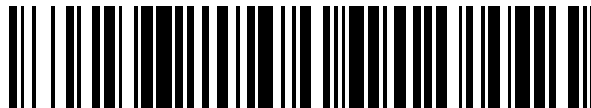


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 688 591**

51 Int. Cl.:

A61K 9/16 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.03.2012 PCT/EP2012/055497**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.10.2012 WO12130872**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2012 E 12710751 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.07.2018 EP 2691415**

54 Título: **Método para producir formulaciones sólidas que comprenden dominios variables individuales de inmunoglobulina**

30 Prioridad:

28.03.2011 US 201161468341 P

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

05.11.2018

73 Titular/es:

**ABLYNX N.V. (100.0%)
Technologiepark 21
9052 Ghent-Zwijnaarde, BE**

72 Inventor/es:

**DEBUNNE, ANN y
DE BRABANDERE, VERONIQUE**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 688 591 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

Método para producir formulaciones sólidas que comprenden dominios variables individuales de inmunoglobulina

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos para preparar formulaciones sólidas de dominios variables individuales de inmunoglobulina. Los métodos se basan en poner en contacto portador(es) sólido(s) con un líquido que comprende los dominios variables individuales de inmunoglobulina, por ejemplo mediante pulverización del líquido sobre el/los portador(es) sólido(s), para provocar la granulación o el recubrimiento del/de los portador(es). Durante la puesta en contacto se agita el portador, por ejemplo en un lecho fluido, y se expone la mezcla de portador y líquido a calor, por ejemplo una corriente de aire calentada, para evaporar el líquido. De ese modo se forma la formulación sólida.

15 **Técnica anterior**

En la industria farmacéutica se usan ampliamente formulaciones sólidas tales como polvos, gránulos o comprimidos. Normalmente comprenden al menos un principio activo, y pueden comprender además portadores y otros excipientes. También se usan formulaciones sólidas en otras aplicaciones comerciales, por ejemplo en el campo del diagnóstico, tal como en la fabricación de kits de diagnóstico. Pueden usarse gránulos, por ejemplo, en cápsulas, sobres o procesarse adicionalmente (por ejemplo, prensarse) para dar comprimidos. Las ventajas ofrecidas por formulaciones sólidas incluyen menos espacio de almacenamiento, facilidad de manipulación y estabilidad mejorada. Además, los comprimidos o las cápsulas proporcionan la unidad de dosificación más ampliamente usada para aplicar fármacos a un paciente de una manera no invasiva. Existe una práctica establecida desde hace mucho tiempo de preparación de formulaciones sólidas para principios activos de molécula pequeña.

Mientras tanto, las inmunoglobulinas están encontrando un uso cada vez mayor como principios activos en aplicaciones terapéuticas o de diagnóstico. Estas aplicaciones se basan en la actividad de unión a antígeno de las inmunoglobulinas.

En comparación con fármacos de molécula pequeña, las inmunoglobulinas son moléculas muy grandes y complejas. Portan múltiples grupos funcionales y forman complejas estructuras tridimensionales. El plegamiento correcto para dar una estructura terciaria, y, posiblemente, el ensamblaje de múltiples dominios o subunidades de tales estructuras tridimensionales para dar una estructura cuaternaria son esenciales para la unión a antígeno. Por ejemplo, la unión de un dominio variable de inmunoglobulina a su antígeno depende de la correcta formación del sitio de unión a antígeno, y por tanto, del correcto plegamiento global de la molécula.

La complejidad en cuanto a la composición química y la estructura impone rigurosos límites sobre los métodos para preparar formulaciones sólidas que comprenden inmunoglobulinas biológicamente activas. El principal problema asociado con métodos para la formulación sólida de inmunoglobulinas es la inestabilidad de proteínas, en particular la inestabilidad química y la inestabilidad física.

La inestabilidad química está provocada por cambios en la composición de proteínas mediante formación o escisión de enlaces. Los ejemplos de inestabilidad química de proteínas incluyen desamidación, racemización, hidrólisis, isomerización, deshidratación, oxidación, eliminación beta, glicación e intercambio/reorganización de enlaces disulfuro.

La inestabilidad física afecta a la estructura de la proteína. Cambios en la temperatura, tensión de cizalladura, efectos provocados por superficies de contacto entre fases (por ejemplo, líquido/gas) y pérdida de efectos de hidratación pueden dar cada uno como resultado inestabilidad física de inmunoglobulinas, tal como cambios para dar estructura de orden superior (es decir, agregación), desnaturalización o desplegamiento, adsorción y precipitación. La función biológica de macromoléculas tales como inmunoglobulinas se basa en su conformación nativa, que se mantiene mediante enlaces de hidrógeno sensibles a la temperatura o interacciones no covalentes entre grupos funcionales de la macromolécula. Cuando se expone una inmunoglobulina a una temperatura aumentada por encima de un nivel crítico conocido como temperatura de fusión (Tf) o temperatura de desnaturalización (Td), experimenta una abrupta transición estructural y se desnaturaliza. Normalmente esta transición estructural inducida por temperatura es irreversible. Por ejemplo, se sabe que los dominios de inmunoglobulina son vulnerables al desplegamiento inducido por calor. Esto a su vez conduce a la exposición de parches hidrófobos que interaccionan para formar agregados irreversibles.

No es necesario mencionar que la inestabilidad química y física interaccionan poniendo en peligro la actividad biológica. La pérdida resultante de actividad es incompatible con una aplicación farmacéutica o de diagnóstico de tales formulaciones de inmunoglobulina sólidas.

Todos los efectos anteriores sobre la estabilidad física o química se ven favorecidos por la exposición a calor en un estado líquido. Además, se ven favorecidos por una alta área de superficie de contacto entre la fase de líquido y de

gas.

Se sabe ampliamente que las proteínas pueden resistir temperaturas superiores en un estado seco que en un estado líquido.

Por tanto, resulta de particular preocupación para la estabilidad de inmunoglobulinas la combinación de calor y un estado líquido, en particular en condiciones de tensión de cizalladura adicional y la presencia de grandes superficies de contacto entre fases. Las inmunoglobulinas que se calientan en un estado líquido experimentarán modificaciones químicas, además de perder su estructura apropiada mediante agregación y desnaturalización.

Por consiguiente, se han desplegado estrategias para evitar la desnaturalización inducida por temperatura. Estas estrategias incluyen a) acortar el tiempo de exposición a alta temperatura durante el secado (por ejemplo, secado por pulverización basado en evaporación ultrarrápida); b) reducir la humedad: el contenido en agua tiene un gran impacto sobre la desnaturalización térmica de proteínas que están formulándose o almacenándose en una forma en polvo. El aumento del contenido en agua da como resultado una disminución de T_d y la entalpia de desnaturalización y una movilidad de proteínas aumentada.

Los problemas encontrados con productos terapéuticos de proteínas macromoleculares tales como inmunoglobulinas no son tan pronunciados en péptidos muy pequeños. En particular, los péptidos muy pequeños difieren en cuanto a su inestabilidad desde un punto de vista químico, biológico y físico. Los cambios de conformación irreversibles, incluyendo agregación, están normalmente ausentes en péptidos muy pequeños. Dicho de otro modo, aunque un péptido experimente cambios de conformación en el transcurso de un procedimiento de formulación, puede recuperar una conformación funcional en condiciones apropiadas y por tanto recuperar su actividad. Por ejemplo, se conocen formulaciones sólidas de insulina (por ejemplo, Hosny *et al.*, 2002; J. Pharm. 237(1-2): 71-6). Esto contrasta de manera marcada con los cambios irreversibles de productos terapéuticos de proteínas macromoleculares que pierden irreversiblemente su actividad, y es un motivo por el que se ha dirigido mucho esfuerzo a comercializar péptidos muy pequeños y moléculas pequeñas en lugar de proteínas en formas de dosificación sólidas particuladas.

Por tanto, los métodos conocidos para preparar formulaciones de inmunoglobulina sólidas evitan la exposición a temperaturas elevadas en un estado líquido y con tensión de cizalladura. El documento EP 2 036 574 describe formulaciones de anticuerpos producidas mediante granulación en lecho fluido en las que la temperatura usada a lo largo de todo el procedimiento no supera 35 °C.

Los métodos habitualmente usados para la formulación sólida de inmunoglobulinas incluyen secado por congelación (liofilización). El secado por congelación funciona a temperaturas muy bajas y por tanto evita la inestabilidad de inmunoglobulina provocada por la exposición a calor en un estado líquido. Sin embargo, normalmente las formulaciones sólidas que pueden obtenerse mediante secado por congelación no son directamente adecuadas para la fabricación, por ejemplo, de comprimidos, cápsulas o implantes. Se necesita un procesamiento adicional complicado y caro si deben producirse tales formas de dosificación sólidas. Por tanto, la técnica intentó modificar y mejorar procedimientos de secado por congelación (Leuenberger *et al.* 2006; *Drying Technology* 24: 711-719).

Otro método conocido para la producción suave de formulaciones en estado sólido que comprenden proteínas es el secado por pulverización, o combinaciones de secado por congelación y secado por pulverización (por ejemplo, Lee 2000; *Pharm. Biotechnol.* 13: 135-58; Sollohub y Cal 2010; *J. Pharm. Sci.* 99(2): 587-97; Vehring 2008; *Pharm. Res.* 25(5): 99-1022). El documento US 2010/0003253 A1 describe formulaciones en polvo seco de un VHH producidas mediante secado por pulverización (ejemplo 23).

El secado por pulverización se basa en el principio de que se pulveriza un líquido que comprende el agente activo en una corriente caliente de gas, por ejemplo aire, y se vaporiza. Se ajusta el tamaño de gota (por ejemplo, 20 μm) para maximizar el área de superficie para la transferencia de calor y la tasa de evaporación de agua. Se forman sólidos a medida que la humedad sale rápidamente de las gotas. Durante este procedimiento la evaporación tiene un efecto refrigerante sobre las gotas. Debido a la razón ventajosa de volumen con respecto a área de superficie de las gotas, los secadores por pulverización pueden secar un producto muy rápidamente en comparación con otros métodos de secado. Por tanto, la exposición a calor en un estado líquido se reduce al mínimo, y la conversión a un estado sólido es casi inmediata (por ejemplo, en el intervalo de unos pocos segundos). Además, la evaporación de las gotas no está asociada con tensión de cizalladura para el agente activo.

Sin embargo, sigue existiendo una necesidad de métodos adicionales para preparar formulaciones sólidas que comprendan dominios variables individuales de inmunoglobulina.

La presente invención se basa en el hallazgo inesperado de que una formulación sólida que comprende, como agente activo, dominios variables individuales de inmunoglobulina, en particular dominios VHH (camélidos), dominios VH camelizados o dominios VHH humanizados, puede producirse mediante un método que combina exposición a calor en un estado líquido y tensión de cizalladura, sin pérdida significativa de actividad biológica.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un método de producción de una formulación sólida de un dominio variable individual de inmunoglobulina, que es un procedimiento de granulación en húmedo o un procedimiento de recubrimiento en el que se agita un material portador sólido y se pone en contacto con un líquido que comprende un dominio variable individual de inmunoglobulina como agente activo y simultáneamente se aplica calor para evaporar el líquido, en el que el método se realiza a una temperatura del material portador sólido puesto en contacto con el líquido que comprende un dominio variable individual de inmunoglobulina de entre 40 °C y 80 °C. En una realización particular de la invención, el método puede ser un procedimiento de granulación en húmedo, tal como un procedimiento de granulación en lecho fluido.

La invención en una realización particular se refiere a uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina seleccionados de un dominio variable individual de inmunoglobulina VHH, un dominio variable individual de inmunoglobulina VHH humanizado o un dominio variable individual de inmunoglobulina VH camelizado o cualquier fragmento adecuado de los mismos.

Según la invención, el material portador sólido puede ser uno o más seleccionados de disacáridos tales como lactosa, maltitol, sacarosa, maltosa; polioles o alcoholes de azúcar tales como manitol, sorbitol, isomalt; fosfato de calcio; polisacáridos tales como maltodextrina, almidón y derivados de almidón, almidón pregelatinizado, inulina; celulosa; o mezclas de los mismos, pero no se limita a estos ejemplos particulares. En un aspecto preferido, el material portador sólido es manitol.

La invención también abarca el uso de aglutinantes adicionales, tales como uno o más seleccionados de almidón, pasta de almidón, almidón parcialmente pregelatinizado, gelatina y derivados de celulosa tales como hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa (HPC), polivinilpirrolidona (PVP), copovidona, polidextrosa, carbómero o mezclas de los mismos. En un aspecto particular, el aglutinante se selecciona de hidroxipropilcelulosa y polivinilpirrolidona, preferiblemente hidroxipropilcelulosa.

En una realización particular, la invención se refiere a un procedimiento de recubrimiento, en particular un procedimiento de recubrimiento en lecho fluido. El procedimiento de recubrimiento puede comprender un portador sólido seleccionado de polvos y perlas, en particular perlas de tipo nonpareil inertes, más en particular perlas seleccionadas de uno o más de celulosa microcristalina, sacarosa o mezclas de las mismas.

Según algunas realizaciones de la invención, el líquido se evapora hasta un contenido de menos del 10 % (p/p), preferiblemente menos del 5 %, menos del 2,5 % o menos del 1 % de la formulación sólida final.

Los métodos de la invención incluyen realizaciones en las que el portador sólido se agita mediante uno o más de mezclado, agitación, remoción, mediante aplicación de una corriente de gas, o mediante combinaciones de los mismos.

En realizaciones a modo de ejemplo de los métodos de la invención, puede aplicarse calor en forma de una corriente de gas calentada, preferiblemente una corriente de aire calentada, que se dirige al material portador sólido de manera que se forma un lecho fluido.

En realizaciones a modo de ejemplo se realizan los métodos de la invención, en los que la temperatura del material portador sólido puesto en contacto con un líquido que comprende un dominio variable individual de inmunoglobulina como agente activo oscila entre 40 °C y 80 °C, más específicamente entre 40 °C y 70 °C, preferiblemente entre 40 °C y 60 °C, más preferiblemente entre 40 °C y 55 °C.

En una realización a modo de ejemplo de los métodos de la invención, el material portador sólido se pone en contacto con el líquido que comprende un agente activo mediante pulverización, en particular mediante pulverización del líquido sobre un lecho fluido del material portador sólido.

Los métodos de la invención pueden tener, en determinadas realizaciones, una duración de al menos 15 min, por ejemplo al menos 20 min, al menos 30 min, al menos 40 min, al menos 50 min.

En los métodos de la invención el líquido que comprende el agente activo puede seleccionarse de agua o un tampón acuoso. El líquido puede comprender además excipientes.

Además, la invención abarca métodos que comprenden etapas adicionales para preparar una preparación farmacéutica tal como una cápsula, comprimido o implante.

La solicitud también describe métodos para preparar preparaciones farmacéuticas que usan una formulación sólida que puede obtenerse mediante el método según cualquier aspecto de la invención.

La solicitud también describe una formulación sólida que puede obtenerse mediante un método tal como se

describió anteriormente, tal como una preparación farmacéutica.

Descripción detallada

5 A menos que se indique o se defina lo contrario, todos los términos usados tienen su significado habitual la técnica, que resultará evidente para el experto. Por ejemplo, se hace referencia a los manuales convencionales, tales como Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (2.^a ed.), vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); F. Ausubel *et al.*, eds., "Current protocols in molecular biology", Green Publishing and Wiley Interscience, Nueva York (1987); Lewin, "Genes II", John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y., (1985); Old *et al.*, "Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering", 2.^a edición, University of California Press, Berkeley, CA (1981); Roitt *et al.*, "Immunology" (6^a ed.), Mosby/Elsevier, Edimburgo (2001); Roitt *et al.*, "Roitt's Essential Immunology", 10.^a ed. Blackwell Publishing, R.U. (2001); y Janeway *et al.*, "Immunobiology" (6.^a ed.), Garland Science Publishing/Churchill Livingstone, Nueva York (2005), así como a la técnica anterior general citada en el presente documento.

