

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 738 114**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/08** (2006.01)

**A61K 47/10** (2007.01)

**A61K 47/26** (2006.01)

**A61K 9/00** (2006.01)

**A61P 11/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.02.2011 PCT/EP2011/052024**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.08.2011 WO11098552**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.02.2011 E 11705486 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019 EP 2533761**

54 Título: **Métodos y composiciones para la preparación de aerosoles**

30 Prioridad:

**23.12.2010 US 426610 P**

**11.02.2010 US 303447 P**

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

**20.01.2020**

73 Titular/es:

**ABLYNX N.V. (100.0%)**

**Technologiepark 21**

**9052 Ghent-Zwijnaarde, BE**

72 Inventor/es:

**DEPLA, ERIK;**

**SERGI, MAURO y**

**CASTEELS, PETER**

74 Agente/Representante:

**MARTÍN BADAJOZ, Irene**

ES 2 738 114 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**

Métodos y composiciones para la preparación de aerosoles

**5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos para la preparación de un aerosol. Más específicamente la presente invención proporciona métodos para la preparación de un aerosol de dominios variables individuales de inmunoglobulina en los que la cantidad de formación de agregado está significativamente reducida. La invención proporciona además aerosoles preparados mediante los métodos de la invención, así como composiciones para su uso en los métodos de la invención.

La invención se refiere además a métodos para las preparaciones de tales composiciones y a un nebulizador de malla vibrante que comprende tales composiciones y a usos del mismo.

Otros aspectos, realizaciones, ventajas y aplicaciones de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción adicional en el presente documento.

**20 Antecedentes de la técnica**

Los dominios variables individuales de inmunoglobulina (tal como se describe adicionalmente en el presente documento) se caracterizan por la formación del sitio de unión a antígeno mediante un dominio variable individual, que no requiere interacción con un dominio adicional (por ejemplo en forma de interacción VH/VL) para reconocimiento de antígeno. Se han descrito dominios variables individuales de inmunoglobulina contra una amplia gama de dianas diferentes (documentos WO 04/062551, WO 05/044858, WO 06/040153, WO 06/122825, WO 07/104529, WO 08/020079, WO 08/074839, WO 08/071447, WO 08/074840, WO 08/074867, WO 08/077945, WO 08/101985, WO 08/142164, WO 09/068625, WO 08/142165, WO 09/068627) que pueden ser candidatos para desarrollo de fármacos. Se han descrito dominios variables individuales de inmunoglobulina contra la subunidad p19 de IL-23 que bloquean la interacción de IL-23 con su receptor por ejemplo en el documento WO 09/068627. Se han descrito dominios variables individuales de inmunoglobulina contra la proteína F de virus sincitial respiratorio humano (VSRh) que pueden neutralizar al VSRh por ejemplo en el documento WO 09/147248.

La mayoría de los dominios variables individuales de inmunoglobulina en desarrollo preclínico o clínico se han administrado por vía parenteral (es decir mediante administración intravenosa o subcutánea) y se han descrito formulaciones estables para estos métodos de administración (véanse por ejemplo los documentos WO 2011/026945 y WO 2011/026948). Sin embargo, estos métodos de administración tienen una aceptación por los pacientes bastante baja y existe una necesidad de modos de administración alternativos más convenientes (sin aguja) que pueden realizarse fácilmente por los propios pacientes.

Un posible método alternativo es la administración del dominio variable individual de inmunoglobulina a través de los pulmones. Puede conseguirse la administración de un fármaco por vía pulmonar mediante inhalación, por vía oral y/o nasal. Los ejemplos de dispositivos farmacéuticos para su administración por vía pulmonar incluyen inhaladores de dosis medida (MDI), inhaladores de polvo seco (DPI) y nebulizadores. Tradicionalmente, los nebulizadores se han clasificado en dos tipos principales: dispositivos de chorro de aire (neumáticos) y por ultrasonidos. Recientemente, se ha comercializado un tercer tipo, nebulizadores de malla vibrante (Newman y Gee-Turner, 2005, J. Appl. Ther. Res. 5: 29-33).

El nebulizador es una primera opción lógica para el desarrollo de un fármaco basado en proteína farmacéutica para su administración por vía pulmonar dado que la mayoría de las proteínas se purifican y se almacenan como concentrado acuoso. Sin embargo, la estabilidad de disoluciones acuosas en el anaquel puede no traducirse en estabilidad durante la nebulización y la proteína puede desnaturalizarse mediante varios mecanismos incluyendo secado, cizallamiento y efectos en superficie (Charm y Wong, 1970, Biotechnol. Bioeng 12: 1103-1109; Andrews, 1991, Biochem. Soc. Trans, 272S 19). Se mostró, por ejemplo, que la nebulización inducía la pérdida de actividad enzimática de lactato deshidrogenasa (LDH) y daba como resultado la agregación, que consistía principalmente en formación de dímeros, y degradación de factor estimulante de granulocitos humano recombinante (G-CSF) (Niven y Brain, 1994, Int. J. Pharm., 104: 73-85).

El documento WO 04/041867 describe métodos y composiciones para la administración por vía pulmonar de dominio variable individual de inmunoglobulina. En el documento WO 09/074634 se describen métodos de administración por vía pulmonar directa de anticuerpos de dominio, y composiciones de anticuerpos de dominio particulares adecuadas para su administración por vía pulmonar directa. Más específicamente, se describen composiciones que comprenden un polipéptido de anticuerpo de dominio y un tampón que contiene PEG1000 a del 2% a aproximadamente el 10% y sacarosa al 1,2% (p/v). Estas composiciones de anticuerpo de dominio parecen tener una viscosidad que permite la producción de gotitas suficientes con el tamaño correcto para su administración a un sujeto mediante administración por vía pulmonar local directa. Ninguno de los documentos anteriores describe o comenta la reducción de formación de agregado y/o la mejora de la estabilidad durante la administración por vía

pulmonar de dominios variables individuales de inmunoglobulina. Sigue existiendo una necesidad de métodos y composiciones adicionales para la administración de dominios variables individuales de inmunoglobulina intactos y funcionales por vía pulmonar.

## 5 Sumario de la invención

La presente invención proporciona un método (también denominado “método de la invención” o “métodos de la invención”) para la preparación de un aerosol (también denominado “aerosol de la invención”; tal como se define adicionalmente en el presente documento) de dominios variables individuales de inmunoglobulina con niveles de agregación de bajos a indetectables y/o sin una pérdida significativa de actividad y/o potencia biológica de los dominios variables individuales de inmunoglobulina. El método de la invención comprende la etapa de atomizar una composición (también denominada “composición de la invención” o “composiciones de la invención”; tal como se define adicionalmente en el presente documento) que comprende un portador acuoso y un polipéptido (también denominado “polipéptido de la invención” o “polipéptidos de la invención”; tal como se define adicionalmente en el presente documento) que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina a una concentración de 1 mg/ml a 200 mg/ml. Se ha demostrado en la presente invención que la presencia de ciertos elementos en la composición que se va a atomizar (“composición de la invención”) y/o el uso de sistemas de administración de aerosol seleccionados reduce significativamente (e inesperadamente) la cantidad de formación de agregado en el material atomizado y, por consiguiente, la pérdida de actividad y/o potencia biológica de los polipéptidos de la invención presentes en el material atomizado. Se ha mostrado que la cantidad de formación de agregado puede reducirse hasta el 6% o menos, el 5% o menos, tal como el 4% o menos, el 3% o menos, el 2% o menos, o incluso el 1% o menos.

El polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales está presente en la composición a una concentración de 50 mg/ml o más; y la composición se atomiza en un nebulizador de malla vibrante.

En un aspecto particular, que no es parte de la invención, la presencia de un detergente en la composición redujo significativamente la cantidad de formación de agregado en el material atomizado cuando el polipéptido estaba presente en la composición a una concentración de menos de 20 mg/ml, tal como por ejemplo a una concentración de 5 mg/ml, 10 mg/ml o 15 mg/ml. Por consiguiente, la presente solicitud describe un método para la preparación de un aerosol de dominios variables individuales de inmunoglobulina en el que la cantidad de formación de agregado es del 7% o menos, preferiblemente el 6% o menos, el 5% o menos, tal como el 4% o menos, el 3% o menos, el 2% o menos, o incluso el 1% o menos, el % de formación de agregado tal como se determina mediante SE-HPLC, comprendiendo dicho método la etapa de atomizar una composición que comprende un portador acuoso y un polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina a una concentración de menos de 20 mg/ml, tal como por ejemplo a una concentración de 5 mg/ml, 10 mg/ml o 15 mg/ml, en el que la composición comprende además un tensioactivo a una concentración de entre el 0,001% y el 1% (v:v).

Preferiblemente el tensioactivo está presente en la composición a una concentración de entre el 0,001% y el 0,1% (v:v), o entre el 0,01% y el 0,1% (v:v) tal como aproximadamente el 0,001% (v:v), el 0,005% (v:v), el 0,01% (v:v), el 0,02% (v:v), el 0,05% (v:v), el 0,08% (v:v) o el 0,1%(v:v), preferiblemente de aproximadamente el 0,04% a aproximadamente el 0,08% (v:v), en particular el 0,04%. En un aspecto preferido, el tensioactivo se selecciona de un detergente no iónico, tal como polisorbatos (tales como por ejemplo Tween 20, y Tween 80) y poloxámeros (tales como por ejemplo Pluronic®). En otro aspecto, puede añadirse polietilenglicol (PEG) como compuesto de tipo tensioactivo. En todavía otro aspecto, la composición comprende un tensioactivo tal como se describió anteriormente, que no es PEG. En particular, la composición no comprende PEG 1000 a de aproximadamente el 2% a aproximadamente el 10% en tampón de fosfato 50 mM que contiene sacarosa al 1,2% (p/v). La reducción de la formación de agregado fue inesperada, particularmente a concentraciones de tensioactivo tan bajas.

La presencia del polipéptido de la invención en la composición de la invención a una concentración de 50 mg/ml o incluso más, redujo significativamente la cantidad de formación de agregado en el material atomizado. Por consiguiente, la presente invención se refiere a un método para la preparación de un aerosol de dominios variables individuales de inmunoglobulina en el que la cantidad de formación de agregado es del 6% o menos, el 5% o menos, tal como el 4% o menos, el 3% o menos, el 2% o menos, o incluso el 1% o menos, el % de formación de agregado tal como se determina mediante SE-HPLC, comprendiendo dicho método la etapa de atomizar una composición que comprende un portador acuoso y un polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina, en el que el polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina está presente en la composición de la invención a una concentración de 50 mg/ml o incluso más y la composición se atomiza en un nebulizador de malla vibrante.

En un aspecto particular, la presencia del polipéptido de la invención en la composición de la invención a una concentración de 50 mg/ml o incluso más, redujo significativamente la cantidad de formación de agregado en el material atomizado en ausencia de un tensioactivo. Por consiguiente, en todavía otro aspecto, la presente solicitud describe un método para la preparación de un aerosol de dominios variables individuales de inmunoglobulina en el que la cantidad de formación de agregado es preferiblemente del 6% o menos, el 5% o menos, tal como el 4% o menos, el 3% o menos, el 2% o menos, o incluso el 1% o menos, el % de formación de agregado tal como se

determina mediante SE-HPLC, comprendiendo dicho método la etapa de atomizar una composición que comprende un portador acuoso y un polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina a una concentración de 50 mg/ml o incluso más, en el que la composición no comprende un tensioactivo.

5 El polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina está presente en la composición a una concentración de 50 mg/ml, 60 mg/ml o más, 70 mg/ml o más, 80 mg/ml o incluso más. En un aspecto más preferido, el polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina está presente en la composición a una concentración de 50 mg/ml. La reducción de la formación de agregado a concentraciones más altas (por ejemplo, una relación inversa entre concentración y formación de agregado), tal como a una concentración de 50 mg/ml o incluso más, fue inesperada.

10 El uso de un sistema de administración de aerosol particular, concretamente el nebulizador de malla vibrante, para atomizar la composición de la invención también redujo significativamente la cantidad de formación de agregado en el material atomizado. Por consiguiente, la presente solicitud describe un método para la preparación de un aerosol de dominios variables individuales de inmunoglobulina en el que la cantidad de formación de agregado es del 6% o menos, el 5% o menos, tal como el 4% o menos, el 3% o menos, el 2% o menos, o incluso el 1% o menos, el % de formación de agregado tal como se determina mediante SE-HPLC, comprendiendo dicho método la etapa de atomizar una composición que comprende un portador acuoso y un polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina a una concentración de 1 mg/ml a 200 mg/ml, en el que la composición se atomiza en un nebulizador de malla vibrante. La reducción de la formación de agregado usando un nebulizador de malla vibrante fue inesperada.

15 El método de la invención es preferiblemente capaz de producir un aerosol que tiene una mediana del diámetro en volumen de entre 1 y 10  $\mu\text{m}$ , preferiblemente entre 1 y 7  $\mu\text{m}$ , lo más preferiblemente entre 1 y 5  $\mu\text{m}$ , tal como aproximadamente 3, 3,5 ó 4  $\mu\text{m}$ .

20 La presente invención también se refiere a un aerosol ("aerosol de la invención") preparado mediante el método de la invención. El aerosol tiene preferiblemente una mediana del diámetro en volumen de entre 1 y 10  $\mu\text{m}$ , preferiblemente entre 1 y 7  $\mu\text{m}$ , lo más preferiblemente entre 1 y 5  $\mu\text{m}$ , tal como aproximadamente 3, 3,5 ó 4  $\mu\text{m}$ .

25 En un aspecto particular, que no es parte de la invención, la presente solicitud describe un aerosol que comprende gotitas líquidas que pueden obtenerse mediante la atomización de una composición que comprende un portador acuoso y un polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina a una concentración de menos de 20 mg/ml, tal como por ejemplo a una concentración de 5 mg/ml, 10 mg/ml o 15 mg/ml, en el que la cantidad de formación de agregado en el material atomizado es del 7% o menos, preferiblemente el 6% o menos, el 5% o menos, tal como el 4% o menos, el 3% o menos, el 2% o menos, o incluso el 1% o menos, el % de formación de agregado tal como se determina mediante SE-HPLC, y en el que la composición comprende además un tensioactivo a una concentración de entre el 0,001% y el 1% (v:v).

30 Preferiblemente el tensioactivo está presente en la composición a una concentración de entre el 0,001% y el 0,1% (v:v), o entre el 0,01% y el 0,1% (v:v) tal como aproximadamente el 0,001% (v:v), el 0,005% (v:v), el 0,01% (v:v), el 0,02% (v:v), el 0,05% (v:v), el 0,08% (v:v) o el 0,1% (v:v), de manera preferible de aproximadamente el 0,04% a aproximadamente el 0,08% (v:v), en particular el 0,04%. En un aspecto preferido, el tensioactivo se selecciona de un detergente no iónico, tal como polisorbatos (tales como por ejemplo Tween 20, y Tween 80) y poloxámeros. En otro aspecto, puede añadirse PEG como compuesto de tipo tensioactivo. En otro aspecto, el tensioactivo no es PEG. En particular, la composición no comprende PEG 1000 a de aproximadamente el 2% a aproximadamente el 10% en tampón de fosfato 50 mM que contiene sacarosa al 1,2% (p/v).

35 En otro aspecto, la invención también se refiere a un aerosol que comprende gotitas líquidas que pueden obtenerse mediante la atomización de una composición que comprende un portador acuoso y un polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina, en el que la cantidad de formación de agregado en el material atomizado es del 6% o menos, el 5% o menos, tal como el 4% o menos, el 3% o menos, el 2% o menos, o incluso el 1% o menos, el % de formación de agregado tal como se determina mediante SE-HPLC, y en el que el polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina está presente en la composición a una concentración de 50 mg/ml o incluso más y la composición se atomiza en un nebulizador de malla vibrante.

40 En todavía otro aspecto, la invención se refiere a un aerosol que comprende gotitas líquidas que pueden obtenerse mediante la atomización de una composición que comprende un portador acuoso y un polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina, en el que la cantidad de formación de agregado en el material atomizado es del 6% o menos, el 5% o menos, tal como el 4% o menos, el 3% o menos, el 2% o menos, o incluso el 1% o menos, el % de formación de agregado tal como se determina mediante SE-HPLC, en el que el polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina está presente en la composición a una concentración de 50 mg/ml o incluso más, y en el que la composición no comprende un tensioactivo.

El polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina está presente en la composición a una concentración de 50 mg/ml, 60 mg/ml o más, 70 mg/ml o más, 80 mg/ml, o incluso más. En un aspecto más preferido, el polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina está presente en la composición a una concentración de 50 mg/ml.

5 La invención se refiere a un aerosol que comprende gotitas líquidas que pueden obtenerse mediante la atomización de una composición que comprende un portador acuoso y un polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina a una concentración de 1 mg/ml a 200 mg/ml, en el que la cantidad de formación de agregado es del 6% o menos, el 5% o menos, tal como el 4% o menos, el 3% o menos, el 2% o menos, o incluso el 1% o menos, el % de formación de agregado tal como se determina mediante SE-HPLC, en el que la composición se atomiza en un nebulizador de malla vibrante.

10 La invención también se refiere a una composición ("composición de la invención" o "composiciones de la invención") adecuada para su uso en el método de la invención y/o adecuada para la preparación del aerosol de la invención.

15 En un aspecto particular, que no es parte de la invención, la presente solicitud describe una composición adecuada para la preparación de un aerosol de dominios variables individuales de inmunoglobulina con una cantidad de formación de agregado del 7% o menos, preferiblemente el 6% o menos, el 5% o menos, tal como el 4% o menos, el 3% o menos, el 2% o menos, o incluso el 1% o menos, el % de formación de agregado tal como se determina mediante SE-HPLC, comprendiendo dicha composición un portador acuoso y un polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina a una concentración de menos de 20 mg/ml, tal como por ejemplo a una concentración de 5 mg/ml, 10 mg/ml o 15 mg/ml, en la que la composición comprende además un tensioactivo a una concentración de entre el 0,001% y el 1% (v:v).

20 Preferiblemente el tensioactivo está presente en la composición a una concentración de entre el 0,001% y el 0,1% (v:v), o entre el 0,01% y el 0,1% (v:v) tal como aproximadamente el 0,001% (v:v), el 0,005% (v:v), el 0,01% (v:v), el 0,02% (v:v), el 0,05% (v:v), el 0,08% (v:v) o el 0,1% (v:v), de manera preferible de aproximadamente el 0,04% a aproximadamente el 0,08% (v:v), en particular el 0,04%. En un aspecto preferido, el tensioactivo se selecciona de un detergente no iónico, tal como polisorbatos (tales como por ejemplo Tween 20, y Tween 80) y poloxámeros. En otro aspecto, puede añadirse PEG como compuesto de tipo tensioactivo. En todavía otro aspecto, el tensioactivo no es PEG. En particular, la composición no comprende PEG 1000 a de aproximadamente el 2% a aproximadamente el 10% en tampón de fosfato 50 mM que contiene sacarosa al 1,2% (p/v).

25 La presente invención se refiere a una composición adecuada para la preparación de un aerosol de dominio variable individual de inmunoglobulinas en la que la cantidad de formación de agregado es del 6% o menos, el 5% o menos, tal como el 4% o menos, el 3% o menos, el 2% o menos, o incluso el 1% o menos, el % de formación de agregado tal como se determina mediante SE-HPLC, comprendiendo dicha composición un portador acuoso y un polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina, en la que el polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina está presente en la composición a una concentración de 50 mg/ml o incluso más y la composición se atomiza en un nebulizador de malla vibrante.

30 En todavía otro aspecto, la invención se refiere a una composición adecuada para la preparación de un aerosol de dominios variables individuales de inmunoglobulina en la que la cantidad de formación de agregado es del 6% o menos, el 5% o menos, tal como el 4% o menos, el 3% o menos, el 2% o menos, o incluso el 1% o menos, el % de formación de agregado tal como se determina mediante SE-HPLC, en la que el polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina está presente en la composición a una concentración de 50 mg/ml o incluso más, y en la que la composición no comprende un tensioactivo.

35 En un aspecto preferido, el polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina está presente en la composición a una concentración de 50 mg/ml, 60 mg/ml o más, 70 mg/ml o más, 80 mg/ml o incluso más. En un aspecto más preferido, el polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina está presente en la composición a una concentración de 50 mg/ml.

40 El polipéptido (también denominado "polipéptido de la invención" o "polipéptidos de la invención") comprende o consiste esencialmente en uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina (tal como se define en el presente documento). En un aspecto, el polipéptido de la invención puede comprender o consistir esencialmente en un dominio variable individual de inmunoglobulina. En otro aspecto, el polipéptido de la invención puede comprender o consistir esencialmente en dos o más dominios variables individuales de inmunoglobulina, tal como dos o tres. En otro aspecto, el polipéptido de la invención se une específicamente a VSRh o IL-23. En otro aspecto, el polipéptido de la invención se selecciona de una de SEQ ID NO: 1, 2 y 3.

45 La invención también se refiere a métodos para la preparación de la composición de la invención. Los métodos comprenden al menos la etapa de concentrar el polipéptido e intercambiarlo con el tampón seleccionado.

50

En un aspecto particular, que no es parte de la invención, la solicitud describe un método para la preparación de una composición que comprende la etapa de concentrar el polipéptido hasta una concentración de menos de 20 mg/ml, tal como por ejemplo a una concentración de 5 mg/ml, 10 mg/ml o 15 mg/ml, y adicionalmente comprende la etapa de añadir un tensioactivo a una concentración de entre el 0,001% y el 1% (v:v).

Preferiblemente el tensioactivo se añade a una concentración de entre el 0,001% y el 0,1% (v:v), o entre el 0,01% y el 0,1% (v:v) tal como aproximadamente el 0,001% (v:v), el 0,005% (v:v), el 0,01% (v:v), el 0,02% (v:v), el 0,04% (v:v), el 0,05% (v:v), el 0,08% (v:v) o el 0,1%(v:v), de manera preferible de aproximadamente el 0,04% a aproximadamente el 0,08% (v:v), en particular el 0,04%. En un aspecto preferido, el tensioactivo se selecciona de un detergente no iónico, tal como polisorbatos (tales como por ejemplo Tween 20, y Tween 80) y poloxámeros. En otro aspecto, puede añadirse PEG como compuesto de tipo tensioactivo. En todavía otro aspecto, el tensioactivo no es PEG. En particular, la composición no comprende PEG 1000 a de aproximadamente el 2% a aproximadamente el 10% en tampón de fosfato 50 mM que contiene sacarosa al 1,2% (p/v).

En otro aspecto, en el método para la preparación de una composición de la invención el polipéptido se concentra hasta una concentración de 50 mg/ml o incluso más.

En todavía otro aspecto, en el método para la preparación de una composición, el polipéptido se concentra hasta una concentración de 50 mg/ml o incluso más, y no se añade tensioactivo.

En un aspecto preferido, el polipéptido se concentra hasta una concentración de 50 mg/ml, 60 mg/ml o más, 70 mg/ml o más, 80 mg/ml, o incluso más. En un aspecto más preferido, el polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina está presente en la composición a una concentración de 50 mg/ml.

La invención proporciona además el uso de los métodos, aerosol y composiciones de la invención. Los métodos, aerosol y composiciones de la invención pueden usarse para la preparación de un medicamento para su administración a un sujeto humano mediante un sistema de administración de aerosol. Preferiblemente el medicamento se administra mediante nebulización, concretamente a través de un nebulizador de malla vibrante.

También se proporcionan sistemas de administración de aerosol. El sistema de administración de aerosol debe comprender al menos un envase y un generador de aerosol conectado al envase, en el que el envase comprende una composición de la invención. El sistema de administración de aerosol es un nebulizador de malla vibrante.

Los envases, kits y dosificaciones unitarias farmacéuticas pueden comprender las composiciones de la invención para su uso, por ejemplo, por un profesional de la salud. Los envases, kits o dosificaciones unitarias farmacéuticas que comprenden las composiciones de la invención deben ser adecuados para la administración por vía pulmonar del polipéptido de la invención a un sujeto humano. Preferiblemente los envases, kits o dosificaciones unitarias farmacéuticas que comprenden las composiciones de la invención deben ser adecuados para la administración del polipéptido de la invención a un sujeto humano mediante un sistema de administración de aerosol que es un nebulizador de malla vibrante.

Las composiciones de la invención, envases, sistemas de administración de aerosol, nebulizadores, dosificaciones unitarias farmacéuticas y/o kits pueden usarse en profilaxis y/o terapia. En un aspecto específico, las composiciones, envases, sistemas de administración de aerosol, nebulizadores, dosificaciones unitarias farmacéuticas y/o kits se usan para la prevención y/o tratamiento de una o más enfermedades y/o trastornos tales como enfermedades y/o trastornos respiratorios (por ejemplo infección por VSRh). Por consiguiente, la presente invención también se refiere a una composición de la invención para su uso en un método para la prevención y/o el tratamiento de una o más enfermedades y/o trastornos, tales como una o más enfermedades respiratorias. En un aspecto, la enfermedad y/o trastorno tratado es infección por VSRh. La composición se administra a través de un nebulizador de malla vibrante.

### Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Comparación de temperaturas de fusión (Tf) de RSV434 en presencia de diferentes agentes de tamponamiento con manitol como agente de osmolaridad. Se realizaron mediciones mediante ensayo de cambio térmico (TSA) a 0,1 mg/ml.

Figura 2. Porcentaje (%) de picos previos medidos mediante análisis de SE-HPLC de RSV434 nebulizado a 5 mg/ml mediante el nebulizador de malla Omron en presencia de diferentes composiciones de tampón/excipientes (se usaron glicina y manitol a una concentración de 0,3 M, NaCl a 0,15 M).

Figura 3: Porcentaje (%) de picos previos medidos mediante análisis de SE-HPLC de RSV434 nebulizado a 5 mg/ml mediante el nebulizador de malla Omron en presencia de diferentes composiciones de tampón/excipientes con Tween 80 y/o PEG1000.

Figura 4. Representación de formación de picos previos a partir de datos de análisis de SE-HPLC, después de la nebulización de disoluciones de 5 mg/ml de RSV434 mediante nebulizador Akita<sup>2</sup> Apixneb™ (un nebulizador de malla vibrante) (nebulizado) en comparación con el material no nebulizado (REF).

