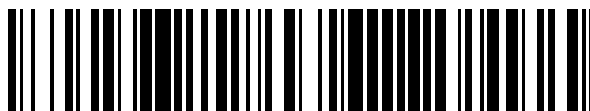


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 687**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 47/44 (2007.01)
A61K 9/14 (2006.01)
A61K 9/19 (2006.01)
A61K 47/42 (2007.01)
A61K 9/10 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61K 38/38 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.09.2011** **PCT/US2011/054257**
87 Fecha y número de publicación internacional: **13.09.2012** **WO12121754**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2011** **E 11860324 (0)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2019** **EP 2683403**

54 Título: **Formulaciones de anticuerpos de suspensiones con viscosidad reducida de alta concentración no acuosas**

30 Prioridad:

09.03.2011 US 201113043925

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.02.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

DAI, WEIGUO;
HILL, BETH;
LIU, KUI y
MIECZKOWSKI, CARL

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 743 687 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

Formulaciones de anticuerpos de suspensiones con viscosidad reducida de alta concentración no acuosas

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a formulaciones de suspensiones con viscosidad reducida de alta concentración no acuosas y a métodos para elaborarlas y usarlas.

10 **Antecedentes de la invención**

Los anticuerpos monoclonales (mAb) se han convertido en importantes agentes terapéuticos basados en proteínas para tratar varias enfermedades humanas como el cáncer, enfermedades infecciosas, inflamación, y enfermedades autoinmunes. Actualmente, más de 20 productos de anticuerpos monoclonales han sido aprobados por la Food and Drug Administration, y aproximadamente el 20% de todos los productos biofarmacéuticos que se están evaluando actualmente en ensayos clínicos son anticuerpos monoclonales (Daugherty et al., Adv. Drug Deliv. Rev. 58:686-706, 2006).

Los anticuerpos pueden administrarse, por ejemplo, por vía parenteral, como inyección intravenosa (IV), subcutánea (SC) o intramuscular (IM). La vía SC o IM reduce el coste del tratamiento y mejora la conveniencia para los pacientes y los proveedores de atención médica durante la administración. Para ser eficaces y farmacéuticamente aceptables, las formulaciones parenterales deben ser preferiblemente estériles, estables, poderse preparar en jeringuillas, inyectables, y no irritantes. Estas características dan como resultado requisitos de fabricación, almacenamiento y uso que hacen que las formulaciones inyectables dificulten el desarrollo de formas de dosificación, en particular formulaciones que tienen altas concentraciones de proteínas.

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

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

Los productos de anticuerpos monoclonales comerciales actuales administrados por vía SC o IM se formulan habitualmente en tampones acuosos como tampón fosfato o de L-histidina, con excipientes o surfactantes como manitol, sacarosa o polisorbato 80 para prevenir la agregación y mejorar la estabilidad. Las concentraciones de anticuerpos informadas son de hasta 100 mg/ml en formulaciones acuosas (Wang et al., J. Pharm. Sci. 96:1-26, 2007). La viscosidad de las formulaciones acuosas se ha reducido mediante la adición de sales (Patente de Estados Unidos N° 7.666.413) o ácidos orgánicos o inorgánicos (Patente de Estados Unidos N° 7.740.842).

La US2006/141040 describe una suspensión no acuosa inyectable. La WO2011/112669 describe formulaciones de suspensiones con viscosidad reducida de alta concentración no acuosas.

Se han descrito formulaciones de anticuerpos o proteínas no acuosas. La WO2006/071693 describe una suspensión no acuosa de hasta 100 mg/ml de anticuerpo monoclonal en una formulación que tiene un potenciador de la viscosidad (polivinilpirrolidona, PVP) y un solvente (benzoato de bencilo (BB) o PEG400). La WO2004/089335 describe aproximadamente 100 mg/ml de formulaciones de suspensión de lisozima no acuosas que contienen PVP, glicofurol (GF), BB, alcohol bencílico (BA) o PEG400. La US2008/0226689A1 describe una formulación viscosa no acuosa de componente con tres vehículos (polímero, surfactante y un solvente) de única fase de hormona de crecimiento humana (hGH) de 100 mg/ml. La Patente de Estados Unidos N° 6.730.328 describe vehículos no acuosos, hidrófobos, no polares de baja reactividad (como perfluorodecalina) para formulaciones de proteínas. Estas formulaciones no son óptimas teniendo, por ejemplo, alta viscosidad que perjudica el procesamiento, la fabricación y la inyección, la presencia de múltiples componentes de vehículo en las formulaciones, y los posibles desafíos regulatorios asociados con el uso de polímeros aún no aprobados.

