se deterioró bruscamente a temperaturas superiores a 60°C.

Ejemplo 4

La estabilidad de una composición que comprende un polipéptido o proteína de unión al antígeno seleccionada de entre infliximab (un anticuerpo monoclonal híbrido con regiones constantes humanas y variables murinas, y una masa molecular de 149 kDa), la proteína de fusión etanercept (una proteína humana recombinante con una masa molecular de 150 kDa que comprende la porción de unión a ligando del TNFR de 75 kDa (receptor del factor de necrosis tumoral) fusionada a la porción Fc de IgG1), y certolizumab (un fragmento de anticuerpo con una masa molecular de 91 kDa, que comprende un conjugado biotecnológico de Fab' a un polietilenglicol de aproximadamente 40 kDa) o uno de sus biosimilares y un vehículo líquido que comprende un alcano semifluorado de fórmula RFRH en donde RF es un segmento de hidrocarburo perfluorado lineal con 4 a 12 átomos de carbono, y en donde RH es un grupo alquilo lineal con 4 a 8 átomos de carbono (por ejemplo F₄H₅ y F₆H₈) se estudia y se comparan con las formulaciones en diferentes medios.

El anticuerpo se liofiliza y se vuelve a poner en suspensión en un alcano semifluorado. Se preparan también suspensiones/soluciones comparativas en otros medios. Las siguientes pruebas de estabilidad se realizaron en estas formulaciones:

- Estabilidad de almacenamiento en condiciones de ICH (25 y 40°C).
- Estabilidad de temperatura fuera de las condiciones de ICH, es decir, desnaturalización térmica.

Éstas se realizaron de forma análoga a los métodos descritos en los ejemplos 1-3. Se realizaron métodos analíticos adecuados para ensayar la estabilidad de estos polipéptidos de unión al antígeno. Los ensayos para controlar la actividad y la potencia del anticuerpo, así como para controlar niveles de agregación en el transcurso de los experimentos de estabilidad mencionados anteriormente incluyen técnicas como ELISA en similitud con el protocolo descrito anteriormente en los ejemplos 1-3.

Se llevaron a cabo los métodos de análisis con muestras obtenidas directamente de las suspensiones de anticuerpos o dependiendo de la técnica analítica, en muestras que son extracciones en amortiguador acuoso.

Cabe esperar que las composiciones que comprenden el polipéptido o proteínas de unión al antígeno presenten un aumento de estabilidad y una menor propensión a la formación de agregados.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un polipéptido o proteína de unión al antígeno seleccionado de entre un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un fragmento de anticuerpo, una proteína de fusión que comprende un fragmento de anticuerpo, un conjugado anticuerpo-fármaco y una cualquiera de sus combinaciones y un vehículo líquido que consiste en un alcano semifluorado de fórmula

RFRH

en donde RF es un segmento de hidrocarburo lineal perfluorado con 4 a 12 átomos de carbono, y en donde RH es un grupo alquilo lineal con 4 a 8 átomos de carbono; en donde el polipéptido o proteína de unión al antígeno se incorpora en la composición como para formar una dispersión o suspensión y en donde la composición opcionalmente comprende un líquido orgánico no fluorado, en donde la composición conserva al menos 85% de su actividad de unión al antígeno inicial durante el almacenaje de 6 meses a una temperatura entre la T.A. y 40°C.

2. La composición de la reivindicación 1, en donde el fragmento de anticuerpo es un fragmento de unión al antígeno (Fab), un fragmento variable monocatenario (scFv), un anticuerpo de un monodominio, un minicuerpo, o un diacuerpo.

3. La composición de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo híbrido, humanizado o humano.

4. La composición de cualquier reivindicación anterior, en donde el polipéptido o proteína de unión al antígeno tiene una masa molecular de al menos 90 kDa.

5. La composición de cualquier reivindicación anterior, en donde el alcano semifluorado se selecciona de entre F₄H₅, F₄H₆, F₄H₈, F₆H₄, F₆H₆, F₆H₈ y F₆H₁₀.

6. La composición de cualquier reivindicación anterior, que esta efectivamente exenta de agua.

7. La composición de cualquier reivindicación anterior, en donde el polipéptido o proteína de unión al antígeno está en una concentración de al menos 0,5 mg/ml.