15 Dominio variable individual de inmunoglobulina

20 El término "dominio variable individual de inmunoglobulina", usado de manera intercambiable con "dominio variable individual", define moléculas en las que el sitio de unión a antígeno está presente en, y formado por, un dominio de inmunoglobulina individual. Esto diferencia los dominios variables individuales de inmunoglobulina de inmunoglobulinas "convencionales" o sus fragmentos, en las que dos dominios de inmunoglobulina, en particular dos dominios variables, interaccionan para formar un sitio de unión a antígeno. Normalmente, en inmunoglobulinas convencionales, un dominio variable de cadena pesada (VH) y un dominio variable de cadena ligera (VL) interaccionan para formar un sitio de unión a antígeno. En este caso, las regiones determinantes de complementariedad (CDR) tanto de VH como de VL contribuirán al sitio de unión a antígeno, es decir, un total de 6 CDR participarán en la formación del sitio de unión a antígeno.

30 En cambio, el sitio de unión de un dominio variable individual de inmunoglobulina está formado por un único dominio VH o VL. Por tanto, el sitio de unión a antígeno de un dominio variable individual de inmunoglobulina está formado por no más de tres CDR.

35 Por tanto, los términos "dominios variables individuales de inmunoglobulina" o "dominio variable individual" no comprenden inmunoglobulinas convencionales o sus fragmentos que requieren la interacción de al menos dos dominios variables para la formación de un sitio de unión a antígeno. Este también es el caso para las realizaciones de la invención que "comprenden" o "contienen" un dominio variable individual de inmunoglobulina. En el contexto de la presente invención, tales realizaciones excluyen inmunoglobulinas convencionales o sus fragmentos. Por tanto, un constructo o péptido que "comprende" o "contiene" un dominio variable individual de inmunoglobulina puede referirse, por ejemplo, a constructos que comprenden más de un dominio variable individual de inmunoglobulina. Alternativamente, puede haber constituyentes adicionales distintos de los dominios variables individuales de inmunoglobulina, por ejemplo agentes auxiliares de diferentes clases, etiquetas de proteínas, colorantes, tintes, etc. Sin embargo, los términos "dominios variables individuales de inmunoglobulina" o "dominio variable individual" sí que comprenden fragmentos de inmunoglobulinas convencionales en los que el sitio de unión a antígeno está formado por un dominio variable individual.

45 Puede considerarse que la secuencia y estructura de aminoácidos de una secuencia de inmunoglobulina tal como un dominio variable individual de inmunoglobulina, en particular un Nanobody, comprende (sin embargo, sin limitarse a ello) cuatro regiones de entramado o "FR", que en la técnica y en el presente documento se denominan "región de entramado 1" o "FR1"; "región de entramado 2" o "FR2"; "región de entramado 3" o "FR3"; y "región de entramado 4" o "FR4", respectivamente; regiones de entramado que están interrumpidas por tres regiones determinantes de la complementariedad o "CDR", que en la técnica se denominan "región determinante de la complementariedad 1" o "CDR1"; "región determinante de la complementariedad 2" o "CDR2"; y "región determinante de la complementariedad 3" o "CDR3", respectivamente.

55 Por tanto, generalmente, los dominios variables individuales serán secuencias de aminoácidos que consisten en, o consisten esencialmente en, 4 regiones de entramado (de FR1 a FR4 respectivamente) y 3 regiones determinantes de complementariedad (de CDR1 a CDR3 respectivamente). En este contexto, "consistir esencialmente" significa que pueden estar presentes elementos adicionales tales como por ejemplo etiquetas usadas para purificación o marcaje, pero tales elementos adicionales son pequeños en comparación con el dominio variable individual de inmunoglobulina en sí mismo, y no interfieren con la actividad de unión a antígeno del dominio variable individual de inmunoglobulina.

60 El número total de residuos de aminoácido en un dominio variable individual de inmunoglobulina VHH, un VHH humanizado o VH camelizado, o un Nanobody, respectivamente, puede estar en la región de 110-120, es preferiblemente de 112-115, y es lo más preferiblemente de 113. Sin embargo, debe observarse que partes, fragmentos, análogos o derivados (tal como se describen adicionalmente en el presente documento) no están particularmente limitados en cuanto a su longitud y/o tamaño, siempre que tales partes, fragmentos, análogos o

derivados cumplan los requisitos adicionales expuestos en el presente documento, en particular muestren actividad de unión a antígeno, y también son preferiblemente adecuados con los propósitos descritos en el presente documento.

5 “Fragmentos adecuados” de dominios variables individuales de inmunoglobulina se refieren a polipéptidos que contienen menos aminoácidos que un dominio variable individual de inmunoglobulina nativo, pero todavía muestran actividad de unión a antígeno (que entonces contendrán habitualmente al menos algunos de los residuos de aminoácido que forman al menos una de las CDR, tal como se describe adicionalmente en el presente documento).
 10 Tales dominios variables individuales y fragmentos comprenden lo más preferiblemente un plegamiento de inmunoglobulina o son capaces de formar, en condiciones adecuadas, un plegamiento de inmunoglobulina. Más específicamente, los dominios variables individuales de inmunoglobulina y sus fragmentos son tales que son capaces de unirse al antígeno diana. Como tal, el dominio variable individual puede comprender, por ejemplo, una secuencia de dominio variable de cadena ligera (por ejemplo, una secuencia de VL) o un fragmento adecuado de la misma; o una secuencia de dominio variable de cadena pesada (por ejemplo, una secuencia de VH o secuencia de VHH) o un fragmento adecuado de la misma; siempre que sea capaz de formar una unidad de unión a antígeno individual (es decir, una unidad de unión a antígeno funcional que consiste esencialmente en el dominio variable individual, de manera que el dominio de unión a antígeno individual no necesita interactuar con otro dominio variable para formar una unidad de unión a antígeno funcional, tal como es el caso por ejemplo para los dominios variables que están presentes, por ejemplo, en anticuerpos convencionales y fragmentos scFv que necesitan interactuar con otro dominio variable, por ejemplo mediante una interacción VH/VL, para formar un dominio de unión a antígeno funcional).

Por ejemplo, los dominios variables individuales de inmunoglobulina pueden ser un anticuerpo de dominio o pueden ser un anticuerpo de un único dominio (o una secuencia de aminoácidos que es adecuada para su uso como anticuerpo de un único dominio), un “Acd” o Acd (o una secuencia de aminoácidos que es adecuada para su uso como Acd) o un Nanobody® (tal como se define en el presente documento, e incluyendo, pero sin limitarse a, una secuencia de VHH); otros dominios variables individuales, o cualquier fragmento adecuado de uno cualquiera de los mismos. Para una descripción general de anticuerpos de (un único) dominio, también se hace referencia a la técnica anterior citada en el presente documento, así como al documento EP 0 368 684. Para el término “Acd”, se hace referencia, por ejemplo, a Ward *et al.* 1989 (Nature 341 (6242): 544-6), a Holt *et al.* 2003 (Trends Biotechnol. 21(11): 484-490), así como por ejemplo a los documentos WO 04/068820, WO 06/030220, WO 06/003388 y otras solicitudes de patente publicadas de Domantis Ltd. También debe observarse que, aunque se prefiere menos en el contexto de la presente invención porque no son de origen de mamífero, pueden derivar dominios variables individuales de determinadas especies de tiburón (por ejemplo, los denominados “dominios IgNAR”, véase por ejemplo el documento WO 05/18629).

En particular, la secuencia de aminoácidos puede ser un Nanobody® o un fragmento adecuado del mismo. Para una descripción adicional de VHH y Nanobody, se hace referencia al artículo de revisión de Muyldermans 2001 (en Reviews in Molecular Biotechnology 74: 277-302); así como a las siguientes solicitudes de patente, que se mencionan como técnica anterior general: documentos WO 94/04678, WO 95/04079 y WO 96/34103 de Vrije Universiteit Brussel; documentos WO 94/25591, WO 99/37681, WO 00/40968, WO 00/43507, WO 00/65057, WO 01/40310, WO 01/44301, EP 1134231 y WO 02/48193 de Unilever; documentos WO 97/49805, WO 01/21817, WO 03/035694, WO 03/054016 y WO 03/055527 de Vlaams Instituut voor Biotechnologie (VIB); documento WO 03/050531 de Algonomics N.V. y Ablynx N.V.; documento WO 01/90190 de National Research Council de Canadá; documento WO 03/025020 (= EP 1 433 793) de Institute of Antibodies; así como documentos WO 04/041867, WO 04/041862, WO 04/041865, WO 04/041863, WO 04/062551, WO 05/044858, WO 06/40153, WO 06/079372, WO 06/122786, WO 06/122787 y WO 06/122825, de Ablynx N.V. y las solicitudes de patente publicadas adicionales de Ablynx N.V. También se hace referencia a la técnica anterior adicional mencionada en estas solicitudes, y en particular a la lista de referencias mencionadas en las páginas 41-43 de la solicitud internacional WO 06/040153. Tal como se describe en estas referencias, los Nanobody (en particular secuencias de VHH y Nanobody parcialmente humanizados) pueden caracterizarse en particular por la presencia de uno o más “residuos distintivos” en una o más de las secuencias de entramado. En el documento WO 07/104529, por ejemplo, puede encontrarse una descripción adicional de los Nanobody, incluyendo humanización y/o camelización de Nanobody, así como otras modificaciones, partes o fragmentos, derivados o “fusiones de Nanobody”, constructos multivalentes (incluyendo algunos ejemplos no limitativos de secuencias de unión) y diferentes modificaciones para aumentar la semivida de los Nanobody y sus preparaciones.

Por tanto, en el significado de la presente invención, el término “dominio variable individual de inmunoglobulina” o “dominio variable individual” comprende polipéptidos que derivan de una fuente distinta de humanos, preferiblemente un camélido, preferiblemente un anticuerpo de cadena pesada de camélido. Pueden estar humanizados, tal como se describió anteriormente. Además, el término comprende polipéptidos derivados de fuentes distintas de camélidos, por ejemplo ratón o humano, que se han “camelizado”, tal como se describió anteriormente.

Por tanto, en realizaciones preferidas de los métodos según la invención el dominio variable individual de inmunoglobulina comprende uno o más seleccionados de un dominio variable individual de inmunoglobulina VHH, un dominio variable individual de inmunoglobulina VHH humanizado o un dominio variable individual de

inmunoglobulina VH camelizado o cualquier fragmento adecuado o combinación de los mismos.

A menos que se indique lo contrario, el término "inmunoglobulina" (ya se use en el presente documento para hacer referencia a un anticuerpo de cadena pesada o a un anticuerpo de 4 cadenas convencional) se usa como término general para incluir el anticuerpo de tamaño completo, las cadenas individuales del mismo así como todas las partes, dominios o fragmentos del mismo (incluyendo, pero sin limitarse a, dominios o fragmentos de unión a antígeno tales como dominios VHH o dominios VH/VL, respectivamente). Los términos moléculas de unión a antígeno o proteína de unión a antígeno se usan de manera intercambiable con secuencia de inmunoglobulina, e incluyen Nanobody.

Los dominios variables individuales de inmunoglobulina proporcionados por el método de la invención están preferiblemente en forma aislada o forma esencialmente aislada, o forman parte de una proteína o polipéptido, que puede comprender o consistir esencialmente en uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina y que puede comprender opcionalmente de manera adicional una o más secuencias de aminoácidos adicionales (todas unidas opcionalmente a través de uno o más grupos de unión adecuados). Por ejemplo, y sin limitación, los uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina pueden usarse como unidad de unión en una proteína o polipéptido de este tipo, que puede contener opcionalmente una o más secuencias de aminoácidos adicionales que pueden servir como unidad de unión (por ejemplo, contra uno o más de otros antígenos y/o dianas), para proporcionar un polipéptido monovalente, multivalente o multiespecífico, respectivamente, todo ello tal como se describe en el presente documento. Una proteína o polipéptido de este tipo también puede estar en forma aislada o esencialmente aislada. Por tanto, según la invención, los dominios variables individuales de inmunoglobulina comprenden constructos que comprenden dos o más unidades de unión a antígeno en forma de dominios variables individuales, tal como se expuso anteriormente. Por ejemplo, dos (o más) dominios variables individuales de inmunoglobulina con la misma o diferente especificidad de antígeno pueden unirse para formar, por ejemplo, un constructo bivalente, trivalente o multivalente. Combinando dominios variables individuales de inmunoglobulina de dos o más especificidades, pueden formarse constructos biespecíficos, trispecíficos, etc. Por ejemplo, un polipéptido puede comprender dos dominios variables individuales de inmunoglobulina dirigidos contra la diana A, y un dominio variable individual de inmunoglobulina contra la diana B. Todos de tales constructos y modificaciones de los mismos, que el experto puede prever fácilmente, se proporcionan mediante el método de la presente invención.

Generalmente, los polipéptidos que comprenden o consisten esencialmente en un único dominio variable individual de inmunoglobulina (tal como un único Nanobody) se denominarán en el presente documento polipéptidos "monovalentes" o "constructos monovalentes". Los polipéptidos que comprenden o consisten esencialmente en dos o más dominios variables individuales de inmunoglobulina (tal como al menos dos Nanobody) se denominarán en el presente documento proteínas o polipéptidos "multivalentes" o "constructos multivalentes". Algunos ejemplos no limitativos de tales constructos multivalentes resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción en el presente documento.

Según un aspecto específico, pero no limitativo, un polipéptido proporcionado mediante el método de la invención es un constructo bivalente y comprende o consiste esencialmente en dos dominios variables individuales de inmunoglobulina, tales como dos Nanobody. Según otro aspecto específico, pero no limitativo, un polipéptido es un constructo trivalente y comprende o consiste esencialmente en tres dominios variables individuales de inmunoglobulina, tales como tres Nanobody.

En los constructos anteriores, los uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina y/o Nanobody pueden estar directamente unidos entre sí y/o unidos de manera adecuada entre sí a través de una o más secuencias de unión.

La invención incluye secuencias de inmunoglobulina de origen diferente, comprendiendo secuencias de inmunoglobulina de ratón, rata, conejo, burro, humano y camélido. La invención también incluye secuencias de inmunoglobulina totalmente humanas, humanizadas o quiméricas. Por ejemplo, la invención comprende secuencias de inmunoglobulina de camélido y secuencias de inmunoglobulina de camélido humanizadas, o anticuerpos de dominio camelizados, por ejemplo Acd camelizados tal como se describe por Ward *et al.* (véase, por ejemplo, el documento WO 94/04678 y Davies y Riechmann (1994; Febs Letters 339: 285-290) y (1996; Prot. Engineering 9: 531-537)). Además, la invención comprende secuencias de inmunoglobulina fusionadas, por ejemplo formando un constructo multivalente y/o multiespecífico (para polipéptidos multivalentes y multiespecíficos que contienen uno o más dominios de VHH y su preparación, también se hace referencia a Conrath *et al.* 2001 (J. Biol. Chem. 276: 7346-7350), así como, por ejemplo, a los documentos WO 96/34103 y WO 99/23221), y secuencias de inmunoglobulina que comprenden etiquetas u otros restos funcionales, por ejemplo toxinas, marcadores, productos radioquímicos, etc., que pueden derivar a partir de las secuencias de inmunoglobulina.

Todas estas moléculas también se describen en la solicitud como "polipéptido", que es sinónimo de "secuencias de inmunoglobulina".

Además, el término "secuencia" tal como se usa en el presente documento (por ejemplo, en términos tales como "secuencia de inmunoglobulina", "secuencia de anticuerpo", "secuencia de dominio variable", "secuencia de VHH" o

“secuencia de proteína”) debe entenderse de manera general como que incluye tanto la secuencia de aminoácidos relevante así como secuencias de ácido nucleico o secuencias de nucleótidos que codifican para la misma, a menos que el contexto requiera una interpretación más limitada.