Por tanto, hay una necesidad de desarrollar formulaciones no acuosas mejoradas de alta concentración.

Breve descripción de los dibujos

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

Figura 2. La fuerza de inyección (N) de las formulaciones disminuye con cantidades crecientes de agente reductor de la viscosidad en una formulación. A. BSA; B. formulaciones de mAb anti-TNF α .

Figura 3. La fuerza de inyección y la viscosidad aumentan con concentración de mAb anti-TNF α A. y B. y BSA C. creciente en las formulaciones.

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

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

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

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

Figura 8. Estabilidad de CNT0148 A) formulaciones de suspensiones secadas por pulverización y de 100 mg/ml y B) formulaciones de suspensión de 100 mg/ml y 200 mg/ml a 25° C medidas por SE-HPLC. Nt = suspensión no tratada con óxido de aluminio. Form-1, Form-5 y Form-7 son formulaciones secadas por pulverización del experimento SD_1 en la Tabla 7. SO/EO = EO/SO/50/50.

Figura 9. Estabilidad de CNT0148 A) formulaciones de suspensiones secadas por pulverización y de 100 mg/ml y B) formulaciones de suspensión de 100 mg/ml y 200 mg/ml a 40° C medida por SE-HPLC. Nt = suspensión no tratada con óxido de aluminio. Form-1, Form-5 y Form-7 son formulaciones secadas por pulverización del experimento SD_1 en la Tabla 7. SO/EO = EO/SO/50/50. SD = secado por pulverización.

Figura 10. % de bioactividad de la formulación Form-1 secada por pulverización CNT0148 del experimento SD_1 en la Tabla 7 y formulaciones de suspensión de 100 mg/ml de Form-1. SD = secado por pulverización. SO/EO = EO/SO/50/50.

Figura 11. La exploración de UV CD lejana de la formulación Form 1 secad por pulverización CNT0148 del experimento SD_1 en la Tabla 7 y las formulaciones de suspensión de 100 mg/ml de Form-1 recogidas a 25° C. SD = secado por pulverización. SO/EO = EO/SO/50/50.

Figura 12. A) Secuencias de la región variable de la cadena pesada de los anticuerpos anti-TNF α TVN14 (SEQ ID NO: 1), TVN15 (SEQ ID NO: 2), TVN148 (SEQ ID NO: 3), TVN148B (SEQ ID NO: 4) y TVN196 (SEQ ID NO: 5) y B) secuencias de la región variable de la cadena ligera de los anticuerpos anti-TNF α TVN14 (SEQ ID NO: 6), TVN15 (SEQ ID NO: 6), TVN148 (SEQ ID NO: 7), TVN148B (SEQ ID NO: 7), y TVN196 (SEQ ID NO: 7).

Sumario de la invención

La invención proporciona una formulación de suspensión de alta concentración no acuosa, que comprende:

un vehículo, que comprende un agente hidrófobo y un agente reductor de la viscosidad, en donde el agente hidrófobo es aceite de sésamo y el agente reductor de la viscosidad es oleato de etilo; y

un anticuerpo formulado con un excipiente, en donde el anticuerpo es un anticuerpo anti-TNF α que comprende una región variable de la cadena ligera (VL) de la SEQ ID NO: 6 y una región variable de la cadena pesada (VH) de las SEQ ID NO: 1 o 2, o una VL de la SEQ ID NO: 7 y una VH de las SEQ ID NO: 3, 4 o 5.

La invención proporciona además un método para reducir una fuerza de inyección a aproximadamente 45 Newton (N) o menos de una formulación que contiene ≥ 50 mg/ml de anticuerpo anti-TNF α en un vehículo que comprende un agente hidrófobo, que comprende:

añadir por lo menos el 28% en volumen de un agente reductor de la viscosidad en el vehículo que comprende un agente hidrófobo; o

utilizar partículas de proteína con un tamaño de partícula de entre aproximadamente 2 μ m y 13 μ m para preparar la formulación,

en donde la fuerza de inyección se mide usando una jeringuilla de vidrio con protector de aguja rígido de 1 ml con un diámetro interior de 0,25 pulgadas, equipada con una aguja de calibre de 0,5 pulgadas 26½ a una velocidad de inyección de 250 mm/min,

en donde el anticuerpo anti-TNF α tiene una región variable de la cadena ligera (VL) de la SEQ ID NO: 6 y una región variable de la cadena pesada (VH) de las SEQ ID NO: 1 o 2, o una VL de la SEQ ID NO: 7 y una VH de las SEQ ID NO: 3, 4 o 5, y

en donde el agente hidrófobo es aceite de sésamo y el agente reductor de la viscosidad es oleato de

etilo.