8. Una composición de cualquier reivindicación anterior para su uso como medicamento.

9. Una composición de la reivindicación 8 para su uso como medicamento, en donde el medicamento es para la administración parenteral por inyección subcutánea, dérmica, intramuscular o locorregional.

10. Un procedimiento para estabilizar un polipéptido o proteína de unión al antígeno, en donde el polipéptido o proteína de unión al antígeno es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un fragmento de anticuerpo, una proteína de fusión que comprende un fragmento de anticuerpo, un conjugado anticuerpo-fármaco y una cualquiera de sus combinaciones, que comprende la etapa de mezclar el polipéptido o proteína de unión al antígeno con un vehículo líquido que comprende un alcano semifluorado de fórmula

RFRH

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

11. El procedimiento de la reivindicación 10, en donde el polipéptido o proteína de unión al antígeno conserva al menos 85% de la actividad de unión al antígeno inicial durante 6 meses de almacenamiento a una temperatura entre T.A. y 40°C.

12. El procedimiento de la reivindicación 10, que comprende una etapa de preparación del polipéptido o proteína de unión al antígeno por liofilización o secado por atomización.

13. La composición de la reivindicación 8 para uso como medicamento, en donde el medicamento es para el tratamiento del cáncer y en donde el polipéptido o proteína de unión al antígeno es un anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo seleccionado de entre alemtuzumab, bevacizumab, cetuximab, gemtuzumab, ipilimumab, ibritumomab, nimotuzumab, ofatumumab, panitumumab, rituximab, tositumomab y trastuzumab

14. La composición de la reivindicación 8 para uso como medicamento, en donde el medicamento es para el tratamiento de afecciones autoinmunitarias o inflamatorias y el polipéptido o proteína de unión al antígeno es un anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo seleccionado de entre adalimumab, alemtuzumab, belimumab, briakinumab, canakinumab, eculizumab, epratuzumab, efalizumab, golimumab,

infliximab, mepolizumab, natalizumab, ofatumumab, ocrelizumab, orelizumab, omalizumab, reslizumab, rituximab, teplizumab, tocilizumab, ustekinumab, y vedolizumab.