5 Formulación sólida de un dominio variable individual de inmunoglobulina

La presente solicitud describe formulaciones, por ejemplo formulaciones farmacéuticas o de diagnóstico. Estas formulaciones comprenden, como agente activo, dominios variables individuales de inmunoglobulina. Los “agentes activos” contribuyen a, o son responsables de, los efectos biológicos de la formulación, por ejemplo efectos terapéuticos en una composición farmacéutica. Los efectos biológicos pueden estar relacionados, en particular, con la actividad de unión a antígeno de los dominios variables individuales de inmunoglobulina. Sin embargo, resulta evidente que una formulación sólida no ejercerá normalmente ningún efecto biológico a menos que sus agentes activos vuelvan a un estado adecuado, por ejemplo a una disolución acuosa. Esto puede lograrse antes del uso, por ejemplo antes de la administración, o como consecuencia del uso, por ejemplo tras la administración. Por ejemplo, si se ingiere un comprimido o una cápsula que comprende una formulación sólida por un sujeto que va a tratarse o diagnosticarse, los dominios variables individuales de inmunoglobulina se devolverán a un estado líquido por ejemplo dentro del tracto intestinal.

Los agentes activos son distintos de los compuestos auxiliares, portadores, excipientes, etc., que no tienen necesariamente efectos biológicos en sí mismos. Sin embargo, la descripción no excluye la presencia de agentes adicionales que tienen efectos biológicos por sí mismos.

Al mismo tiempo, la solicitud también describe formulaciones que comprenden más de un agente activo, que puede o no ser un dominio variable individual de inmunoglobulina. Sin embargo, tales combinaciones de agentes activos siempre comprenden al menos un agente activo que comprende o que consiste en un dominio variable individual de inmunoglobulina. Las formulaciones están en un estado sólido. Las “formulaciones sólidas” incluyen polvos o gránulos, por ejemplo que pueden obtenerse mediante un procedimiento de granulación o recubrimiento. Las formulaciones sólidas pueden tener la forma de aglomerados, es decir una agregación de partículas de portador sólido intercaladas con agente activo, o la forma de portadores particulados recubiertos, en los que una capa que comprende el agente activo se deposita sobre la superficie del portador.

Sin embargo, el término también incluye formulaciones que pueden obtenerse mediante procesamiento adicional. Por ejemplo, si se prensa un granulado para dar un comprimido, se rellena en una cápsula o se formula para dar un implante (término que se pretende que incluya un depósito), en particular un implante sólido, entonces estos comprimidos, cápsulas e implantes también representan formulaciones sólidas. La formación de tales formulaciones sólidas puede comprender el uso adicional de excipientes adicionales, cargas, agentes aromatizantes, estabilizantes, etc. Por tanto, las formulaciones sólidas descritas en la solicitud pueden adaptarse a formas de administración convencionales, tales como administración oral, rectal, vaginal, ocular. En realizaciones particulares las formulaciones sólidas también pueden adaptarse a la administración mediante administración sublingual.

La presente solicitud se refiere a formulaciones sólidas sin limitación. “Formulación sólida” significa que se excluyen formulaciones líquidas. También se excluyen formulaciones tales como suspensiones o suspensiones espesas, que contienen altas cantidades de líquido, de manera que las propiedades físicas de la formulación se ven significativamente influidas por el líquido. Dicho de otro modo, “formulación sólida” tal como se usa en el presente documento se refiere a formulaciones que tienen un bajo contenido en líquido, es decir que están secas o esencialmente secas. Los ejemplos típicos de contenido en líquido incluyen un contenido de menos del 10 % (p/p), preferiblemente menos del 5 %, menos del 2,5 % o menos del 1 %, por ejemplo el 0,5-1 % o el 0,5-5 % de la formulación sólida.

Los dominios variables individuales de inmunoglobulina comprendidos en la formulación deben recuperar su actividad cuando se ponen en un entorno apropiado, por ejemplo se disuelven en un líquido. Con respecto a la formulación líquida de los dominios variables individuales de inmunoglobulina usada como material de partida en el procedimiento de producción de una formulación en estado sólido, la actividad de los dominios variables individuales de inmunoglobulina será por ejemplo de al menos el 50 %, 60 % o 70 %, preferiblemente al menos el 80 %, 90 % o 95 % tras la reconstitución de la formulación sólida a un estado líquido. Una comparación de este tipo empleará de manera adecuada condiciones (por ejemplo, temperatura, tampón, pH), que en sí mismas no afectan a la medición de la actividad. La actividad puede determinarse o bien mediante un ensayo de unión o bien mediante un ensayo que se basa en una actividad biológica adicional (por ejemplo, bloqueo de un determinado efecto biológico de la molécula diana). El experto puede determinar fácilmente ensayos adecuados basándose en la especificidad de antígeno de los dominios variables individuales de inmunoglobulina.

Los valores anteriores de actividad serán preferiblemente estables a lo largo de tiempos prolongados de almacenamiento de la formulación sólida. Por ejemplo, los valores anteriores de actividad podrán alcanzarse tras al menos 1, 3 o 6 meses de almacenamiento de la formulación sólida a 4 °C.

En la realización particular de granulación en húmedo en lecho fluido, puede lograrse una actividad de más del

90 %, preferiblemente más del 95 %, que permanece a más del 90 % incluso tras 3 meses de almacenamiento a 4 °C. En la realización de recubrimiento con perlas, puede lograrse una actividad de más de por ejemplo el 70 %, 75 % u 80 %.

- 5 Aparte de la estabilidad en cuanto a la actividad de los dominios variables individuales de inmunoglobulina, las formulaciones sólidas descritas en la presente solicitud también se caracterizan por la integridad y estabilidad de los dominios variables individuales de inmunoglobulina desde el punto de vista químico y físico.

10 La integridad física puede determinarse, por ejemplo, mediante cromatografía de exclusión molecular (abreviada "SEC"). La formación de agregados o la pérdida de estructura, por ejemplo mediante desplegamiento, afectarán a las propiedades de flujo a través de dominios variables individuales de inmunoglobulina en este método cromatográfico. El experto conoce equipos cromatográficos adecuados y software de análisis. Los ejemplos no limitativos incluyen, por ejemplo, el sistema de HPLC Agilent 1200 equipado con software ChemStation (Agilent Technologies, Palo Alto, EE. UU., Rev B); sistema de HPLC Dionex Ultimate 3000 equipado con software Chromeleon (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, EE. UU., V6.8); o sistema ACQUITY UPLC® H-Class Bio (Waters, Saint-Quentin, Francia). Tales sistemas permiten la generación y el análisis de cromatogramas.

20 Normalmente, un pico principal que comprende el dominio variable individual de inmunoglobulina puede estar flanqueado por los denominados picos previos o posteriores, que representan variantes estructurales, por ejemplo agregados (peso molecular superior al pico de producto principal) o fragmentos (peso molecular inferior al pico de producto principal). Los picos en el cromatograma pueden compararse, por ejemplo en cuanto a su área bajo la curva. Esto puede lograrse mediante software comercial convencional tal como se mostró a modo de ejemplo anteriormente. Normalmente, el área bajo la curva total de todos los picos característicos en un cromatograma se establece al 100 % y también se denomina "área de pico", y puede compararse la distribución entre diferentes picos de un cromatograma. Por ejemplo, el pico principal correspondiente a dominios variables individuales de inmunoglobulina puede ser del 98 %, y un pico previo, que comprende por ejemplo un agregado dimérico, puede ser del 2 % del área de pico total en el cromatograma. Estos patrones pueden compararse entre una referencia líquida y una formulación sólida. De manera ideal, la proporción del pico principal frente a los picos secundarios no cambiará, o no cambiará significativamente, mediante los métodos de la invención.

30 Las formulaciones solo mostrarán cambios muy minoritarios entre el pico principal y los picos previos o posteriores provocados por el método de formulación. Por ejemplo, los aumentos relativos de picos previos o posteriores serán de menos del 5 % para cada pico individual, por ejemplo menos del 4, 3, 2 o 1 %. Esto significa, por ejemplo, que si en la muestra de referencia un pico previo individual 1 representa el 1 % del área total de picos, este pico no representará más del 6 % tras preparar una formulación sólida según los métodos de la presente invención, y más particularmente permanecerá por ejemplo al 2 o 3 %. Dicho de otro modo, los dominios variables individuales de inmunoglobulina conservarán su integridad física sin cambios significativos. Esto también se refleja en el hecho de que el pico principal que corresponde a los dominios variables individuales de inmunoglobulina será más del 90 %, más del 95 %, preferiblemente más del 96, 97 o 98 % del área total bajo la curva incluso tras el método de formulación de la presente invención.

Los cambios definidos anteriormente en el patrón de picos también pueden considerarse "cambio no significativo", o "solo cambios minoritarios" en el contexto de la presente invención.

- 45 Además, el patrón de picos será estable en almacenamiento, y no diferirá significativamente (tal como se definió anteriormente) ni siquiera tras, por ejemplo, 3 meses de almacenamiento a 4 °C.

50 La estabilidad química de los dominios variables individuales de inmunoglobulina puede evaluarse, por ejemplo, mediante cromatografía de fase inversa (abreviada "RPC", para equipos y software de análisis a modo de ejemplo adecuados, véase anteriormente). Las modificaciones químicas del polipéptido afectarán a los tiempos de retención y por tanto influirán sobre el cromatograma. Tal como en SEC, los diversos picos pueden analizarse y compararse con un valor de referencia.

55 En una realización preferida, la formulación descrita en la solicitud no mostrará ningún cambio significativo en el cromatograma de RPC en comparación con la muestra de referencia.

60 La formulación puede comprender un único tipo de dominio variable individual de inmunoglobulina, o una mezcla de dos o más tipos de dominios variables individuales de inmunoglobulina. En este contexto "tipo" significa por ejemplo una secuencia de dominio variable individual de inmunoglobulina particular que tiene una especificidad de antígeno dada, o un constructo que comprende dos o más de tales dominios variables individuales de inmunoglobulina, etc.

65 Los ejemplos típicos de formulaciones sólidas, en particular granulados y/o perlas recubiertas, comprenderán, en una base en peso/peso, menos de por ejemplo el 50 %, 40 %, 30 % o, preferiblemente, menos del 25 % de principio activo. El contenido de principio activo con respecto al peso total también se denomina algunas veces "cantidad de carga" o "carga" del principio activo. Ejemplos típicos son menos del 20 %, menos del 15 %, menos del 10 % y más específicamente en el intervalo del 0,1 al 10 %. Ejemplos típicos de cargas que pueden obtenerse mediante un

procedimiento de granulación en húmedo, por ejemplo un procedimiento de granulación en húmedo en lecho fluido, son carga del 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 %. Ejemplos no limitativos específicos de cargas que pueden obtenerse mediante un procedimiento de recubrimiento, por ejemplo un procedimiento de recubrimiento en lecho fluido, son carga del 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 %.

Con frecuencia una alta carga resulta ventajosa, ya que da como resultado una alta actividad específica de la formulación, es decir, la actividad en cuanto a la unión a antígeno y/u otros efectos biológicos por peso de formulación. Una alta actividad específica conduce ventajosamente a unidades de dosificación menores, por ejemplo una cápsula, comprimido o implante menor. Sin embargo, en formas de dosificación sólidas, que pueden aplicarse a un paciente por ejemplo por vía oral, rectal o vaginal, con frecuencia la carga no es crítica, porque pueden usarse incluso cápsulas, comprimidos o implantes relativamente grandes con el fin de lograr la dosificación deseada en un paciente.

Cuando se procesan adicionalmente un granulado y/o perlas recubiertas, la carga en % de la forma de unidad de dosificación final, por ejemplo, para comprimido, cápsula o implante, puede ser menor, dependiendo de la cantidad de agentes adicionales (por ejemplo, agentes auxiliares adicionales y/o agentes activos adicionales) que se añaden.

Constituyentes de formulaciones sólidas

Las formulaciones sólidas descritas en la solicitud, por ejemplo granulados, consisten en una mezcla de componentes, al menos un excipiente y un agente activo. Tal como se usa en el presente documento, el término "excipiente" se refiere a componentes farmacéuticamente aceptables que se usan habitualmente en la tecnología farmacéutica para preparar un granulado y/o formulaciones de dosificación orales sólidas. Los ejemplos de categorías de excipientes incluyen, pero no se limitan a, aglutinantes, disgregantes, lubricantes, deslizantes, estabilizantes, cargas y diluyentes. El experto puede seleccionar fácilmente uno o más de los excipientes anteriormente mencionados en vista de las propiedades deseadas particulares del granulado y/o la forma de dosificación oral sólida. La cantidad de cada excipiente usada puede variar dentro de intervalos convencionales en la técnica. En la medida en que el experto requiera cualquier orientación adicional, se hace referencia a la sección experimental de esta memoria descriptiva así como a libros de texto generales sobre técnicas y excipientes usados para formular formas de dosificación orales, tales como *The Handbook of Pharmaceutical Excipients 2003* (4.^a edición, Rowe *et al.*, Eds., American Pharmaceuticals Association); y *Remington: the Science and Practice of Pharmacy 2000* (20.^a edición, Gennaro, Ed., Lippincott Williams & Wilkins).

En un procedimiento de granulación o de recubrimiento resulta de interés particular el portador sólido (es decir, un compuesto sólido que se pone en contacto con el líquido que comprende el dominio variable individual de inmunoglobulina), que se describe en más detalle a continuación.

Material portador sólido

Según la invención, la formulación de dominio variable individual de inmunoglobulina sólida comprenderá un material portador sólido. El portador está en forma de partículas sólidas, que pueden tener formas regulares o irregulares, por ejemplo polvos, cristales o perlas. El material portador puede ser un único compuesto químico, tal como por ejemplo manitol, o puede ser una mezcla de dos o más compuestos. También se prevé que el portador comprenda excipientes adicionales tal como se definió anteriormente. El portador será normalmente un polvo o perlas. Pueden usarse materiales portadores convencionales conocidos a partir de formulaciones sólidas, por ejemplo, en el campo de las preparaciones farmacéuticas. Específicamente, se usarán materiales portadores que no afectan negativamente a la unión a antígeno de los dominios variables individuales de inmunoglobulina. El experto puede determinar fácilmente mediante pruebas funcionales rutinarias si un material portador o mezcla de materiales dado es compatible con los dominios variables individuales de inmunoglobulina que son el principio activo de la formulación.

Generalmente se conocen materiales portadores sólidos aceptables que son compatibles con el método de la invención, por ejemplo un procedimiento de granulación en húmedo, más específicamente un procedimiento de granulación en lecho fluido o un procedimiento de granulación con mezcladora de alta cizalladura, en particular un procedimiento de granulación en lecho fluido.

Los ejemplos específicos de tales materiales portadores sólidos incluyen, pero no se limitan a, uno o más seleccionados de disacáridos tales como lactosa, maltitol, sacarosa, maltosa; polioles o alcoholes de azúcar tales como manitol, sorbitol, isomalt; fosfato de calcio; polisacáridos tales como maltodextrina, almidón y derivados de almidón, almidón pregelatinizado, inulina; celulosa; o mezclas de los mismos. En un aspecto preferido, el portador sólido usado en el procedimiento de granulación en húmedo es manitol.

El experto también conoce portadores sólidos que son compatibles con un procedimiento de recubrimiento. Por ejemplo, pueden seleccionarse de polvos y perlas, en particular perlas de tipo nonpareil inertes, más en particular perlas seleccionadas de uno o más de celulosa microcristalina, sacarosa o mezclas de las mismas.

Preferiblemente, cualquier material portador será farmacéuticamente aceptable. Para aplicaciones de diagnóstico el experto también conoce materiales portadores adecuados, y con frecuencia pueden emplearse portadores farmacéuticamente aceptables.

5 Aglutinante

En determinadas realizaciones los métodos de la invención también comprenden el uso de un aglutinante adicional. Normalmente, los aglutinantes se hinchan o comienzan a disolverse cuando entran en contacto con agua, formando una consistencia de tipo gel. Los aglutinantes ampliamente usados incluyen, pero no se limitan a, uno o más seleccionados de almidón, pasta de almidón, almidón parcialmente pregelatinizado, preparaciones acuosas de almidón de maíz, gelatina y derivados de celulosa tales como metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, polivinilpirrolidona (povidona), copovidona, polidextrosa, carbómero, gomas naturales tales como goma arábiga, o mezclas de los mismos. En particular, tales aglutinantes se usan en formulaciones de granulación en húmedo. (Véase Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.^a ed., Mack Publishing Company: Easton, Pa., 1635-1636 (1990)). En un aspecto preferido, el aglutinante usado en el procedimiento de granulación en húmedo es hidroxipropilcelulosa.