5 Figura 5. Representación de recuperación de proteínas a partir de datos de análisis de SE-HPLC, después de la nebulización de disoluciones de 5 mg/ml de RSV434 mediante nebulizador Akita<sup>2</sup> Apixneb™ (un nebulizador de malla vibrante) en comparación con el material de referencia no nebulizado.

10 Figura 6. Representación de formación de picos previos a partir de datos de análisis de SE-HPLC, después de la nebulización de disoluciones de 5, 25 y 50 mg/ml de RSV434 mediante nebulizador Akita<sup>2</sup> Apixneb™ (un nebulizador de malla vibrante).

15 Figura 7. Representación de formación de picos previos a partir de datos de análisis de SE-HPLC, después de la nebulización de disoluciones de 5, 25 y 50 mg/ml de RSV434 mediante nebulizador de chorro Akita<sup>®</sup> (un nebulizador de chorro).

20 Figura 8. Tamaño promedio de gotita (expresado como mediana del diámetro en volumen (VMD)) medido mediante difracción láser después de la nebulización de disoluciones de RSV434 con diferentes concentraciones de proteína y en presencia de diferentes composiciones de tampón/excipiente mediante nebulizador Akita<sup>2</sup> Apixneb™. La etiqueta en el eje de las X se refiere al código de producto y composición asociada indicados en la tabla 8.

25 Figura 9. Aumento en la región de la línea base de cromatogramas de SE-HPLC de RSV434 en fosfato 10 mM + NaCl 0,13 M pH 7,0 (A) sin Tween 80 a 50 mg/ml, (B) con Tween 80 al 0,04% a 50 mg/ml, (C) sin Tween 80 a 5 mg/ml, (D) con Tween 80 al 0,04% a 5 mg/ml. La figura indica los picos previos correspondientes a todas las formas multiméricas como "total de picos previos" y el pico previo correspondiente a especies de alto peso molecular (o pico previo 1) como "especies HMW". La diferencia en tiempo de retención entre los cromatogramas (A) y (B) y los cromatogramas (C) y (D) puede explicarse porque (A) y (B) se ejecutan a 0,15 ml/min y (C) y (D) a 0,2 ml/min.

### 30 Descripción detallada de la invención

A menos que se indique o se defina de otra manera, todos los términos utilizados tienen su significado habitual en la técnica, que serán claros para el experto en la técnica. Se hace referencia por ejemplo a los manuales convencionales, tales como Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (2ª 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", 2ª edición, University of California Press, Berkeley, CA (1981); Roitt *et al.*, "Immunology" (6a. Ed.), Mosby/Elsevier, Edinburgo (2001); Roitt *et al.*, Roitt's Essential Immunology, 10ª ed. Blackwell Publishing, Reino Unido (2001); y Janeway *et al.*, "Immunobiology" (6ª ed.), Garland Science Publishing/Churchill Livingstone, Nueva York (2005), así como a los antecedentes de la técnica generales citados en los mismos.

45 Tal como se usa en el presente documento, el término "aislado" en el contexto de un polipéptido se refiere a un polipéptido que está sustancialmente libre de material celular o proteínas contaminantes de la fuente de célula o tejido de la que deriva, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza de manera química. La expresión "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de un polipéptido en las que el polipéptido está separado de los componentes celulares de las células a partir de las cuales se aísla o se produce de manera recombinante. Por tanto, un polipéptido que está sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de un polipéptido que tiene menos de aproximadamente el 30%, el 20%, el 10%, o el 5% (en peso seco) de proteína, polipéptido, péptido, o anticuerpo heterólogos (también denominado "proteína contaminante"). Cuando el polipéptido se produce de manera recombinante, también puede estar sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente el 20%, el 10%, o el 5% del volumen de la preparación de polipéptido. Cuando el polipéptido se produce mediante síntesis química, preferiblemente está sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos, es decir, está separado de precursores químicos u otros productos químicos que participan en la síntesis del polipéptido. Por consiguiente, tales preparaciones de un polipéptido tienen menos de aproximadamente el 30%, el 20%, el 10%, el 5% (en peso seco) de precursores químicos o compuestos distintos del polipéptido de interés. En una realización específica, un polipéptido "aislado" se purifica mediante un procedimiento de purificación de múltiples etapas que comprende dos etapas de cromatografía (por ejemplo intercambio catiónico e intercambio aniónico), una etapa de ultrafiltración de 100K, seguida por una etapa de intercambio de tampón y concentración en modo de ultrafiltración/diafiltración.

65 Tal como se usa en el presente documento, los términos "sujeto" y "paciente" se usan de manera intercambiable. Tal como se usa en el presente documento, los términos "sujeto" y "sujetos" se refieren a un animal, preferiblemente un mamífero incluyendo un mamífero no primate (por ejemplo, una vaca, cerdo, caballo, gato, perro, rata y ratón) y un primate (por ejemplo, un mono, tal como un macaco cangrejero, chimpancé, babuino y un humano), y más preferiblemente un humano. En una cierta realización, el sujeto es un mamífero, preferiblemente un humano, con

una o más enfermedades o trastornos. En otra realización, el sujeto es un mamífero, preferiblemente un humano, en riesgo de desarrollar una o más enfermedades y/o trastornos.

5 La frase “farmacéuticamente aceptable” tal como se usa en el presente documento significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal, o que figura en la Farmacopea de los EE.UU., Farmacopea Europea u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente en humanos. En este sentido, debe ser compatible con los demás componentes de la formulación y no provocar un efecto perjudicial inaceptable en el sujeto. Se refiere a aquellos compuestos, materiales, composiciones, y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance de un criterio médico razonable, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación excesivos, proporcional con una razón de beneficio/riesgo razonable.

10 Según la Farmacopea Europea, una disolución se considera “isotónica” si tiene una osmolalidad de  $290 \pm 30$  mOsm/kg. La isotonicidad puede medirse, por ejemplo, mediante un osmómetro de tipo presión de vapor o punto de congelación.

15 Tal como se usa en el presente documento, el término “cantidad eficaz” se refiere a la cantidad de un agente (por ejemplo un agente profiláctico o terapéutico) que es suficiente para reducir y/o mejorar la gravedad y/o duración de una o más enfermedades y/o trastornos.

20 Tal como se usa en el presente documento, los términos “agente terapéutico” y “agentes terapéuticos” se refieren a cualquier agente que puede usarse en la prevención, tratamiento y/o gestión de una o más enfermedades y/o trastornos. En el contexto de la presente invención, el término “agente terapéutico” se refiere a un polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina. En ciertas otras realizaciones, el término “agente terapéutico” se refiere a un agente distinto del polipéptido de la invención que puede usarse en la composición.

25 Tal como se usa en el presente documento, el término “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a la cantidad de un agente terapéutico (por ejemplo un polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina), que es suficiente para reducir la gravedad de una o más enfermedades y/o trastornos.

30 El término “excipiente” tal como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia inerte que se utiliza normalmente como un diluyente, vehículo, conservante, aglutinante o agente estabilizante para fármacos que confiere una propiedad física beneficiosa a una formulación, tal como estabilidad proteica aumentada, solubilidad proteica aumentada y/o viscosidad disminuida. Los ejemplos de excipientes incluyen, pero no se limitan a, proteínas (por ejemplo, albúmina sérica), aminoácidos (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina, glicina), tensioactivos (por ejemplo, dodecilsulfato de sodio (SDS), polisorbatos tales como Tween 20 y Tween 80, poloxámeros tales como Pluronic, y otros tensioactivos no iónicos tales como polietilenglicol (PEG)), sacáridos (por ejemplo, glucosa, sacarosa, maltosa y trehalosa), polioles (por ejemplo, manitol y sorbitol), ácidos grasos y fosfolípidos (por ejemplo, alquilsulfonatos y caprilato). Para información adicional con respecto a los excipientes, véase Remington's Pharmaceutical Sciences (por Joseph P. Remington, 18<sup>a</sup> ed., Mack Publishing Co., Easton, PA).

35 El término “dominio variable” se refiere a la parte o dominio de un anticuerpo o molécula de inmunoglobulina que es parcial o completamente responsable de la unión a antígeno. El término “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 pone a los dominios variables individuales aparte de inmunoglobulinas “convencionales” o sus fragmentos, en los que dos dominios de inmunoglobulina, en particular dos “dominios variables” interactúan 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) interactúan para formar un sitio de unión a antígeno. En este caso, las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) tanto de VH como de VL contribuirán con el sitio de unión a antígeno, es decir un total de 6 CDR participarán en la formación del sitio de unión a antígeno.

40 En cambio, el sitio de unión de un dominio variable individual de inmunoglobulina está formado por un dominio VH o VL individual. Por tanto, el sitio de unión a antígeno de un dominio variable individual de inmunoglobulina está formado por no más de tres CDR. El término “dominio variable individual de inmunoglobulina” no comprende fragmentos de inmunoglobulinas convencionales en los que el sitio de unión a antígeno está formado por un dominio variable individual.

45 Generalmente, los dominios variables individuales de inmunoglobulina serán secuencias de aminoácidos que consisten esencialmente en 4 regiones de entramado (FR1 a FR4 respectivamente) y 3 regiones determinantes de la complementariedad (CDR1 a CDR3 respectivamente); o cualquier fragmento adecuado de una secuencia de aminoácidos de este tipo (que contendrá entonces habitualmente al menos algunos de los residuos de aminoácido que forman al menos una de las CDR). Tales dominios variables individuales de inmunoglobulina y fragmentos son lo más preferiblemente de tal manera que comprenden un pliegue de inmunoglobulina o son capaces de formar, en condiciones adecuadas, un pliegue de inmunoglobulina. De tal modo, el dominio variable individual de

inmunoglobulina puede comprender, por ejemplo, una secuencia de dominio variable de cadena ligera (por ejemplo una secuencia de  $V_L$ ) o un fragmento adecuado de la misma; o una secuencia de dominio variable de cadena pesada (por ejemplo una secuencia de  $V_H$  o secuencia de  $V_{HH}$ ) 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 inmunoglobulina, de tal 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, como es por ejemplo el caso de los dominios variables que están presentes por ejemplo en anticuerpos convencionales y fragmentos scFv que necesitan interactuar con otro dominio variable, por ejemplo a través de una interacción  $V_H/V_L$ , para formar un dominio de unión a antígeno funcional.

Los dominios variables individuales de inmunoglobulina pueden ser secuencias de dominio variable de cadena ligera (por ejemplo una secuencia de  $V_L$ ), o secuencias de dominio variable de cadena pesada (por ejemplo una secuencia de  $V_H$ ); más específicamente, los dominios variables individuales pueden ser secuencias de dominio variable de cadena pesada que derivan de un anticuerpo de cuatro cadenas convencional o secuencias de dominio variable de cadena pesada que derivan de un anticuerpo de cadena pesada.

El dominio variable individual de inmunoglobulina puede ser un anticuerpo de dominio (o una secuencia de aminoácidos que es adecuada para su uso como un anticuerpo de dominio), un anticuerpo de dominio individual (o una secuencia de aminoácidos que es adecuada para su uso como un anticuerpo de dominio individual), un "dAc" (o una secuencia de aminoácidos que es adecuada para su uso como un dAc) o un Nanobody<sup>®</sup> (tal como se define en el presente documento, y que incluye pero no se limita a una secuencia de  $V_{HH}$ ) [nota: Nanobody<sup>®</sup> y Nanobodies<sup>®</sup> son marcas registradas de Ablynx N.V.]; otros dominios variables individuales de inmunoglobulina, o cualquier fragmento adecuado de uno cualquiera de los mismos. Para una descripción general de anticuerpos de dominio (individual), también se hace referencia a la técnica anterior citada en el presente documento, así como al documento EP 0 368 684. Para el término "dAc", se hace referencia por ejemplo a Ward *et al.* 1989 (Nature 341: 544-546), a Holt *et al.* 2003 (Trends Biotechnol. 21: 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 menos preferidos en el contexto de la presente invención porque no son de origen de mamífero, los dominios variables individuales de inmunoglobulina pueden derivar de ciertas especies de tiburón (por ejemplo, los denominados "dominios IgNAR", véase por ejemplo el documento WO 05/18629).

En particular, los polipéptidos pueden comprender uno o más Nanobodies o un fragmento adecuado de los mismos. Para una descripción adicional de  $V_{HH}$  y Nanobodies, se hace referencia al artículo de revisión por Muldermans 2001 (Reviews in Molecular Biotechnology 74: 277-302; así como a las siguientes solicitudes de patente, que se mencionan como técnica anterior general: los documentos WO 94/04678, WO9504079 y WO9634103 de la Vrije Universiteit Brussel; los documentos WO9425591, WO9937681, WO0040968, WO0043507, WO 00/65057, WO 01/40310, WO 01/44301, EP 1 134 231 y WO 02/48193 de Unilever; los documentos WO 97/49805, WO 01/21817, WO 03/035694, WO 03/054016 y WO 03/055527 del Vlaams Instituut voor Biotechnologie (VIB); el documento WO 03/050531 de Algonomics N.V. y Ablynx N.V.; el documento WO 01/90190 por el National Research Council of Canada; el documento WO 03/025020 (= EP 1 433 793) por el Institute of Antibodies; así como los 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 mencionada en estas solicitudes, y en particular a la lista de referencias mencionada en las páginas 41-43 de la solicitud internacional WO 06/040153. Tal como se describe en estas referencias, los Nanobodies (en particular secuencias de  $V_{HH}$  y Nanobodies parcialmente humanizados) pueden caracterizarse en particular por la presencia de uno o más "residuos distintivos" en una o más de las secuencias de entramado. Una descripción adicional de los Nanobodies, incluyendo humanización y/o camelización de Nanobodies, así como otras modificaciones, partes o fragmentos, derivados o "fusiones de Nanobodies", constructos multivalentes (incluyendo algunos ejemplos no limitativos de secuencias de ligador) y diferentes modificaciones para aumentar la semivida de los Nanobodies y sus preparaciones pueden encontrarse por ejemplo en los documentos WO 08/101985 y WO 08/142164.

El número total de residuos de aminoácido en un Nanobody puede estar en la región de 110-120, es preferiblemente de 112-115, y es lo más preferiblemente 113. Sin embargo debe observarse que partes, fragmentos, análogos o derivados (tal como se describen adicionalmente en el presente documento) de un Nanobody no están particularmente limitados en cuanto a su longitud y/o tamaño, siempre que tales partes, fragmentos, análogos o derivados cumplan los requisitos adicionales explicados resumidamente en el presente documento y también sean preferiblemente adecuados para los propósitos descritos en el presente documento.

Por tanto, en el significado de la presente invención, el término "dominio variable individual de inmunoglobulina" comprende polipéptidos que derivan de una fuente no humana, preferiblemente un camélido, preferiblemente un anticuerpo de cadena pesada de camélido. Pueden estar humanizados, tal como se describió previamente. Además, el término comprende polipéptidos derivados de fuentes distintas de camélidos, por ejemplo ratón o humano, que se han "camelizado", tal como se describió previamente.

El término “dominio variable individual de inmunoglobulina” también abarca dominios variables de diferente origen, comprendiendo dominios variables de ratón, rata, conejo, burro, humano y camélido; así como dominios variables completamente humanos, humanizados o quiméricos. Por ejemplo, la invención comprende dominios variables de camélido y dominios variables de camélido humanizados o dominios variables camelizados, por ejemplo dAc camelizado tal como se describe por Ward *et al* (véase por ejemplo el documento WO 94/04678 y Davies y Riechmann (1994, FEBS Lett. 339: 285-290) y (1996, Protein Eng. 9: 531-537)). Además, la invención comprende dominios variables fusionados, por ejemplo constructos multivalentes y/o multiespecíficos (para polipéptidos multivalentes y multiespecíficos que contienen uno o más dominios  $V_{HH}$  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).

Los dominios variables individuales de inmunoglobulina están preferiblemente en forma esencialmente aislada (tal como se define en el presente documento), o forman parte de un polipéptido (también denominado “polipéptido de la invención”), que puede comprender o consistir esencialmente en uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina y que pueden comprender además opcionalmente una o más secuencias de aminoácidos adicionales (todas opcionalmente conectadas mediante uno o más ligadores adecuados). Por ejemplo, y sin limitación, el uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina pueden usarse como una unidad de unión en un polipéptido de este tipo, que puede opcionalmente contener una o más secuencias de aminoácidos adicionales que pueden servir como una unidad de unión (es decir contra una o más de otras dianas), de modo que se proporciona un polipéptido monovalente, multivalente o multiespecífico de la invención, respectivamente como se describe por ejemplo en los documentos WO 08/101985, WO 08/142164, WO 09/068625, WO 09/068627 y WO 08/020079. Una proteína o polipéptido de este tipo también puede estar en forma esencialmente aislada (tal como se define en el presente documento) y los métodos, aerosoles y composiciones de la presente invención se aplican igualmente a dominios variables individuales de inmunoglobulina y a polipéptidos que comprenden uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina.

Según la invención, el término “dominio variable individual de inmunoglobulina” puede comprender constructos que comprenden dos o más unidades de unión a antígeno en forma de dominio variable individual de inmunoglobulina, tal como se describió anteriormente de manera resumida. Por ejemplo, dos (o más) dominios variables individuales de inmunoglobulina con la misma o diferente especificidad de antígeno pueden conectarse para formar por ejemplo un constructo bivalente, trivalente o multivalente. Mediante la combinación de dominios variables individuales de inmunoglobulina de dos o más especificidades, pueden formarse constructos biespecíficos, triespecíficos, etc. Por ejemplo, un dominio variable individual de inmunoglobulina según la invención puede comprender o consistir esencialmente en dos o tres dominios variables individuales de inmunoglobulina idénticos o dos dominios variables individuales de inmunoglobulina dirigidos contra la diana A, y un dominio variable individual de inmunoglobulina contra la diana B. Tales constructos y modificaciones de los mismos, que el experto en la técnica puede prever fácilmente, están todos abarcados por el término “dominio variable individual de inmunoglobulina” tal como se usa en el presente documento y también se denominan “polipéptido de la invención” o “polipéptidos de la invención”.

Tal como se describe adicionalmente en el párrafo m) en la página 53 del documento WO 08/020079, se dice que una secuencia de aminoácidos (tal como un Nanobody, un anticuerpo, un polipéptido de la invención, o de manera general una proteína o polipéptido de unión a antígeno o un fragmento de los mismos) que puede unirse(específicamente) a, que tiene afinidad por y/o que tiene especificidad por un determinante antigénico, epítipo, antígeno o proteína específicos (o por al menos una parte, fragmento o epítipo de los mismos) es “contra” o está “dirigida contra” dicho determinante antigénico, epítipo, antígeno o proteína.

Un “aerosol” tal como se usa en el presente documento se refiere a una suspensión de líquido en forma de partículas finas dispersadas en un gas (es decir una niebla fina o pulverización que contiene partículas diminutas). Tal como se usa en el presente documento, el término “partícula” se refiere a líquidos, por ejemplo, gotitas. Pueden inhalarse aerosoles farmacéuticos para la administración de los polipéptidos de la invención a los pulmones mediante la boca y/o mediante la nariz. En la administración por vía pulmonar, se considera necesaria la generación de partículas más pequeñas de aproximadamente 5 ó 6 micrómetros para conseguir la deposición como la fracción de partículas finas (FPF) (es decir en la región alveolar y bronquiolar respiratoria) (O’Callaghan y Barry, 1997, Thorax 52: S31-S44). El tamaño de partícula en un aerosol puede expresarse como mediana del diámetro en volumen (VMD). La “mediana del diámetro en volumen” se define como el diámetro de partícula geométrica de un aerosol, en el que el 50% del volumen del aerosol es mayor que este valor y el 50% es menor que este valor. La “mediana del diámetro aerodinámico en masa” se define como el diámetro aerodinámico medio geométrico, en el que el 50% de las partículas en peso será menor que este valor y el 50% será mayor que este valor. Cuando la densidad de las partículas de aerosol es de  $1 \text{ g/cm}^3$ , VMD y MMAD son equivalentes. El aerosol puede tener una mediana del diámetro en volumen de entre 1 y  $10 \mu\text{m}$ , preferiblemente entre 1 y  $7 \mu\text{m}$ , lo más preferiblemente entre 1 y  $5 \mu\text{m}$ , tal como aproximadamente 3, 3,5 ó  $4 \mu\text{m}$ .

“Aerosolización” tal como se usa en la presente invención significa la producción de un aerosol mediante la transformación de una composición de la invención en partículas pequeñas o gotitas. Esto se hace habitualmente a través de un sistema de administración de aerosol (tal como se define adicionalmente).

En el contexto de la presente invención, el término “atomizar” y “atomización” significa la producción de gotitas mediante alteración (mecánica) de un líquido a granel. Las gotitas producidas compondrán la niebla fina o pulverización que forma el aerosol.

5 Los términos “nebulizador” y “nebulización” tal como se usan en la presente invención se refieren a la conversión de un líquido en una niebla o pulverización fina mediante un nebulizador (tal como se define adicionalmente en el presente documento).

10 Los términos “material atomizado” o “material aerosolizado” es el material (tal como la composición que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina) que se ha sometido al procedimiento de aerosolización. Este material todavía puede estar en forma de un aerosol (tal como se define en el presente documento). También puede suceder que este material se transforme de vuelta en un líquido a granel que se ha recogido mediante la combinación de las diferentes gotitas presentes en el aerosol.

15 Los términos “estabilidad” y “estable” tal como se usan en el presente documento se refieren a la resistencia a la agregación del polipéptido de la invención que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina tras la atomización de la composición que comprende dicho polipéptido. Aparte de esto y/o además, las composiciones “estables” de la invención retienen actividad biológica tras la atomización. La estabilidad de dicho polipéptido puede evaluarse mediante grados de agregación, tal como se miden por ejemplo mediante SE-HPLC, recuento de partículas subvisibles, ultracentrifugación analítica, dispersión de luz dinámica, medición de la razón de DO320/DO280, dispersión de luz elástica, etc., y/o mediante el % de actividad biológica (tal como se mide por ejemplo mediante ELISA, Biacore, etc.) en comparación con una composición de referencia que no se ha atomizado.

25 “Agregación” o “formación de agregado” tal como se usa en la presente invención significa el desarrollo de agregados. En el contexto de la presente invención, un “agregado” incluye cualquier partícula que consiste en más de una subunidad idéntica (o monómero) del polipéptido de la invención, incluyendo también oligómeros, tales como por ejemplo dímeros, trímeros, tetrámeros, pentámeros. Los agregados pueden ser de diferentes tamaños, incluyendo agregados de alto peso molecular, así como agregados de bajo peso molecular. Tal como se usa en el presente documento, los agregados de alto peso molecular (abreviados como HMW) consisten habitualmente en más de cuatro unidades de monómero, tales como pentámeros; los agregados de bajo peso molecular consisten habitualmente en cuatro o menos unidades de monómero, tales como dímeros, trímeros y/o tetrámeros.

30 La frase “niveles de agregación de bajos a indetectables” tal como se usa en el presente documento se refiere a muestras que contienen no más del 7%, no más del 6%, no más del 5%, no más del 4%, no más del 3%, no más del 2%, no más del 1%, o no más del 0,5% de agregación en peso de proteína.

35 En los métodos, los aerosoles y composiciones de la invención, menos del 6% (menos del 5%, incluso más preferiblemente menos del 4%, menos del 3%, menos del 2%, o lo más preferiblemente menos del 1%) del polipéptido de la invención forma agregados (tal como se define en el presente documento) durante la atomización. La formación de agregado en el material atomizado puede evaluarse mediante diversos métodos analíticos y/o inmunológicos conocidos en la técnica incluyendo por ejemplo, pero sin limitarse a, cromatografía de exclusión molecular (SE-HPLC), recuento de partículas subvisibles, ultracentrifugación analítica (AUC), dispersión de luz dinámica (DLS), dispersión de luz estática (SLS), dispersión de luz elástica, DO320/DO280, espectroscopía de infrarrojos con transformada de Fourier (FTIR), dicroísmo circular (CD), técnicas de despliegue de proteínas inducida por urea, fluorescencia de triptófano intrínseca y/o técnicas de calorimetría diferencial de barrido. La distribución de tamaño molecular y las cantidades relativas de polipéptido de la invención e impurezas de proteína pueden determinarse mediante cromatografía de líquidos de alta resolución de exclusión molecular (SE-HPLC). El experto en la técnica conoce métodos de SE-HPLC y también se describen en la sección de ejemplos.

40 En una ultracentrifugación analítica, una muestra que está centrifugándose puede monitorizarse en tiempo real a través de un sistema de detección óptico, usando un sistema sensible a la absorción de luz ultravioleta y/o al índice de refracción óptico de interferencia. Esto permite al operario observar la evolución de la concentración de la muestra frente al perfil de eje de rotación como resultado del campo centrífugo aplicado. Con instrumentación moderna, estas observaciones se digitalizan electrónicamente y se almacenan para un análisis matemático adicional. Normalmente se realizan dos tipos de experimentos con estos instrumentos: experimentos de velocidad de sedimentación y experimentos de equilibrio de sedimentación.

45 Los experimentos de velocidad de sedimentación tienen como objetivo interpretar todo el transcurso temporal de sedimentación, y notificar sobre la forma y masa molar de las macromoléculas disueltas, así como su distribución de tamaño (Perez-Ramirez y Steckert, 2005, Therapeutic Proteins: Methods and Protocols. C.M. Smales y D.C. James, Eds. Vol. 308: 301-318. Humana Press Inc, Totowa, NJ, EE.UU.). La resolución de tamaño de este método aumenta aproximadamente con el cuadrado de los radios de partícula, y mediante el ajuste de la velocidad del rotor del experimento pueden cubrirse intervalos de tamaño de desde 100 Da hasta 10 GDa. También pueden usarse experimentos de velocidad de sedimentación para estudiar equilibrios químicos reversibles entre especies macromoleculares, mediante la monitorización del número y masa molar de complejos macromoleculares, mediante

la obtención de información sobre la composición del complejo a partir de análisis de señales múltiples aprovechando las diferencias en la señal espectroscópica de cada componente, o mediante el seguimiento de la dependencia con respecto a la composición de las velocidades de sedimentación del sistema macromolecular, tal como se describe en la teoría de Gilbert-Jenkins.