La invención proporciona además un método para elaborar una formulación de suspensión de alta concentración no acuosa de un anticuerpo anti-TNF α que tiene una región variable de la cadena ligera (VL) de la SEQ ID NO: 6 y una región variable de la cadena pesada (VH) de las SEQ ID NO: 1 o 2, o una VL de la SEQ ID NO: 7 y una VH de las SEQ ID NO: 3, 4 o 5, que comprende proporcionar el anticuerpo anti-TNF α ; proporcionar un agente hidrófobo; proporcionar un agente reductor de la viscosidad; mezclar el agente hidrófobo y el agente reductor de la viscosidad para formar un vehículo; y añadir el anticuerpo anti-TNF α en el vehículo formado en el paso d a una concentración igual o mayor que 50 mg/ml, y en donde el agente hidrófobo es aceite de sésamo y el agente reductor de la viscosidad es oleato de etilo.

En la presente se divulga una formulación de suspensión de alta concentración no acuosa, que comprende un vehículo, que comprende un agente hidrófobo y un agente reductor de la viscosidad; y una molécula bioactiva.

También se divulga en la presente una formulación de suspensión de alta concentración no acuosa, que comprende un vehículo que comprende aceite de sésamo y oleato de etilo; y una molécula bioactiva.

También se divulga en la presente un método para reducir una fuerza de inyección a aproximadamente 45 Newtons (N) o menos de una formulación que contiene ≥ 50 mg/ml de una proteína en un vehículo que comprende un agente hidrófobo, que comprende: añadir por lo menos el 28% en volumen de un agente reductor de la viscosidad en el vehículo que comprende un agente hidrófobo; o utilizar partículas de proteína con un tamaño de partícula de entre aproximadamente 2 μ m - 13 μ m para preparar la formulación, en donde la fuerza de inyección se mide usando una jeringuilla de vidrio con protector de aguja rígido de 1 ml con un diámetro interior de 0,25 pulgadas, equipada con una aguja de calibre 0,5 pulgadas 26½ a una velocidad de inyección 250 mm/min.

También se divulga en la presente un método para preparar una formulación de suspensión de alta concentración no acuosa de una molécula bioactiva, que comprende proporcionar una molécula bioactiva; proporcionar un agente hidrófobo; proporcionando un agente reductor de la viscosidad; mezclar el agente hidrófobo y el agente reductor de la viscosidad para formar un vehículo; y añadir la molécula bioactiva en el vehículo formado.

Descripción detallada de la invención

Debe entenderse que la terminología usada en la presente tiene el propósito de describir solo realizaciones particulares y no pretende ser limitativa. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que el entendido comúnmente un experto en la técnica a la que se refiere la invención.

Aunque puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente en la puesta en práctica para probar la presente invención, en la presente se describen materiales y métodos ejemplares. Al describir y reivindicar la presente invención, se usará la siguiente terminología.

"Un agente hidrófobo", como se usa en la presente, se refiere a un material que tiene un valor de equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) de 0-13. Los agentes hidrófobos ejemplares son aceites vegetales, ácidos grasos que tienen 8-24 carbonos, cera, polímeros biodegradables y materiales anfífilos. Los aceites vegetales ejemplares son aceite de almendra, aceite de anís, aceite de semilla de albaricoque, aceite de arachis, aceite de argán, aceite de aguacate, aceite de borraja, aceite de cajuput, aceite de canola, aceite de alcaravea, aceite de cassia, aceite de ricino, aceite de canela, aceite de citronela, aceite de clavo, aceite de coco, aceite de cilantro, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de eucalipto, aceite de onagra, aceite de hinojo, aceite de geranio, aceite de semilla de uva, aceite de avellana, aceite de cáñamo, aceite de jojoba, aceite de enebro, aceite de lavanda, aceite de limón, aceite de macadamia, aceite de macis, aceite de melaleuca, aceite de neem, aceite de neroli, aceite de niaouli, aceite de nuez moscada, aceite de oliva, aceite de naranja, aceite de palma, aceite de almendra de palma, aceite de pino, aceite de semilla de amapola, aceite de pulegio, aceite de semilla de calabaza, aceite de colza, aceite de salvado de arroz, aceite de rosa mosqueta, aceite de romero, aceite de ruda, aceite de cártamo, aceite de sésamo (SO), aceite de menta, aceite de soja, aceite de girasol, aceite de tomillo, aceite de nuez o aceite de germen de trigo. Los ácidos grasos ejemplares son ácido caprílico, ácido cáprico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido araquídico, ácido linoleico, ácido miristoleico, ácido palmitoleico, ácido sapiénico, ácido oleico, ácido α -linolénico, ácido araquidónico, ácido eicosapentaenoico, ácido erúcico, ácido docosahexaenoico, ácido eicosapentaenoico, ácido docosahexaenoico, ácido docosapentaenoico y glicérido (monoglicérido; diglicérido; triglicérido) con diferentes longitudes de cadena. Los polímeros biodegradables ejemplares son ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA), poli ϵ -caprolactona (PCL), poliortoésteres, polihidroxibutirato (PHB), polidioxanona, polianhídridos, carbonato de politrimetileno, y polifosfazenos. Los materiales anfífilos ejemplares son un aceite de ricino polietoxilado o un derivado del mismo (referido