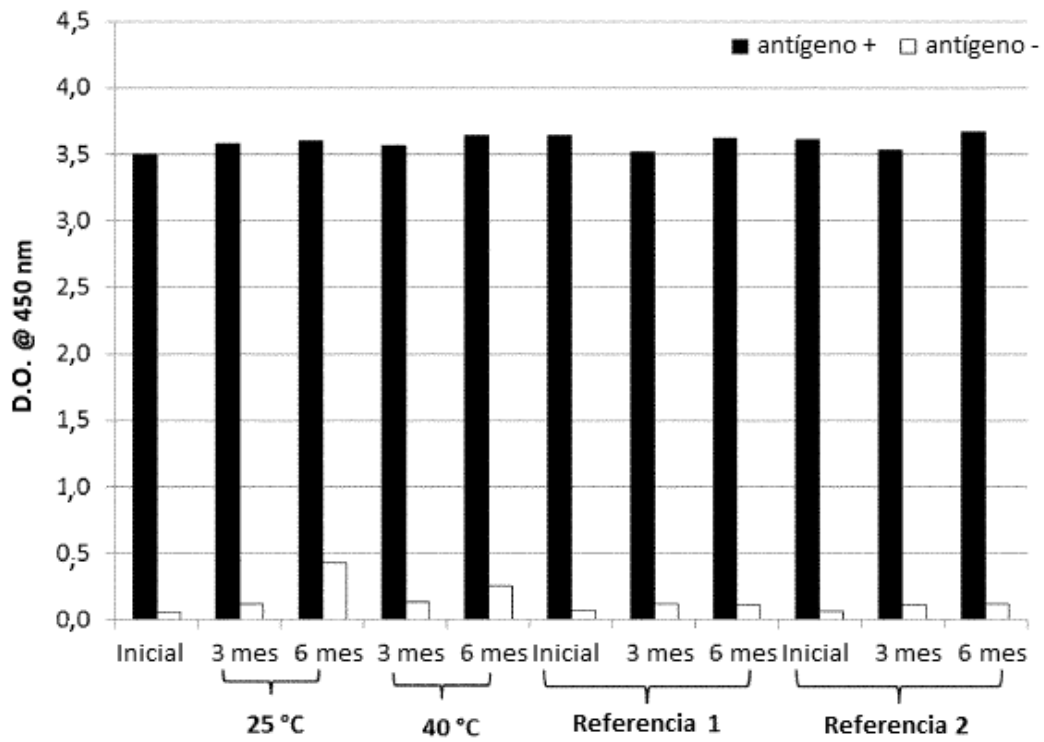


Fig. 1

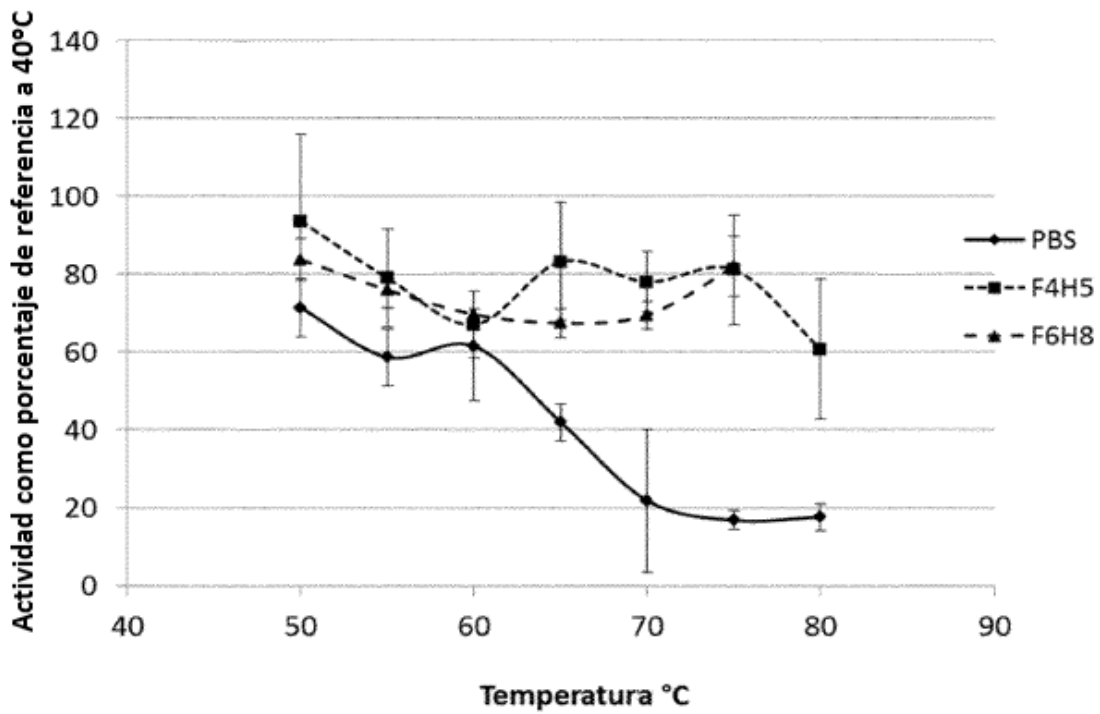


Fig. 2