Normalmente pueden añadirse aglutinantes hasta una contribución final en peso del 1-15 %, más específicamente el 2-10 %, por ejemplo el 2-8 % de la formulación final.

20 Excipientes adicionales

Las formulaciones sólidas descritas en la presente solicitud pueden comprender además excipientes ampliamente usados en formulaciones sólidas, por ejemplo formulaciones sólidas farmacéuticas. Los ejemplos incluyen cargas, agentes aromatizantes, colorantes, disgregantes o lubricantes.

El disgregante puede ser, por ejemplo, uno de varios almidones modificados o polímeros de celulosa modificados, incluyendo croscarmelosa sódica tal como croscarmelosa sódica NF tipo A.

30 Los lubricantes pueden incluir estearato de magnesio, estearato de calcio, ácido esteárico, agentes tensioactivos tales como laurilsulfato de sodio, propilenglicol, dodecanosulfonato de sodio, oleatosulfonato de sodio, y laurato de sodio mezclado con estearatos y talco, estearilfumerato de sodio, y otros lubricantes conocidos.

35 También se conocen y se usan ampliamente materiales de barrera en la producción de formulaciones sólidas. Tales sustancias pueden aplicarse, por ejemplo, como capa adicional sobre una perla recubierta o un gránulo. Los materiales de barrera se usan, por ejemplo, para producir una formulación de liberación dependiente del pH, o una formulación de liberación retardada. El experto puede elegir materiales de barrera adecuados que se conocen habitualmente para llevar a cabo la presente invención.

40 Como con todas las demás sustancias para su uso en los métodos de la presente invención, el experto elegirá tales agentes que no interfieran con la actividad biológica del agente activo, y no tengan un efecto negativo sobre el procedimiento de producción de una formulación sólida.

45 Concentración de sal

En cualquier aspecto de la invención resulta ventajoso que la concentración de sal total del líquido que comprende el agente activo sea de menos del 15 % (p/p), preferiblemente menos del 10 %, por ejemplo menos del 9 %, 8 %, 7 %, 6 % o 5 %, en la que se entiende opcionalmente que cada valor comprende un intervalo de ± 20 %, es decir se entiende que un valor del 10 % (p/p) se refiere a un intervalo entre el 8 y el 12 %. Las sales pueden derivarse de un tampón, excipiente, lubricante o cualquier otro compuesto usado en los métodos de la presente invención. Cuando se usan por ejemplo un tampón y un excipiente que comprenden sal, la concentración anterior se refiere a la combinación de todas las sales.

55 También es deseable que la concentración de sales totales en el líquido que comprende un dominio variable individual de inmunoglobulina usado en el contexto de la presente invención, por ejemplo concentración de tampón, sea relativamente baja, por ejemplo menos de 30 mM, menos de 20 mM, y preferiblemente menos de 10 mM, por ejemplo 9, 8, 7, 6 o 5 mM, en el que se entiende opcionalmente que cada valor abarca un intervalo de ± 20 %, por ejemplo se entiende que un valor de 10 mM abarca un intervalo de 8 a 12 mM.

60 Los métodos de la invención

Los procedimientos de granulación o de recubrimiento se encuentran entre los procedimientos más ampliamente usados en la preparación de formulaciones farmacéuticas o de diagnóstico sólidas. Estas formulaciones sólidas permiten la manipulación física de los fármacos, la fabricación de formas de dosificación tales como comprimidos o cápsulas, y proporcionan polvos estables para el almacenamiento. Por ejemplo, pueden rellenarse gránulos o perlas recubiertas en cápsulas, y por tanto usarse directamente para la fabricación de esta forma de dosificación. Además,

los gránulos son un material de partida ampliamente usado para la fabricación de comprimidos, que se forman prensando los gránulos para dar una forma de comprimido. Por tanto, de nuevo, los gránulos sirven como material de partida que puede convertirse en comprimidos sin etapas de procesamiento adicionales complicadas y caras. En todas estas aplicaciones, las características físicas, por ejemplo, de los gránulos o las perlas recubiertas son fundamentales para los procedimientos de fabricación, por ejemplo, de preparaciones farmacéuticas. Las formulaciones sólidas deben mostrar propiedades de flujo adecuadas, ser suficientemente estables para resistir la tensión física encontrada durante procedimientos de fabricación industriales, y evitar la formación de polvo. De manera importante, los procedimientos industriales establecidos para la granulación en húmedo o el recubrimiento permiten al experto controlar los parámetros de las formulaciones sólidas, tales como por ejemplo tamaño de gránulo, características de flujo, carga, etc.

Desafortunadamente, los procedimientos usados para la granulación o el recubrimiento de fármacos de molécula pequeña resultan desventajosos para inmunoglobulinas. Los procedimientos de granulación en húmedo y de recubrimiento requieren la presencia de un líquido, que a su vez tiene que evaporarse para obtener una formulación sólida seca. Esto requiere la aplicación de calor. La mezcla de portador/líquido se agita físicamente para prevenir la formación de grumos y proporcionar una mezcla uniforme de los componentes. Esta combinación de características de procedimiento conduce a un entorno con tensión extrema para macromoléculas tales como inmunoglobulinas. Este entorno favorece todos los aspectos que son perjudiciales para la actividad biológica de inmunoglobulinas, es decir, tensión química (fomentada por la exposición a calor, superficies de contacto grandes, alta exposición, por ejemplo, a oxígeno derivado del aire, y tiempos de procedimiento prolongados), y diversas tensiones físicas, en particular intensa tensión de cizalladura mediante agitación física de la mezcla de portador sólido y líquido, así como tensión física inducida por superficies de contacto entre fases entre líquido y gas, en combinación con frecuencia con altas velocidades de partículas y una alta frecuencia de colisiones entre partículas y entre partículas y paredes de recipiente en un envase de reacción.

Ahora se ha encontrado sorprendentemente que dominios variables individuales de inmunoglobulina, tales como dominios VHH, VH camelizado o VHH humanizado, pueden resistir condiciones de procedimiento convencionales en la producción de formulaciones sólidas que se encuentran en procedimientos de granulación en húmedo o de recubrimiento. En particular, estas moléculas pueden resistir la exposición a una combinación de calor en un estado líquido, superficies de contacto gas/líquido grandes y tensión de cizalladura. Por tanto, sorprendentemente, pueden prepararse formulaciones sólidas que comprenden dominios variables individuales de inmunoglobulina usando equipos convencionales y parámetros de procedimiento usados habitualmente. No obstante, las formulaciones conservan actividad biológica así como integridad física y química y comparten todas las ventajas adicionales, tal como se explicó anteriormente de manera adicional.

a) Granulación en húmedo

En la producción de formulaciones farmacéuticas o de diagnóstico se usan ampliamente métodos convencionales que combinan calor en húmedo y agitación de materiales portadores. Los ejemplos específicos incluyen procedimientos de granulación en húmedo, tales como procedimientos de granulación en lecho fluido. Se usan procedimientos de granulación farmacéuticos para la producción de comprimidos, cápsulas y gránulos esféricos.

“Procedimiento de granulación” significa cualquier procedimiento mediante el cual se agrupan partículas pequeñas para dar masas permanentes más grandes en las que todavía pueden identificarse las partículas originales. Este procedimiento también se describe como “aglomeración mediante agitación”: una alimentación particulada, por ejemplo un material portador sólido, se introduce en un recipiente de procedimiento y se aglomera o bien de manera discontinua o bien de manera continua para formar un producto granulado. La alimentación se agita en el recipiente de procedimiento para provocar la granulación. (Perry’s Chemical Engineer’s Handbook, 7.^a edición, 1997).

En la granulación en húmedo, la alimentación particulada se pone en contacto con un líquido, por ejemplo mediante pulverización del líquido en el recipiente de procedimiento. Normalmente el líquido se pulverizará sobre la alimentación particulada. Se conocen ampliamente aparatos que pueden pulverizar desde la parte inferior, la parte superior o cualquier otra orientación adecuada. El líquido actúa como aglutinante para aglomerar la alimentación particulada sólida. La cantidad de líquido tiene que controlarse apropiadamente, ya que una humectación en exceso provocará que los gránulos sean demasiado duros y una humectación insuficiente provocará que sean demasiado blandos y friables. Por tanto, la cantidad de líquido y la tasa de adición influirán sobre el procedimiento de granulación, tal como se conoce ampliamente.

Por tanto, un procedimiento de granulación en húmedo comprenderá al menos las etapas de poner en contacto la alimentación particulada (el portador sólido) con un líquido que comprende los dominios variables individuales de inmunoglobulina y aplicar calor para evaporar el líquido. Sin embargo, el procedimiento también puede comprender opcionalmente etapas adicionales, por ejemplo una fase de calentamiento previo para llevar la alimentación particulada hasta una temperatura apropiada. Además, la puesta en contacto de la alimentación particulada con el líquido puede ser continua o discontinua, y puede prolongarse a lo largo de todo el procedimiento, o solo una parte del procedimiento. Por ejemplo, la alimentación particulada se pondrá en contacto con el líquido durante un periodo de tiempo predefinido, y por tanto se pondrá en contacto una cantidad predefinida de agente activo con la

alimentación particulada en una cantidad igualmente predefinida. Después, puede seguir una fase de secado independiente, en la que no se añade ningún líquido adicional al recipiente de reacción. No obstante, la aplicación de calor continúa hasta que se logra un contenido en líquido residual deseado. La fase de secado puede no ser necesaria, por ejemplo en el caso en el que el contenido en líquido se mantiene continuamente por debajo del nivel deseado ajustando los parámetros de procedimiento de manera apropiada.

Los parámetros de procedimiento que pueden ajustarse fácilmente por el experto incluyen la tasa de alimentación particulada, la tasa de adición del líquido, la forma e intensidad de aplicación de calor, por ejemplo el volumen y la temperatura de un gas calentado que se envía como corriente a través del recipiente de reacción, la intensidad y forma de agitación física, por ejemplo mezclado o fluidizado mediante el uso de una corriente de gas, y la duración global del procedimiento. El experto puede obtener orientación sobre parámetros de procedimiento adecuados a partir de su conocimiento común en procedimientos de granulación en húmedo, y encontrará orientación adicional en la sección experimental de esta descripción.

La alimentación comprende al menos el material portador sólido, y normalmente puede comprender una mezcla de componentes sólidos que pueden incluir aglutinantes, diluyentes, adyuvantes de fluidez, tensioactivos, agentes humectantes, lubricantes y cargas.

En el contexto de la presente invención, la granulación en húmedo implica añadir un líquido que comprende los dominios variables individuales de inmunoglobulina como agente activo. La invención también abarca métodos en los que el líquido comprende agentes adicionales, por ejemplo aglutinantes tales como aglutinantes poliméricos.

Los aglutinantes pueden o bien disolverse previamente en el líquido que comprende los dominios variables individuales de inmunoglobulina. Alternativamente, los aglutinantes pueden incluirse en la alimentación particulada, por ejemplo mediante combinación previa con los otros componentes de la alimentación particulada. Entonces, los aglutinantes lograrán el efecto deseado tras entrar en contacto con el líquido que contiene el agente activo.

Según la invención, el material portador sólido y el líquido que comprende los dominios variables individuales de inmunoglobulina se ponen en contacto con agitación. La forma de agitación no está limitada, e incluye uno o más de mezclado, agitación, remoción, aplicación de una corriente de gas o combinaciones de los mismos. Tal agitación puede aplicarse usando un aparato de lecho fluido, bandeja, tambor y granuladores mezcladores. Preferiblemente, la agitación es continua.

En principio la invención también abarca procedimientos de granulación de baja cizalladura o alta cizalladura. Los procedimientos de granulación de baja cizalladura usan equipos de mezclado muy sencillos, y pueden tardar un tiempo considerable en lograr un estado mezclado de manera uniforme. Los procedimientos de granulación en húmedo de alta cizalladura usan equipos que mezclan la alimentación sólida particulada y líquido a una tasa muy rápida, y por tanto aceleran el procedimiento de fabricación. Sin embargo, normalmente la cantidad de líquido que puede mezclarse con portadores sólidos en procedimientos de granulación de baja o alta cizalladura, sin provocar que los portadores sólidos se disuelvan o disgreguen, es limitada. Se añaden dominios variables individuales de inmunoglobulina al portador sólido en un estado líquido. La concentración máxima de dominios variables individuales de inmunoglobulina en líquidos es limitada. La limitación del volumen de líquido total que puede añadirse por unidad de portador, junto con la limitación de la concentración máxima de dominios variables individuales de inmunoglobulina, da como resultado una limitación de la carga de agente activo que puede lograrse en el granulado final mediante tales procedimientos de granulación en húmedo. Por tanto, para aplicaciones farmacéuticas importantes el uso de tales procedimientos se ve rigurosamente limitado, en la medida en que no pueden lograrse las cargas requeridas.

Otro método convencional preferible de producción de formulaciones sólidas de fármacos de molécula pequeña implica el uso de aparatos de lecho fluidizado para granular y/o recubrir partículas de portador. En comparación con los procedimientos de granulación en húmedo anteriormente mencionados, el agente activo puede añadirse, por ejemplo pulverizarse, sobre un material portador de manera continua, mientras que al mismo tiempo se evapora líquido de manera continua mediante exposición a calor. Equilibrando la introducción de líquido y la evaporación, se evita la disgregación del material portador mediante líquido en exceso. La adición continua de agente activo permite el control sobre la carga de la formulación sólida final (granulado o perla recubierta) ajustando el tiempo de procedimiento. Cuando más tiempo se aplica el agente activo, más altas son las cargas en la formulación sólida final.

Este método se ha aplicado a péptidos muy pequeños, tales como insulina (Hosny *et al.* 2002; *Int. J. Pharm.* 237(1-2): 71-6). Sin embargo, en un procedimiento de granulación o de recubrimiento en lecho fluidizado, se expone el agente activo a calor en un estado líquido a lo largo de periodos de tiempo prolongados, por ejemplo de 30-90 min. Además, la agitación continua de las partículas de portador conduce a una intensa tensión de cizalladura en el lecho fluidizado, así como áreas de superficie de contacto muy grandes entre fase líquida y gaseosa. Anteriormente se ha considerado que esta exposición prolongada a calor en un estado líquido en condiciones de tensión de cizalladura era inadecuada para producir formulaciones de inmunoglobulina en estado sólido. Se esperaba que condujera a pérdida de actividad biológica debido a inestabilidad química y física.

Por tanto, en una realización adicional preferida de la invención, el método de granulación en húmedo es un procedimiento de granulación en lecho fluido. La granulación en lecho fluido es un procedimiento de granulación en húmedo, en el que las etapas de calentamiento previo, granulación y secado pueden realizarse en un recipiente de procedimiento.

“Lecho fluido” y “lecho fluidizado” se usan como sinónimos. Estos términos describen un estado en el que se agita materia sólida particulada para que se comporte como un líquido. Puede lograrse, por ejemplo, mediante una corriente de gas, que suspende la materia sólida particulada. La corriente de gas también se denomina “medio de fluidización”.

En lechos fluidizados, hay un buen transporte térmico dentro del lecho fluidizado y buena transferencia de calor entre el lecho y su envase. Los lechos fluidizados fomentan altos niveles de contacto entre gases y sólidos. Se caracterizan por un área de superficie de contacto muy alta entre el medio de fluidización y el sólido por unidad de volumen de lecho, una velocidad relativa alta entre el medio de fluidización y la fase sólida dispersada, un alto nivel de entremezclado de la fase particulada, y colisiones frecuentes partícula-partícula y partícula-pared.

Por tanto, en esta realización de la invención, se producen granulos, por ejemplo, en un único equipo mediante pulverización de una disolución sobre un lecho fluidizado de portador sólido, por ejemplo un polvo. En el procedimiento de granulación en lecho fluido se suspenden las partículas en la corriente de aire, que puede calentarse hasta una temperatura adecuada para evaporar el líquido, y se pulveriza el líquido atomizado sobre el mismo.