5 Los experimentos de equilibrio de sedimentación sólo tienen en cuenta el estado estacionario final del experimento, en el que la sedimentación está equilibrada por difusión que se opone a los gradientes de concentración, lo que tiene como resultado un perfil de concentración independiente del tiempo. Las distribuciones de equilibrio de sedimentación en el campo centrífugo se caracterizan por distribuciones de Boltzmann. Este experimento es  
10 insensible a la forma de la macromolécula, y notifica directamente sobre la masa molar de las macromoléculas y, para mezclas que reaccionan químicamente, sobre constantes de equilibrio químico.

15 Los tipos de información que pueden obtenerse a partir de una ultracentrifugación analítica incluyen la forma bruta de las macromoléculas, los cambios conformacionales en las macromoléculas, y las distribuciones de tamaño de muestras macromoleculares. Para macromoléculas, tales como proteínas, que existen en equilibrio químico con diferentes complejos no covalentes, pueden estudiarse el número y la estequiometría de subunidades de los complejos y las constantes de equilibrio. (Véase también Scott D.J., Harding S.E. y Rowe A.J. Analytical Ultracentrifugation Techniques and Methods, RSC Publishing).

20 La dispersión de luz dinámica (también conocida como espectroscopía de correlación de fotones o dispersión de luz cuasi-elástica) es una técnica en física, que puede usarse para determinar el perfil de distribución de tamaño de partículas pequeñas en disolución. Cuando un haz de luz pasa a través de una dispersión coloidal, las partículas o gotitas dispersan parte de la luz en todas las direcciones. Cuando las partículas son muy pequeñas en comparación con la longitud de onda de la luz, la intensidad de la luz dispersada es uniforme en todas las direcciones (dispersión de Rayleigh); para partículas más grandes (por encima de aproximadamente 250 nm de diámetro), la intensidad es  
25 dependiente del ángulo (dispersión de Mie). Si la luz es coherente y monocromática, tal como de un láser por ejemplo, es posible observar fluctuaciones dependientes del tiempo en la intensidad dispersada utilizando un detector adecuado tal como un fotomultiplicador capaz de funcionar en modo de recuento de fotones.

30 Estas fluctuaciones surgen del hecho de que las partículas son lo suficientemente pequeñas como para experimentar movimiento térmico aleatorio (browniano) y por tanto la distancia entre las mismas varía constantemente. La interferencia constructiva y destructiva de luz dispersada por partículas vecinas dentro de la zona iluminada da lugar a la fluctuación de intensidad en el plano de detector lo que, ya que se produce a partir del movimiento de partículas, contiene información sobre este movimiento. El análisis de la dependencia con respecto al tiempo de la fluctuación de la intensidad puede por tanto producir el coeficiente de difusión de las partículas a partir  
35 del cual, mediante la ecuación de Stokes Einstein, conociendo la viscosidad del medio, puede calcularse el diámetro o radio hidrodinámico de las partículas. (Véase también Berne B. J. y Pecora R. Dynamic Light Scattering With Applications to Chemistry, Biology and Physics, Dover Publications).

40 También puede medirse la agregación mediante el instrumento PAMAS SVSS-C (sistema de jeringa de pequeño volumen C) de (PArtikelMess - und AnalyseSysteme GMBH), que es un analizador de distribución de tamaño de partícula para fluidos poco viscosos. Utiliza el principio de oscurecimiento de luz para detectar partículas subvisibles en el intervalo de tamaño de 1  $\mu\text{m}$  - 200  $\mu\text{m}$ . Los criterios de validación/límites especificados de la Farmacopea Europea (EP<2.9.19 Particulate Contamination: sub-visible particles) para productos parenterales de pequeño y gran  
45 volumen están definidos por las cuentas totales por envase:

- Para partículas > 10  $\mu\text{m}$ , no más de 6000 cuentas por envase

- Para partículas > 25  $\mu\text{m}$ , no más de 600 cuentas por envase

50 La razón de DO320/DO280 también es una medida de la turbidez o la presencia de materiales particulados en la muestra. En un aspecto preferido, la razón de DO320/DO280 de la composición de la invención debe ser de 0,05 o menos, preferiblemente de 0,01 o menos, tal como de 0,005 o menos.

55 La tendencia para la formación de agregado de un polipéptido en un determinado aerosol también puede medirse mediante dispersión de luz elástica. La dispersión de luz elástica puede medirse en un espectrofluorómetro (por ejemplo longitud de onda de excitación y emisión de 500 nm) mediante desnaturalización inducida por temperatura tal como se mide por ejemplo a un ángulo de 90°. Preferiblemente la dispersión máxima permanecerá dentro del límite de detección de absorción. La dispersión debe ser de 1000 abs o menos, preferiblemente de 750 abs o  
60 menos, tal como de 500 abs o menos.

El contenido en proteína de los polipéptidos recuperados de la invención en el material atomizado puede detectarse, por ejemplo, mediante SE-HPLC o mediante métodos espectrofotométricos.

65 Se ha observado una formación de agregado significativamente reducida de los polipéptidos de la invención tras la atomización de composiciones que comprenden adicionalmente un tensioactivo a una concentración de entre el

0,001% y el 1% (v:v); tras la atomización de composiciones que contienen el polipéptido de la invención a una concentración de 20 mg/ml o más, tal como por ejemplo a una concentración de 25 mg/ml o más, o a una concentración de 50 mg/ml o incluso más; y/o cuando se utilizó un nebulizador de malla vibrante para la atomización de la composición.

5 Por consiguiente, la presente invención se refiere a un método para la preparación de un aerosol de dominios variables individuales de inmunoglobulina en el que la cantidad de formación de agregado es del 6% o menos, el % de formación de agregado tal como se determina mediante SE-HPLC, comprendiendo dicho método la etapa de atomizar una composición que comprende un portador acuoso y un polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina a una concentración de 1 mg/ml a 200 mg/ml, en el que:

- el polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina está presente en la composición a una concentración de 50 mg/ml o más; y

15 - la composición se atomiza en un nebulizador de malla vibrante.

En otro aspecto, que no es parte de la invención, la presente solicitud describe un método para la preparación de un aerosol de dominios variables individuales de inmunoglobulina en el que la cantidad de formación de agregado es del 6% o menos, el % de formación de agregado tal como se determina mediante SE-HPLC, comprendiendo dicho método la etapa de atomizar una composición que comprende un portador acuoso y un polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina a una concentración de menos de 20 mg/ml, tal como por ejemplo a una concentración de 5 mg/ml, 10 mg/ml o 15 mg/ml, en el que la composición comprende además un tensioactivo a una concentración de entre el 0,001% y el 1% (v:v); y/o la composición se atomiza en un nebulizador de malla vibrante.

25 En todavía otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para la preparación de un aerosol de dominios variables individuales de inmunoglobulina en el que la cantidad de formación de agregado es del 6% o menos, el % de formación de agregado tal como se determina mediante SE-HPLC, comprendiendo dicho método la etapa de atomizar una composición que comprende un portador acuoso y un polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina a una concentración de 50 mg/ml o incluso más, y la composición se atomiza en un nebulizador de malla vibrante.

35 En aún otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para la preparación de un aerosol de dominios variables individuales de inmunoglobulina en el que la cantidad de formación de agregado es del 6% o menos, el % de formación de agregado tal como se determina mediante SE-HPLC, comprendiendo dicho método la etapa de atomizar una composición que comprende un portador acuoso y un polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina a una concentración de 50 mg/ml o incluso más, en el que la composición no comprende un tensioactivo; y la composición se atomiza en un nebulizador de malla vibrante.

40 Aparte de esto y/o además, en los métodos, aerosoles y composiciones de la invención, se ha observado de poca a ninguna pérdida de potencia y/o actividad biológica de los polipéptidos de la invención en el material atomizado.

La potencia y/o actividad biológica de un producto biológico describe la capacidad o habilidad específica de dicho producto biológico para conseguir un efecto biológico definido. Los términos "actividad biológica" o "actividades biológicas" tal como se usan en el presente documento se refieren a actividades de dominio variable individual de inmunoglobulina, incluyendo, pero sin limitarse a, habilidades de unión específica del dominio variable individual de inmunoglobulina a la diana de interés tal como se mide mediante diversos ensayos inmunológicos, incluyendo, pero sin limitarse a, ELISA y/o por resonancia de plasmón superficial (Biacore). En una realización, tras la atomización de la composición de la invención, los dominios variables individuales de inmunoglobulina presentes en el material atomizado retienen al menos el 50%, preferiblemente al menos el 55%, el 60%, el 65%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 98% o incluso el 99% o más de la habilidad para unirse específicamente a la diana de interés en comparación con una composición de referencia (que no se ha atomizado), tal como se mide mediante un ensayo inmunológico conocido por un experto en la técnica o descrito en el presente documento. Por ejemplo, puede utilizarse un ensayo basado en ELISA para comparar las habilidades del dominio variable individual de inmunoglobulina para unirse específicamente a su diana después de la atomización de dicho dominio variable individual de inmunoglobulina y sin atomización de dicho dominio variable individual de inmunoglobulina.

La potencia y actividades biológicas de los polipéptidos de la invención pueden evaluarse mediante diversos ensayos incluyendo cualquier ensayo *in vitro* adecuado, ensayo basado en células, ensayo *in vivo* y/o modelo animal conocidos en sí mismos, o cualquier combinación de los mismos, dependiendo de la enfermedad o trastorno específico implicado. Ensayos *in vitro* adecuados resultarán evidentes para el experto en la técnica, y por ejemplo incluyen ELISA; ensayo de unión FACS; Biacore; ensayo de unión competitiva (AlphaScreen<sup>®</sup>, Perkin Elmer, Massachusetts, EE.UU.; FMAT). Por ejemplo, SEQ ID NO: 2 y 3 interactúan con la proteína F de VSRh y bloquean la interacción de la proteína F con su receptor. SEQ ID NO: 1 interactúa con IL-23 y bloquea la interacción de este ligando con su receptor. La potencia de SEQ ID NO: 1, 2 y 3 para bloquear la interacción ligando/receptor respectiva puede determinarse, por ejemplo mediante ELISA, Biacore, AlphaScreen<sup>®</sup>.

Por ejemplo, en una realización, el análisis cinético de Biacore utiliza tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR) para monitorizar interacciones macromoleculares en tiempo real y se utiliza para determinar las velocidades de asociación y disociación de unión de polipéptidos de la composición de la invención a su diana. El análisis cinético de Biacore comprende analizar la unión y disociación de la diana a partir de chips con polipéptidos inmovilizados de la invención en su superficie. Un estudio cinético de Biacore típico implica la inyección de 250  $\mu$ l de reactivo de polipéptido a concentración variable en tampón de solución salina tamponada con HEPES (HBS) que contiene Tween 20 al 0,005% sobre una superficie de chip sensor, sobre el que se ha inmovilizado el antígeno. En el sistema BIAcore 3000, el ligando está inmovilizado en dextrano carboximetilado sobre una superficie de oro, mientras la segunda pareja (analito) se captura a medida que fluye sobre la superficie de ligando inmovilizado. Los ligandos inmovilizados son notablemente resistentes y mantienen su actividad biológica. Los analitos unidos pueden separarse del ligando inmovilizado sin afectar a su actividad para permitir varios ciclos de unión y regeneración en la misma superficie inmovilizada. Se detecta la interacción en tiempo real mediante SPR y a alta sensibilidad. Dado que la misma afinidad puede reflejar diferentes velocidades de asociación y velocidades de disociación, este instrumento destaca con respecto a la mayoría de los demás métodos de medición de la afinidad en que mide velocidades de asociación ( $k_a$ ) y velocidades de disociación ( $k_d$ ). También son factibles experimentos de determinación de la concentración.

En los métodos, aerosoles y composiciones de la invención, se ha observado de poca a ninguna pérdida de potencia y/o actividad biológica de los polipéptidos de la invención en el material atomizado, tal como se evalúa mediante diversos ensayos inmunológicos que incluyen, por ejemplo, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y resonancia de plasmón superficial, que miden la habilidad del polipéptido para unirse específicamente a su antígeno. Tras la atomización, los polipéptidos presentes en la composición de la presente invención retienen más del 80%, más del 85%, más del 90%, más del 95%, más del 98%, más del 99%, o incluso más del 99,5% de sus actividades biológicas iniciales (por ejemplo, la habilidad de unirse a IL-23, VSRh) de los polipéptidos antes de la atomización.

En una realización específica de la invención, los polipéptidos se unen a IL-23. Tras la atomización de la composición de la presente invención que comprende dichos polipéptidos de unión a IL-23, al menos el 80% (al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98%, al menos el 99%, o al menos el 99,5%) de los polipéptidos retienen su actividad de unión a IL-23.

En otra realización específica, los polipéptidos se unen a VSRh. Tras la atomización de la composición de la presente invención que comprende dichos polipéptidos de unión a VSRh, al menos el 80% (al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98%, al menos el 99%, o al menos el 99,5%) de los polipéptidos de la invención retienen su actividad de unión a VSRh.

Otros modelos *in vitro* e *in vivo* adecuados para determinar la potencia y/o actividad biológica de los polipéptidos presentes en el material atomizado resultarán evidentes para el experto en la técnica y dependerán de la enfermedad y/o trastorno previsto que va a prevenirse y/o tratarse. Modelos animales adecuados para someter a prueba la potencia y/o actividad biológica de SEQ ID NO: 1 se describen por ejemplo en los documentos WO 09/068627 y WO 09/147248. La potencia y/o actividad biológica de SEQ ID NO: 2 para neutralizar VSRh puede determinarse por ejemplo, *in vitro*, por ejemplo en un ensayo de microneutralización de VSRh (véase por ejemplo el documento WO 09/147248) e, *in vivo*, por ejemplo en el modelo de rata de algodón para estudios sobre VSR (Murphy *et al.*, 1988, Virus Res. 11: 1-15).

Se ha observado de poca a ninguna pérdida de potencia de los polipéptidos tras la atomización de composiciones que comprenden adicionalmente un tensioactivo a una concentración de entre el 0,001% y el 1% (v:v); tras la atomización de composiciones que contienen el polipéptido de la invención a una concentración de 20 mg/ml o más, tal como por ejemplo a una concentración de 25 mg/ml o más, o a una concentración de 50 mg/ml o incluso más; y/o cuando se utilizó un nebulizador de malla vibrante para la atomización de la composición.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un método para la preparación de un aerosol de dominios variables individuales de inmunoglobulina en el que se retiene más del 80%, más del 85%, más del 90%, más del 95%, más del 98%, más del 99%, o más del 99,5% de la actividad biológica inicial del dominio variable de inmunoglobulina, comprendiendo dicho método la etapa de atomizar una composición que comprende un portador acuoso y un polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina a una concentración de 1 mg/ml a 200 mg/ml, en el que:

- el polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina está presente en la composición a una concentración de 50 mg/ml o más; y

- la composición se atomiza en un nebulizador de malla vibrante.

En otro aspecto, que no es parte de la invención, la presente solicitud describe un método para la preparación de un aerosol de dominios variables individuales de inmunoglobulina en el que se retiene más del 80%, más del 85%, más del 90%, más del 95%, más del 98%, más del 99%, o más del 99,5% de la actividad biológica inicial del dominio

variable de inmunoglobulina, comprendiendo dicho método la etapa de atomizar una composición que comprende un portador acuoso y un polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina a una concentración de menos de 20 mg/ml, tal como por ejemplo a una concentración de 5 mg/ml, 10 mg/ml o 15 mg/ml, en el que la composición comprende además un tensioactivo a una concentración de entre el 0,001% y el 1% (v:v); y/o la composición se atomiza en un nebulizador de malla vibrante.

En todavía otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para la preparación de un aerosol de dominios variables individuales de inmunoglobulina en el que se retiene más del 80%, más del 85%, más del 90%, más del 95%, más del 98%, más del 99%, o más del 99,5% de la actividad biológica inicial del dominio variable de inmunoglobulina, comprendiendo dicho método la etapa de atomizar una composición que comprende un portador acuoso y un polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina a una concentración de 50 mg/ml o incluso más, y la composición se atomiza en un nebulizador de malla vibrante.

En aún otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para la preparación de un aerosol de dominios variables individuales de inmunoglobulina en el que se retiene más del 80%, más del 85%, más del 90%, más del 95%, más del 98%, más del 99%, o más del 99,5% de la actividad biológica inicial del dominio variable de inmunoglobulina, comprendiendo dicho método la etapa de atomizar una composición que comprende un portador acuoso y un polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina a una concentración de 50 mg/ml o incluso más, en el que la composición no comprende un tensioactivo; y la composición se atomiza en un nebulizador de malla vibrante.

Por consiguiente, en el material atomizado obtenido en el método de la invención preferiblemente:

- menos del 6%, menos del 5%, incluso más preferiblemente menos del 4%, menos del 3%, menos del 2%, o lo más preferiblemente menos del 1% del polipéptido de la invención forma agregados (tal como se define en el presente documento);

- al menos el 80% (al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98%, al menos el 99%, o al menos el 99,5%) del polipéptido retiene su actividad de unión (por ejemplo tal como se evalúa mediante ELISA y/o Biacore) a al menos una (preferiblemente a todas) de sus dianas.

El polipéptido que comprende o consiste esencialmente en uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina para su uso en los métodos y composiciones de la invención puede ser terapéutico o profiláctico, y puede ser útil en el tratamiento y/o gestión de una o más enfermedades. El polipéptido puede comprender o consistir esencialmente en uno, o al menos dos, o al menos tres dominios variables individuales de inmunoglobulina.

El polipéptido que comprende o consiste esencialmente en uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina para su uso en los métodos y composiciones de la invención puede reconocer cualquier diana y preferiblemente una diana que está asociada con una o más enfermedades. En un aspecto, el polipéptido de la invención reconoce una diana que está asociada con una o más enfermedades respiratorias. En otro aspecto, el polipéptido reconoce específicamente VSRh. En otro aspecto, el polipéptido reconoce específicamente IL-23. En un aspecto preferido, los dominios variables individuales de inmunoglobulina utilizados en el polipéptido de la invención pueden seleccionarse a partir de los documentos WO 09/068627 (tal como por ejemplo SEQ ID NO 2578, 2584 y/o 2585 del documento WO 09/068627), WO 2010/139808 (tal como por ejemplo SEQ ID NO: 142 del documento US 61/265,014) y WO 08/028977 (tal como por ejemplo SEQ ID NO: 62 del documento WO 08/028977). Los polipéptidos preferidos de la invención también pueden seleccionarse de SEQ ID NO: 1, 2 y 3.

La concentración de polipéptido de la invención presente en la composición de la invención puede ser cualquier concentración del polipéptido que proporciona el efecto deseado al sujeto. La concentración del polipéptido debe al menos ser tal que puede administrarse una cantidad eficaz del polipéptido al sujeto a través de administración por vía pulmonar. La concentración del polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina de la invención es de desde 1 hasta 200 mg/ml tal como aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 60 mg/ml, aproximadamente 65 mg/ml, aproximadamente 70 mg/ml, aproximadamente 80 mg/ml, aproximadamente 90 mg/ml o aproximadamente 100 mg/ml o más. La concentración de polipéptido de la invención puede ser de 110 mg/ml o más, 120 mg/ml o más, 130 mg/ml o más, 140 mg/ml o más, 150 mg/ml o más o incluso 200 mg/ml o más.

La concentración de polipéptido de la invención en la composición de la invención es de 50 mg/ml o incluso más. Los presentes inventores han demostrado que composiciones que comprenden el polipéptido de la invención en cantidades de 20 mg/ml o mayores, tal como por ejemplo 25 mg/ml o más, o 50 mg/ml o incluso más, muestran formación de agregado significativamente reducida tras la aerosolización en comparación con composiciones con una concentración de polipéptido que es de menos de 20 mg/ml. Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención se refiere a un método para la preparación de un aerosol de dominios variables individuales de inmunoglobulina en el que la cantidad de formación de agregado es del 6% o menos, el % de formación de agregado tal como se determina mediante SE-HPLC, comprendiendo dicho método la etapa de atomizar una composición que comprende un portador acuoso y un polipéptido que comprende uno o más dominios variables

individuales de inmunoglobulina, en el que el polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina está presente en la composición a una concentración de 50 mg/ml o incluso más. La invención también se refiere a un aerosol que comprende gotitas líquidas que pueden obtenerse mediante la atomización de una composición que comprende un portador acuoso y un polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina, en el que la cantidad de formación de agregado en el aerosol es del 6% o menos, el % de formación de agregado tal como se determina mediante SE-HPLC, y en el que el polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales está presente en la composición a una concentración de 50 mg/ml o incluso más. En un aspecto particular, la concentración de polipéptido de la invención en la composición de la invención es de 50 mg/ml, 60 mg/ml o más, 70 mg/ml o más, 80 mg/ml o incluso más. La invención se refiere además a una composición de este tipo adecuada para la preparación de un aerosol de dominios variables individuales de inmunoglobulina, en la que la cantidad de formación de agregado es del 6% o menos, el % de formación de agregado tal como se determina mediante SE-HPLC, comprendiendo dicha composición un portador acuoso y un polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina, en el que el polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales está presente en la composición a una concentración de 50 mg/ml o incluso más.

Aparte de y/o además de la concentración del polipéptido de la invención en la composición de la invención, la presencia de un tensioactivo en la composición de la invención también tuvo un efecto positivo sobre la formación de agregado en el material atomizado. Tras la atomización de una composición que comprende un tensioactivo, se redujo significativamente la formación de agregado en comparación con la atomización de una composición que no contenía el tensioactivo.

El efecto positivo de la presencia de un tensioactivo en la composición sobre la formación de agregado en el material atomizado fue lo más significativa tras la atomización de composiciones que contenían el polipéptido de la invención a una concentración de menos de 20 mg/ml, tal como por ejemplo a una concentración de 5 mg/ml, 10 mg/ml o 15 mg/ml.

Por consiguiente, en otro aspecto, que no es parte de la invención, la presente solicitud describe un método para la preparación de un aerosol de dominios variables individuales de inmunoglobulina en el que la cantidad de formación de agregado es del 6% o menos, el % de formación de agregado tal como se determina mediante SE-HPLC, comprendiendo dicho método la etapa de atomizar una composición que comprende un portador acuoso y un polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina a una concentración de menos de 20 mg/ml, tal como por ejemplo a una concentración de 5 mg/ml, 10 mg/ml o 15 mg/ml, en el que la composición también comprende un tensioactivo a una concentración de entre el 0,001% y el 1% (v:v). La solicitud también describe un aerosol que comprende gotitas líquidas que pueden obtenerse mediante la atomización de una composición que comprende un portador acuoso y un polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina a una concentración de menos de 20 mg/ml, tal como por ejemplo a una concentración de 5 mg/ml, 10 mg/ml o 15 mg/ml, en el que la cantidad de formación de agregado en el aerosol es del 6% o menos, el % de formación de agregado tal como se determina mediante SE-HPLC, y en el que la composición comprende además un tensioactivo a una concentración de entre el 0,001% y el 1% (v:v). La solicitud describe además una composición de este tipo adecuada para la preparación de un aerosol de dominios variables individuales de inmunoglobulina en la que la cantidad de formación de agregado es del 6% o menos, el % de formación de agregado tal como se determina mediante SE-HPLC, comprendiendo dicha composición un portador acuoso y un polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina a una concentración de menos de 20 mg/ml, tal como por ejemplo a una concentración de 5 mg/ml, 10 mg/ml o 15 mg/ml, en la que la composición comprende además un tensioactivo a una concentración de entre el 0,001% y el 1% (v:v).

La reducción de la formación de agregado en el material atomizado de composiciones de la invención que contienen el polipéptido de la invención a una concentración de 20 mg/ml o más, tal como por ejemplo a una concentración de 25 mg/ml o más, o a una concentración de 50 mg/ml o incluso más, fue menos pronunciada en presencia de un tensioactivo. Además, la cantidad relativa de agregados de alto peso molecular aumentó en el material atomizado de estas composiciones en presencia de un tensioactivo.

Por consiguiente, en todavía otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para la preparación de un aerosol de dominios variables individuales de inmunoglobulina en el que la cantidad de formación de agregado es del 6% o menos, el % de formación de agregado tal como se determina mediante SE-HPLC, comprendiendo dicho método la etapa de atomizar una composición que comprende un portador acuoso y un polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina a una concentración de 50 mg/ml o incluso más, en el que la composición no comprende un tensioactivo. La invención también se refiere a un aerosol que comprende gotitas líquidas que pueden obtenerse mediante la atomización de una composición que comprende un portador acuoso y un polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina a una concentración de 50 mg/ml o incluso más, en el que la cantidad de formación de agregado en el aerosol es del 6% o menos, el % de formación de agregado tal como se determina mediante SE-HPLC, y en el que la composición no comprende un tensioactivo. La invención se refiere además a una composición de este tipo adecuada para la preparación de un aerosol de dominios variables individuales de inmunoglobulina en el que la cantidad de formación de agregado es del 6% o menos, el % de formación de agregado tal como se determina mediante SE-HPLC,

comprendiendo dicha composición un portador acuoso y un polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina a una concentración de 50 mg/ml o incluso más, en la que la composición no comprende un tensioactivo.

5 Un tensioactivo se refiere a un agente surfactante que comprende una porción hidrófoba y una porción hidrófila. En un aspecto preferido, el tensioactivo no es iónico. Ciertos tensioactivos no iónicos a modo de ejemplo incluyen (sin limitarse a) alcoholes grasos, polisorbatos, incluyendo, sin limitarse a, polisorbato 80 (Tween 80) y polisorbato 20 (Tween 20), Triton X-100, copolímero polioxipropileno-polioxietileno (Pluronic<sup>®</sup>), y nonilfenoxipolietoxietanol (NP-40).  
 10 Otros tensioactivos que pueden utilizarse en la composición de la invención incluyen (sin limitarse a) fosfoglicéridos, tales como fosfatidilcolinas (lecitina), tales como el tensioactivo que se produce de manera natural, dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC). Otros tensioactivos a modo de ejemplo incluyen difosfatidilglicerol (DPPG), hexadecanol, polioxietileno-9-lauril éter, un ácido graso surfactante, tal como ácido palmítico o ácido oleico, trioleato de sorbitano (Span 85), glicocolato, surfactina, un poloxámero, un éster de ácido graso de sorbitano tal como trioleato de sorbitano, tiloxapol y un fosfolípido. En un aspecto específico, el tensioactivo se selecciona de Tween  
 15 20, Tween 80 o un poloxámero. Otros compuestos tales como polietilenglicol (PEG) tienen propiedades de tipo tensioactivo dado que actúan sobre la superficie de contacto aire-agua. En un aspecto de la invención, el tensioactivo no es PEG. En particular, la composición no comprende PEG 1000 a de aproximadamente el 2% a aproximadamente el 10% en tampón de fosfato 50 mM que contiene sacarosa al 1,2% (p/v). La concentración del tensioactivo puede oscilar entre el 0,001% y el 1% (v:v) (preferiblemente entre el 0,001% y el 0,1% (v:v), o entre el  
 20 0,01% y el 0,1% (v:v) tal como aproximadamente el 0,001% (v:v), el 0,005% (v:v), el 0,01% (v:v), el 0,02% (v:v), el 0,05% (v:v), el 0,08% (v:v), el 0,1% (v:v), el 0,5% (v:v), o el 1% (v:v) de la composición, de manera preferible aproximadamente desde el 0,04% hasta el 0,08% (v:v). En una realización específica, el tensioactivo es Tween 20 o Tween 80, que está a una concentración del 0,001% (v:v), el 0,005% (v:v), el 0,01% (v:v), el 0,02% (v:v), el 0,04%, el  
 25 0,05% (v:v), el 0,08% (v:v), el 0,1% (v:v), el 0,5% (v:v) o el 1% (v:v) de la composición, preferiblemente del 0,04% al 0,08% (v:v), en particular 0,04% (v:v).