colectivamente como "aceite de ricino polietoxilado"), un alquil éter de polioxietileno, un éster de ácido de polioxietileno sorbitano, un estearato de polioxietileno, un copolímero de bloque de óxido de polietileno ("PEO")-óxido de polipropileno ("PPO")-PEO, un copolímero de bloque de PPO-PEO-PPO, un copolímero de bloque tetra-funcional de PEO-PPO, como (PEO-PPO)₂-(PPO-PEO)₂, o un copolímero de bloque tetra-funcional de PPO-PEO, como (PPO-PEO)₂-(PEO-PPO)₂. Los agentes hidrófobos ejemplares y sus características se muestran en la Tabla 1. Las viscosidades se miden a 25°C a menos que se indique entre paréntesis.

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

Tabla 1.

Nombre genérico	Viscosidad (cP)		Vía de administración
	Literatura	Medido	
Glicéridos de caprilcaproilo polioxil-8	89		oral
Aceite de ricino, etoxilado	722		IV
Aceite de maíz		44.9	EN
Aceite de algodón		47.7	EN
Monooleato de glicerilo	30-40		tópica, oral, transdérmica
Triglicéridos de cadena media	30	27.12 (20°C), 22.64	IV, oral, tópica
Oleictriglicéridos de polioxietileno	80		
Dicaprilcaprato de propilenglicol	12	11.16 (20°C), 9.66	tópica
Monocaprilato de propilenglicol	20	14.49 (20°C), 12.05	
Monolaurato de propilenglicol	25	26.80 (20°C), 21.91	transdérmica
Aceite de sésamo		51.3	IM, SC, oral
Simeticona	400	482.63 (20°C), 448.37	IM, IV
Aceite vegetal fino	25.4	22.7	oral, tópica

La "tasa de cizallamiento", como se usa en la presente, significa la velocidad con la que se deforma un material. Para los fluidos newtonianos clásicos, la viscosidad no depende de la tasa de cizallamiento. Para fluidos no newtonianos, la viscosidad disminuye o aumenta con el aumento de la tasa de cizallamiento, por ejemplo, los fluidos son "adelgazamiento por cizalladura" o "engrosamiento por cizalladura", respectivamente.

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

La "inyectabilidad", como se usa en la presente, se refiere al rendimiento de la inyección de la formulación de suspensión de alta concentración no acuosa a través de una jeringuilla equipada con una aguja de calibre durante la inyección. La inyectabilidad incluye factores como la presión o la fuerza requerida para la inyección, la uniformidad del flujo, las cualidades de aspiración, y la ausencia de obstrucciones. La inyectabilidad de las formulaciones de la invención se evalúa comparando la fuerza de inyección de una formulación que contiene un agente reductor de la viscosidad con la misma formulación pero que carece del agente reductor de la viscosidad. La reducción en la fuerza de inyección de la formulación que contiene el agente reductor de la viscosidad refleja una inyectabilidad mejorada de esa formulación. La formulación que contiene un agente reductor de la viscosidad tiene una inyectabilidad mejorada cuando la fuerza de inyección se reduce en por lo menos un 10%, por ejemplo un 10%,

15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 99% cuando se compara con la misma formulación pero que carece del agente reductor de la viscosidad.