También se observa que la presente invención es distinta del secado por pulverización-congelación. En un procedimiento de este tipo, se disuelve el fármaco de proteína. Se nebuliza la disolución en un medio criogénico (por ejemplo, nitrógeno líquido), lo que genera una dispersión de gotitas congeladas de manera inmediata. Después se seca la dispersión en un liofilizador. Por tanto, en realizaciones de la invención, se excluyen procedimientos basados en el secado por pulverización-congelación en un lecho fluidizado, entre otras cosas porque funcionan a temperaturas muy bajas y no usan la aplicación de calor.

b) Procedimientos de recubrimiento

Aparte de procedimientos de granulación en húmedo, que se basan en la aglomeración de partículas bajo la influencia de un líquido que comprende los dominios variables individuales de inmunoglobulina, la presente invención también abarca procedimientos de recubrimiento.

Se pone un portador sólido particulado en contacto con un líquido, que comprende dominios variables individuales de inmunoglobulina para formar una capa exterior, o recubrimiento, alrededor del portador sólido particulado. El experto puede seleccionar fácilmente portadores adecuados y, si se requiere, excipientes adicionales adecuados para un procedimiento de recubrimiento. Además, el experto conoce equipos convencionales usados para procedimientos de recubrimiento. El experto también conoce parámetros de procedimiento a partir de procedimientos de recubrimiento convencionales, y puede encontrarse orientación adicional en la sección experimental de la descripción.

La invención puede realizarse usando portadores sólidos comúnmente conocidos que se usan ampliamente en procedimientos de recubrimiento. Normalmente, se seleccionan portadores sólidos particulados de polvos y perlas. Pueden ser en particular perlas de tipo nonpareil inertes, más en particular perlas seleccionadas de uno o más de celulosa microcristalina, sacarosa o mezclas de las mismas.

En una realización preferida de la invención, el procedimiento de recubrimiento es un procedimiento de recubrimiento en lecho fluido. Se forma un lecho fluido tal como se describió anteriormente, y se aplica el líquido que comprende el agente activo, por ejemplo se pulveriza, sobre el lecho fluido de tal manera que se recubre el portador sólido particulado. De nuevo, la dirección de pulverización puede variar dependiendo de los equipos usados, y el experto puede adaptar fácilmente los parámetros.

c) Parámetros comunes

La presente invención combina el agente activo en un estado líquido con calor y agitación. En general, pueden usarse parámetros de procedimiento habitualmente usados en procedimientos de granulación en húmedo o de recubrimiento, siempre que no conduzcan a la inactivación de los dominios variables individuales de inmunoglobulina. El experto conoce bien parámetros de procedimiento tales como la tasa de alimentación de portadores particulados sólidos, la tasa de pulverización del líquido que comprende dominios variables individuales de inmunoglobulina, la intensidad de agitación necesaria, y el nivel de exposición a calor requerido para evaporar el líquido. Puede obtenerse orientación adicional a partir de la sección experimental.

El calentamiento tiene el efecto de evaporar el líquido, de tal manera que se forma una formulación sólida que

- comprende dominios variables individuales de inmunoglobulina. Puede aplicarse calor mediante cualquier medio disponible para el experto, por ejemplo calentando el recipiente de reacción, aplicando radiación tal como microondas, o aplicando una corriente de gas calentada. En una realización preferida, la mezcla de portador sólido particulado y líquido que comprende dominios variables individuales de inmunoglobulina se pone en contacto con una corriente de gas calentada, por ejemplo aire calentado, para evaporar el líquido.
- Tal como se describió anteriormente, en las realizaciones de la invención que comprenden un lecho fluido, normalmente se aplica una corriente de gas para generar el lecho fluido. En estos casos, también puede usarse la corriente de gas para aplicar calor. Esto no excluye maneras adicionales de aplicar calor, por ejemplo mediante radiación adicional, calentamiento de las paredes de recipiente o corrientes de gas adicionales que no participan en la formación del lecho fluido. En una realización a modo de ejemplo, se forma un lecho fluido mediante una corriente de gas que se dirige de una manera apropiada al interior del recipiente de reacción. Se calientan las paredes de recipiente así como la corriente de gas.
- El gas que se usa para formar la corriente de gas, para formar el lecho fluido y/o aplicar calor no está limitado. El experto conoce muchos gases alternativos que son compatibles con los materiales y agentes activos usados en el procedimiento, incluyendo gases inertes tales como nitrógeno o gases nobles, y aire. En una realización preferida el gas es aire.
- Los métodos de la invención pueden usarse a lo largo de un amplio intervalo de temperatura, sin embargo, tienen en común que se realizan a una temperatura elevada, es decir se aplica calor. Temperaturas superiores a 30 °C, más en particular superiores a 35 °C \pm 2 °C, por ejemplo 38 °C, 39 °C o 40 °C pueden considerarse como calor. Más específicamente, por ejemplo, las temperaturas del material portador sólido puesto en contacto con un líquido que comprende un dominio variable individual de inmunoglobulina como agente activo, es decir las temperaturas de producto, oscilan entre 40 °C y 80 °C, por ejemplo 50 °C, 60 °C, 70 °C, más específicamente entre 40 °C y 70 °C, preferiblemente entre 40 °C y 60 °C, más preferiblemente entre 40 °C y 55 °C, por ejemplo entre 45 °C y 55 °C. En una realización la temperatura de producto es superior a 50 °C (independientemente del contenido en humedad), por ejemplo superior a 51 °C, 52 °C, 53 °C o 54 °C, y puede estar en un intervalo con un límite superior tal como se definió anteriormente.
- Específicamente, estos valores de temperatura se refieren a temperaturas de producto que generalmente serán inferiores a la temperatura, por ejemplo, de una corriente de gas calentada aplicada a la mezcla. La temperatura de la corriente de gas calentada también se denomina "temperatura de entrada", distinta de la "temperatura de producto", y la "temperatura de salida". La temperatura de salida se refiere a la temperatura del gas que sale del recipiente de reacción. La temperatura de producto es normalmente inferior a la temperatura de entrada, por ejemplo debido al efecto de enfriamiento de la evaporación del líquido. En realizaciones particulares, la temperatura de entrada será de 5 °C -30 °C superior a la temperatura de producto tal como se especificó anteriormente, por ejemplo 5 °C, 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C o 30 °C superior, en la que cada valor se refiere opcionalmente a un intervalo de \pm 2 °C. Por ejemplo, la temperatura de entrada puede ser superior a 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C o 75 °C.
- Se ha encontrado sorprendentemente que los dominios variables individuales de inmunoglobulina pueden resistir altas temperaturas durante los procedimientos de la invención, a pesar de estar en estado líquido. Informes anteriores relacionados con proteínas que no son dominios variables individuales de inmunoglobulina han indicado al experto no usar temperaturas de producto superiores a 35 °C (tal como se muestra a modo de ejemplo en el documento US 6.596.318). No obstante, los procedimientos particularmente suaves de la invención usan ventajosamente las menores temperaturas compatibles con tiempos de procedimiento adecuados. Cuanto menor es la temperatura, más tardará la evaporación del líquido. Esto a su vez puede aumentar el nivel de tensión física y química del procedimiento, por ejemplo la duración de exposición a tensión de cizalladura aumentará.
- El experto puede obtener orientación general sobre temperaturas de producto adecuadas a partir de la temperatura de fusión T_f de los dominios variables individuales de inmunoglobulina y preferiblemente trabajará a temperaturas de producto que no superan T_f , por ejemplo que están de 1 a 5 o de 1 a 10 °C por debajo de T_f , por ejemplo 1 °C, 2 °C, 3 °C, 4 °C o 5 °C por debajo de T_f . Sin embargo, alternativamente la invención también contempla realizaciones en las que las temperaturas de producto superan T_f , por ejemplo en por ejemplo 1 °C, 2 °C, 3 °C, 4 °C o 5 °C.
- La presente invención se refiere en particular a procedimientos realizados a presión atmosférica, es decir sin reducir la presión dentro del recipiente de reacción para promover la evaporación del líquido, tal como se describe por ejemplo en el documento DE 4441167.
- Se ha encontrado sorprendentemente que los dominios variables individuales de inmunoglobulina pueden resistir la combinación de calor en un estado líquido, alta cizalladura provocada por agitación y las áreas de superficie de contacto grandes simultáneas entre fase líquida y gaseosa durante periodos de tiempo prolongados. Dicho de otro modo, no se requiere la evaporación ultrarrápida del líquido que comprende dominios variables individuales de inmunoglobulina. Por tanto, en cualquiera de los métodos de la presente invención se agita el material portador sólido y se pone en contacto con un líquido que comprende un dominio variable individual de inmunoglobulina y simultáneamente se aplica calor para evaporar el líquido durante, por ejemplo, al menos 15 min, por ejemplo al

menos 20 min, al menos 30 min, al menos 40 min, al menos 50 min. Este intervalo de tiempo describe el tiempo entre el comienzo de la aplicación del líquido al material portador sólido bajo la influencia de calor, hasta que se evapora líquido suficiente de modo que ya no tiene que aplicarse calor. El tiempo de procedimiento estará regido normalmente por el tiempo requerido para reducir el contenido en líquido en la formulación hasta un nivel aceptable, tal como se definió anteriormente. Este tiempo también dependerá del tamaño de lote, que determina el tiempo necesario para la granulación. Por tanto, este intervalo de tiempo puede comprender una fase en la que se aplica líquido que comprende los dominios variables individuales de inmunoglobulina, y un intervalo de tiempo en el que se detiene esta aplicación, pero se continúa la exposición a calor hasta que se logra un nivel de líquido deseado. El contenido en líquido de formulaciones sólidas es normalmente tal como se definió anteriormente, es decir las formulaciones están secas o esencialmente secas.

El líquido que comprende los dominios variables individuales de inmunoglobulina no está limitado, siempre que no ponga en peligro la actividad de los dominios variables individuales de inmunoglobulina. Los ejemplos adecuados incluyen agua y tampones convencionales. El agua, en particular agua desmineralizada, es preferible, dado que no conduce a materia particulada adicional, tal como cristales de sal, cuando se evapora. Tal como se detalló anteriormente, la concentración de sal del líquido es preferiblemente, por ejemplo, inferior al 10 % p/p, y/o inferior a 10 mM. En realizaciones de la invención se excluye el uso de una "matriz de proteínas" que es una mezcla de una o más proteínas y una sal a una alta concentración, por ejemplo, una concentración de sal de entre el 63,7 y el 85,3 % basándose en sólidos secos. En realizaciones de la invención se excluye una matriz de proteínas (es decir, una mezcla de proteínas/sal) que contribuye a aproximadamente el 20-80 % del peso de gránulo final.

Específicamente, la invención se refiere a métodos que no usan un líquido, que comprende dominios variables individuales de inmunoglobulina, como suspensión de proteína agregada. Se sabe que determinadas enzimas resisten la agregación y pueden formularse en concentraciones de sal muy altas, por ejemplo superiores al 60 % del peso seco total de sal (documento US 6.423.517). En cambio, la actividad de dominios variables individuales de inmunoglobulina se ve comprometida mediante agregación o altas concentraciones de sal. Además, agregados y/o altas concentraciones de sal no son aceptables para preparaciones farmacéuticas.

Los métodos según cualquier aspecto de la presente invención también pueden comprender etapas adicionales habitualmente empleadas en la producción de formulaciones sólidas, por ejemplo formulaciones farmacéuticas sólidas. Por ejemplo, los procedimientos de la presente invención pueden comprender además una o más etapas de fabricación de un comprimido, cápsula o implante. La invención también se refiere a la producción de preparaciones farmacéuticas que comprenden la formulación sólida tal como se describe en la solicitud. La formulación farmacéutica no está limitada, y normalmente es un comprimido, cápsula o implante, es decir una formulación farmacéutica sólida.

En vista de lo anterior, una de las ventajas de la presente invención es que pueden prepararse formulaciones sólidas que comprenden dominios variables individuales de inmunoglobulina usando equipos convencionales, componentes convencionales y parámetros de procedimiento convencionales ampliamente usados, por ejemplo, en el campo farmacéutico. Por tanto, la gran cantidad de saber hacer e infraestructura disponibles para la fabricación de formulaciones sólidas puede aplicarse a la formulación de dominios variables individuales de inmunoglobulina, que no era posible antes de la presente invención.

Las formulaciones

La presente solicitud también describe las formulaciones sólidas en sí mismas. Anteriormente no se consideraba posible preparar formulaciones sólidas que pueden obtenerse mediante los métodos de la presente invención. Por ejemplo, las formulaciones sólidas que pueden obtenerse mediante procedimientos de granulación en húmedo son física y químicamente distintas de formulaciones que pueden obtenerse mediante secado por pulverización o liofilización. Lo mismo se aplica a preparaciones farmacéuticas que comprenden las formulaciones sólidas que pueden obtenerse mediante los métodos de la presente invención.

Por tanto, la presente invención hace que las múltiples ventajas de formulaciones sólidas estén disponibles para dominios variables individuales de inmunoglobulina como clase de agentes activos. Estas ventajas incluyen la movilidad restringida de dominios variables individuales de inmunoglobulina y la estabilidad mejorada. Sin embargo, el procedimiento de producción en sí mismo también confiere propiedades ventajosas, tales como control del tamaño de partícula, carga y amplia gama de propiedades de las formulaciones sólidas, dependiendo de las sustancias, tales como excipientes, usadas para su producción. Por ejemplo, la presente invención puede usarse para preparar formulaciones de liberación controlada o enmascaramiento de sabor.

La granulación tiene, entre otras cosas, el efecto de mejorar las propiedades de flujo de polvo y reducir el polvo fino mediante aumento del tamaño y densificación, mejorando por tanto las operaciones de llenado de cápsulas y formación de comprimidos. Además, un agente activo se adhiere físicamente al material portador, de tal manera que el portador y el agente activo pueden manipularse en conjunto. Esto impide que los diversos componentes se separen, y también impide problemas mecánicos y físicos que pueden estar asociados, por ejemplo, con un precipitado de proteína pegajoso tal como se obtiene mediante liofilización o secado por pulverización. Estas

ventajas las comparten los procedimientos de recubrimiento.

Además, los aparatos de lecho fluidizado ofrecen ventajas tales como mezclado de partículas uniforme, gradientes de temperatura uniformes, y flexibilidad para funcionar en procedimiento de producción discontinuo y continuo. Adicionalmente, el aparato de lecho fluidizado proporciona una opción para combinar diversas etapas de formulación tales como secado, granulación y recubrimiento en una única etapa.

A la inversa, los métodos o formulaciones conocidos no proporcionan estas ventajas. Por ejemplo, el secado por congelación (liofilización) da como resultado una "torta" en vez de gránulos o perlas. La torta no muestra las propiedades de flujo de gránulos o perlas recubiertas. Por estos motivos, la formulación sólida que puede obtenerse mediante liofilización no es adecuada para la preparación de comprimidos o cápsulas mediante procedimientos industriales convencionales. Se requieren operaciones adicionales complejas (tales como molienda), que aumentan los costes para el procedimiento global, y además pueden ser perjudiciales para los dominios variables individuales de inmunoglobulina. En cuanto al secado por pulverización, los parámetros de procedimiento son mucho más difíciles de controlar para obtener gránulos adecuados.

Aparte de estas ventajas, las formulaciones sólidas también pueden facilitar nuevas vías de administración. Por ejemplo, el documento WO 2005/067898 describe la inhalación como nueva vía de administración. También están usándose inyecciones sin agujas como vía de administración (véase por ejemplo el documento WO 2011/098518). El documento WO 2004/041867 describe, entre otras cosas, la administración oral de dominios variables individuales de inmunoglobulina.

Ejemplos

A continuación se describe la presente invención en más detalle proporcionando realizaciones a modo de ejemplo específicas.

1 Ejemplo 1: Granulación en lecho fluido

1.1 Materiales y métodos

1.1.1 Dominio variable individual de inmunoglobulina

Como ejemplo específico de un dominio variable individual de inmunoglobulina, se usó el Nanobody que tiene la siguiente secuencia:

EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGITFSINTMGWYRQAPGKQRELVALISSIGDYYADSVKGRFTISRDNKNT

VYLQMNSLKPEDTAVYYCKRFRTAAQGTDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 1)

1.1.2 Procedimiento de granulación en húmedo

Se aplicó un procedimiento de granulación en lecho fluido con pulverización desde la parte superior usando un lecho fluido 4M8-Trix con un diámetro superior pequeño equipado con un elemento de inserción de 1 l.