Un ejemplo de una composición preferida descrita en el presente documento con estas características comprende Tween 80 al 0,01% (v:v), Tween 80 al 0,02% (v:v), Tween 80 al 0,04% (v:v) o Tween 80 al 0,08% (v:v).

30 El portador comprendido en la composición de la invención es preferiblemente un portador acuoso tal como por ejemplo agua destilada, agua MilliQ o agua para inyección (WFI). El pH de la composición de la invención generalmente no debe ser igual al punto isoeléctrico del polipéptido particular de la invención presente en la composición y puede oscilar desde aproximadamente 5,5 hasta aproximadamente 7,5, o desde aproximadamente  
 35 6,0 hasta aproximadamente 7,5, preferiblemente desde aproximadamente 6,5 hasta 7,5, lo más preferiblemente desde aproximadamente 6,5 hasta 7,0, tal como pH 6,0, pH 6,5 o pH 7,0, en particular pH 7,0.

La composición puede tamponarse mediante cualquier tampón que sea farmacéuticamente aceptable. Los tampones preferidos para su uso en la composición de la invención incluyen (sin limitarse a) PBS, tampón de fosfato, TrisHCl, tampón de histidina y tampón de citrato, tal como por ejemplo histidina pH 6,0-6,5, tampón de  
 40 fosfato pH 7,0, TrisHCl pH 7,5 y tampón de citrato/tampón de fosfato pH 6,5, en particular tampón de fosfato (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) pH 7,0.

La concentración del tampón presente en la composición de la invención puede oscilar desde 1 mM hasta 100 mM, 5 mM hasta 100 mM, 5 mM hasta 75 mM, 5 mM hasta 50 mM, 10 mM hasta 50 mM. En un aspecto específico, la  
 45 concentración de tampón en las composiciones de la invención es de 1 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 50 mM, 75 mM o 100 mM. Preferiblemente, la concentración está entre 10 y 50 mM, tal como 10 mM o 50 mM, en particular 10 mM.

Un experto en la técnica entenderá que la composición de la invención puede ser isotónica o ligeramente hipotónica con respecto a la sangre humana, es decir la composición de la invención tiene esencialmente la misma presión  
 50 osmótica o una ligeramente menor que la sangre humana. Tal composición isotónica o ligeramente hipotónica tiene generalmente una presión osmótica de desde aproximadamente 240 mOSm/kg hasta aproximadamente 320 mOSm/kg, tal como aproximadamente 240 mOSm/kg o mayor, 250 mOSm/kg o mayor o 260 mOSm/kg o mayor.

55 Puede ajustarse la tonicidad de una composición mediante el uso de modificadores de la tonicidad. "Modificadores de la tonicidad" son aquellas sustancias inertes farmacéuticamente aceptables que pueden añadirse a la composición para proporcionar una isotonicidad de la composición. Un modificador de la tonicidad preferido en la composición de la invención son excipientes. Los excipientes preferidos para su uso en la composición de la  
 60 invención pueden seleccionarse de azúcares, polioles, tensioactivos y sales. En un aspecto, se ajusta la osmolalidad de la composición de la invención mediante la adición de un azúcar/poliole o una sal inorgánica. Los azúcares/polioles pueden incluir (sin limitarse a) sacarosa y lactosa, así como derivados de azúcares incluyendo alcoholes de azúcar y ácidos de azúcar. Los polioles y glicoles pueden incluir (sin limitarse a) manitol, xilitol, eritritol, treitol, sorbitol y glicerol. Otros azúcares a modo de ejemplo incluyen (sin limitarse a) trehalosa, glicina, maltosa, rafinosa, etc. La  
 65 concentración de este excipiente puede oscilar desde aproximadamente el 1% hasta el 10% (p:v), preferiblemente desde aproximadamente el 2,5% hasta el 10% (p:v), más preferiblemente desde aproximadamente el 5% hasta el

10% (p:v), tal como por ejemplo el 5% (p:v), el 7,5% (p:v), el 8% o el 10% (p:v). Sin limitarse a lo mismo, las sales inorgánicas para ajustar la osmolalidad de la composición de la invención incluyen NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, y MgCl<sub>2</sub>, en particular NaCl. La concentración de sal inorgánica puede oscilar desde 10 mM hasta 200 mM, de 10 mM a 150 mM, de 50 mM a 150 mM, de 100 mM a 150 mM o de 100 mM a 120 mM. En un aspecto específico, la concentración de sal (preferiblemente NaCl) que puede incluirse en las formulaciones de la invención puede ser de aproximadamente 10 mM, aproximadamente 25 mM, aproximadamente 50 mM, aproximadamente 75 mM, aproximadamente 100 mM, aproximadamente 110 mM, aproximadamente 120 mM, aproximadamente 130 mM, aproximadamente 150 mM o aproximadamente 200 mM.

Un ejemplo de una composición con estas características comprende tampón de fosfato 10 mM (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) pH 7,0 y NaCl 130 mM. También puede comprender tampón de fosfato 10 mM (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) pH 7,0, NaCl 130 mM y un polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina tal como se describió anteriormente; o puede comprender tampón de fosfato 10 mM (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) pH 7,0, NaCl 130 mM y el polipéptido con SEQ ID NO: 2; o puede comprender tampón de fosfato 10 mM (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) pH 7,0, NaCl 130 mM y el polipéptido con SEQ ID NO: 2 a una concentración de 50 mg/ml o incluso más, preferiblemente a una concentración de 50 mg/ml.

También pueden usarse otros portadores farmacéuticamente aceptables en una formulación de la presente solicitud. La frase "portador farmacéuticamente aceptable" tal como se usa en el presente documento significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una carga, diluyente, excipiente, disolvente o material de encapsulación líquido o sólido, que participa en portar o transportar el agente (por ejemplo agente profiláctico o terapéutico). Cada portador debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los demás componentes de la formulación y no ser perjudicial para el paciente. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables incluyen: azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; glicoles, tales como propilenglicol; polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agentes de tamponamiento, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; agua libre de pirógenos; solución salina isotónica; disolución de Ringer; alcohol etílico; disoluciones de tampón de fosfato; y otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas.

Las composiciones de la presente invención se caracterizan por proporcionar una alta estabilidad térmica a los polipéptidos de la invención. La estabilidad térmica puede evaluarse, por ejemplo, determinando la temperatura de fusión, por ejemplo Tf. Se conocen técnicas adecuadas para determinar la temperatura de fusión e incluyen por ejemplo un ensayo de cambio térmico (TSA), por ejemplo, tal como se describe en el presente documento. Más específicamente, las composiciones de la presente invención conducen a un aumento de la Tf para los polipéptidos de la invención tal como se determina mediante TSA en comparación con otras formulaciones. Este efecto se muestra a modo de ejemplo en la tabla 3 de la sección experimental.

Según la presente invención, las composiciones de la invención tienen una influencia positiva sobre la Tf a lo largo de un amplio intervalo de valores de pH, por ejemplo entre 5,5 y 6,5 para tampón de citrato, y de 7,0 a 7,5 para tampón de fosfato. El efecto más ventajoso sobre la Tf puede observarse para el tampón de fosfato a pH de 7,0 a 7,5, en particular 7,0±0,2.

Tal como se demuestra mediante la sección experimental de esta descripción, la Tf tal como se determina mediante TSA sirve como indicador valioso para la estabilidad de los polipéptidos de la invención. Una Tf creciente indica una estabilidad aumentada también en otros parámetros fisicoquímicos, y por tanto puede indicar realizaciones particularmente preferibles de la invención.

El experto en la técnica conoce métodos generales para producir los dominios variables individuales de inmunoglobulina y/o polipéptidos presentes en la composición de la invención y/o se han descrito en la técnica. Los dominios variables individuales de inmunoglobulina y/o polipéptidos pueden producirse en cualquier huésped conocido por el experto en la técnica. Por ejemplo, pero sin limitarse a lo mismo, los dominios variables individuales de inmunoglobulina y/o polipéptidos pueden producirse en huéspedes procariotas, entre ellos *E. coli*, o huéspedes eucariotas, por ejemplo huésped eucariota seleccionado de células de insecto, células de mamífero y huéspedes eucariotas inferiores comprendiendo levaduras tales como *Pichia*, *Hansenula*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Torulopsis*, *Torulasporea*, *Schizosaccharomyces*, *Citeromyces*, *Pachysolen*, *Debaromyces*, *Metschnikowia*, *Rhodospodium*, *Leucosporidium*, *Botryosaccharus*, *Sporidiobolus*, *Endomycopsis*, preferiblemente *Pichia pastoris*. La producción de dominios variables individuales de inmunoglobulina en huéspedes procariotas y eucariotas inferiores tales como *Pichia pastoris* se ha descrito, por ejemplo, en los documentos WO 94/04678, WO 94/25591 y WO 08/142164. Se hace referencia explícitamente al contenido de estas solicitudes en relación con métodos y técnicas de cultivo generales, incluyendo condiciones y medios adecuados. El experto en la técnica también puede diseñar constructos genéticos adecuados para la expresión de los polipéptidos de la invención en diferentes huéspedes basándose en la presente solicitud y el conocimiento general común. La presente invención también se refiere a condiciones y constructos genéticos descritos en la técnica, por ejemplo los métodos de cultivo generales, plásmidos, promotores y secuencias líder descritos en los documentos WO 94/25591, WO 08/020079, Gasser *et al.* 2006 (Biotechnol. Bioeng. 94: 535); Gasser *et al.* 2007 (Appl. Environ. Microbiol. 73: 6499); o Damasceno *et al.* 2007 (Microbiol. Biotechnol. 74: 381).

Más particularmente, el método para la expresión y/o producción de un polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina comprende al menos las etapas de:

- 5 a) cultivar un huésped o célula huésped en condiciones que son tales que dicho huésped o célula huésped se multiplicará;
- b) mantener dicho huésped o célula huésped en condiciones que son tales que dicho huésped o célula huésped expresa y/o produce el polipéptido;
- 10 c) aislar y/o purificar el polipéptido secretado a partir del medio.

Para producir/obtener la expresión del polipéptido, la célula huésped transformada o el organismo huésped transformado pueden conservarse, mantenerse y/o cultivarse generalmente en condiciones tales que el polipéptido (deseado) se expresa/produce. Las condiciones adecuadas resultarán evidentes para el experto en la técnica y habitualmente dependerán de la célula huésped/el organismo huésped usado, así como de los elementos reguladores que controlan la expresión de la secuencia de nucleótidos (relevante). De nuevo, se hace referencia a los manuales y las solicitudes de patente anteriormente mencionados.

20 Generalmente, las condiciones adecuadas pueden incluir el uso de un medio adecuado, la presencia de una fuente adecuada de alimento y/o nutrientes adecuados, el uso de una temperatura adecuada, y opcionalmente la presencia de un compuesto o factor de inducción adecuado (por ejemplo cuando las secuencias de nucleótidos de la invención se encuentran bajo el control de un promotor inducible); todos los cuales puede seleccionarlos el experto en la técnica. De nuevo, en tales condiciones, las secuencias de aminoácidos de la invención pueden expresarse de una manera constitutiva, de una manera transitoria o únicamente cuando se induzcan de manera adecuada.

Entonces puede aislarse el polipéptido de la invención a partir de la célula huésped/organismo huésped y/o a partir del medio en el que se cultivó dicha célula huésped u organismo huésped, usando técnicas de aislamiento y/o purificación de proteínas conocidas en sí mismas, tales como técnicas de cromatografía (preparativa) y/o electroforesis, técnicas de precipitación diferencial, técnicas de afinidad (por ejemplo usando una secuencia de aminoácidos específica, escindible, fusionada con el polipéptido de la invención) y/o técnicas inmunológicas preparativas (es decir usando anticuerpos contra el polipéptido que va a aislarse).

35 En la presente invención, el huésped puede retirarse del medio de cultivo mediante medios de rutina. Por ejemplo, el huésped puede retirarse mediante centrifugación o filtración. La disolución obtenida mediante retirada del huésped a partir del medio de cultivo también se denomina sobrenadante de cultivo o sobrenadante de cultivo aclarado. Los polipéptidos de la invención pueden purificarse a partir del sobrenadante de cultivo mediante métodos convencionales. Los métodos convencionales incluyen, pero no se limitan a, métodos cromatográficos, incluyendo cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de afinidad. Estos métodos pueden realizarse solos o en combinación con otros métodos de purificación, por ejemplo precipitación o electroforesis en gel. El experto en la técnica puede diseñar combinaciones adecuadas de métodos de purificación para los polipéptidos de la invención basándose en el conocimiento general común. Para ejemplos específicos se hace referencia a la técnica mencionada en el presente documento.

45 En una realización a modo de ejemplo, los polipéptidos de la invención pueden purificarse a partir de sobrenadante de cultivo mediante una combinación de cromatografía de afinidad sobre proteína A, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de exclusión molecular. La referencia a cualquier "etapa de purificación" incluye, pero no se limita a, estos métodos particulares.

50 Más específicamente, los polipéptidos de la invención pueden purificarse a partir de sobrenadante de cultivo usando un procedimiento en el que el sobrenadante aclarado (obtenido mediante centrifugación) se captura sobre cualquier combinación de columnas seleccionadas de (sin limitarse a) resina de cromatografía de afinidad tal como resina de proteína A, cromatografía de intercambio catiónico (CIEC) o una cromatografía de intercambio aniónico (AIEC) usando por ejemplo Poros 50HS (POROS), SOURCE 30S o SOURCE 15S (GE Healthcare), SP Sepharose (GE Healthcare), Capto S (GE Healthcare), Capto MMC (GE Healthcare) o Poros 50HQ (POROS), SOURCE 30Q o SOURCE 15Q (GE Healthcare), Q Sepharose (GE Healthcare), Capto Q y DEAE Sepharose (GE Healthcare), cromatografía de exclusión molecular (SE-HPLC) usando por ejemplo Superdex 75 o Superdex 200 (GE Healthcare), cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) usando, por ejemplo, octil, butil-Sepharose o equivalentes, incluyendo también opcionalmente una etapa de filtración de flujo tangencial (TFF). Puede usarse cualquier combinación de columnas para la purificación de los polipéptidos de la invención, tal como por ejemplo resina de proteína A seguida por cromatografía de intercambio catiónico o dos etapas de cromatografía de intercambio catiónico.

65 La presente invención también proporciona métodos para preparar las composiciones de la invención que comprenden los polipéptidos de la invención. Más particularmente, la presente invención proporciona métodos para preparar composiciones de tales polipéptidos, comprendiendo dichos métodos concentrar una fracción que contiene

5 el polipéptido purificado hasta la concentración final de polipéptido usando por ejemplo una membrana semipermeable con un punto de corte de peso molecular apropiado (PM) (por ejemplo un punto de corte de 5 kD para dominios variables individuales; un punto de corte de 10 kD para polipéptidos bivalentes que comprenden dos dominios variables individuales; o un punto de corte de 15 kD para polipéptidos trivalentes que comprenden tres dominios variables individuales) y diafiltrar y/o ultrafiltrar para realizar intercambio de tampón y concentrar adicionalmente la fracción de polipéptido en el tampón seleccionado usando la misma membrana.

10 Puede añadirse tensioactivo (por ejemplo Tween 20, Tween 80 o poloxámero) después de la etapa de diafiltración/ultrafiltración final a una concentración en el intervalo de entre el 0% y el 1%, preferiblemente entre el 0,001% y el 0,1%, o entre el 0,01% y el 0,1% tal como aproximadamente el 0,001%, el 0,005%, el 0,01%, el 0,02%, el 0,04%, el 0,05%, el 0,08%, el 0,1%, el 0,5% o el 1% de la composición, preferiblemente del 0,04% al 0,08%, en particular el 0,04%.

15 La composición de la presente invención puede esterilizarse mediante diversos métodos de esterilización, incluyendo esterilización por filtración, radiación, etc. En una realización específica, la composición de polipéptido se esteriliza por filtración con un filtro previamente esterilizado de 0,2 micrómetros.

20 Preferiblemente, la composición de la presente invención se suministra en un envase herméticamente sellado. Las composiciones líquidas pueden comprender una cantidad de entre 1 ml y 20 ml, de manera preferible aproximadamente 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 7 ml, 8 ml, 9 ml, 10 ml, 15 ml o 20 ml.

25 La composición de la presente invención puede prepararse como formas de dosificación unitaria preparando un vial que contiene una alícuota de la composición para un único uso. Por ejemplo, una dosificación unitaria de composición líquida por vial puede contener 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 7 ml, 8 ml, 9 ml, 10 ml, 15 ml o 20 ml de la composición. Las formas de dosificación unitaria farmacéuticas deben ser adecuadas para la administración por vía pulmonar del polipéptido mediante aerosol.

30 La cantidad de una composición de la presente invención que será eficaz en la prevención, tratamiento y/o gestión de una determinada enfermedad o trastorno puede determinarse mediante técnicas clínicas convencionales bien conocidas en la técnica o descritas en el presente documento. Pueden extrapolarse dosis eficaces a partir de curvas de dosis-respuesta derivadas a partir de sistemas de pruebas *in vitro* o de modelo de animal. Para composiciones del polipéptido, abarcadas por la invención, la dosificación administrada a un paciente puede calcularse además usando el peso del paciente en kilogramos (kg) multiplicado por la dosis que va a administrarse en mg/kg. También puede ser útil para cálculos de la dosis el porcentaje de la dosis aplicada que llega al pulmón y/o el porcentaje de la dosis aplicada que llega a la circulación sistémica (dependiendo de la enfermedad que va a prevenirse y/o tratarse y la ubicación en el cuerpo de la actividad profiláctica y/o terapéutica del agente).

35 Después se determina el volumen requerido (en ml) que va a administrarse tomando la dosis en mg requerida dividida entre la concentración de la composición de polipéptido. El volumen requerido calculado final se obtendrá combinando el contenido de tantos viales como sea necesario.

40 La composición tal como se reivindica en la presente invención puede estar comprendida en un producto farmacéutico acondicionado y etiquetado terminado. Este artículo de fabricación o kit incluye la forma de dosificación unitaria apropiada en un recipiente o envase apropiado tal como un vial de vidrio u otro envase que está herméticamente sellado. La forma de dosificación unitaria debe ser adecuada para su administración por vía pulmonar mediante aerosol. Preferiblemente, el artículo de fabricación o kit comprende además instrucciones sobre cómo usar la composición en un sistema de administración de aerosol. Las instrucciones pueden contener además material informativo que recomienda al médico, técnico o paciente cómo prevenir o tratar de manera apropiada la enfermedad o el trastorno en cuestión. Dicho de otro modo, el artículo de fabricación incluye medios de instrucción que indican o sugieren una pauta posológica para su uso en el sistema de administración de aerosol incluyendo, pero sin limitarse a, dosis reales, procedimientos de monitorización y otra información de monitorización.

45 Tal como con cualquier producto farmacéutico, el material de acondicionamiento y el envase están diseñados para proteger la estabilidad del producto durante el almacenamiento y el envío.

50 Las composiciones de la presente invención, envases, dosificaciones farmacéuticas unitarias y kits deben ser adecuados para la administración del polipéptido de la invención mediante administración por vía pulmonar, es decir aerosolización; y deben ser adecuados para su uso en un sistema de administración de aerosol (tal como se define adicionalmente en el presente documento). Por consiguiente, la presente invención también se refiere a una composición de la invención para su administración a un sujeto humano mediante aerosolización, tal como mediante nebulización en un nebulizador de malla vibrante.

55 La presente invención también contempla sistemas de administración de aerosol que pueden usarse en el método de la invención (para la preparación de un aerosol) y/o para la administración de las composiciones de la invención mediante aerosolización. Sólo los nebulizadores de malla vibrante forman parte de la invención. El sistema de administración de aerosol de la invención puede comprender un envase que comprende la composición de la

invención y un generador de aerosol conectado al mismo. El generador de aerosol se construye y dispone para generar un aerosol de la composición de la invención. Sin limitarse a lo mismo, los generadores de aerosol incluyen nebulizadores, bombas mecánicas y envases presurizados.

5 En un aspecto, el sistema de administración de aerosol puede incluir un envase presurizado que contiene la composición de la invención. El envase presurizado tiene normalmente un elemento de accionamiento conectado a una válvula dosificadora de modo que la activación del elemento de accionamiento provoca que una cantidad predeterminada de la composición dentro del envase se dispense a partir del envase en forma de un aerosol. En la técnica se conocen bien envases presurizados de este tipo como inhaladores dosificadores impulsados por propelente (pMDI o simplemente MDI). Los MDI incluyen normalmente un elemento de accionamiento, una válvula dosificadora y un envase presurizado que contiene una suspensión o disolución de fármaco micronizado, propelente licuado y tensioactivo (por ejemplo, ácido oleico, trioleato de sorbitano, lecitina). Los inhaladores dosificadores presurizados (pMDI) son el inhalador más habitualmente usado en todo el mundo. El aerosol se crea cuando se abre una válvula (habitualmente pulsando sobre el cartucho de propelente), permitiendo que propelente líquido se pulverice fuera del cartucho. Normalmente, un fármaco o producto terapéutico está contenido en partículas pequeñas (habitualmente de unos pocos micrómetros de diámetro) suspendidas en el propelente líquido, pero en algunas formulaciones el fármaco o producto terapéutico puede estar disuelto en el propelente. El propelente se evapora rápidamente a medida que el aerosol abandona el dispositivo, dando como resultado pequeñas partículas de fármaco o producto terapéutico que se inhalan. Los propelentes usados en tales pMDI incluyen, pero no se limitan a, hidrofluoroalcano (HFA). Históricamente, estos MDI normalmente usaban clorofluorocarbonos (CFC) como propelentes, incluyendo triclorofluorometano, diclorodifluorometano y diclorotetrafluoro-metano. Los propelentes más nuevos pueden incluir 1,1,1,2-tetrafluoroetano y 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano. También pueden emplearse otros disolventes o excipientes con pMDI, tales como etanol, ácido ascórbico, metabisulfato de sodio, glicerina, clorobutanol, y cloruro de cetilpiridio. Tales pMDI pueden incluir además dispositivos de adición tales como, por ejemplo, separadores, cámaras de contención y otras modificaciones.

La tecnología de aerosolización Sonik LDI (Drug Delivery Technology, Montville, NJ, EE.UU.) se usa principalmente para la administración de medicamentos líquidos y en ocasiones polvos. La boquilla patentada se alimenta con gas comprimido, normalmente dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), para suministrar ráfagas sistemáticas de medicamento con cada accionamiento del dispositivo. Después de que el gas comprimido salga a partir del chorro principal de la boquilla de Sonik LDI, se forma una cadena de ondas de choque de compresión y refracción reflejadas. La boquilla introduce medicamento líquido en la cadena de ondas de choque dentro de una cámara de choque para producir una ráfaga sistemática y de alta calidad de aerosol. Tras salir de la boquilla de Sonik LDI, la corriente de aerosol/gas se fuerza a través de una cámara de amplificación, en la que procedimientos de aerosolización secundarios provocan un aumento de las partículas respirables y una disminución de la pulverización residual. Se usa CO<sub>2</sub> como propelente de impulso, principalmente porque es económico y puede almacenarse fácilmente en cartuchos desechables compactos. A diferencia de los MDI, la tecnología de aerosolización de Sonik LDI no mezcla propelente y medicamento hasta el momento de la aerosolización. Este enfoque retardado permite almacenar medicamento líquido (o en polvo) en blísteres sellados y facilita la carga de desarrollo de estabilidad de la formulación. Esta tecnología puede adaptarse a varias configuraciones: cámaras de contención de aerosol accionadas por respiración, entrada oral directa a baja velocidad compacta, medicamentos de dosis unitaria previamente acondicionados, y dispositivos de depósito llenados por el paciente o el médico.

El sistema de administración de aerosol es un nebulizador. Los nebulizadores producen una niebla de gotitas líquidas que contienen fármaco para inhalación. La "nebulización", tal como se usa en la presente invención, significa la conversión de un líquido en una pulverización fina. Los nebulizadores mezclan medicamento con aire comprimido para crear una niebla fina que el paciente inhala a través de una máscara o boquilla. Para niños, la nebulización es una de las maneras más fáciles y eficaces de administrar medicamento a los pulmones. Usando máscaras de tamaño apropiado que se adaptan a los lactantes, o boquillas para niños más mayores y adultos, los pacientes pueden simplemente respirar con normalidad hasta que se ha inhalado todo el medicamento. Otra ventaja de la nebulización, particularmente para niños pequeños, es que no requiere ninguna técnica especial para que el medicamento entre en los pulmones.

Los nebulizadores se clasifican habitualmente en dos tipos: nebulizadores por ultrasonidos y nebulizadores de chorro. Los nebulizadores de chorro de aire para atomización se consideran portátiles debido a la disponibilidad de pequeñas bombas de aire comprimido, pero son sistemas relativamente grandes e incómodos. Los nebulizadores por ultrasonidos tienen la ventaja de ser más portátiles porque generalmente no requieren una fuente de aire comprimido.