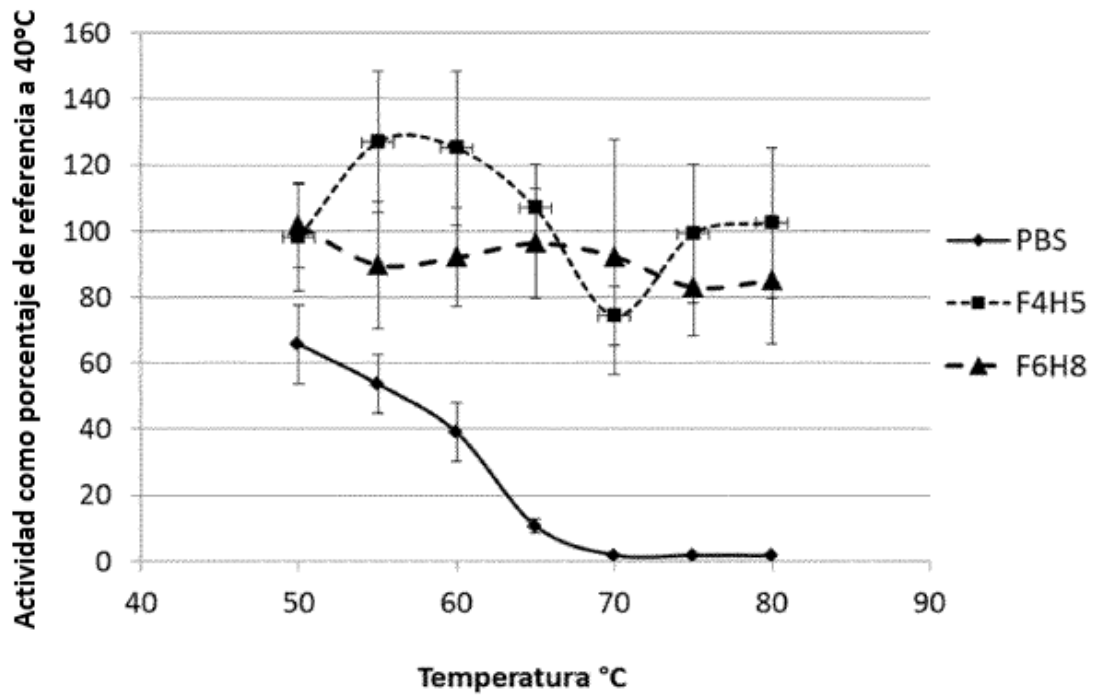


Fig. 3

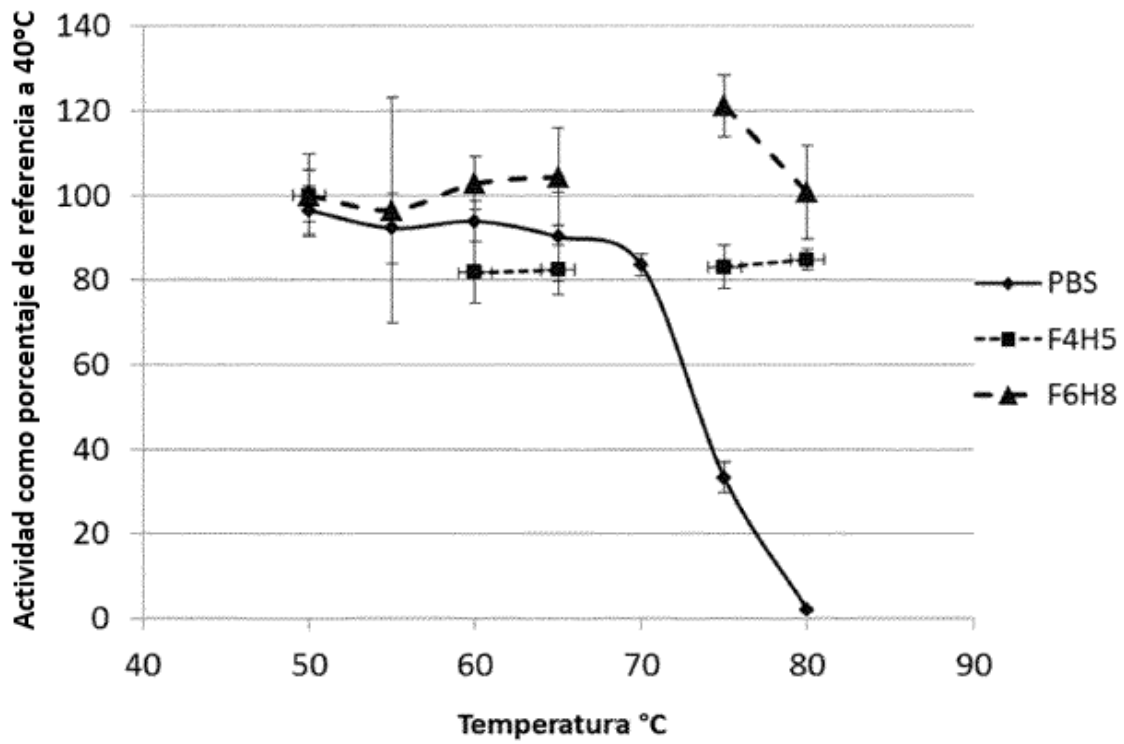


Fig. 4