El tamaño de lote inicial era de 50 g. Se usó manitol con un tamaño de partícula de aproximadamente 250 µm (Pearlitol 300 DC). Se usó la disolución de Nanobody como líquido de granulación. Específicamente, se usó una disolución de Nanobody 5F7 (véase el documento WO 09/068625, SEQ ID NO. 2112) a una concentración de 29,3 mg/ml en agua como líquido de granulación.

Se seleccionó como objetivo una carga de Nanobody del 7,1 % (p/p). Se alimentó la disolución a una boquilla de dos fluidos (diámetro de 0,2 mm) por medio de una bomba peristáltica.

Se aumentaron ligeramente la tasa de pulverización y el volumen de aire de entrada durante el procedimiento. Al final del procedimiento de granulación se enfrió el material granulado hasta temperatura ambiente y se transfirió a un vial de vidrio de color ámbar. Se almacenó el vial a 5 °C. Se calculó el rendimiento de procedimiento como la cantidad de granulado recogida en el depósito dividida entre la cantidad teórica de sólidos usada en la formulación.

Los parámetros de procedimiento se indican en la tabla 1. La composición del granulado se muestra en la tabla 2.

Tabla 1: Condiciones del procedimiento de granulación en lecho fluido

Parámetro de procedimiento	Valor objetivo
Volumen de aire de entrada (m ³ /h)	0,11 - 0,55
Temperatura de aire de entrada (°C)	50 - 65

Temperatura de aire de salida (°C)	36 - 43
Temperatura de producto (°C)	42 - 55
Tasa de pulverización (ml/min)	3-7
Presión de aire de pulverización (bar)	1
Flujo de aire de pulverización (l/min)	4
Tiempo de procedimiento (s)	2954

Tabla 2: Composición del granulado (calculada)

Material	Cantidad (g/lote)
Disolución de Nanobody 5F7 (sólida)	3,821
Disolución en agua de Nanobody 5F7*	130,259
Manitol	50,00
*No aparece en el producto final	

5 1.1.3 Métodos analíticos

Preparación de muestras

10 Se pesaron aproximadamente 30 mg del granulado de Nanobody 5F7/manitol en una balanza analítica y se solubilizaron en aproximadamente 200 µl de agua MilliQ, con el fin de tener una concentración teórica de 5F7 en disolución de aproximadamente 10 mg/ml. Se agitó la muestra con vórtex hasta que se obtuvo la completa disolución.

Mediciones de contenido

15 Para determinar la concentración de Nanobody 5F7 en disolución, se midieron la DO280 y DO320. Se realizaron ajuste de blanco y dilución de las muestras en agua MilliQ (1/20). Se prepararon diluciones por triplicado.

Ensayo de pureza (integridad física) de los Nanobody mediante cromatografía de líquidos de alta resolución de extrusión molecular (SE-HPLC)

20 Para el ensayo de SE-HPLC se usó una columna G2000SW_{XL} de gel de sílice TSK preempaquetada (Tosoh Bioscience) equipada con un filtro de precolumna. La fase móvil estaba compuesta por arginina 0,3 M, Na₂HPO₄·7H₂O 3,25 mM, NaH₂PO₄·H₂O 6,75 mM y NaN₃ al 0,005 % a pH 6. Se realizó detección UV a 280 nm. Se expresó la cantidad relativa de pureza de proteína como % en área, y se calculó dividiendo el área de pico entre el área integrada total.

30 Se diluyeron las muestras hasta 1 mg/ml en agua MilliQ antes de la inyección en la columna de SEC y se inyectaron 10 µl (que correspondían teóricamente a 10 µg).

Ensayo de pureza (integridad química) y cuantificación de los Nanobody mediante cromatografía de líquidos de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC o RPC)

35 En el ensayo de RP-HPLC se usó una columna Zorbax 300SB-C3 (Agilent Technologies, Palo Alto, EE. UU.). Se determinó la cantidad de la proteína midiendo la absorbancia de luz de los componentes que eluían de la columna de RP-HPLC y comparando con una muestra de referencia. Se confirmó la identidad de los Nanobody comparando el tiempo de elución relativo a partir de la columna de RP-HPLC. Se expresó la cantidad relativa de pureza de proteína como % en área, y se calculó dividiendo el área de pico entre el área integrada total (pico principal + impurezas).

40 Se diluyeron las muestras hasta 1 mg/ml en agua MilliQ antes de la inyección en la columna de RPC y se inyectaron 10 µl (que correspondían teóricamente a 10 µg).

Pruebas de funcionalidad de 5F7 mediante resonancia de plasmón superficial (Biacore)

45 Se determinó la funcionalidad de material formulado con 5F7 mediante un ensayo de funcionalidad con rhErbB2Fc (Her2; R&D Systems, Mineápolis, MN) para determinar la actividad en porcentaje en la formulación en comparación con una muestra de 5F7 de referencia tal como se describió anteriormente (véase por ejemplo el ejemplo 10 del documento WO 09/068625).

50 En resumen, se usó un instrumento Biacore 3000. Se inmovilizó rhErbB2Fc (Her2) sobre un chip (CM5). En primer lugar se acondicionó previamente el chip mediante 5 inyecciones de 5F7 5 nM. A continuación se diluyeron las muestras por triplicado (diluciones independientes) hasta 5 nM y se analizaron en el chip.

Se realizó la evaluación usando el software BIAevaluation. Se determinaron las pendientes usando el método de "ajuste general" y el modelo de ajuste lineal. Para determinar la tasa de unión inicial (IBR) se seleccionó la pendiente de la línea de regresión lineal entre 5 s y 30 s. A partir de esta pendiente se calculó la funcionalidad como la razón de la pendiente de la muestra frente a la pendiente del material de referencia.

5

Determinación del contenido en agua mediante valoración de Karl Fischer

Se determinó el contenido en agua por medio de un dispositivo de valoración de Karl Fischer V30 (Mettler Toledo, EE. UU.). Se pesó polvo y se transfirió al recipiente de valoración, que contenía metanol seco de Hydranal® (Sigma Aldrich) y se agitó durante 300 segundos. Se realizó la valoración con Hydranal®Composite 2 (Sigma Aldrich).

10

Determinación del contenido en agua mediante pérdida por desecación (LOD)

Se determinó el contenido en disolvente residual total con un analizador de humedad de halógeno HR83P (Mettler Toledo, EE. UU.). Se colocó aproximadamente 1 g de muestra en una bandeja de muestra de aluminio. Se secó la muestra durante 15 minutos a una temperatura constante de 105 °C. Se monitorizó el peso de muestra y se registró la pérdida de peso expresada en % con un intervalo de 1 min.

15

Determinación de la densidad aparente y de compactación

Se usó un medidor de volumen (J. Engelsmann AG, Ludwigshafen, Alemania). Se añadieron de manera suave aproximadamente 40 g del granulado a un tubo graduado de 100 ml. Se registró el volumen tras 0, 10 y 500 golpecitos.

20

1.2 Resultados y discusión

25

La granulación en lecho fluido de un Nanobody con manitol como portador dio como resultado polvo de flujo libre con una carga de Nanobody del 4,7 %. Se conservaron la funcionalidad así como la integridad física y química tras la granulación. El material era estable tras almacenamiento durante 3 meses a 4 °C.

30

Estas conclusiones se respaldan adicionalmente por los siguientes resultados detallados.

1.2.1 Contenido

La carga teórica de 5F7 era del 7,1 % p/p. Las medidas de DO indicaron una carga real del 4,7 % (tabla 3).

35

Este resultado indica que, usando parámetros de procedimiento convencionales para granulación en lecho fluidizado, puede lograrse una carga satisfactoria de los gránulos con agente activo (Nanobody).

Tabla 3: Resultados de cuantificación para granulado a t = 0 y tras 3 meses de almacenamiento a 4 °C

40

Punto de tiempo	Conc. promedio (mg/ml, n = 3)	Carga de 5F7 en el granulado (p/p)
T = 0	7,25 ± 0,07	4,7 %
T = 3 meses	6,70 ± 0,01	4,5 %

Tras 3 meses de almacenamiento a 4 °C de la muestra granulada de 5F7/manitol, todavía se midió aproximadamente el 96 % del contenido inicial (tabla 3).

45

Este resultado indica que un granulado que comprende Nanobody muestra una estabilidad en almacenamiento satisfactoria a lo largo de varios meses, por ejemplo 3 meses, a una temperatura de almacenamiento adecuada, por ejemplo 4 °C.

1.2.2 Datos de SEC

50

Se analizaron cromatogramas de SEC de la referencia de 5F7 y el material granulado de 5F7, comparando los picos característicos tal como se indica en la tabla 4 de Nanobody de referencia mantenido en disolución y el Nanobody granulado. Los datos de SEC mostraron un pequeño aumento desde el 0,1 hasta el 0,7 % del segundo pico previo tras la granulación (t = 0, tabla 4).

55

Tabla 4: Resultados de SEC para granulado a t = 0 y tras 3 meses de almacenamiento a 4 °C, en comparación con Nanobody de referencia a t = 0

	área en % de lote de ref. de 5F7	área en % de granulado, t = 0	área en % de granulado, t = 3 m
Pico previo 1	0,1	0,1	0,2

Pico previo 2	0,1	0,7	1,2
Pico previo 3	0,2	0,2	0,2
Pico principal	99,7	99,0	98,4

Tras 3 meses de almacenamiento a 4 °C de la muestra granulada de 5F7/manitol, los datos de SEC mostraron un aumento adicional del % de picos previos hasta el 1,6 % (tabla 4).

5 Estos datos proporcionan evidencias de que el procedimiento de granulación no influye negativamente en la integridad física de Nanobody, en particular con respecto a la formación de aglomerados o cualquier otra forma de derivados de alto peso molecular.

1.2.3 Datos de RPC

10 La disolución de referencia de 5F7 y el material granulado de 5F7 mostraron cromatogramas de RPC comparables en el punto de tiempo de referencia $t = 0$. Además, tras 3 meses de almacenamiento a 4 °C, no se observó ningún cambio significativo en RPC en comparación con la referencia a $t = 0$.

15 Estos datos proporcionan evidencias de que los Nanobody no se ven negativamente afectados en cuanto a la estabilidad química por el procedimiento de granulación. En particular, los datos de RPC permiten la conclusión de que no hay un aumento de la aparición de especies de Nanobody químicamente modificadas en comparación con una disolución de referencia.

20 1.2.4 Datos de funcionalidad

Se preparó una muestra de prueba al 80 % (4 nM) y al 120 % (6 nM) con el material de 5F7 de referencia. Se determinó la funcionalidad y se comparó con la muestra de 5F7 al 100 % (5 nM). Tal como se muestra en la tabla 5, las actividades calculadas fueron del 75,9 % y el 116,2 % respectivamente.

25 Tabla 5: QC del ensayo de funcionalidad (preparaciones de referencia)

Muestra	Pendiente promedio (RU/s) ($n = 3$)	% de actividad en comparación con la ref.
Ref. de 5F7 5 nM	1,89	100,0
Ref. de 5F7 4 nM	1,44	75,9
Ref. de 5F7 6 nM	2,20	116,2
Ref. de 5F7 5 nM	1,89	99,6

30 La referencia de disolución de 5F7 5 nM que se inyectó al comienzo del experimento volvió a analizarse al final del experimento y se observó una funcionalidad del 99,6 % (tabla 5), indicando que el chip se mantuvo estable durante el experimento.

Tabla 6: Concentración de 5F7 funcional en el granulado a $t = 0$ y tras 3 meses de almacenamiento a 4 °C

Muestra	Pendiente promedio (RU/s) ($n=3$)	% de actividad en comparación con la ref.
Granulado de 5F7 5 nM, $t = 0$	1,82	96,0
Granulado de 5F7 5 nM, $t = 3$ meses	1,59	90,9

35 En la tabla 6 se muestran los resultados de funcionalidad de las muestras de granulado, calculados frente a la preparación de referencia (disolución de Nanobody, sin granulación).

40 La actividad de la muestra granulada de 5F7/manitol (96 %) era comparable a la muestra de referencia. No se detectó ningún cambio significativo en la funcionalidad tras la granulación en húmedo y tras el almacenamiento de granulado durante 3 meses a 4 °C.

Estos datos proporcionan evidencias de que los Nanobody pueden granularse en un procedimiento en lecho fluidizado convencional sin experimentar ninguna pérdida de función significativa.

45 1.2.5 Caracterización de granulado

En la tabla 7 se notifican los resultados de contenido en agua y densidad.

50 Tabla 7: Contenido en agua y densidades de 5F7 granulado

Contenido en agua (% p/p)	0,69
---------------------------	------

Densidad aparente (g/ml)	0,67
Densidad de compactación (500 golpecitos) (g/ml)	0,72

La densidad del granulado era comparable a la densidad del material de partida que se usó como portador (Pearlitol, 0,70-0,76 g/ml).

5 2 Ejemplo 2: Granulación en lecho fluido haciendo uso de diferentes portadores y aglutinantes

Debido a los resultados positivos inesperados del primer experimento de granulación, se expandió el experimento de granulación usando dos portadores diferentes: manitol (MAN) (Pearlitol 300 DC; Roquette, Lestrem, Francia) y lactosa (LAC) (SuperTab 11SD; MV-Fonterra).

10 Se expandió adicionalmente el experimento de granulación usando dos aglutinantes diferentes: polivinilpirrolidona (PVP) (Kollidon K30, BASF) e hidroxipropilcelulosa (HPC) (Klucel EF Pharm, Ashland Aqualon).

15 2.1 Materiales y métodos

2.1.1 Dominio variable individual de inmunoglobulina

Volvió a seleccionarse el Nanobody usado en el ejemplo 1 para el desarrollo de la formulación mediante granulación.

20 2.1.2 Procedimiento de granulación en húmedo

Se usó una disolución de Nanobody a una concentración de 29,3 mg/ml en agua como líquido de granulación. Para la preparación de la disolución de aglutinante, se añadió la disolución de Nanobody a un vaso de precipitados de vidrio. Se añadió el aglutinante mientras se agitaba usando un agitador magnético hasta que se disolvió completamente. Se aplicó una concentración de aglutinante del 2,2 % p/p para diseños con HPC y del 6,2 % p/p para diseños con PVP. En la tabla 15 se facilita la composición cualitativa y cuantitativa de los diseños de gránulo. Se aplicó una carga de Nanobody del 8,0 %.

Tabla 15: Composición de diseños de gránulo

Diseño	LAC/HPC		LAC/PVP		MAN/HPC		MAN/PVP	
	g	%	g	%	g	%	g	%
Manitol	-	-	-	-	50,04	85,5	50,01	72,4
Lactosa	49,98	85,5	50,01	72,4	-	-	-	-
PVP	-	-	13,50	19,60	-	-	13,51	19,6
HPC	3,81	6,5	-	-	3,80	6,5	-	-
Nanobody	4,69	8,0	5,53	8,0	4,68	8,0	5,52	8,0

Se pulverizó esta disolución sobre el polvo de portador (manitol o lactosa) en un procedimiento de granulación en lecho fluido. Se usó un instrumento Mycrolab (Hüttlin GmbH, Schopfheim, Alemania) con un elemento de inserción de 3,8 l y con configuración de pulverización desde la parte inferior. Se alimentó la disolución a una boquilla de dos fluidos (diámetro: 0,6 mm) por medio de una bomba peristáltica, tipo 323 (Watson Marlow, Cornwall, R.U.).

Los parámetros de procedimiento se indican en la tabla 16. Se aumentó ligeramente la tasa de pulverización durante el procedimiento. Tras la granulación, se apagaron la bomba y el calentador de aire y se secaron los gránulos durante poco tiempo.