Los nebulizadores de chorro de aire convierten líquido en aerosoles por medio de un gas a alta velocidad que pasa a través de una boquilla estrecha de tipo "Venturi". El fluido en el depósito de nebulizador se aspira por un tubo de alimentación y surge como filamentos finos que colapsan para dar gotitas de aerosol debido a la tensión superficial. Deflectores dentro del nebulizador retiran gotitas más grandes. El tamaño de gotita en la corriente de aire se ve influido por la presión de aire comprimido. Las medianas de diámetro en masa oscilan normalmente desde 2 hasta 5 µm con presiones de aire de 20 a 30 psig. Los ejemplos de nebulizadores de chorro incluyen (sin limitarse a) Pari

LC Jet Plus (PARI GmbH, Gräfelingen, Alemania), Hudson T Up-draft II (Hudson RCI, Kernen, Alemania), Raindrop (Puritan Bennett, Boulder, CO, EE.UU.).

Los nebulizadores por ultrasonidos generan aerosoles usando ondas de ultrasonidos de alta frecuencia (es decir, 100 kHz y superiores) enfocadas en la cámara de líquido mediante un cristal piezoeléctrico de cerámica que vibra mecánicamente tras la estimulación (Dennis *et al.*, 1992, J. Med. Eng; Tech. 16: 63-68; O'Doherty *et al.*, 1992, Am. Rev. Respir. Dis. 146: 383-88). Se produce una fuente de fluido en la superficie de contacto aire-fluido. Se generan pequeñas gotitas a partir de las regiones inferiores de la fuente mientras que se generan gotitas grandes a partir del vértice. En algunos casos, un propulsor sopla las partículas fuera del nebulizador o el aerosol se inhala directamente por el paciente. El nebulizador por ultrasonidos es capaz de una producción mayor que el nebulizador de chorro de aire y por este motivo se usa con frecuencia en terapia con fármacos en aerosol. Los ejemplos de nebulizadores por ultrasonidos incluyen (sin limitarse a) Mabis Mist II (Allergy Asthma Technology LLC), sistemas de compresor nebulizador DeVilbiss, nebulizadores de chorro reutilizables DeVilbiss (DeVilbiss Healthcare, Somerset, Pensilvania, EE.UU.), Kun-88 (K-Sonic, Taipei, Taiwán), SUN 345 (Siemens, Elema AB, Solna, Suecia).

En los nebulizadores tanto de chorro de aire como por ultrasonidos, deflectores en el nebulizador atrapan y recirculan las gotitas de aerosol grandes (primarias), mientras que las gotitas pequeñas (secundarias) se liberan para su inhalación. En ambos tipos de nebulizador, el fármaco está habitualmente contenido en disolución en el líquido en el nebulizador y por tanto las gotitas que están produciéndose contienen fármaco en disolución.

Los nebulizadores por ultrasonidos generalmente no son adecuados para la administración de suspensiones (Tailor y McCallion, 2002, en: Swarbrick, Boilan (Eds.), Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, 2ª ed. Marcel Dekker, Inc., Nueva York, págs. 2840-2847) y liposomas (Elhissi y Tailor, 2005, J. Drug Deliv. Sci. Technol. 15: 261-265), y debido a la generación de calor durante la atomización pueden degradar sustancias lábiles tales como proteínas (Niven *et.*, 1995, Pharm. Res. 12: 53-59).

Los nebulizadores de malla vibrante pueden superar los inconvenientes de los nebulizadores de chorro de aire y por ultrasonidos. Los dispositivos de malla vibrante emplean placas perforadas que vibran con el fin de generar el aerosol. La activación del elemento vibrante para hacer vibrar la placa con aberturas provoca que la composición de la invención se aspire a través de la pluralidad de aberturas para crear un aerosol a baja velocidad con un intervalo definido de tamaños de gotita (es decir partícula). Estos nebulizadores no calientan el fluido durante la atomización y se ha mostrado que son adecuados para la administración de suspensiones (Fink, y Simmons, 2004. Chest 126: 816S), y estructuras delicadas tales como liposomas (Wagner, 2006, J. Liposome Res. 16: 113-125) y ácidos nucleicos (Lentz, 2006, J. Aerosol Med. 19: 372-384). Los nebulizadores de malla vibrante se dividen en dispositivos de malla vibrante pasiva y activa (Newman, 2005, J. Appl. Ther. Res. 5: 29-33). Los dispositivos de malla vibrante pasiva (por ejemplo el nebulizador Omron MicroAir NE-U22) emplean una placa perforada que tiene hasta 6000 orificios de tamaño micrométrico. Un cristal piezoeléctrico vibrante unido a una bocina de transductor induce vibraciones "pasivas" en la placa perforada posicionada delante del mismo, dando como resultado la extrusión de fluido a través de los orificios y la generación del aerosol. Los dispositivos de malla vibrante activa (por ejemplo nebulizador Aeroneb Pro) pueden emplear un sistema de "microbomba" que comprende un generador de aerosol que consiste en una placa con hasta 1000 aberturas en forma de bóveda y un elemento vibrante que se contrae y se expande con la aplicación de una corriente eléctrica. Esto da como resultado movimientos hacia arriba y hacia abajo de la malla de unos pocos micrómetros, extruyendo el fluido y generando el aerosol. Otros ejemplos de nebulizadores de malla vibrante incluyen eFlow® (PARI GmbH, Gräfelingen, Alemania; véase también el documento US 5.586.550), Aeroneb® (Aerogen, Inc., Sunnyvale, California; véanse también los documentos US 5.586.550; US 5.938.117; US 6.014.970; US 6.085.740; US 6.205.999).

Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención se refiere a un método para la preparación de un aerosol de dominios variables individuales de inmunoglobulina, en el que la cantidad de formación de agregado es del 6% o menos, el % de formación de agregado tal como se determina mediante SE-HPLC, comprendiendo dicho método la etapa de atomizar una composición que comprende un portador acuoso y un polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina a una concentración de 1 mg/ml a 200 mg/ml, en el que la composición se atomiza en un nebulizador de malla vibrante. La invención también se refiere a un aerosol que comprende gotitas líquidas que pueden obtenerse mediante la atomización de una composición que comprende un portador acuoso y un polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina a una concentración de 1 mg/ml a 200 mg/ml, en el que la cantidad de formación de agregado en el aerosol es del 6% o menos, el % de formación de agregado tal como se determina mediante SE-HPLC, y en el que la composición se atomiza en un nebulizador de malla vibrante. La invención se refiere además a un nebulizador de malla vibrante que comprende un envase y un generador de aerosol conectado al envase, en el que el envase comprende una composición de la invención.

Las composiciones, envases, sistemas de administración de aerosol, dosificaciones farmacéuticas unitarias y/o kits de la presente invención pueden administrarse a un sujeto para prevenir, tratar y/o gestionar una o más enfermedades y/o trastornos específicos. En un aspecto específico, las composiciones, envases, sistemas de administración de aerosol, dosificaciones farmacéuticas unitarias y/o kits de la presente invención se administran a un sujeto para prevenir, tratar y/o gestionar una o más enfermedades y/o trastornos respiratorios.

Las enfermedades y/o trastornos respiratorios que pueden tratarse, suprimirse o prevenirse usando las composiciones, envases, sistemas de administración de aerosol, dosificaciones farmacéuticas unitarias y/o kits de la invención pueden incluir inflamación pulmonar, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma, neumonía, 5 neumonitis por hipersensibilidad, infiltración pulmonar con eosinofilia, enfermedad pulmonar ambiental, neumonía, bronquiectasia, fibrosis quística, enfermedad pulmonar intersticial, hipertensión pulmonar primaria, tromboembolia pulmonar, trastornos de la pleura, trastornos del mediastino, trastornos del diafragma, hipoventilación, hiperventilación, apnea del sueño, síndrome de dificultad respiratoria agudo, mesotelioma, sarcoma, rechazo de injerto, enfermedad de injerto contra huésped, cáncer de pulmón, rinitis alérgica, alergia, asbestosis, aspergiloma, 10 aspergilosis, bronquiectasia, bronquitis crónica, enfisema, neumonía eosinófila, fibrosis pulmonar idiopática, enfermedad invasiva por neumococos, gripe, micobacterias no tuberculosas, efusión pleural, neumoconiosis, neumocitosis, neumonía, actinomicosis pulmonar, proteinosis alveolar pulmonar, carbunco pulmonar, edema pulmonar, embolia pulmonar, inflamación pulmonar, histiocitosis X pulmonar, hipertensión pulmonar, nocardiosis pulmonar, tuberculosis pulmonar, enfermedad venoclusiva pulmonar, enfermedad pulmonar reumatoide, sarcoidosis, granulomatosis de Wegener, y carcinoma de pulmón de células no pequeñas. En un aspecto específico, las composiciones, envases, sistemas de administración de aerosol, dosificaciones farmacéuticas unitarias y/o kits de la presente invención se administran a un sujeto para prevenir, tratar y/o gestionar infecciones pulmonares virales y más particularmente infecciones por VSRh.

En otro aspecto, las composiciones, envases, sistemas de administración de aerosol, dosificaciones farmacéuticas unitarias y/o kits de la invención se usan para la administración sistémica de un polipéptido de la invención mediante administración por vía pulmonar mediante aerosolización. Por consiguiente, las composiciones, envases, sistemas de administración de aerosol, dosificaciones farmacéuticas unitarias y/o kits de la presente invención pueden administrarse a un sujeto para prevenir, tratar y/o gestionar cualquier enfermedad y/o trastorno asociado con la diana a la que se une específicamente el polipéptido de la invención (presente en la composición, envase, sistema de administración de aerosol, dosificación unitaria farmacéutica y/o kit). Por ejemplo, sin limitarse a lo mismo, la composición, envase, sistema de administración de aerosol, dosificación unitaria farmacéutica y/o kit pueden usarse para prevenir, tratar y/o gestionar enfermedades y/o trastornos asociados con citocinas heterodiméricas y sus receptores incluyendo inflamación y trastornos inflamatorios tales como enfermedades intestinales (colitis, enfermedad de Crohn, EII), enfermedades infecciosas, psoriasis, cáncer, enfermedades autoinmunitarias (tales como EM), caroidis, rechazo de trasplante, fibrosis quística, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, artritis reumatoide, infección viral, inmunodeficiencia variable común.

Las composiciones, envases, sistemas de administración de aerosol, dosificaciones farmacéuticas unitarias y/o kits también pueden usarse ventajosamente en combinación con una o más de otras terapias (por ejemplo, uno o más de otros agentes profilácticos o terapéuticos), preferiblemente terapias útiles en la prevención, tratamiento y/o gestión de la (misma u otra) enfermedad y/o trastorno. Los agentes terapéuticos o profilácticos incluyen, pero no se limitan a, moléculas pequeñas, fármacos sintéticos, péptidos, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos (por ejemplo, nucleótidos de ADN y ARN incluyendo, pero sin limitarse a, secuencias de nucleótidos antisentido, hélices triples, ARNi, y secuencias de nucleótidos que codifican para proteínas, polipéptidos o péptidos biológicamente activos), anticuerpos, otros dominios variables individuales de inmunoglobulina, moléculas inorgánicas sintéticas o naturales, agentes miméticos y moléculas orgánicas sintéticas o naturales. Cualquier terapia (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) que se sabe que es útil, o que se ha usado o está usándose actualmente para la prevención, tratamiento y/o gestión de uno o más síntomas asociados con una enfermedad o trastorno específico, puede usarse en combinación con las composiciones de la presente invención según la invención descrita en el presente documento.

Una composición de la invención puede administrarse a un mamífero, preferiblemente un humano, de manera simultánea con una o más de otras terapias (por ejemplo, uno o más de otros agentes profilácticos o terapéuticos). El término "de manera simultánea" no se limita a la administración de agentes/terapias profilácticos o terapéuticos exactamente al mismo tiempo, sino que más bien se pretende que la composición de la invención y el otro agente/terapia se administren a un mamífero en una secuencia y dentro de un intervalo de tiempo tal que el polipéptido contenido en la composición puede actuar junto con el otro agente/terapia para proporcionar un beneficio aumentado en comparación con si se administraran de otro modo. Por ejemplo, la composición de la invención y el uno o más de otros agentes profilácticos o terapéuticos pueden administrarse al mismo tiempo o secuencialmente en cualquier orden en diferentes puntos en el tiempo; sin embargo, si no se administran al mismo tiempo, deben administrarse suficientemente cerca en el tiempo como para proporcionar el efecto terapéutico o profiláctico deseado.

Cuando se usan en combinación con otras terapias (por ejemplo, agentes profilácticos y/o terapéuticos), las composiciones de la invención y la otra terapia pueden actuar de manera aditiva o sinérgica. La invención contempla la administración de una composición de la invención en combinación con otras terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) mediante las mismas o diferentes vías de administración, por ejemplo, pulmonar y parenteral.

65

Ahora se describirá adicionalmente la invención por medio de los siguientes ejemplos y aspectos preferidos no limitativos:

Aspectos descritos en la solicitud; no todos forman parte de la invención:

- 5 1. Método para la preparación de un aerosol de dominios variables individuales de inmunoglobulina en el que la cantidad de formación de agregado es del 6% o menos, el % de formación de agregado tal como se determina mediante SE-HPLC, comprendiendo dicho método la etapa de atomizar una composición que comprende un portador acuoso y un polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina a una concentración de 1 mg/ml a 200 mg/ml, en el que:
  - 10 - la composición comprende además un tensioactivo a una concentración de entre el 0,001% y el 1%;
  - 15 - el polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina está presente en la composición a una concentración de 20 mg/ml o más; y/o
  - la composición se atomiza en un nebulizador de malla vibrante.
- 20 2. Método según el aspecto 1, en el que la cantidad de formación de agregado es del 5% o menos, preferiblemente el 4% o menos, tal como el 3% o menos, el 2% o menos o incluso el 1% o menos.
- 25 3. Método según cualquiera de los aspectos 1 ó 2, en el que la composición comprende además un tensioactivo a una concentración de entre el 0,001% y el 1%, preferiblemente entre el 0,001% y aproximadamente el 0,1%, o de aproximadamente el 0,01% a aproximadamente el 0,1% tal como aproximadamente el 0,001%, el 0,005%, el 0,01%, el 0,02%, el 0,05%, el 0,08% o el 0,1%, de manera preferible aproximadamente el 0,01%.
- 30 4. Método según cualquiera de los aspectos 1 a 3, en el que el tensioactivo se selecciona de un detergente no iónico.
- 35 5. Método según cualquiera de los aspectos 1 a 4, en el que el tensioactivo se selecciona de polisorbatos (tales como por ejemplo Tween 20, y Tween 80) y poloxámeros, o en el que se añade PEG como compuesto de tipo tensioactivo.
6. Método según cualquiera de los aspectos 3 a 5, en el que el polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina está presente a una concentración de menos de 20 mg/ml.
7. Método según cualquiera de los aspectos 1 a 5, en el que el polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina está presente a una concentración de 20 mg/ml o más.
- 40 8. Método según cualquiera de los aspectos 1 ó 2, en el que el polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina está presente a una concentración de 20 mg/ml o más y en el que la composición no comprende un tensioactivo.
- 45 9. Método según cualquiera de los aspectos 1 a 8, en el que el polipéptido comprende un dominio variable individual de inmunoglobulina.
10. Método según cualquiera de los aspectos 1 a 8, en el que el polipéptido comprende dos o más dominios variables individuales de inmunoglobulina, tal como dos o tres.
- 50 11. Método según cualquiera de los aspectos 1 a 10, en el que el polipéptido se une específicamente a VSR o IL-23.
12. Método según el aspecto 11, en el que el polipéptido se selecciona de una de SEQ ID NO: 1, 2 y 3.
- 55 13. Método según cualquiera de los aspectos 1 a 12, en el que la composición se atomiza en un nebulizador.
14. Método según el aspecto 13, en el que el nebulizador es un nebulizador de malla vibrante.
- 60 15. Método según cualquiera de los aspectos 1 a 14, en el que el aerosol tiene una mediana del diámetro en volumen de entre 1 y 10  $\mu\text{m}$ , preferiblemente entre 1 y 7  $\mu\text{m}$ , lo más preferiblemente entre 1 y 5  $\mu\text{m}$ , tal como aproximadamente 3, 3,5 ó 4  $\mu\text{m}$ .
- 65 16. Aerosol que comprende gotitas líquidas que pueden obtenerse mediante la atomización de una composición que comprende un portador acuoso y un polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina a una concentración de 1 mg/ml a 200 mg/ml, en el que la cantidad de formación de agregado en el aerosol es del 6% o menos, el % de formación de agregado tal como se determina mediante SE-HPLC, y en el que:

- la composición comprende además un tensioactivo a una concentración de entre el 0,001% y el 1%;
  - el polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina está presente en la composición a una concentración de 20 mg/ml o más; y/o
- 5
- la composición se atomiza en un nebulizador de malla vibrante.
17. Aerosol según el aspecto 16, en el que la cantidad de formación de agregado en el aerosol es del 5% o menos, preferiblemente el 4% o menos, tal como el 3% o menos, el 2% o menos o incluso el 1% o menos.
- 10
18. Aerosol según cualquiera de los aspectos 16 ó 17, en el que la composición comprende además un tensioactivo a una concentración de entre el 0,001% y el 1%, preferiblemente entre el 0,001% y aproximadamente el 0,1%, o de aproximadamente el 0,01% a aproximadamente el 0,1% tal como aproximadamente el 0,001%, el 0,005%, el 0,01%, el 0,02%, el 0,05%, el 0,08% o el 0,1%, de manera preferible aproximadamente el 0,01%.
- 15
19. Aerosol según cualquiera de los aspectos 16 a 18, en el que el tensioactivo se selecciona de un detergente no iónico.
20. Aerosol según cualquiera de los aspectos 16 a 19, en el que el tensioactivo se selecciona de polisorbatos (tales como por ejemplo Tween 20, y Tween 80) y poloxámeros, o en el que se añade PEG como compuesto de tipo tensioactivo.
21. Aerosol según cualquiera de los aspectos 18 a 20, en el que el polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina está presente a una concentración de menos de 20 mg/ml.
- 25
22. Aerosol según cualquiera de los aspectos 16 a 20, en el que el polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina está presente a una concentración de 20 mg/ml o más.
23. Aerosol según cualquiera de los aspectos 16 ó 17, en el que el polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina está presente a una concentración de 20 mg/ml o más y en el que la composición no comprende un tensioactivo.
- 30
24. Aerosol según cualquiera de los aspectos 16 a 23, en el que el polipéptido comprende un dominio variable individual de inmunoglobulina.
- 35
25. Aerosol según cualquiera de los aspectos 16 a 23, en el que el polipéptido comprende dos o más dominios variables individuales de inmunoglobulina, tal como dos o tres.
26. Aerosol según cualquiera de los aspectos 16 a 25, en el que el polipéptido se une específicamente a VSR o IL-23.
- 40
27. Aerosol según el aspecto 26, en el que el polipéptido se selecciona de una de SEQ ID NO: 1, 2 y 3.
28. Aerosol según cualquiera de los aspectos 16 a 27, en el que la composición se atomiza en un nebulizador.
- 45
29. Aerosol según el aspecto 28, en el que el nebulizador es un nebulizador de malla vibrante.
30. Aerosol según cualquiera de los aspectos 16 a 29, en el que el aerosol tiene una mediana del diámetro en volumen de entre 1 y 10  $\mu\text{m}$ , preferiblemente entre 1 y 7  $\mu\text{m}$ , lo más preferiblemente entre 1 y 5  $\mu\text{m}$ , tal como aproximadamente 3, 3,5 ó 4  $\mu\text{m}$ .
- 50
31. Una composición adecuada para la preparación de un aerosol de dominios variables individuales de inmunoglobulina en la que la cantidad de formación de agregado es del 6% o menos, el % de formación de agregado tal como se determina mediante SE-HPLC, comprendiendo dicha composición un portador acuoso y un polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina a una concentración de 1 mg/ml a 200 mg/ml, en la que:
- 55
- la composición comprende además un tensioactivo a una concentración de entre el 0,001% y el 1%; y/o
  - el polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina está presente en la composición a una concentración de 20 mg/ml o más.
- 60
32. La composición según el aspecto 31, en la que la cantidad de formación de agregado es del 5% o menos, preferiblemente el 4% o menos, tal como el 3% o menos, el 2% o menos o incluso el 1% o menos.
- 65

- 5 33. La composición según cualquiera de los aspectos 31 ó 32, que comprende un tensioactivo a una concentración de entre el 0,001% y el 1%, preferiblemente entre el 0,001% y aproximadamente el 0,1%, o de aproximadamente el 0,01% a aproximadamente 0,1% tal como aproximadamente el 0,001%, el 0,005%, el 0,01%, el 0,02%, el 0,05%, el 0,08% o el 0,1%, de manera preferible aproximadamente el 0,01%.
34. La composición según cualquiera de los aspectos 31 a 33, en la que el tensioactivo se selecciona de un detergente no iónico.
- 10 35. La composición según el aspecto 34, en la que el tensioactivo se selecciona de polisorbatos (tales como por ejemplo Tween 20, y Tween 80) y poloxámeros, o en la que se añade PEG como compuesto de tipo tensioactivo.
36. La composición según cualquiera de los aspectos 33 a 35, en la que el polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina está presente a una concentración de menos de 20 mg/ml.
- 15 37. La composición según cualquiera de los aspectos 31 a 35, en la que el polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina está presente a una concentración de 25 mg/ml o más.
- 20 38. La composición según cualquiera de los aspectos 31 ó 32, en la que el polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina está presente a una concentración de 20 mg/ml o más y en la que la composición no comprende un tensioactivo.
39. La composición según cualquiera de los aspectos 31 a 38, en la que el polipéptido comprende un dominio variable individual de inmunoglobulina.
- 25 40. La composición según cualquiera de los aspectos 31 a 38, en la que el polipéptido comprende dos o más dominios variables individuales de inmunoglobulina, tal como dos o tres.
41. La composición según cualquiera de los aspectos 31 a 40, en la que el polipéptido se une específicamente a VSR o IL-23.
- 30 42. La composición según el aspecto 41, en la que el polipéptido se selecciona de una de SEQ ID NO: 1, 2 y 3.
43. El método según cualquiera de los aspectos 1 a 15, el aerosol según cualquiera de los aspectos 16 a 30, o la composición según cualquiera de los aspectos 31 a 42, en los que el portador acuoso en la composición es agua destilada, agua de calidad MilliQ o agua para inyección (WFI).
- 35 44. El método según cualquiera de los aspectos 1 a 15, el aerosol según cualquiera de los aspectos 16 a 30, o la composición según cualquiera de los aspectos 31 a 42, en los que la composición se tampona a pH de 5,5 a 7,5, preferiblemente pH 7,0.
- 40 45. El método, el aerosol, o la composición según el aspecto 44, en los que la composición se tampona con un tampón seleccionado de PBS, tampón de fosfato, TrisHCl, tampón de histidina y tampón de citrato, preferiblemente tampón de fosfato.
- 45 46. El método, el aerosol, o la composición según el aspecto 45, en los que el tampón en la composición tiene una concentración de 10 a 100 mM, preferiblemente de 10 a 50 mM, tal como 10 mM o 20 mM, en particular 10 mM.
- 50 47. El método según cualquiera de los aspectos 1 a 15, el aerosol según cualquiera de los aspectos 17 a 30, o la composición según cualquiera de los aspectos 31 a 42, en los que la composición es isotónica o ligeramente hipotónica.
48. El método, el aerosol, o la composición según el aspecto 47, en los que la composición tiene una osmolalidad de  $290 \pm 60$  mOsm/kg.
- 55 49. El método, el aerosol, o la composición según cualquiera de los aspectos 47 ó 48, en los que la osmolalidad en la composición se ha ajustado mediante la adición de un azúcar o una sal, preferiblemente NaCl, en particular NaCl 130 mM.
- 60 50. Un método para la preparación de una composición según cualquiera de los aspectos 31 a 42, que comprende al menos la etapa de concentrar el polipéptido e intercambiarlo con el tampón seleccionado.
- 65 51. El método según el aspecto 50, que comprende adicionalmente la etapa de añadir un tensioactivo a una concentración de entre el 0,001% y el 1%, preferiblemente entre el 0,001% y aproximadamente 0,1%, o de aproximadamente el 0,01% a aproximadamente el 0,1% tal como aproximadamente el 0,001%, el 0,005%, el 0,01%, el 0,02%, el 0,05%, el 0,08% o el 0,1%, de manera preferible aproximadamente el 0,01%.

52. El método según cualquiera de los aspectos 50 ó 52, en el que el tensioactivo se selecciona de un detergente no iónico.
53. El método según el aspecto 52, en el que el tensioactivo se selecciona de polisorbatos (tales como por ejemplo Tween 20, y Tween 80) y poloxámeros, o en el que se añade PEG como compuesto de tipo tensioactivo.
54. El método según cualquiera de los aspectos 51 a 53, en el que el polipéptido se concentra a una concentración de menos de 20 mg/ml.
55. El método según cualquiera de los aspectos 50 a 53, en el que el polipéptido se concentra a una concentración de 20 mg/ml o más.
56. El método según el aspecto 50, en el que el polipéptido se concentra a una concentración de 20 mg/ml o más y en el que no se añade tensioactivo.
57. Uso de una composición según cualquiera de los aspectos 31 a 42 para la preparación de un medicamento para su administración a un sujeto humano mediante aerosolización.
58. Uso de una composición según el aspecto 57, para la preparación de un medicamento para su administración a un sujeto humano mediante nebulización.
59. Uso de una composición según el aspecto 58, para la preparación de un medicamento para su administración a un sujeto humano mediante nebulización en un nebulizador de malla vibrante.
60. Un envase que contiene una composición según cualquiera de los aspectos 31 a 42.
61. Un kit que comprende uno o más de los envases según el aspecto 60, e instrucciones de uso de la composición para su administración en un sistema de administración de aerosol.
62. El kit según el aspecto 61, en el que el sistema de administración de aerosol es un nebulizador.
63. El kit según el aspecto 62, en el que el nebulizador es un nebulizador de malla vibrante.
64. Un sistema de administración de aerosol que comprende un envase, un generador de aerosol conectado al envase, en el que el envase comprende una composición según cualquiera de los aspectos 31 a 42.
65. El sistema de administración de aerosol según el aspecto 64, que es un nebulizador.
66. El nebulizador según el aspecto 65, que es un nebulizador de malla vibrante.
67. La composición, envase, kit, sistema de administración de aerosol o nebulizador según cualquiera de los aspectos anteriores para su uso en terapia.
68. La composición, envase, kit, sistema de administración de aerosol o nebulizador según el aspecto 67, en los que la terapia es el tratamiento de enfermedad respiratoria.
69. Método para la prevención y/o el tratamiento de una o más enfermedades y/o trastornos, que comprende administrar mediante aerosolización a un sujeto que lo necesita una composición según cualquiera de los aspectos 31 a 42.
70. Método según el aspecto 69, para la prevención y/o el tratamiento de una o más enfermedades respiratorias, que comprende administrar mediante aerosolización a un sujeto que lo necesita una composición según cualquiera de los aspectos 31 a 42.
71. Método según el aspecto 70, en el que la enfermedad respiratoria es infección por VSR.
72. Método según cualquiera de los aspectos 69 a 71, en el que la composición se administra mediante nebulización.
73. Método según el aspecto 72, en el que la composición se administra mediante un nebulizador de malla vibrante.
74. Uso de una composición, envase, kit, sistema de administración de aerosol o nebulizador según cualquiera de los aspectos anteriores para la preparación de un medicamento para tratamiento de enfermedades respiratorias.
75. Uso según el aspecto 74, en el que la enfermedad respiratoria es infección por VSR.

**Ejemplos**

Ejemplo 1: Administración por nebulizador de Nanobody P231L0075 (ejemplo de referencia)

5 Se ha descrito 231L0075 (SEQ ID NO: 1; EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFSLPASGNIFNLLIAWYRQAPGKGRVATINSGRSRTYYADSVKGRFTIS RDNSKKTILQMNSLRPEDTAVYYCQTSVSGSPNFWGQGLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSRL SCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKTTLLIQMNSLRPEDTAVYYCTI 10 GGSLSRSSQGLVTVSSGGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTLSSYAMGWFRQAPGKGRFV ARISQGGTAIYYADSVKGRFTISRDNKNTLILQMNSLRPEDTAVYYCAKDPSPYYRGSAILLSGSYDSWGQGLVTV SS) como SEQ ID NO: 2622 en el documento WO 2009/068627. 231L0075 consiste en tres dominios variables humanizados de un anticuerpo de llama de cadena pesada: 119A3v16 y 81A12v5 que se unen a diferentes epítomos de IL23 p19, y el ALB8 que se une a HSA. Las subunidades en ambos Nanobodies están fusionadas cabeza con cola con un ligador 9G/S.

15 Se sometió a prueba P231L0075 en el nebulizador de bolsillo Omron MicroAir que pertenece a los nebulizadores de malla vibrante. En el dispositivo, se sometió a prueba P231L0075 a 4 mg/ml con una gama de tampones de formulación diferentes. Se sometió a prueba la estabilidad de las muestras con respecto al procedimiento de nebulización comparando muestras pre- y posnebulización usando cromatografía de exclusión molecular (SE-HPLC). 20

25 Se sometió a prueba P231L0075 en tampón de PBS (solución salina tamponada con fosfato) + Tween80 al 0,01%, PBS + Tween80 al 0,04%, histidina 10 mM pH 6 + sacarosa al 10% + Tween 80 al 0,01% e histidina 10 mM pH 6 + sacarosa al 10% + Tween 80 al 0,04%. Se nebulizaron 0,5 ml de cada disolución usando el nebulizador de bolsillo Omron MicroAIR. Se inyectaron 5 microlitros de muestras de proteína en la columna de SE-HPLC (TSKgel G2000SWXL). Se realizó la separación de proteínas en SE-HPLC a 0,2 ml/min durante 70 minutos. Se usó Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3,25 mM + NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6,75 mM + arginina HCl 0,3 M + NaN<sub>3</sub> al 0,005% pH 6 como fase móvil. Se llevó a cabo la detección de material proteináceo eluido mediante detección en línea por UV (Abs 280 nm).

30 Los resultados en la tabla 1 muestran que los perfiles de SE-HPLC posnebulización de las cuatro formulaciones diferentes sometidas a prueba presentaron un pico previo ligeramente aumentado en comparación con las muestras de referencia e indicaron un aumento menor de la cantidad relativa de agregados solubles. Se calculó la recuperación de la proteína después de la nebulización a partir del área de pico total de muestra nebulizada con respecto a la de referencia. Los resultados en la tabla 1 muestran que las muestras nebulizadas formuladas en histidina/sacarosa tienen una cantidad de P231L0075 comparable al material de entrada. Esto sugiere que el material no experimenta degradación o fragmentación significativas con la nebulización. 35

40 Tween-80 aumentó la recuperación y estabiliza P231L0075 contra la agregación y degradación de una manera dependiente de la dosis. La recuperación del Nanobody P231L0075 después de la nebulización fue del 100% en la formulación de histidina/sacarosa que contenía Tween-80 al 0,04% y se observó la cantidad más baja de agregados solubles (3%). En una formulación similar que contenía sólo Tween-80 al 0,01%, la recuperación de P231L0075 después de la nebulización fue del 90% y el porcentaje de agregados solubles el 4,8%. Estos datos indican que Tween-80 tiene un efecto estabilizante contra la agregación después de la nebulización de una manera dependiente de la concentración. 45

Tabla 1. Resumen de los datos de análisis de SE-HPLC de P231L0075 a 4 mg/ml en diferentes tampones de formulación, después de la nebulización en un nebulizador de bolsillo Omron MicroAir en comparación con las muestras de referencia (misma formulación, sin nebulización).

Tampón de formulación		Área total	picos previos	pico principal	pico posterior	Recuperación
PBS + Tween80 al 0,01%	Referencia	131,5	0,4%	95,2%	4,4%	
	Nebulizado	91,4	5,2%	89,4%	5,4%	70%
PBS + Tween80 al 0,04%	Referencia	133,9	0,4%	95,3%	4,3%	
	Nebulizado	126,5	4,6%	90,8%	4,6%	94%
Histidina 10 mM pH 6 + sacarosa al 10% + Tween80 al 0,01%	Referencia	135,4	0,8%	99,2%	0,0%	
	Nebulizado	121,3	4,8%	95,2%	0,0%	90%
Histidina 10 mM pH 6 + sacarosa al 10% + Tween80 al 0,04%	Referencia	130,2	0,7%	99,3%	0,0%	
	Nebulizado	134,0	3,0%	97,0%	0,0%	103%

50

Ejemplo 2: Efecto de diferentes dispositivos nebulizadores y concentraciones de proteína sobre la nebulización de Nanobody RSV420 (ejemplo de referencia)

RSV420 tiene la siguiente secuencia:  
 5 EVQLVESGGGLVQAGGSLISCAASGGGSLSNYVLGWFRQAPGKEREFVAAINWRGDITIGPPNVEGRFTISRDNANK  
 TGILQMNSLAPDDTAVYYCGAGTPLNPGAYIYDWSYDYWGRGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGG  
 LVQAGGSLISCAASGGGSLSNYVLGWFRQAPGKEREFVAAINWRGDITIGPPNVEGRFTISRDNANKTGILQMNSLAP  
 DDTAVYYCGAGTPLNPGAYIYDWSYDYWGRGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLIS  
 10 CAASGGGSLSNYVLGWFRQAPGKEREFVAAINWRGDITIGPPNVEGRFTISRDNANKTGILQMNSLAPDDTAVYYCGA  
 GTPLNPGAYIYDWSYDYWGRGTQVTVSS (SEQ ID NO: 3).

Se sometió a prueba RSV420 en los nebulizadores AKITA® JET y AKITA<sup>2</sup> APIXNEB™ (Activaero) que pertenecen a los nebulizadores de chorro y con malla, respectivamente. En los dispositivos, Se sometió a prueba RSV420 a diferentes concentraciones (aproximadamente 1, 5 y 20 mg/ml) en tampón de solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se sometió a prueba la estabilidad de las muestras con respecto al procedimiento de nebulización comparando muestras pre- y posnebulización usando cromatografía de exclusión molecular (SE-HPLC).

Se nebulizó cada disolución tal como sigue: se llenó el nebulizador con 500 µl de líquido y se recogió el material nebulizado en un tubo de polipropileno de 50 ml. Se analizaron 10 µg de cada muestra de antes y después de la nebulización mediante SE-HPLC usando un TSK Gel SuperSW3000 (velocidad de flujo 0,15 ml/min, tiempo de ejecución 35 minutos, fase móvil KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3,9 mM + Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6,1 mM + NaCl 0,4 M pH 7,0; la detección se estableció a 280 nm).

Se observó que la nebulización, nebulizador con malla o de chorro, induce formas multiméricas de RSV420 diferenciadas, visibles como picos previos cuando se analizan mediante SE-HPLC. La tabla 2 informa los datos de integraciones a partir de análisis de SE-HPLC de muestras después de la nebulización; se muestran en particular las cantidades relativas de picos previos en datos de SE-HPLC (% de oligómeros) a partir de diferentes concentraciones de RSV420 (5,32 mg/ml y 22,90 mg/ml) nebulizadas usando un nebulizador de chorro (AKITA® JET) o con malla (AKITA<sup>2</sup> APIXNEB™).

A partir de estos resultados, está claro que la cantidad de formas multiméricas fue mucho más pronunciada cuando se usó un nebulizador de chorro (hasta 45% de picos previos) en comparación con un nebulizador con malla; además la formación de estos productos secundarios fue menos pronunciada cuando se nebulizó disoluciones que contenían una mayor concentración de proteína. Específicamente, cuando se nebulizó una disolución de RSV420 a una concentración de aproximadamente 20 mg/ml en PBS mediante un nebulizador con malla, la cantidad relativa de picos previos visible mediante análisis de SE-HPLC en el aerosol fue como mucho del 2%.

Tabla 2. Porcentaje de oligómeros (a partir de los datos de SE-HPLC) en RSV420 nebulizado usando dispositivos de nebulizador diferentes y diferentes concentraciones de proteína

Tipo de nebulizador	Concentración de proteína [mg / ml]	% de oligómeros
chorro	5,32	45
	22,90	40
malla	5,32	11
	22,90	2

Ejemplo 3: Efecto de diferentes tampón/excipientes combinaciones sobre la nebulización de Nanobody RSV434 (ejemplo de referencia)

Se ha descrito RSV434 (SEQ ID NO: 2; DVQLVESGGGLVQAGGSLISCAASGGGSLSNYVLGWFRQAPGKEREFVAAINWRGDITIGPPNVEGRFTISRDNANK TGILQMNSLAPDDTAVYYCGAGTPLNPGAYIYDWSYDYWGRGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGG LVQAGGSLISCAASGGGSLSNYVLGWFRQAPGKEREFVAAINWRGDITIGPPNVEGRFTISRDNANKTGILQMNSLAP DDTAVYYCGAGTPLNPGAYIYDWSYDYWGRGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLIS CAASGGGSLSNYVLGWFRQAPGKEREFVAAINWRGDITIGPPNVEGRFTISRDNANKTGILQMNSLAPDDTAVYYCGA GTPLNPGAYIYDWSYDYWGRGTQVTVSS) como SEQ ID NO: 142 en el documento WO 2010/139808. RSV434 consiste en tres dominios variables de un anticuerpo de llama de cadena pesada. Las subunidades en ambos Nanobodies están fusionadas cabeza con cola con un ligador 15G/S.

Se analizó en primer lugar la estabilidad de RSV434 en composiciones de tampón/excipientes que mostraban un intervalo de pH desde pH 3,8 hasta 7,0 midiendo la temperatura de fusión (T<sub>f</sub>) de RSV434 en las diferentes composiciones. Este parámetro, que define una temperatura a la que el 50% de la proteína en disolución está desplegada, se mide mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) o ensayo de cambio térmico (TSA).

Para los experimentos DSC, se llevaron todas las muestras a una concentración de 0,5 mg/ml en los tampones que se iban a someter a prueba. Se aplicaron las muestras (400  $\mu$ l) a placa de 96 pocillos y los parámetros de DSC fueron tal como sigue: concentración de proteína final 0,5 mg/ml; temperatura inicial 35°C; temperatura final 95°C; velocidad de barrido 1°C/min.; velocidad de enfriamiento: EXP; modo de retroalimentación: ninguno; periodo de filtración 4; termostato previo al barrido: 10 min.; termostato posterior al barrido: 0 min. Cada análisis incluyó también dos ejecuciones en tampón para establecer referencias estables. Se obtuvieron los termogramas después de la sustracción de la referencia.

Los resultados de DSC indican que los valores Tf fueron mayores a pH neutros (véase la tabla 3).

Tabla 3. Determinación de Tf mediante DSC de RSV434 (0,5 mg / ml) en diferentes composiciones de tampón/excipiente (concentración de tampón 20 mM)

RSV434 en	Temperatura de fusión (°C)
citrato pH 3,8	57,2
acetato pH 3,8	57,3
citrato + NaCl pH 5,5	64,7
acetato + NaCl pH 5,5	64,8
Bis-Tris pH 6,5	66,3
Tris pH 7,0	66,6
PBS	67,0
Fosfato de Na pH 7,0	67,9

A continuación, se analizó la estabilidad de RSV434 en composiciones de tampón /excipiente seleccionadas en un intervalo de pH de 6,0 a 7,5 (véase la figura 1; todos los tampones indicados contienen adicionalmente manitol 0,3 M) midiendo la temperatura de fusión (Tf) de RSV434 en los diferentes tampones mediante ensayo de cambio térmico (TSA).

Puede realizarse el ensayo de cambio térmico (TSA) de una manera de alto rendimiento (placa de 96 pocillos) en un dispositivo Q-PCR para evaluar el efecto de tampón (acoplado), fuerza iónica, pH y excipientes sobre la estabilidad térmica de las proteínas. El ensayo tiene como resultado un valor de Tf que es indicativo de la estabilidad térmica en los tampones sometidos a prueba. De manera breve, el ensayo sigue los cambios de señal de un tinte de fluorescencia, tal como Sypro Orange, mientras la proteína experimenta desplegamiento térmico. Cuando se añade Sypro Orange a una disolución de proteína debidamente plegada, se expone en un ambiente acuoso y se extingue su señal de fluorescencia. Cuando la temperatura sube, la proteína experimenta desplegamiento térmico y expone su región central hidrófoba. Se une entonces Sypro Orange a las regiones hidrófobas y se desextingue, que tiene como resultado el aumento de la señal de fluorescencia. El ensayo se realizó con disoluciones que contenían el tampón que se quería someter a prueba, la muestra de proteína a 0,1 mg/ml y 10x Sypro Orange. El programa consistió en las siguientes etapas: calentar hasta 37°C a una tasa de incremento de 4,4°C/s y mantener durante 10 s; calentar hasta 90°C a una tasa de incremento continuo de 0,01°C/s (66 adquisiciones por °C); y enfriar hasta 37°C a una tasa de incremento de 2,2°C/s y mantener durante 10 s.

Además, se analizó adicionalmente el efecto de diferentes composiciones de tampón/excipiente sobre la estabilidad de RSV434 al nebulizarse mediante SE-HPLC.

Se nebulizaron disoluciones de 5 mg/ml de Nanobody RSV434 mediante el nebulizador con malla portátil Omron MicroAir en presencia de diferentes excipientes. Se analizaron entonces las muestras de antes y después de la nebulización mediante cromatografía de exclusión molecular.

De manera breve, se formuló RSV434 a 5 mg/ml en los siguientes tampones: fosfato de sodio 10 mM pH 7,0, fosfato de sodio 50 mM pH 7,0, fosfato 10 mM pH 7,5, fosfato 50 mM pH 7,5, TRIS 10 mM pH 7,5, TRIS 50 mM pH 7,5, citrato/fosfato 10 mM pH 6,5, citrato/fosfato 50 mM pH 6,5. También se añadió a cada disolución, como agente de osmolaridad, glicina o manitol hasta una concentración final de 0,3 M, o cloruro de sodio hasta una concentración final de 0,15 M (véanse la tabla 4 y la figura 2). Se nebulizó cada disolución tal como sigue: se llenó el nebulizador con 500  $\mu$ l de líquido y se recogió el material nebulizado en un tubo de polipropileno de 50 ml. Se analizaron 10  $\mu$ g de cada muestra de antes y después de la nebulización mediante SE-HPLC usando un TSK Gel SuperSW3000 (velocidad de flujo 0,15 ml/min, tiempo de ejecución 35 minutos, fase móvil  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3,9 mM +  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  6,1 mM + NaCl 0,4 M pH 7,0; la detección se estableció a 280 nm).

La tabla 4 notifica los datos de integración a partir de análisis de SE-HPLC de las muestras de antes y después de la nebulización; se muestran en particular las cantidades relativas de picos previos y posteriores, así como el pico principal del producto. Se ha observado que la nebulización, nebulizador con malla o de chorro, induce formas multiméricas de RSV434 diferenciadas, probablemente debido a exposición de las moléculas a una superficie de contacto aire-agua durante el procedimiento de aerosolización. La cantidad total de picos previos representa la formación de tales formas multiméricas. La columna de recuperación total notifica el porcentaje de material recuperado después de la nebulización basado en la razón de área total después y antes de la nebulización.

A partir de estos resultados, está claro que la cantidad de formas multiméricas está por encima del 10% en la mayoría de las condiciones sometidas a prueba; unas pocas composiciones de tampón/excipientes condujeron a una menor multimerización, tal como, por ejemplo, fosfato de sodio 10 mM pH 7,0/NaCl 0,15 M, fosfato 50 mM pH 7,5/NaCl 0,15 M, TRIS 10 mM pH 7,5/ glicina 0,3 M, TRIS 50 mM pH 7,5/ glicina 0,3 M, citrato/fosfato 50 mM pH 6,5/NaCl 0,15 M. En términos de recuperación de proteínas, todas las combinaciones que contienen TRIS tienen un mejor comportamiento.

Tabla 4. Resumen de los datos de análisis de SE-HPLC de RSV434 a 5 mg/ml en diferentes tampones de formulación, después de la nebulización mediante nebulizador de bolsillo Omron MicroAIR (nebulizado) en comparación con el material no nebulizado (REF)

RSV434 5 mg/ml		pico previo 1	pico previo 2	pico previo 3	pico previo 4	pico principal	pico posterior 1	recuperación total	% de pico previo total
fosfato 10 mM pH 7,0 glicina 0,3 M	REF	0,12%	0,06%	0,34%	3,90%	95,48%	0,10%		0,53%
	nebulizado	3,38%	2,32%	4,39%	3,50%	86,37%	0,05%	86,59%	10,09%
fosfato 10 mM pH 7,0 manitol 0,3 M	REF	0,16%	0,09%	0,23%	4,30%	95,10%	0,12%		0,48%
	nebulizado	3,90%	2,40%	4,56%	3,73%	85,34%	0,08%	86,41%	10,85%
fosfato 10 mM pH 7,0 NaCl 0,15 M	REF	0,08%	0,00%	0,15%	3,69%	95,86%	0,22%		0,24%
	nebulizado	3,26%	1,95%	4,06%	3,33%	87,16%	0,23%	82,76%	9,27%
fosfato 50 mM pH 7,0 glicina 0,3 M	REF	0,10%	0,01%	0,05%	4,38%	95,28%	0,18%		0,16%
	nebulizado	5,14%	2,43%	4,60%	3,65%	84,01%	0,16%	79,75%	12,17%
fosfato 50 mM pH 7,0 manitol 0,3 M	REF	0,24%	0,04%	0,17%	4,41%	95,02%	0,12%		0,45%
	nebulizado	6,15%	2,64%	4,92%	3,76%	82,42%	0,11%	90,41%	13,71%
fosfato 50 mM pH 7,0 NaCl 0,15 M	REF	0,14%	0,07%	0,00%	3,97%	95,68%	0,15%		0,21%
	nebulizado	3,98%	2,18%	4,50%	3,37%	85,82%	0,16%	80,11%	10,66%
fosfato 10 mM pH 7,5 glicina 0,3 M	REF	0,01%	0,01%	0,05%	3,84%	96,01%	0,07%		0,07%
	nebulizado	3,48%	2,38%	4,46%	3,41%	86,21%	0,06%	91,24%	10,33%
fosfato 10 mM pH 7,5 manitol 0,3 M	REF	0,02%	0,08%	0,25%	4,42%	95,10%	0,14%		0,34%
	nebulizado	4,14%	2,51%	4,70%	3,76%	84,78%	0,10%	91,07%	11,36%
fosfato 10 mM pH 7,5 NaCl 0,15 M	REF	0,05%	0,01%	0,14%	3,79%	95,76%	0,25%		0,20%
	nebulizado	4,08%	2,33%	4,69%	3,39%	85,29%	0,23%	91,34%	11,09%
fosfato 50 mM pH 7,5 glicina 0,3 M	REF	0,15%	0,02%	0,06%	4,22%	95,39%	0,17%		0,22%
	nebulizado	5,61%	2,62%	4,91%	3,68%	83,01%	0,16%	88,90%	13,15%
fosfato 50 mM pH 7,5 manitol 0,3 M	REF	0,09%	0,01%	0,08%	4,25%	95,46%	0,12%		0,18%
	nebulizado	6,07%	2,58%	4,78%	3,84%	82,65%	0,08%	92,67%	13,43%
fosfato 50 mM pH 7,5 NaCl 0,15 M	REF	0,08%	0,06%	0,03%	3,98%	95,70%	0,15%		0,17%
	nebulizado	3,43%	2,02%	4,32%	3,37%	86,74%	0,13%	88,68%	9,77%
TRIS 10 mM pH 7,5 glicina 0,3 M	REF	0,04%	0,04%	0,00%	3,81%	96,05%	0,05%		0,08%
	nebulizado	2,78%	2,11%	4,08%	3,35%	87,67%	0,02%	94,81%	8,97%
TRIS 10 mM pH 7,5	REF	0,08%	0,06%	0,21%	4,28%	95,26%	0,10%		0,36%

manitol 0,3 M	nebulizado	3,16%	2,18%	4,17%	3,72%	86,71%	0,06%	94,06%	9,51%
TRIS 10 mM pH 7,5 NaCl 0,15 M	REF	0,07%	0,01%	0,09%	3,86%	95,74%	0,24%		0,17%
	nebulizado	3,85%	2,32%	4,83%	3,19%	85,60%	0,22%	93,68%	11,00%
TRIS 50 mM pH 7,5 glicina 0,3 M	REF	0,02%	0,04%	0,05%	3,86%	95,89%	0,14%		0,11%
	nebulizado	3,49%	2,14%	4,20%	3,43%	86,60%	0,14%	96,31%	9,83%
TRIS 50 mM pH 7,5 manitol 0,3 M	REF	0,19%	0,08%	0,27%	4,50%	94,75%	0,21%		0,54%
	nebulizado	4,44%	2,41%	4,55%	3,75%	84,63%	0,22%	95,15%	11,40%
TRIS 50 mM pH 7,5 NaCl 0,15 M	REF	0,11%	0,01%	0,13%	3,64%	95,86%	0,26%		0,25%
	nebulizado	3,40%	2,18%	4,67%	3,23%	86,31%	0,22%	95,17%	10,24%
citrato/fosfato 10 mM pH 6,5 glicina 0,3 M	REF	0,21%	0,02%	0,40%	3,98%	95,29%	0,10%		0,63%
	nebulizado	4,18%	2,12%	3,99%	3,60%	86,06%	0,05%	91,51%	10,29%
citrato/fosfato 10 mM pH 6,5 manitol 0,3 M	REF	0,35%	0,06%	0,22%	4,26%	94,97%	0,15%		0,62%
	nebulizado	4,64%	2,22%	4,09%	4,02%	84,93%	0,10%	90,77%	10,95%
citrato/fosfato 10 mM pH 6,5 NaCl 0,15 M	REF	0,01%	0,03%	0,09%	3,75%	95,91%	0,21%		0,14%
	nebulizado	4,25%	2,00%	4,08%	3,53%	85,91%	0,24%	92,33%	10,33%
citrato/fosfato 50 mM pH 6,5 glicina 0,3 M	REF	0,05%	0,09%	0,06%	4,13%	95,55%	0,12%		0,20%
	nebulizado	5,24%	2,06%	4,09%	3,80%	84,71%	0,10%	91,71%	11,39%
citrato/fosfato 50 mM pH 6,5 manitol 0,3 M	REF	0,18%	0,02%	0,07%	4,21%	95,36%	0,16%		0,26%
	nebulizado	5,60%	2,26%	4,36%	3,90%	83,73%	0,15%	93,57%	12,22%
citrato/fosfato 50 mM pH 6,5 NaCl 0,15 M	REF	0,19%	0,08%	0,01%	3,81%	95,74%	0,17%		0,28%
	nebulizado	2,95%	1,67%	3,71%	3,60%	87,90%	0,18%	85,88%	8,33%

Ejemplo 4: Efecto de tensioactivos y composiciones de tampón/excipientes seleccionados sobre la nebulización de Nanobody RSV434 (ejemplo de referencia)

- 5 Se nebulizaron disoluciones de 5 mg/ml de Nanobody RSV434 mediante el nebulizador con malla portátil Omron MicroAir en presencia de tampones y tensioactivos seleccionados. Se analizaron entonces las muestras de antes y después de la nebulización mediante cromatografía de exclusión molecular.

10 En una primera serie de experimentos, se formuló RSV434 a 5 mg/ml en los siguientes tampones: NaCl al 0,9% (solución salina), TRIS 10 mM pH 7,5 / glicina 0,3 M, fosfato de sodio 10 mM pH 7,5 / NaCl 0,15 M, citrato/fosfato 50 mM pH 6,5 / NaCl 0,15 M. En una segunda serie de experimentos, se formuló RSV434 a 5 mg/ml en los siguientes tampones: NaCl al 0,9% (solución salina), PBS, fosfato de sodio 10 mM pH 7,0 / NaCl 0,14 M, fosfato de sodio 10 mM pH 7,5 / NaCl 0,145 M, citrato/fosfato 10 mM pH 6,5 / NaCl 0,133 M. Se sometió a prueba cada una de estas condiciones de tampón sin o con la adición de polisorbato 80 (Tween 80) al 0,04% y/o polietilenglicol (PEG) 1000 al 0,02%. Se nebulizó cada disolución tal como sigue: se llenó el nebulizador con 500 µl de líquido y se recogió el material nebulizado en un tubo de polipropileno de 50 ml. Se analizaron 10 µg de cada muestra de antes y después de la nebulización mediante SE-HPLC usando un TSK Gel SuperSW3000 (velocidad de flujo 0,15 ml/min, tiempo de ejecución 35 minutos, fase móvil KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3,9 mM + Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6,1 mM + NaCl 0,4 M pH 7,0; la detección se estableció a 280 nm).