40 Tabla 16: Condiciones de procedimiento de granulación en lecho fluido

Parámetro de procedimiento	LAC/HPC	LAC/PVP	MAN/HPC	MAN/PVP
Volumen de aire de entrada (m ³ /h)	13	13	17	17
Temperatura de aire de entrada (°C)	59-60	56-60	54-56	55
Temperatura de producto (°C)	36-47	35-47	36-45	37-44
Tasa de pulverización (ml/min)	2,4	2,5	2,4	2,5
Presión de aire de pulverización (bar)	0,4	0,4	0,4	0,4
Presión de microclima (bar)	0,5	0,5	0,5	0,5
Tiempo de pulverización (min)	75	91	74	90
Presión de soplado de filtro de producto (bar)	0,8	0,8	0,8	0,8
Intervalo presión de soplado de filtro de producto (s)	9	9	9	9

Tras el procedimiento, se enfrió el polvo hasta temperatura ambiente y se transfirió a viales de vidrio de color ámbar. Se calculó el rendimiento de procedimiento como la cantidad de polvo recogida en el depósito dividida entre la

cantidad teórica de material seco dosificado por preparación. Se almacenaron los viales a 5 °C. Tras la granulación se secó posteriormente el polvo en un horno de vacío para eliminar la humedad residual.

2.1.3 Métodos analíticos

5

Preparación de muestras y medición del contenido

Se llevaron a cabo la preparación de muestras y mediciones del contenido tal como se describió en el ejemplo 1. Para la determinación de la concentración de proteína, también se determinó la absorbancia a 500 nm (A500). Una alta absorbancia a 500 nm es una indicación de la formación de variantes de alto peso molecular.

10

Ensayo de pureza (integridad física) de los Nanobody mediante cromatografía de líquidos de alta resolución de extrusión molecular (SE-HPLC)

15

Se realizó SE-HPLC con un instrumento H-Class Bio (Waters) con detector de DAD. Se diluyeron las muestras hasta 1 mg/ml en agua MilliQ antes de la inyección en la columna de RPC.

20

Se analizaron muestras de la disolución de alimentación, de los gránulos antes del secado posterior y de los gránulos después del secado posterior. Se expresó la cantidad relativa de pureza de proteína como % en área, y se calculó dividiendo el área de pico entre el área integrada total (pico principal + impurezas).

Ensayo de pureza (integridad química) y cuantificación de los Nanobody mediante cromatografía de líquidos de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC, o RPC)

25

Se realizó RP-HPLC con un instrumento H-Class (Waters) con detector de TUV. Se diluyeron las muestras hasta 1 mg/ml en agua MilliQ antes de la inyección en la columna de RPC.

30

Se analizaron muestras de la disolución de alimentación, de los gránulos antes del secado posterior y de los gránulos después del secado posterior. Se expresó la cantidad relativa de pureza de proteína como % en área, y se calculó dividiendo el área de pico entre el área integrada total (pico principal + impurezas).

2.2 Resultados

2.2.1 Rendimiento y contenido

35

Se obtuvo un polvo de flujo libre para todos los diseños. En la tabla 17 se indican los resultados de rendimiento de procedimiento y contenido en agua antes y después del procedimiento de secado posterior. Tal como se indica en la tabla 17, el rendimiento de procedimiento era del 88 % p/p o superior.

40

Tras la granulación, los diseños con PVP como aglutinante tenían un contenido en agua superior en comparación con los diseños con HPC. La diferencia desapareció mediante secado posterior del polvo en un procedimiento de secado a vacío sucesivo. El contenido en agua de diseños con manitol era inferior (<1 %) a los diseños con lactosa (5 %).

45

Tabla 17: Rendimientos de procedimiento y contenido en agua de diferentes lotes de gránulos

Diseño	LAC/HPC	LAC/PVP	MAN/HPC	MAN/PVP
Rendimiento de procedimiento (% p/p)	88	92	93	94
Contenido en agua (% p/p) BD*	3,27	5,13	0,82	2,57
Contenido en agua (% p/p) AD*	4,76	4,73	0,56	0,68

*BD: antes del secado posterior; AD: después del secado posterior

2.2.2 Datos de SEC

50

Con el fin de evaluar el efecto del procedimiento de granulación sobre la pureza de 5F7, se realizó un análisis de SEC con la disolución de alimentación, los gránulos antes del secado posterior y los gránulos después del secado posterior. Se monitorizó Nanobody 5F7 puro en paralelo. Los resultados se muestran en la tabla 18.

55

Tabla 18: Resultados de SEC de granulación de Nanobody 5F7 con manitol o lactosa como portador y HPC o PVP como aglutinante

Nanobody 5F7	% de área promedio de pico principal			% de área promedio de picos previos		
	Alimentación	Gran BD*	Gran AD*	Alimentación	Gran BD*	Gran AD*
Disolución de ref.	99,90			0,10		
Lactosa/PVP	99,94	99,50	99,52	0,06	0,50	0,49

Manitol/HPC	ND	98,66	98,51	ND	1,32	1,49
Lactosa/HPC	99,91	99,98	99,52	0,09	1,02	0,48
Manitol/PVP	99,94	99,23	99,32	0,06	0,74	0,68
*Gran BD: granulado antes del secado; Gran AD: granulado después del secado						

Los resultados de SEC mostraron poca influencia del procedimiento de granulación sobre la agregación. Hubo un ligero aumento en la formación de picos previos (RRT 0,91).

- 5 El patrón de picos era estable en almacenamiento, y no difirió significativamente ni siquiera tras, por ejemplo, 3 meses de almacenamiento a 4 °C.

2.2.3 Datos de RPC

- 10 Con el fin de evaluar el efecto del procedimiento de granulación sobre la pureza de 5F7, se realizó un análisis de RPC con la disolución de alimentación, los gránulos antes del secado posterior y los gránulos después del secado posterior. Se monitorizó Nanobody 5F7 en paralelo. Los resultados se muestran en la tabla 19.

15 Tabla 19: Resultados de RPC de granulación de Nanobody 5F7 con manitol y lactosa como portador y HPC y PVP como aglutinante

Nanobody 5F7	% de área promedio de pico principal			% de área promedio de picos posteriores			% de área promedio de picos previos		
	Alimentación	Gran BD*	Gran AD*	Alimentación	Gran BD*	Gran AD*	Alimentación	Gran BD*	Gran AD*
Disolución de ref.	95,17			4,82			0		
Lactosa/PVP	94,81	93,53	92,43	4,34	4,82	5,70	0,84	1,65	1,87
Manitol/HPC	ND	94,76	94,30	ND	4,34	4,70	ND	0,9	0,98
Lactosa/HPC	95,23	94,42	94,10	4,27	4,56	4,90	0,50	1,02	0,90
Manitol/PVP	94,93	94,73	92,60	4,34	4,28	5,50	0,73	0,99	1,90
*Gran BD: granulado antes del secado; Gran AD: granulado después del secado									

- 20 Los diseños con HPC como aglutinante mostraron un aumento del % de área de picos previos y posteriores total de no más del 1 % a lo largo de todo el procedimiento. Los diseños que usaban PVP como aglutinante mostraron un aumento de uno de los picos posteriores (RRT 1,09) con el secado posterior. Para estos diseños se detectó un aumento del % de área de picos previos y posteriores total de aproximadamente el 2,5 % a lo largo de todo el procedimiento.

- 25 El patrón de picos fue estable en almacenamiento, y no difirió significativamente ni siquiera tras, por ejemplo, 3 meses de almacenamiento a 4 °C.

2.2.4 Medición de UV

- 30 Se llevó a cabo una medición de UV con la disolución de alimentación, los gránulos antes del secado posterior y los gránulos después del secado posterior. No se observó ninguna turbidez en ninguna de las muestras. El portador o aglutinante usado no tuvo ningún impacto sobre el contenido en Nanobody.

3 Ejemplo 3: Granulación en lecho fluido de Nanobody diferentes

- 35 Debido a los resultados positivos inesperados del primer experimento de granulación, se expandió el experimento de granulación usando tres Nanobody diferentes. Basándose en los resultados en el ejemplo 2, se seleccionó manitol como portador y HPC como aglutinante.

3.1 Materiales y métodos

40 3.1.1 Dominio variable individual de inmunoglobulina

En este estudio se evaluó un Nanobody monovalente, bivalente y trivalente. Los Nanobody tenían la siguiente secuencia:

Nanobody	SEQ ID NO	Secuencia
5F7 1	1	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGITFSINTMGWYRQAPGKQRELVALISSIG DTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCKRFRATAAQGTDYWG QGTQVTVSS

NB2	2	DVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVAISR GGSTYYPESVEGRFTISRDNARTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEQGRV RTLPEYTFWGGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCAASGRTFSY NPMGWFRQAPGKGRELVAISRGGSTYYPESVEGRFTISRDNARTVYLQMNS LRAEDTAVYYCAAAGVRAEQGRVRTLPEYTFWGGQGTQVTVSS
NB3	3	EVQLVESGGGLVQAGGSLISCAASGGSLSNVVLGWFRQAPGKREFVAAINWR GDITIGPPNVEGRFTISRDNARTGYLQMNSLAPDDTAVYYCGAGTPLNPGAYIY DWSYDYWGRGTQVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLI SCAASGGSLSNVVLGWFRQAPGKREFVAAINWRGDITIGPPNVEGRFTISRDN ARTGYLQMNSLAPDDTAVYYCGAGTPLNPGAYIYDWSYDYWGRGTQVTVSSG GGGGSGGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLISCAASGGSLSNVVLGWFRQ APGKREFVAAINWRGDITIGPPNVEGRFTISRDNARTGYLQMNSLAPDDTAV YYCGAGTPLNPGAYIYDWSYDYWGRGTQVTVSS

3.1.2 Procedimiento de granulación en húmedo

5 Se usó una disolución de Nanobody a una concentración de 29,3 mg/ml (5F7), 32,88 mg/ml (NB2) y 51,27 mg/ml (NB3) en agua como líquido de granulación. Para la preparación de la disolución de aglutinante, se añadió la disolución de Nanobody a un vaso de precipitados de vidrio. Se añadió el aglutinante (HPC) mientras se agitaba usando un agitador magnético hasta que se disolvió completamente. Se aplicó una concentración de aglutinante del 2,2 % p/p. En la tabla 20 se facilita la composición cualitativa y cuantitativa de los diseños de gránulo. Se aplicó una

10 carga de Nanobody del 8,0 % p/p con 5F7, del 9,5 % p/p con NB2 y del 14,1 % p/p con NB3.

Tabla 20: Composición de diseños de gránulos

Diseño	5F7		NB2		NB3	
	g	%	g	%	g	%
Manitol	50,04	85,5	50,01	84,1	50,00	79,8
HPC	3,80	6,5	3,80	6,4	3,80	6,1
Nanobody	4,68	8,0	5,67	9,5	8,83	14,1

15 Se pulverizó esta disolución sobre el polvo de portador (manitol) en un procedimiento de granulación en lecho fluido. Se usó un instrumento Mycrolab (Hüttlin GmbH, Schopfheim, Alemania) con un elemento de inserción de 3,8 l y con una configuración de pulverización desde la parte inferior. Se alimentó la disolución a una boquilla de dos fluidos (diámetro: 0,6 mm) por medio de una bomba peristáltica, tipo 323 (Watson Marlow, Cornwall, R.U.).

20 Los parámetros de procedimiento se indican en la tabla 21. Se aumentó ligeramente la tasa de pulverización durante el procedimiento. Tras la granulación, se apagaron la bomba y el calentador de aire y se secaron los gránulos durante poco tiempo.

Tabla 21: Condiciones de procedimiento de granulación en lecho fluido

Parámetro de procedimiento	5F7	NB2	NB3
Volumen de aire de entrada (m ³ /h)	17	17	17
Temperatura de aire de entrada (°C)	54-56	54-55	54
Temperatura de producto (°C)	36-45	36-44	36-44
Tasa de pulverización (ml/min)	2,4	2,4	2,5
Presión de aire de pulverización (bar)	0,4	0,4	0,4
Presión de microclima (bar)	0,5	0,5	0,5
Tiempo de pulverización (min)	74	73	74
Presión de soplado de filtro de producto (bar)	0,8	0,8	0,8
Intervalo de soplado de filtro de producto (s)	9	9	9

25 Tras el procedimiento, se enfrió el polvo hasta temperatura ambiente y se transfirió a viales de vidrio de color ámbar. Se calculó el rendimiento de procedimiento como la cantidad de polvo recogida en el depósito dividida entre la cantidad teórica de material seco dosificado por preparación. Se almacenaron los viales a 5 °C. Tras la granulación se secó posteriormente el polvo en un horno a vacío para eliminar la humedad residual.

30

3.1.3 Métodos analíticos

Preparación de muestras y medición del contenido

Se llevaron a cabo la preparación de muestras y mediciones del contenido tal como se describió en el ejemplo 1. Para la determinación de la concentración de proteína, también se determinó la absorbancia a 500 nm (A500). Una alta absorbancia a 500 nm es una indicación de la formación de variantes de alto peso molecular.

Ensayo de pureza (integridad física) de los Nanobody mediante cromatografía de líquidos de alta resolución de extrusión molecular (SE-HPLC)

Se realizó SE-HPLC con un instrumento H-Class Bio (Waters) con detector de DAD. Para Nanobody 5F7 y NB2, se diluyeron las muestras hasta 1 mg/ml en agua MilliQ antes de la inyección en la columna de RPC. Para NB3, se diluyeron las muestras hasta 2 mg/ml en agua MilliQ y se usaron adicionalmente a 1:1 (vol) con agua MilliQ.

Se analizaron muestras de la disolución de alimentación, de los gránulos antes del secado posterior y de los gránulos después del secado posterior. Se expresó la cantidad relativa de pureza de proteína como % en área, y se calculó dividiendo el área de pico entre el área integrada total (pico principal + impurezas).

Ensayo de pureza (integridad química) y cuantificación de los Nanobody mediante cromatografía de líquidos de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC, o RPC)

Para Nanobody 5F7 y NB3, se realizó RP-HPLC con un instrumento H-Class (Waters) con detector de TUV. Para NB2, se realizó RP-HPLC tanto con un instrumento H-Class (Waters) con detector de TUV como con un instrumento H-Class bio (Waters) con detector de DAD. Para Nanobody 5F7 y NB2, se diluyeron las muestras hasta 1 mg/ml en agua MilliQ antes de la inyección en la columna de RPC. Para NB3, se diluyeron las muestras hasta 2 mg/ml en agua MilliQ y se usaron adicionalmente a 1:1 (vol) con isopropanol al 36 %.

Se analizaron muestras de la disolución de alimentación, de los gránulos antes del secado posterior y de los gránulos después del secado posterior. Se expresó la cantidad relativa de pureza de proteína como % en área, y se calculó dividiendo el área de pico entre el área integrada total (pico principal + impurezas).

3.2 Resultados

3.2.1 Rendimiento y contenido

Se obtuvo un polvo de flujo libre para todos los diseños. En la tabla 22 se indican los resultados de rendimiento de procedimiento y contenido en agua antes y después del procedimiento de secado posterior.

Tal como se indica en la tabla 22, el rendimiento de procedimiento era del 92 % p/p o superior.

Tabla 22: Rendimientos de procedimiento y contenido en agua de diferentes lotes de gránulos

Diseño	5F7	NB2	NB3
Rendimiento de procedimiento (% p/p)	93	92	97
Contenido en agua (% p/p) BD*	0,82	1,07	1,40
Contenido en agua (% p/p) AD*	0,56	0,60	0,54
*BD: antes del secado posterior; AD: después del secado posterior			

3.2.2 Datos de SEC

Con el fin de evaluar el efecto del procedimiento de granulación sobre la pureza de los Nanobody sometidos a prueba, se realizó un análisis de SEC con la disolución de alimentación, los gránulos antes del secado posterior y los gránulos después del secado posterior. Se monitorizó Nanobody puro en paralelo. Los resultados se muestran en la tabla 23.

Tabla 23: Resultados de SEC de granulación de Nanobody 5F7, NB2 y NB3

	% de área promedio de pico principal			% de área promedio de picos previos		
	Alimentación	Gran BD*	Gran AD*	Alimentación	Gran BD*	Gran AD*
Disolución de ref. de 5F7	99,90			0,10		
5F7	ND	98,66	98,51	ND	1,32	1,49
Disolución de ref. de NB2	99,87			0,13		
NB2	100	98,96	98,83	0,00	1,04	1,17
Disolución de ref. de NB3	99,75			0,25		
NB3: carga del 15 %	99,79	98,80	98,61	0,21	1,20	1,39
NB3: carga del 8 %	ND	ND	98,98	ND	ND	1,06
*Gran BD: granulado antes del secado; Gran AD: granulado después del secado						

Los resultados de SEC muestran poca influencia del procedimiento de granulación sobre la agregación de NB2. Hubo un ligero aumento en la formación de picos previos (RRT 0,91). Para NB3, un pico previo a RRT 0,87 aumenta desde el 0,25 hasta aproximadamente el 1,10 % en área.