20 La tabla 5 notifica los datos de integraciones a partir de análisis de SE-HPLC de muestras de la primera serie de experimentos antes y después de la nebulización; se muestran en particular las cantidades relativas de picos previos y posteriores, así como el pico principal del producto. La cantidad total de picos previos representa la formación de formas multiméricas. La columna de recuperación total notifica el porcentaje de material recuperado después de la nebulización basado en la razón de área total después y antes de la nebulización. La figura 3 muestra el porcentaje de picos previos medidos mediante análisis de SE-HPLC de muestras de la segunda serie de experimentos después de la nebulización.

30 A partir de los resultados notificados, el efecto beneficioso sobre la reducción de la cantidad de material multimérico después de la nebulización es claro para tanto Tween 80 como PEG 1000. En el caso de solución salina y disoluciones citrato/fosfato 50 mM pH 6,5 / NaCl 0,15 M, Tween 80 aparenta tener un mejor comportamiento. Por otro lado, PEG 1000 siempre parece aumentar la recuperación de proteínas después de la nebulización.

Tabla 5. Resumen de los datos de análisis de SE-HPLC de RSV434 a 5 mg/ml en diferentes tampones de formulación después de la nebulización mediante nebulizador de bolsillo Omron MicroAir (nebulizado) en comparación con el material no nebulizado (REF).

RSV434 mg / ml	5	Tensioactivo		pico previo 1	pico previo 2	pico previo 3	pico previo 4	pico principal	pico posterior 1	recuperación total	% de pico previo total
NaCl al 0,9%	/	REF		0,06%	0,05%	0,38%	3,93%	95,30%	0,28%	100,00%	0,49%
		nebulizado		1,81%	1,40%	3,28%	3,45%	89,73%	0,32%	85,17%	6,50%
	Tween80 al 0,04%	REF		0,06%	0,01%	0,20%	3,96%	95,47%	0,30%	100,00%	0,26%
		nebulizado		0,58%	0,29%	1,50%	3,79%	93,50%	0,33%	81,96%	2,38%
	PEG1000 al 0,02%	REF		0,07%	0,03%	0,03%	3,92%	95,67%	0,29%	100,00%	0,13%
		nebulizado		1,34%	0,97%	2,29%	3,56%	91,55%	0,29%	91,18%	4,60%
Tris 10 mM pH 7,5 glicina 0,3 M	/	REF		0,06%	0,01%	0,10%	4,01%	95,79%	0,03%	100,00%	0,18%
		nebulizado		2,60%	2,02%	3,90%	3,67%	87,80%	0,00%	93,53%	8,52%
	Tween80 al 0,04%	REF		0,13%	0,01%	0,16%	4,22%	95,31%	0,18%	100,00%	0,30%
		nebulizado		0,45%	0,71%	2,40%	4,11%	92,17%	0,16%	95,80%	3,56%
	PEG1000 al 0,02%	REF		0,15%	0,04%	0,02%	4,11%	95,65%	0,03%	100,00%	0,21%
		nebulizado		0,77%	0,85%	1,83%	3,77%	92,78%	0,01%	92,90%	3,45%
fosfato 10 mM pH 7,0 NaCl 0,15 M	/	REF		0,02%	0,01%	0,17%	3,95%	95,57%	0,28%	100,00%	0,20%
		nebulizado		3,58%	2,18%	4,57%	3,47%	85,90%	0,29%	93,80%	10,33%
	Tween80 al 0,04%	REF		0,14%	0,03%	0,21%	3,97%	95,36%	0,29%	100,00%	0,38%
		nebulizado		2,09%	0,74%	2,54%	3,76%	90,55%	0,32%	89,50%	5,37%
	PEG1000 al 0,02%	REF		0,02%	0,03%	0,14%	3,98%	95,55%	0,29%	100,00%	0,18%
		nebulizado		1,61%	1,17%	2,65%	3,53%	90,77%	0,27%	94,31%	5,43%
citrato/fosfato 50 mM pH 6,5 NaCl 0,15 M	/	REF		0,24%	0,07%	0,03%	4,06%	95,45%	0,15%	100,00%	0,34%
		nebulizado		3,19%	1,97%	4,29%	3,60%	86,80%	0,16%	85,43%	9,45%
	Tween80 al 0,04%	REF		0,10%	0,03%	0,13%	4,24%	95,34%	0,17%	100,00%	0,26%
		nebulizado		0,52%	0,29%	1,50%	4,00%	93,48%	0,20%	85,37%	2,32%
	PEG1000 al 0,02%	REF		0,18%	0,07%	0,03%	4,02%	95,55%	0,15%	100,00%	0,29%
		nebulizado		0,70%	0,72%	1,94%	3,67%	92,81%	0,16%	87,92%	3,36%

5 Ejemplo 5: Efecto de diferentes concentraciones de polisorbato (Tween) 80 sobre la nebulización de Nanobody RSV434 (ejemplo de referencia)

10 Se nebulizaron disoluciones de 5 mg/ml de Nanobody RSV434 mediante el nebulizador con malla Akita Apixneb (Activaero) en presencia de tampones y tensioactivos seleccionados. Se analizaron entonces las muestras de antes y después de la nebulización mediante cromatografía de exclusión molecular.

15 De manera breve, se formuló RSV434 a 5 mg/ml en fosfato de sodio 10 mM pH 7,5 / NaCl 0,14 M en presencia de diferentes concentraciones de Tween 80 (0, 0,005%, 0,01%, 0,02%, 0,04%, 0,08%). Se nebulizó cada disolución tal como sigue: se llenó el nebulizador con 500 µl de líquido y se recogió el material nebulizado en un tubo de polipropileno de 50 ml; se sometió a prueba cada condición de formulación por triplicado. Se analizaron 10 µg de cada muestra antes y después de la nebulización mediante SE-HPLC usando un TSK Gel SuperSW3000 (velocidad de flujo 0,15 ml/min, tiempo de ejecución 35 minutos, fase móvil KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3,9 mM + Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6,1 mM + NaCl 0,4 M pH 7,0; la detección se estableció a 280 nm).

20 La figura 4 notifica la cantidad relativa de picos previos obtenidos a partir de análisis de SE-HPLC de las muestras de antes y después de la nebulización. La cantidad total de picos previos representa la formación de formas multiméricas. La figura 5 muestra el efecto de Tween 80 sobre la recuperación total de proteínas basado en el análisis de SE-HPLC de las muestras de antes y después de la nebulización.

A partir de los datos obtenidos puede concluirse que la cantidad relativa de formas multiméricas después de la nebulización mediante nebulizador con malla es dependiente de la concentración de detergente (específicamente Tween 80) en la disolución inicial. El uso de Tween 80 al 0,08% da lugar al porcentaje de picos previos más bajo (figura 4) y la recuperación de área más elevada (figura 5). La recuperación de proteínas más elevada se obtiene con disoluciones nebulizantes que contienen Tween 80 al 0,08% o al 0,04%.

Ejemplo 6: Efecto de diferentes concentraciones de polietilenglicol (PEG) 1000 y Pluronic F68 (poloxámero 188; Lutrol F68) sobre la nebulización de Nanobody RSV434 (ejemplo de referencia)

Se nebulizaron disoluciones de 5 mg/ml de Nanobody RSV434 mediante el nebulizador con malla Akita Apixneb (Activaero) en presencia de tampones y tensioactivos seleccionados. Se analizaron entonces las muestras de antes y después de la nebulización mediante cromatografía de exclusión molecular.

De manera breve, se formuló RSV434 a 5 mg/ml en fosfato de sodio 10 mM pH 7,0 / NaCl 0,13 M en presencia de diferentes concentraciones de PEG 1000 (al 0,02%, al 0,04%) o Pluronic F68 (al 0,001%, al 0,02%, al 0,04%). Se nebulizó cada disolución tal como sigue: se llenó el nebulizador con 500 µl de líquido y se recogió el material nebulizado en un tubo de polipropileno de 50 ml; se analizaron 10 µg de cada muestra de antes y después de la nebulización mediante SE-HPLC usando un TSK Gel SuperSW3000 (velocidad de flujo 0,15 ml/min, tiempo de ejecución 35 minutos, fase móvil KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3,9 mM + Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6,1 mM + NaCl 0,4 M pH 7,0; la detección se estableció a 280 nm).

La tabla 6 notifica los datos de integración a partir de análisis de SE-HPLC de las muestras de antes y después de la nebulización; se muestran en particular las cantidades relativas de picos previos, así como el pico principal del producto. La cantidad total de picos previos representa la formación de formas multiméricas. La columna de recuperación total notifica el porcentaje de material recuperado después de la nebulización basado en la razón de área total después y antes de la nebulización. Se notifican datos como referencia de un experimento anterior realizado en las mismas condiciones experimentales, usando una disolución de RSV434 en fosfato de sodio 10 mM pH 7,0 / NaCl 0,14 M, sin la adición de tensioactivos.

Los datos claramente muestran el papel beneficioso de PEG 1000 a la concentración del 0,04% y especialmente de Pluronic F-68 a la concentración del 0,04% en la reducción de la formación de formas multiméricas después de la nebulización mediante un nebulizador con malla. Los mismos excipientes también permiten una mayor recuperación de material después del mismo procedimiento.

Tabla 6. Resumen de los datos de análisis de SE-HPLC de disoluciones de 5 mg/ml de RSV434 con diferentes excipientes después de la nebulización mediante nebulizador Akita Apixneb (nebulizado) en comparación con el material no nebulizado (REF).

Tensioactivo		pico previo 1	pico previo 2	pico previo 3	pico principal	% de recuperación total	% de pico previo total
PF-68 al 0,04%	REF	0,04%	0,02%	0,09%	99,86%		0,14%
	nebulizado	0,57%	0,41%	1,24%	97,78%	87,36%	2,22%
PF-68 al 0,02%	REF	0,04%	0,01%	0,10%	99,85%		0,15%
	nebulizado	1,79%	1,01%	2,50%	94,70%	90,20%	5,30%
PF-68 al 0,01%	REF	0,11%	0,04%	0,15%	99,71%		0,29%
	nebulizado	3,46%	1,78%	3,87%	90,89%	86,93%	9,11%
PEG1000 al 0,04%	REF	0,08%	0,04%	0,10%	99,77%		0,23%
	nebulizado	1,39%	0,76%	1,82%	96,03%	91,98%	3,97%
PEG1000 al 0,02%	REF	0,13%	0,04%	0,15%	99,68%		0,32%
	nebulizado	2,68%	1,39%	3,02%	92,91%	100,44%	7,09%
ref. sin tensioactivo	REF	0,08%	0,05%	0,30%	95,15%		0,43%
	nebulizado	2,95%	1,62%	3,42%	88,07%	79,52%	7,99%

Ejemplo 7: Efecto de polietilenglicol (PEG) 1000, Pluronic F68 (poloxámero 188; Lutrol F68) y polisorbato (Tween) 80 sobre la nebulización de Nanobody RSV434 mediante un nebulizador de chorro (ejemplo de referencia)

Se nebulizaron disoluciones de 5 mg/ml de Nanobody RSV434 mediante el nebulizador de chorro AkitaJet (Activaero) en presencia de tensioactivos seleccionados. Se analizaron entonces las muestras de antes y después de la nebulización mediante cromatografía de exclusión molecular.

5 De manera breve, se formuló RSV434 a 5 mg/ml en fosfato de sodio 10 mM pH 7,0/NaCl 0,13 M en presencia de PEG 1000 (al 0,04%), Pluronic F68 (al 0,04%) o Tween 80 (al 0,04%, al 0,08%). Se nebulizó cada disolución tal como sigue: se llenó el nebulizador con 2 ml de líquido y se recogió el material nebulizado mediante un golpeador que contenía 30 ml de PBS; después de la nebulización se recogió la disolución del golpeador y se diluyó hasta 50 ml; se determinó la concentración de proteína mediante medición de DO280 y se analizó 10 µg de cada muestra de antes y después de la nebulización mediante SE-HPLC usando un TSK Gel SuperSW3000 (velocidad de flujo 0,15 ml/min, tiempo de ejecución 35 minutos, fase móvil KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3,9 mM + Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6,1 mM + NaCl 0,4 M pH 7,0; la detección se estableció a 280 nm).

15 La tabla 7 notifica los resultados de datos de integración a partir de análisis de SE-HPLC de las muestras de antes y después de la nebulización; se muestran en particular las cantidades relativas de picos previos, así como la pureza del producto (pico principal). La cantidad total de picos previos representa la formación de formas multiméricas.

20 Parece que PEG 1000 a la concentración de 0,04% y Pluronic F-68 a la concentración de 0,04% reduce la formación de formas multiméricas después de la nebulización también en caso de nebulización mediante un nebulizador de chorro pero no de una manera relevante. El uso de Tween 80 parece ser más eficaz para este propósito; el uso de una concentración de tensioactivo mayor (al 0,08% en vez de al 0,04%) no conduce a una disminución importante en la formación de formas de peso molecular más alto (picos previos).

25 Tabla 7. Resumen de los datos de análisis de SE-HPLC de disoluciones de 5 mg/ml de RSV434 con diferentes excipientes después de la nebulización mediante nebulizador AkitaJet (nebulizado) en comparación con el material no nebulizado (REF).

Tensioactivo		pico previo 1	pico previo 2	pico previo 3	pico principal	% de pico previo total
PEG1000 al 0,04%	REF	0,20%	0,00%	0,30%	99,40%	0,50%
	nebulizado	11,85%	8,80%	19,00%	60,20%	39,65%
PF-68 al 0,04%	REF	0,24%	0,01%	0,21%	99,32%	0,46%
	nebulizado	9,72%	7,47%	16,85%	65,75%	34,04%
Tween80 al 0,04%	REF	0,20%	0,00%	0,40%	99,30%	0,60%
	nebulizado	5,37%	3,84%	14,60%	75,90%	23,81%
Tween80 al 0,08%	REF	0,10%	0,00%	0,30%	99,30%	0,40%
	nebulizado	4,10%	3,30%	12,45%	79,75%	19,85%
ref. sin tensioactivo	REF	0,08%	0,06%	0,46%	99,27%	0,60%
	nebulizado	14,42%	8,96%	19,81%	56,70%	43,19%

30 Ejemplo 8: Efecto de la concentración de proteína sobre la nebulización de Nanobody RSV434

Se nebulizaron soluciones de Nanobody RSV434 a 3 diferentes concentraciones mediante el nebulizador con malla Akita Apixneb (Activaero) en presencia de tampones seleccionados y Tween 80 como tensioactivos. Se analizaron entonces las muestras de antes y después de la nebulización mediante cromatografía de exclusión molecular.

35 De manera breve, se formuló RSV434 a 5 mg/ml, 25 mg/ml y 50 mg/ml en solución salina (NaCl al 0,9%) o en PBS (solución salina tamponada con fosfato), con o sin la presencia de Tween 80 al 0,04%.

40 Se nebulizó cada disolución tal como sigue: se llenó el nebulizador con 500 µl de líquido y se recogió el material nebulizado en un tubo de polipropileno de 50 ml; Se analizaron 10 µg de cada muestra de antes y después de la nebulización mediante SE-HPLC usando un TSK Gel SuperSW3000 (velocidad de flujo 0,15 ml/min, tiempo de ejecución 35 minutos, fase móvil KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3,9 mM + Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6,1 mM + NaCl 0,4 M pH 7,0; la detección se estableció a 280 nm).

45 La figura 6 notifica la cantidad relativa de picos previos obtenidos a partir de análisis de SE-HPLC de muestras después de la nebulización. La cantidad total de picos previos representa la formación de formas multiméricas. Está claro cómo la formación de formas multiméricas de RSV434 está inversamente relacionada con la concentración de

la proteína. A mayores concentraciones de proteína (25 y 50 mg/ml) el efecto del tampón y tensioactivo sobre la formación de multímeros parece despreciable.

5 Ejemplo 9: Efecto de la concentración de proteína sobre la nebulización de Nanobody RSV434 mediante un nebulizador de chorro.

Se nebulizaron soluciones de Nanobody RSV434 a 3 diferentes concentraciones mediante el nebulizador de chorro AkitaJet (Activaero) en presencia de tampones seleccionados y Tween 80 como tensioactivo. Se analizaron entonces las muestras de antes y después de la nebulización mediante cromatografía de exclusión molecular.

10 De manera breve, se formuló RSV434 a 5 mg/ml, 25 mg/ml y 50 mg/ml en fosfato de sodio 10 mM ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) + NaCl 0,13 M pH 7,0 o en PBS (solución salina tamponada con fosfato), con o sin la presencia de Tween 80 al 0,04%.

15 Se nebulizó cada disolución tal como sigue: se llenó el nebulizador con 2 ml de líquido y se recogió el material nebulizado mediante un golpeador que contenía 30 ml de PBS; después de la nebulización se recogió la disolución del golpeador y se diluyó hasta 50 ml; se determinó la concentración de proteína mediante medición de DO280 y se analizaron 10  $\mu\text{g}$  de cada muestra de antes y después de la nebulización mediante SE-HPLC usando un TSK Gel SuperSW3000 (velocidad de flujo 0,15 ml/min, tiempo de ejecución 35 minutos, fase móvil  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3,9 mM +  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  6,1 mM + NaCl 0,4 M pH 7,0; la detección se estableció a 280 nm).

25 La figura 7 notifica la cantidad relativa de picos previos obtenidos a partir de análisis de SE-HPLC de las muestras de antes y después de la nebulización. La cantidad total de picos previos representa la formación de formas multiméricas.

El efecto de Tween 80 en la reducción del porcentaje de especies multiméricas es más relevante sólo a una baja concentración del Nanobody (5 mg/ml).

30 Ejemplo 10: Efecto de tampones seleccionados sobre aerosol en tamaño de gotita de Nanobody RSV434.

Los tampones seleccionados fueron  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM pH 7,0 + NaCl 0,13 M con o sin Tween80 al 0,04% (p:v); y tampón PBS con o sin Tween80 al 0,04% (p:v). La composición de PBS fue  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10,14 mM, 1,76 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,76 mM, KCl 2,67 mM y NaCl 136,9 mM con pH 7,8. Se ajustó la concentración de NaCl hasta 0,13 M (en lugar de 0,14 M en experimentos anteriores) con el fin de asegurar una disolución isotónica (aproximadamente 290 mOsm/kg).

35 Se sometieron muestras de RSV434 formuladas tal como se describe en la tabla 8 a experimentos de nebulización con el dispositivo nebulizador Akita<sup>2</sup>Apixneb, con el fin de determinar el tamaño de gotitas promedio (Figura 8). El nebulizador utiliza una membrana con un tamaño de malla de 4  $\mu\text{m}$ , por lo que se debe conseguir un tamaño de partícula 4  $\mu\text{m}$  o menos después de la nebulización.

40 A partir de los datos notificados en la figura 8 parece que el tamaño de gotitas (mediana del diámetro en volumen o VMD, medido mediante difracción láser) es reproducible junto a diferentes formulaciones y es adecuado para una administración a la parte profunda de los pulmones (aproximadamente 4  $\mu\text{m}$ , 3,8  $\mu\text{m}$  para formulaciones a la concentración de 50 mg/ml).

Tabla 8. Descripción del código, composición y concentración de las muestras.

Código de producto	Tampón de formulación	Concentración de proteína
RSV434/1	$\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 10 mM pH 7,0 / NaCl 0,13 M / Tween 80 al 0,04%	26,92 mg/ml
RSV434/2	PBS	51,23 mg/ml
RSV434/3	PBS + Tween 80 al 0,04%	52,15 mg/ml
RSV434/4	$\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 10 mM pH 7,0 NaCl 0,13 M	50,82 mg/ml
RSV434/5	$\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 10 mM pH 7,0 / NaCl 0,13 M / Tween 80 al 0,04%	51,86 mg/ml
RSV434/6	PBS	4,88 mg/ml
RSV434/7	PBS + Tween 80 al 0,04%	5,06 mg/ml
RSV434/8	$\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 10 mM pH 7,0 NaCl 0,13 M	4,98 mg/ml

RSV434/9	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 10 mM pH 7,0 / NaCl 0,13 M / Tween 80 al 0,04%	5,06 mg/ml
----------	---	------------

Ejemplo 11: Efecto de la concentración de proteína sobre el peso molecular de agregados formados en material nebulizado de Nanobody RSV434.

5 Se realizaron experimentos de nebulización adicionales (por triplicado) en disolución de RSV434 a la concentración de 5 y 50 mg/ml, formulada en NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM pH 7,0 + NaCl 0,13 M, con las siguientes concentraciones de tensioactivo: 0, el 0,02% p/v y el 0,04% p/v.

10 Se nebulizó cada muestra tal como en los experimentos previos, con la excepción del procedimiento de recogida, que se realizó usando un envase de vidrio (botella de 100 ml).

El análisis de SE-HPLC de las muestras después de la nebulización permite cuantificar la cantidad relativa de formas multiméricas (picos previos) de RSV434 (véase la tabla 9).

15 No se pudo ver influencia significativa de Tween 80 sobre el porcentaje de formas multiméricas después de la nebulización cuando el Nanobody estaba a una concentración de 50 mg/ml. A la concentración menor (5 mg/ml), la presencia de Tween 80 (al 0,02% y al 0,04% p/v) redujo a la mitad el porcentaje de picos previos totales en el material nebulizado.

20 Analizando en detalle los cromatogramas de SE-HPLC, fue posible determinar también la cantidad relativa de especies de alto peso molecular (HMW) en la región de picos previos (véanse la tabla 9 y la figura 9); los agregados HMW de RSV434 se corresponden con agregados detectados en cromatografía de exclusión molecular que tienen un peso molecular de más de aproximadamente 200 kDa. Los resultados muestran claramente que a 50 mg/ml se forman menos especies HMW en formulaciones sin Tween 80. A 5 mg/ml no se observó ninguna diferencia.

25 Tabla 9. Porcentaje (%) de picos previos totales y porcentaje (%) de especies de alto peso molecular (HMW) (calculados a partir de datos de integración de cromatogramas de SE-HPLC, véase la figura 9) antes y después de la nebulización de RSV434 a la concentración de 50 mg/ml y 5 mg/ml (n=3)

RSV434			% de picos previos totales	% de especies HMW (pico previo 1)
50 mg/ml	Sin Tween 80	REF	0,19	0,01
		NEB	1,03	0,15
	Tween 80 al 0,02%	REF	0,19	0,03
		NEB	1,35	0,79
	Tween 80 al 0,04%	REF	0,20	0,04
		NEB	1,07	0,51
5 mg/ml	Sin Tween 80	REF	1,4	0,4
		NEB	11,6	3,1
	Tween 80 al 0,02%	REF	0,4	0,1
		NEB	4,8	2,1
	Tween 80 al 0,04%	REF	0,7	0,3
		NEB	6,3	3,6

30 **Lista de secuencias**

<110> Ablynx N.V.

35 <120> Métodos y composiciones para la preparación de aerosoles

<130> P10-007-PCT-1

40 <150> US 61/303,447

<151> 2010-02-11

<150> US 61/426,610

45 <151> 2010-12-23

<160> 3

<170> PatentIn versión 3.5

ES 2 738 114 T3

<210> 1

<211> 386

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Nanobody

<400> 1

15 Glu Val Gln Leu Leu 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 Ile Phe Ser Leu Pro  
 20 25 30

Ala Ser Gly Asn Ile Phe Asn Leu Leu Thr Ile Ala Trp Tyr Arg Gln  
 35 40 45

Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile Asn Ser Gly Ser  
 50 55 60

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

Asp Asn Ser Lys Lys Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro  
 85 90 95

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Thr Ser Gly Ser Gly Ser Pro  
 100 105 110

Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly  
 115 120 125

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

Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly



<211> 408

<212> PRT

5

<213> Secuencia artificial

<220>

10

<223> Nanobody

<400> 2

ES 2 738 114 T3

Asp 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  
 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





ES 2 738 114 T3

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

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

ES 2 738 114 T3

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**

1. Método para la preparación de un aerosol de dominios variables individuales de inmunoglobulina en el que la cantidad de formación de agregado es del 6% en peso de proteína o menos, el % de formación de agregado tal como se determina mediante SE-HPLC, comprendiendo dicho método la etapa de atomizar una composición que comprende un portador acuoso y un polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina a una concentración de 1 mg/ml a 200 mg/ml, en el que:
  - el polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina está presente en la composición a una concentración de 50 mg/ml o más; y
  - la composición se atomiza en un nebulizador de malla vibrante.
2. Aerosol que comprende gotitas líquidas que puede obtenerse mediante el método según la reivindicación 1.
3. Composición adecuada para la preparación del aerosol según la reivindicación 2, para su uso como un medicamento para su administración a un sujeto humano mediante nebulización en un nebulizador de malla vibrante, comprendiendo dicha composición un portador acuoso y un polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina a una concentración de 1 mg/ml a 200 mg/ml, en la que:
  - el polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina está presente en la composición a una concentración de 50 mg/ml o más.
4. Composición según la reivindicación 3, en la que el polipéptido se une específicamente a VSR o IL-23.
5. Composición según la reivindicación 4, en la que el polipéptido se selecciona de una de SEQ ID NO: 1, 2 y 3.
6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 3-5, en la que el portador acuoso en la composición es agua destilada, agua de calidad MilliQ o agua para inyección (WFI).
7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 3-5, en la que la composición se tampona a pH de 5,5 a 7,5, preferiblemente pH 7,0.
8. Composición según la reivindicación 7, en la que la composición se tampona con un tampón seleccionado de PBS, tampón de fosfato, TrisHCl, tampón de histidina y tampón de citrato, preferiblemente tampón de fosfato.
9. Composición según la reivindicación 8, en la que el tampón en la composición tiene una concentración de 10 a 100 mM, preferiblemente de 10 a 50 mM, tal como 10 mM o 20 mM, en particular 10 mM.
10. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 3-5, en la que la osmolalidad en la composición se ha ajustado mediante la adición de un azúcar o una sal, preferiblemente NaCl, en particular NaCl 130 mM.
11. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 3-5, para su uso en el tratamiento de enfermedad respiratoria.
12. Composición según las reivindicaciones 3-5, para su uso en el tratamiento de infección por VSR.
13. Método para la preparación de una composición según las reivindicaciones 3-5, que comprende al menos la etapa de concentrar el polipéptido e intercambiarlo con el tampón seleccionado.
14. Nebulizador de malla vibrante que comprende una composición según cualquiera de las reivindicaciones 3-5.

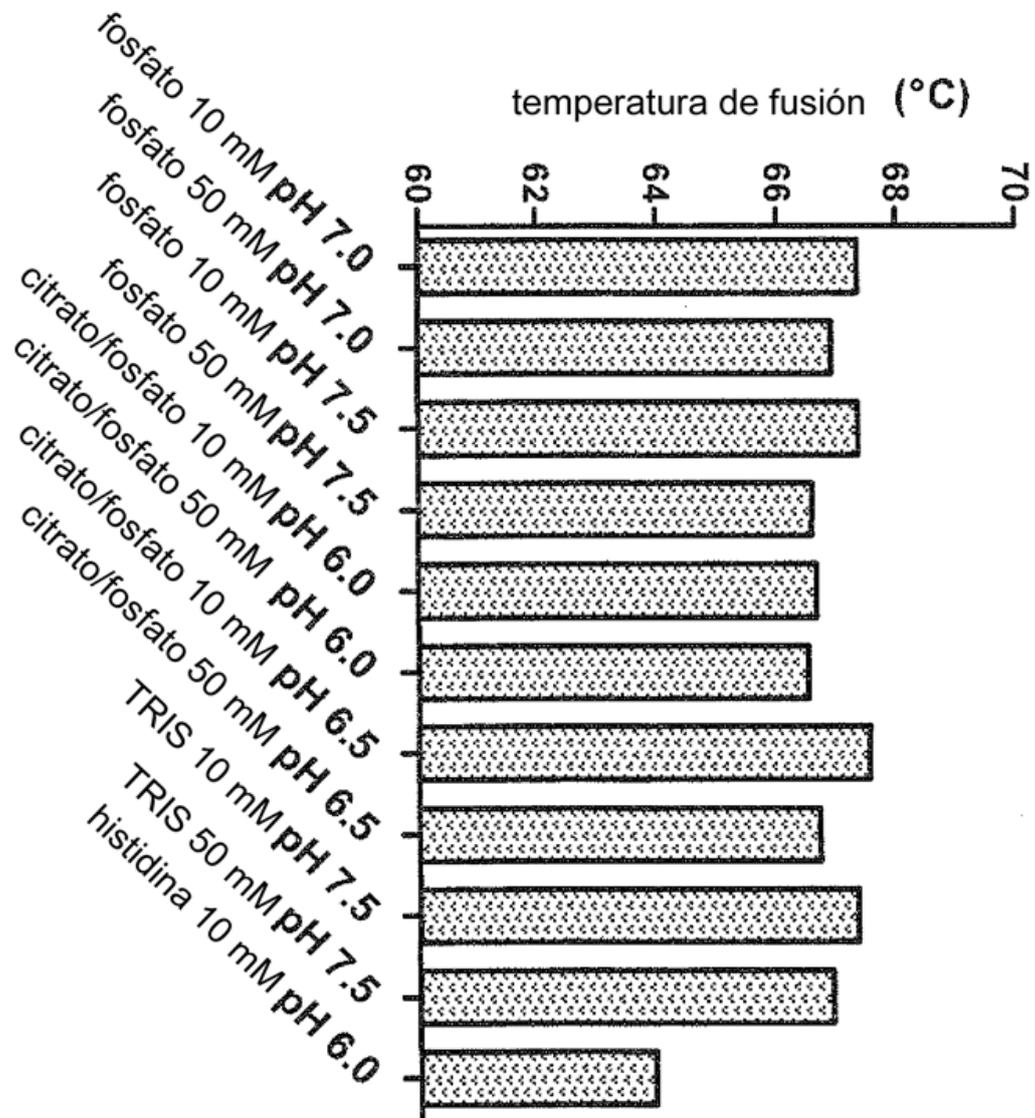


Figura 1

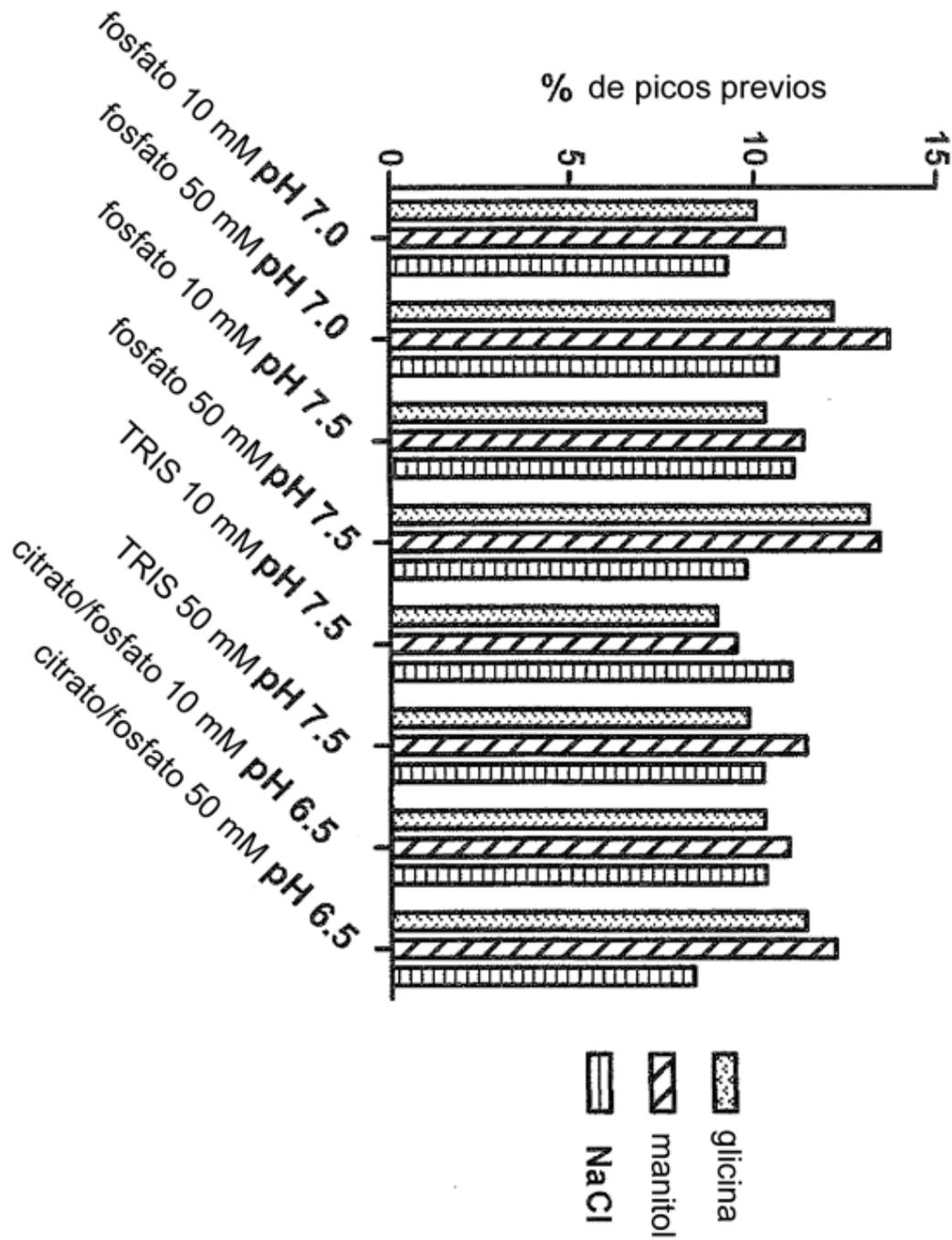


Figura 2

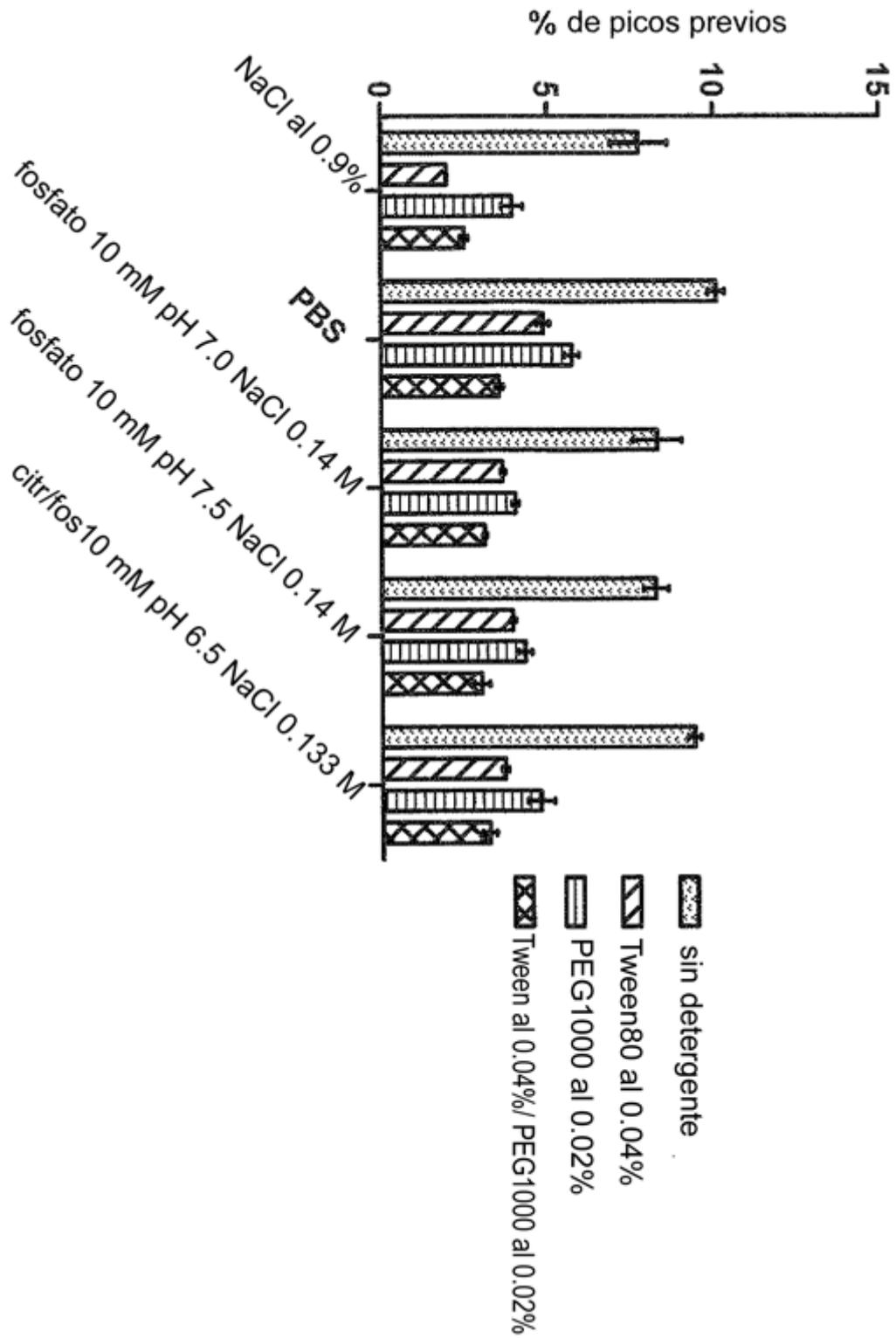


Figura 3

Figura 4



Figura 5

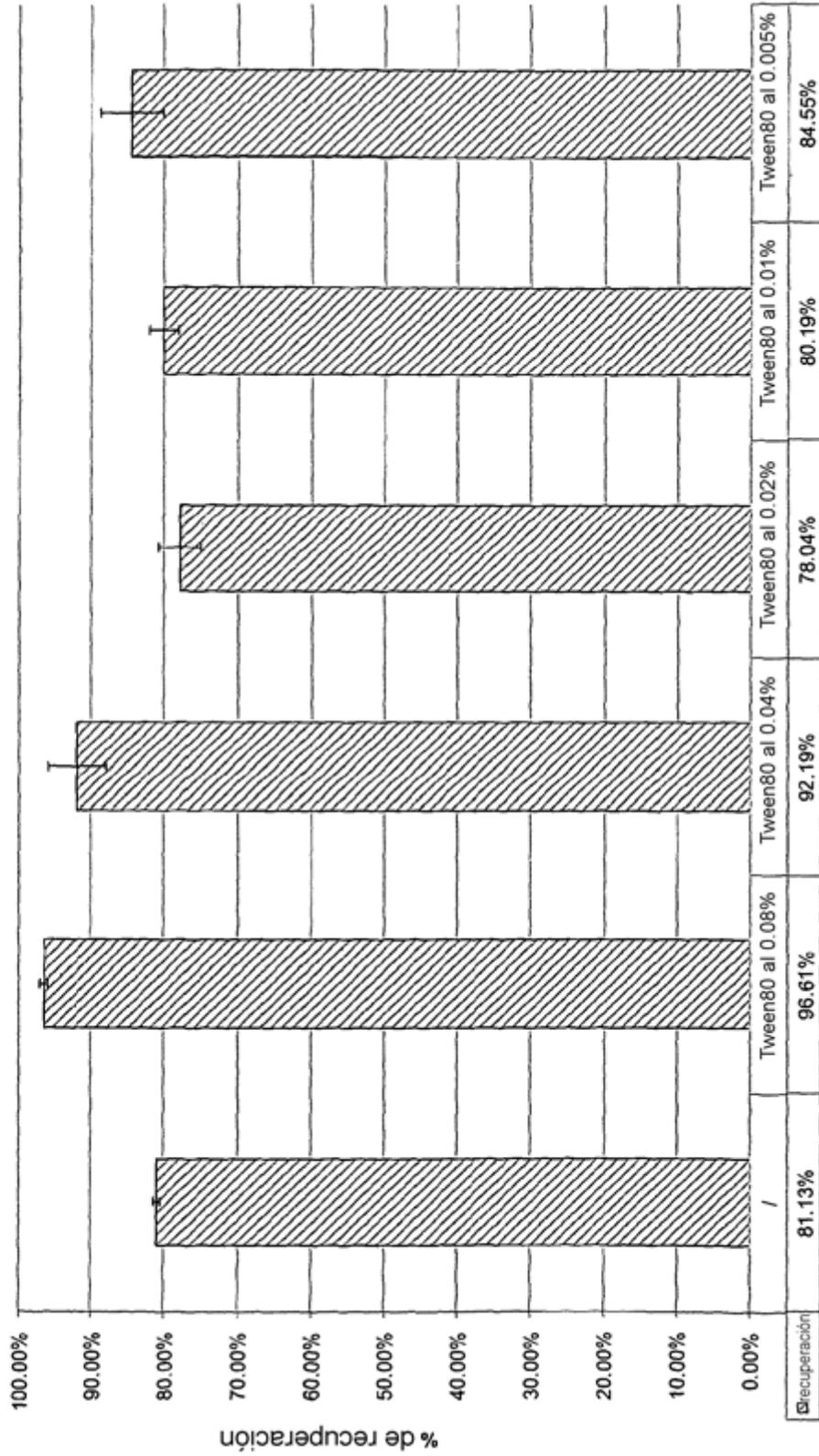


Figura 6

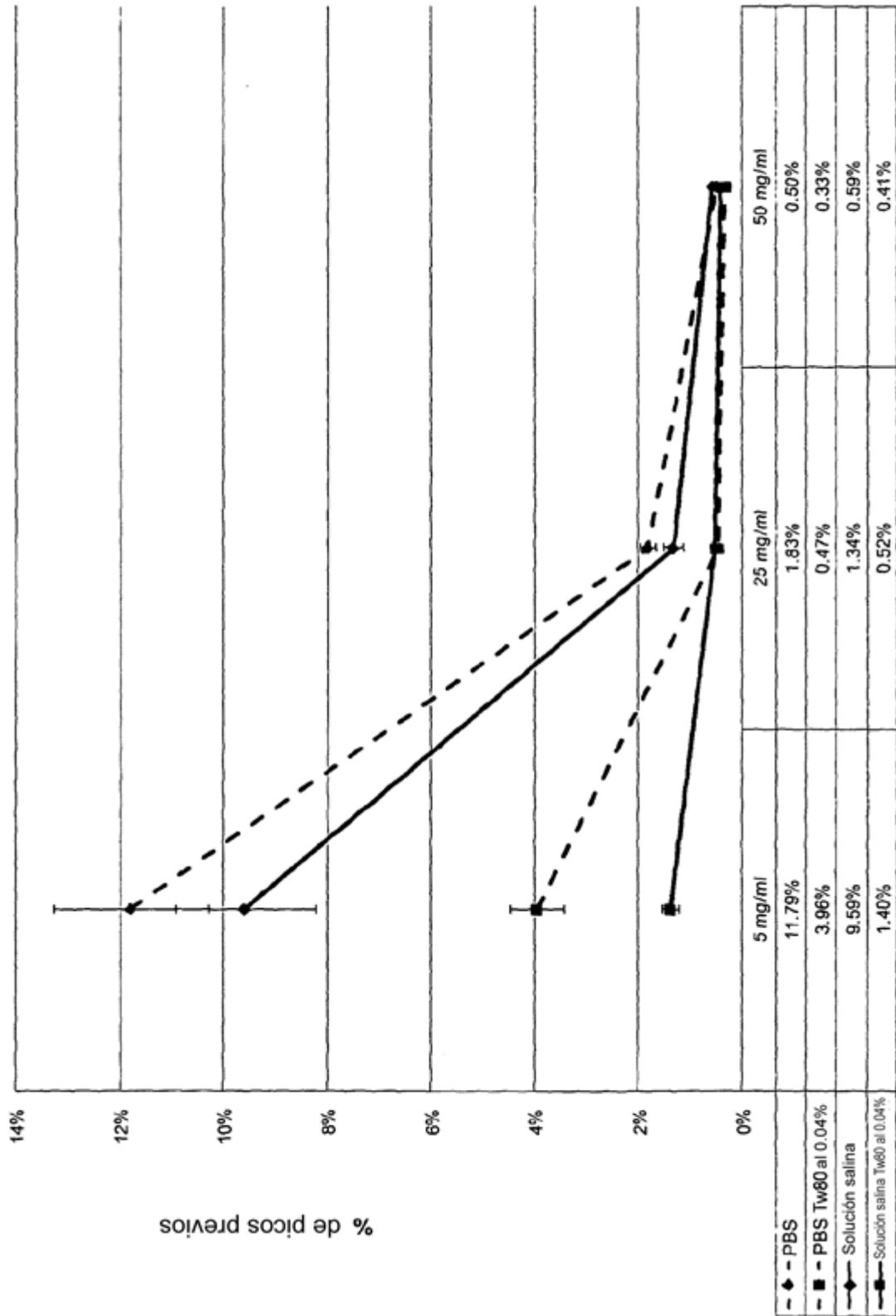
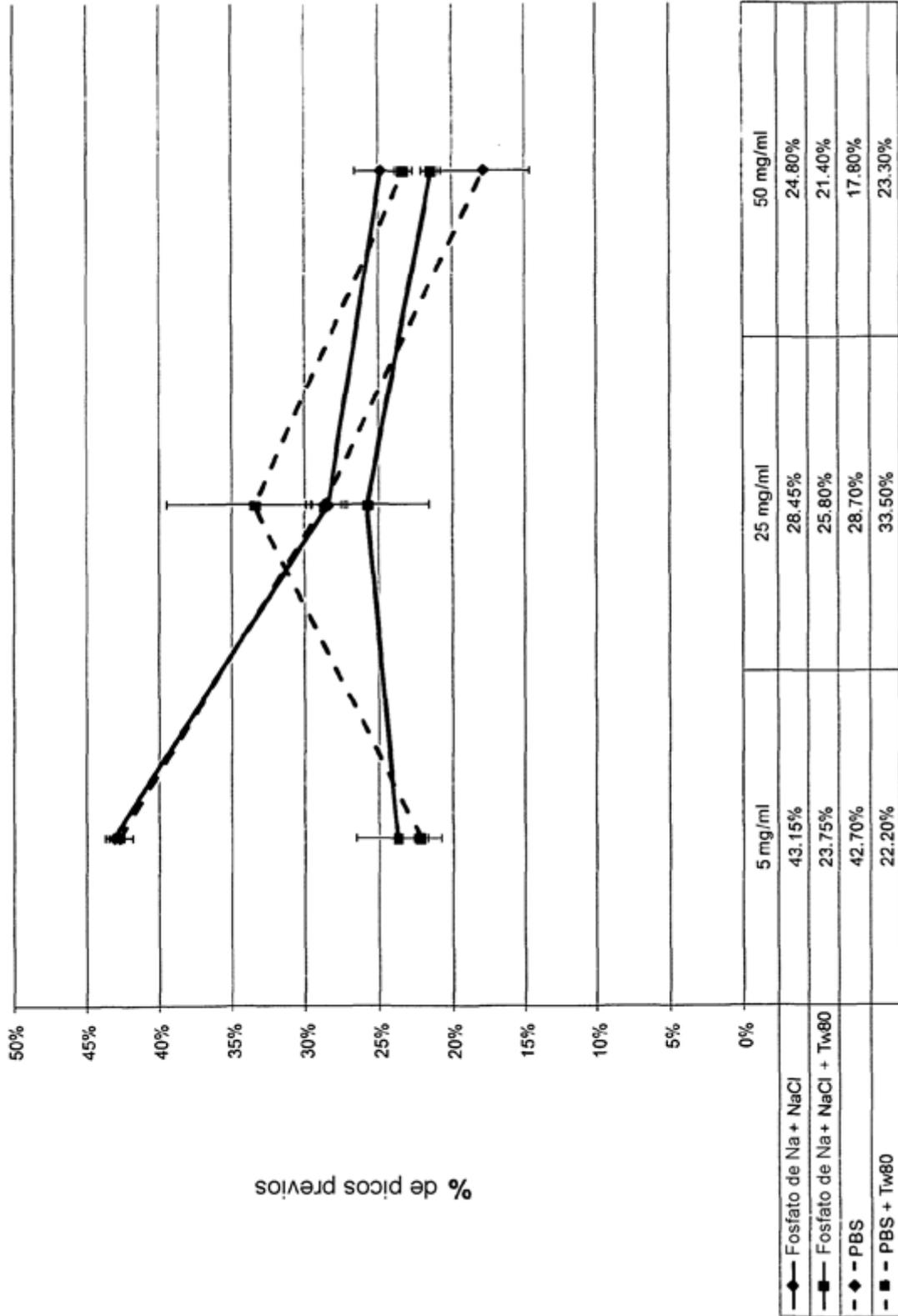


Figura 7



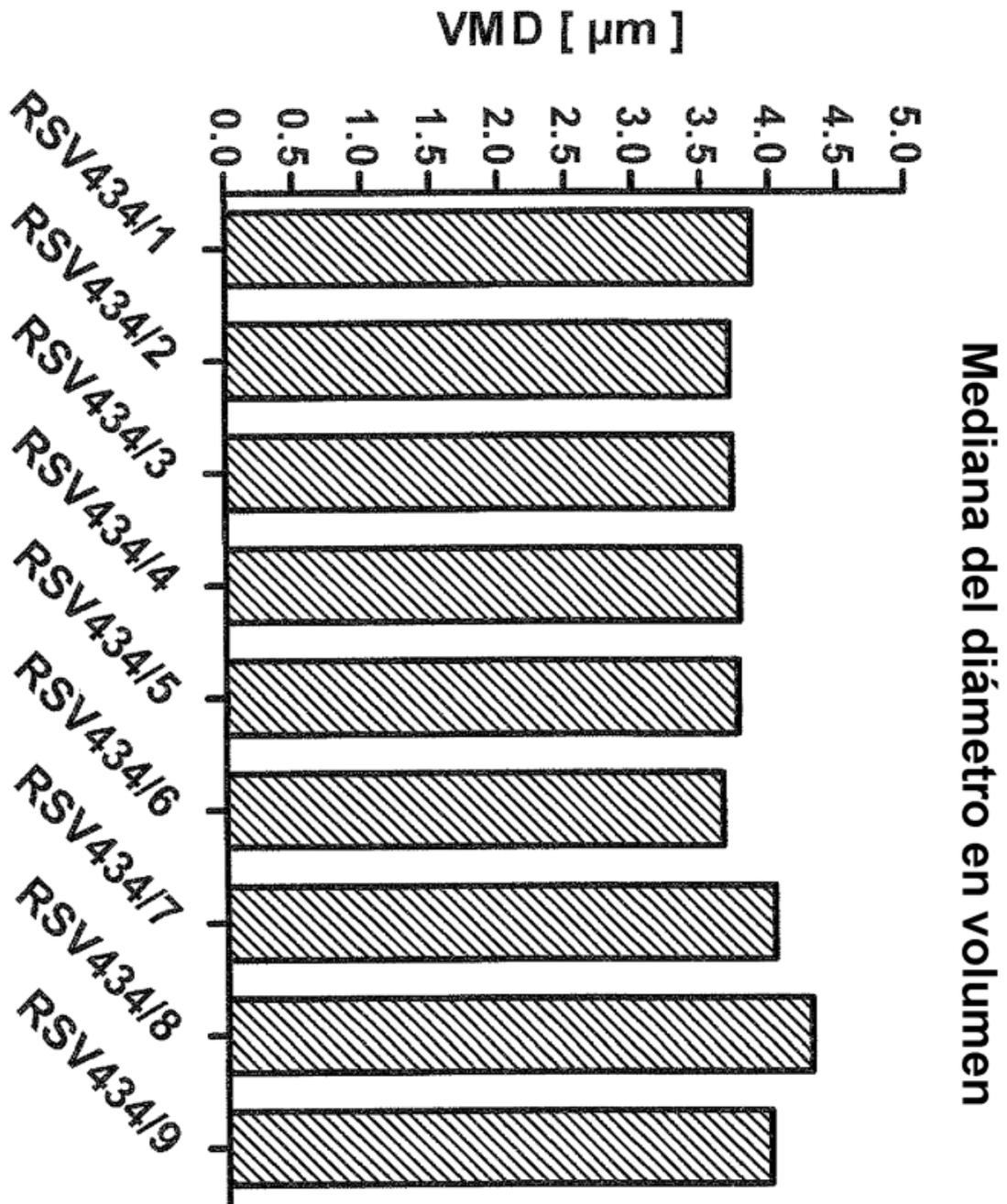


Figura 8

Figura 9