5 El patrón de picos fue estable en almacenamiento, y no difirió significativamente ni siquiera tras, por ejemplo, 3 meses de almacenamiento a 4 °C.

3.2.3 Datos de RPC

10 Con el fin de evaluar el efecto del procedimiento de granulación sobre la pureza de los Nanobody sometidos a prueba, se realizó un análisis de RPC con la disolución de alimentación, los gránulos antes del secado posterior y los gránulos después del secado posterior. Se monitorizó Nanobody puro en paralelo. Los resultados se muestran en la tabla 24.

15 Tabla 24: Resultados de RPC de granulación de Nanobody 5F7, NB2 y NB3

	% de área promedio de pico principal			% de área promedio de picos posteriores			% de área promedio de picos previos		
	Alimentación	Gran BD*	Gran AD*	Alimentación	Gran BD*	Gran AD*	Alimentación	Gran BD*	Gran AD*
Disolución de ref.	95,17			4,82			0		
5F7	ND	94,76	94,30	ND	4,34	4,70	ND	0,9	0,98
Disolución de ref. de NB2	85,24			12,29			2,45		
NB2	86,22	84,60	84,0	11,34	12,57	13,00	2,45	2,82	3,01
Disolución de ref. de NB3	95,16			3,67			1,18		
NB3: carga del 15 %	95,16	88,53	90,62	3,66	9,86	7,99	1,18	1,62	1,38
NB3: carga del 8 %	ND	ND	95,71	ND	ND	3,33	ND	ND	0,96

*Gran BD: granulado antes del secado; Gran AD: granulado después del secado

20 Los resultados de RPC no mostraron ninguna influencia significativa del procedimiento de granulación sobre la pureza de NB2. Los resultados de RPC mostraron una influencia de la duración del procedimiento de granulación sobre la degradación de NB3. La formación de picos previos y/o posteriores no aumentó para una muestra de gránulos al 8 % tomada durante el procedimiento de granulación, mientras que para muestras tomadas tras el ciclo de procedimiento completo (carga del 14 %), los niveles de picos posteriores aumentaron con el 2,5 % para RRT 1,07 (piroglutamato) y el 1 % para RRT 1,11, y se forma un nuevo pico posterior de aproximadamente el 3 % de área a RRT 1,20.

25 El patrón de picos fue estable en almacenamiento, y no difirió significativamente ni siquiera tras, por ejemplo, 3 meses de almacenamiento a 4 °C.

30 3.2.4 Medición de UV

Se llevó a cabo una medición de UV con la disolución de alimentación, los gránulos antes del secado posterior y los gránulos después del secado posterior. El procedimiento de granulación no tuvo ningún impacto sobre el contenido en Nanobody.

4 Ejemplo 2: Recubrimiento de perlas

4.1 Materiales y métodos

40 4.1.1 Dominio variable individual de inmunoglobulina

Se usó el mismo dominio variable individual de inmunoglobulina que en el ejemplo 1.

45 4.1.2 Procedimiento de recubrimiento de perlas

Se desarrollaron cápsulas rellenas con perlas recubiertas con una dosis total de 30 mg de Nanobody.

Para la preparación de perlas recubiertas de Nanobody, se aplicó un procedimiento de recubrimiento en lecho fluido con pulverización desde la parte inferior. Se usó un instrumento Mycolab (Hüttlin GmbH, Schopfheim, Alemania) con un elemento de inserción de 3,8 l.

Se alimentó la disolución de recubrimiento a una boquilla de dos fluidos (diámetro: 0,6 mm) por medio de una bomba peristáltica, tipo 323 (Watson Marlow, Cornwall, R.U.). Se usaron esferas de celulosa microcristalina (MCC) inertes con un tamaño de partícula de 700-1000 µm como portador. El tamaño de lote inicial era de aproximadamente 60 g. Se preparó la disolución de recubrimiento de la siguiente manera. Se llenó agua desmineralizada en un vaso de precipitados de vidrio. Se añadió la disolución de Nanobody. Específicamente, se usó una disolución de Nanobody 5F7 en agua a una concentración de 29,3 mg/ml. Se añadió hidroxipropilmetilcelulosa 5 mPa.s (HPMC E5), un polímero de formación de película, mientras se agitaba con un agitador magnético hasta que se disolvió. La concentración de sólidos teórica de la disolución de pulverización era del 6,4 % (p/p). La composición del recubrimiento se muestra en la tabla 8.

Tabla 8: Composición de la disolución de recubrimiento para la preparación de perlas cargadas con Nanobody

Material	Cantidad (g/lote)
Disolución de Nanobody 5F7	138,606
HPMC E5	6,401
Agua desmineralizada	15,028

Se aumentó ligeramente la tasa de pulverización durante el procedimiento. Tras el recubrimiento, se apagaron la bomba y el calentador de aire y se secaron las perlas durante poco tiempo (aproximadamente 5 min). Tras el procedimiento, se enfriaron las perlas hasta temperatura ambiente y se transfirieron a un vial de vidrio de color ámbar. Se almacenó el vial a 5 °C. Se calculó el rendimiento de procedimiento como la cantidad de perlas recogida en el depósito dividida entre la cantidad teórica de sólidos usada en la formulación. Los parámetros de procedimiento se indican en la tabla 9. La composición de las perlas se muestra en la tabla 10.

Tabla 8: Condiciones procedimiento de recubrimiento en lecho fluido

Parámetro de procedimiento	Valor objetivo
Volumen de aire de entrada (m ³ /h)	17
Temperatura de aire de entrada (°C)	70
Temperatura de aire de salida (°C)	39-46
Temperatura de producto (°C)	46-56
Tasa de pulverización (g/min)	2,2-2,8
Presión de aire de pulverización (bar)	0,8
Presión de aire de microclima (bar)	0,3
Tiempo de recubrimiento (min)	59
Tiempo de secado (min)	7

Tabla 9: Composición de las perlas

Material	Cantidad (g/lote)	Cantidad (mg/cápsula)
Disolución de Nanobody (sólido)	3,841	30,00
Disolución en agua de Nanobody*	134,765	
HPMC E5	6,401	50,00
Agua desmineralizada*	15,028	117,38
Esferas de celulosa microcristalina (MCC) (Cellets 700)	47,370	370,00
*no aparece en el producto final		

Se llenaron las perlas recubiertas en una cápsula de gelatina dura de tamaño 0 a una dosis de 30 mg de Nanobody.

4.1.3 Métodos analíticos y caracterización

Se analizaron las perlas recubiertas usando los mismos métodos tal como se describieron en el contexto de ejemplo 1.

Se realizó la preparación de muestras de la siguiente manera: se pesaron 200 mg de esferas de MCC recubiertas con 5F7 y se pusieron en un tubo Falcon de 50 ml con 3 ml de D-PBS. Se extrajeron en un agitador rotatorio durante al menos 4 horas. Se tomó una muestra de sobrenadante, se puso en un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se centrifugó a alta velocidad (20 000 g).

4.2 Resultados y discusión

El recubrimiento en lecho fluido de perlas inertes dio como resultado partículas esféricas con una estrecha distribución de tamaño y una carga de Nanobody del 7,1 %. Se detectó una pérdida de funcionalidad aceptable.

5 4.2.1 Contenido

Tabla 10: Resultados de DO para perlas cargadas con Nanobody (n=3)

Conc. promedio (mg/ml)	Carga de 5F7 en perlas
4,76	7,1 %

10 La carga teórica de 5F7 para las perlas era del 6,4 %; las mediciones de DO indicaron una carga de 5F7 real del 7,1 % (tabla 11).

Este resultado demuestra que pueden recubrirse satisfactoriamente Nanobody en un procedimiento de recubrimiento convencional y pueden lograrse cargas de Nanobody satisfactorias.

15 4.2.2 Datos de SEC

El análisis de SE-HPLC mostró un aumento de los picos previos en comparación con la referencia (picos previos totales desde el 0,41 hasta el 2,63 %) (tabla 12). La presencia de HPMC no interfirió con las mediciones (tabla 12).

20 Este resultado solo indica un aumento ligero (y aceptable) de especies de peso molecular superior, y confirma que el procedimiento de recubrimiento no condujo a ninguna formación significativa de especies de peso molecular superior de Nanobody.

25 Tabla 11: Resultados de SEC para disolución de HPMC+5F7, perlas recubiertas con 5F7 en comparación con referencia de 5F7

	área en % de lote de ref. de 5F7	área en % de HPMC+5F7	área en % de perlas recubiertas con 5F7
Pico previo 1	0,00	0,1	0,1
Pico previo 2	0,09	0,2	0,8
Pico previo 3	0,09	0,2	1,5
Pico previo 4	0,23	0,3	0,2
Pico principal	99,58	99,2	97,4

30 4.2.3 Datos de RPC

No se detectó ningún aumento significativo de los picos previos y los picos posteriores en RPC en comparación con una preparación de referencia (disolución de partida de Nanobody).

35 Este resultado indica que no hubo ninguna formación de derivados químicamente modificados del Nanobody provocada por el procedimiento de recubrimiento.

4.2.4 Datos de funcionalidad

Tras el recubrimiento de perlas con disolución de 5F7 se detectó una pérdida de funcionalidad minoritaria (tabla 13).

40 Tabla 12: Datos de funcionalidad de perlas recubiertas con 5F7 mediante Biacore

Muestra	Pendiente promedio (RU/s) (n = 3)	% de actividad en comparación con la ref.
Ref. de 5F7 5 nM	2,03	100,0
Perlas recubiertas con 5F7 5 nM	1,55	76,5

45 Estos resultados indican que pueden aplicarse Nanobody a portadores inertes en un procedimiento de recubrimiento convencional y conservarán niveles de actividad aceptables.

4.2.5 Características de perlas recubiertas

Tabla 13: Contenido en agua de perlas recubiertas con 5F7 mediante medición de LOD

Contenido en agua (% p/p) (LOD)	2,63
---------------------------------	------

Lista de secuencias

- 5 <110> Ablynx N.V.
- <120> Método para producir formulaciones sólidas que comprenden dominios variables individuales de inmunoglobulina
- 10 <130> P11-003-PCT-1
- <150> Documento US 61/468.341
- <151> 28-03-2011
- 15 <160> 3
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- 20 <211> 118
- <212> PRT
- 25 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Secuencia de Nanobody
- 30 <400> 1
- Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
- Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Ile Asn
 20 25 30
- Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
 35 40 45
- Ala Leu Ile Ser Ser Ile Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60
- Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu
 65 70 75 80
- Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Lys
 85 90 95
- Arg Phe Arg Thr Ala Ala Gln Gly Thr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
- Gln Val Thr Val Ser Ser
 115
- 35 <210> 2

<211> 259

<212> PRT

5

<213> Secuencia artificial

<220>

10

<223> Secuencia de Nanobody

<400> 2

ES 2 688 591 T3

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn
 20 25 30
 Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val
 35 40 45
 Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Glu Ser Val
 50 55 60
 Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Gln Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
 100 105 110
 Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 Ala Ala Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 130 135 140
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe
 145 150 155 160
 Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg
 165 170 175
 Glu Leu Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro
 180 185 190
 Glu Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg
 195 200 205
 Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 210 215 220
 Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Gln Gly Arg Val Arg
 225 230 235 240

ES 2 688 591 T3

Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
 245 250 255

Val Ser Ser

<210> 3

5 <211> 408

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Secuencia de Nanobody

15 <400> 3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Gly Ser Leu Ser Asn Tyr
 20 25 30

Val Leu Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
 35 40 45

Ala Ala Ile Asn Trp Arg Gly Asp Ile Thr Ile Gly Pro Pro Asn Val
 50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Gly Tyr
 65 70 75 80

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

Gly Ala Gly Thr Pro Leu Asn Pro Gly Ala Tyr Ile Tyr Asp Trp Ser
 100 105 110

Tyr Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
 115 120 125

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

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Ser
 145 150 155 160

Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Gly Ser Leu Ser Asn Tyr Val Leu Gly
 165 170 175

ES 2 688 591 T3

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile
 180 185 190

Asn Trp Arg Gly Asp Ile Thr Ile Gly Pro Pro Asn Val Glu Gly Arg
 195 200 205

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Gly Tyr Leu Gln Met
 210 215 220

Asn Ser Leu Ala Pro Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Ala Gly
 225 230 235 240

Thr Pro Leu Asn Pro Gly Ala Tyr Ile Tyr Asp Trp Ser Tyr Asp Tyr
 245 250 255

Trp Gly Arg Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 260 265 270

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
 275 280 285

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Ser Ile Ser Cys
 290 295 300

Ala Ala Ser Gly Gly Ser Leu Ser Asn Tyr Val Leu Gly Trp Phe Arg
 305 310 315 320

Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Asn Trp Arg
 325 330 335

Gly Asp Ile Thr Ile Gly Pro Pro Asn Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile
 340 345 350

Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Gly Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
 355 360 365

Ala Pro Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Ala Gly Thr Pro Leu
 370 375 380

Asn Pro Gly Ala Tyr Ile Tyr Asp Trp Ser Tyr Asp Tyr Trp Gly Arg
 385 390 395 400

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 405

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de producción de una formulación sólida de un dominio variable individual de inmunoglobulina, que es un procedimiento de granulación en húmedo o un procedimiento de recubrimiento en el que se agita un material portador sólido y se pone en contacto con un líquido que comprende un dominio variable individual de inmunoglobulina como agente activo y simultáneamente se aplica calor para evaporar el líquido, en el que el método se realiza a una temperatura del material portador sólido puesto en contacto con el líquido que comprende un dominio variable individual de inmunoglobulina de entre 40 °C y 80 °C.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, que es un procedimiento de granulación en húmedo, tal como un procedimiento de granulación en lecho fluido.
- 15 3. Método según la reivindicación 1 o 2, en el que el material portador sólido es uno o más seleccionados de disacáridos tales como lactosa, maltitol, sacarosa, maltosa; polioles o alcoholes de azúcar tales como manitol, sorbitol, isomalt; fosfato de calcio; polisacáridos tales como maltodextrina, almidón y derivados de almidón, almidón pregelatinizado, inulina; celulosa; o mezclas de los mismos.
- 20 4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que además se usa un aglutinante, tal como uno o más seleccionados de almidón, pasta de almidón, almidón parcialmente pregelatinizado, gelatina y derivados de celulosa tales como hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, polivinilpirrolidona, copovidona, polidextrosa, carbómero o mezclas de los mismos.
- 25 5. Método según la reivindicación 1, que es un procedimiento de recubrimiento, en particular un procedimiento de recubrimiento en lecho fluido.
6. Método según la reivindicación 5, en el que el portador sólido se selecciona de polvos y perlas, en particular perlas de tipo nonpareil inertes, más en particular perlas seleccionadas de uno o más de celulosa microcristalina, sacarosa o mezclas de las mismas.
- 30 7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el dominio variable individual de inmunoglobulina comprende uno o más seleccionados de un dominio variable individual de inmunoglobulina VHH, un dominio variable individual de inmunoglobulina VHH humanizado o un dominio variable individual de inmunoglobulina VH camelizado o cualquier fragmento adecuado o combinación de los mismos.
- 35 8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la temperatura del material portador sólido puesto en contacto con un líquido que comprende un dominio variable individual de inmunoglobulina como agente activo oscila entre 40 °C y 70 °C, preferiblemente entre 40 °C y 60 °C, más preferiblemente entre 40 °C y 55 °C.
- 40 9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el material portador sólido se pone en contacto con el líquido que comprende un agente activo mediante pulverización, en particular mediante pulverización del líquido sobre un lecho fluido del material portador sólido.
- 45 10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que se agita el material portador sólido y se pone en contacto con un líquido que comprende un dominio variable individual de inmunoglobulina y simultáneamente se aplica calor para evaporar el líquido durante al menos 15 min, por ejemplo al menos 20 min, al menos 30 min, al menos 40 min, al menos 50 min.
- 50 11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende además una etapa de fabricar un comprimido, cápsula o implante.