"Un agente reductor de la viscosidad" como se usa en la presente se refiere a un agente que, cuando está presente en un vehículo o formulación, reduce la viscosidad o la fuerza de inyección del vehículo o formulación en comparación con la viscosidad o fuerza de inyección de un vehículo o formulación que carece del agente reductor de la viscosidad. La cantidad de agente reductor de la viscosidad presente en los vehículos o formulaciones de viscosidad reducida de la invención puede variar de aproximadamente el 0,2% al 99,9% por volumen del agente reductor de la viscosidad en el agente hidrófobo, por ejemplo, 1%, 5%, 10%, 15 %, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%. En algunos casos, el vehículo puede consistir en un 100% de un agente reductor de la viscosidad. El agente reductor de la viscosidad puede reducir la viscosidad o la fuerza de inyección de un vehículo o una formulación en por lo menos un 10%, por ejemplo, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, o el 90%. Los agentes reductores de la viscosidad ejemplares son dietil sebacato, dietilenglicol monoetil éter, alcohol etílico, oleato de etilo (OE), alcohol isopropílico (IPA), miristato de isopropilo, ácido linoleico, ácido propiónico, citrato de trietilo, propilenglicol, etanol, propanol, isopropanol, polietilenglicol, polipropilenoéteres, fluorocarbono (halotano, metoxiflurano, enflurano, isoflurano, sevoflurano y desflurano, etc.), cetona fluorada, perfluorodecalina, perfluoroacrilato, perfluorometacrilato, alcohol bencílico, alcohol laurílico, perfluorodecalina, N-metil-2-pirrolidona, glicofuroil, polietilenglicol (PEG), alquil cetona, éster alquílico inferior de ácido cítrico, benzoato de bencilo, benzoato de metilo, benzoato de etilo, benzoato de n-propilo, benzoato de isopropilo, benzoato de butilo, benzoato de isobutilo, benzoato de sec-butilo, benzoato de terc-butilo y benzoato de isoamilo. Las características de los agentes reductores de la viscosidad ejemplares se muestran en la Tabla 2.

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

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

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

El término "formulación estable" o "estable" como se usa en la presente significa que por lo menos aproximadamente el 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de la molécula bioactiva físicamente estable permanece en una formulación después de 18 meses de almacenamiento a +4° C o condiciones equivalentes a una temperatura elevada, como un almacenamiento de 1 mes a +40° C. Una formulación estable ejemplar es una formulación EO/SO/50/50 de mAb anti-TNF α al 30% que retiene por lo menos el 98% del anticuerpo en forma de monómero después de un mes de almacenamiento a +40° C.

Tabla 2.

Nombre genérico	Viscosidad (cP)		Vía de administración
	Literatura	Medido	
Sebacato de dietilo	3.9	5.59	tópica
Dietilenglicol monoetil éter	20	4.89	IV, tópica, transdérmica
Alcohol etílico (EtOH)	1.2	1.48	IV, IM, SC
Oleato de etilo (EO)	5.9	5.96	transdérmica, IM
Alcohol isopropílico (IPA)	2.43	2.35	IV, oral, transdérmica
Miristato de isopropilo	7	5.1	tópica
Ácido linoleico		18.67	
Ácido propiónico	1	1.65	
Citrato de trietilo		25.65	oral

El término "molécula bioactiva" incluye proteínas, anticuerpos, péptidos, nucleótidos y similares. En este término se incluyen las fracciones producidas sintéticamente, derivadas naturalmente o producidas de manera recombinante. Las moléculas bioactivas pueden ser análogos, derivados, agonistas, antagonistas o sales farmacéuticamente aceptables de moléculas bioactivas.

El término "proteína" significa una molécula que comprende por lo menos dos residuos de aminoácidos unidos por un enlace peptídico para formar un polipéptido. Las proteínas pequeñas de menos de 50 aminoácidos pueden ser referidas como "péptidos". Las proteínas también pueden ser referidas como "polipéptidos".

El término "anticuerpo" incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de los mismos. Los fragmentos de anticuerpo comprenden por lo menos una parte de una molécula de inmunoglobulina, como una región determinante de la complementariedad (CDR), una región variable (V), una región constante (C) o una región marco (FR) de cadena pesada o ligera de anticuerpo. Las inmunoglobulinas pueden asignarse a cinco clases principales, concretamente, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio C de la cadena pesada. Las IgA e IgG se subclasifican adicionalmente como los isotipos, IgA₁, IgA₂, IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄. Las cadenas ligeras de anticuerpos de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, concretamente kappa (κ) y lambda (λ), en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

Un anticuerpo puede ser un Fab, F(ab'), F(ab')₂, scFv, dsFv o diacuerpo. Un anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal (mAb), anticuerpo quimérico, humanizado o humano, dimérico, tetramérico o multimérico. Las estructuras de los fragmentos de anticuerpos mencionados anteriormente, y las técnicas para la preparación y uso de los anticuerpos y fragmentos de los mismos son bien conocidas en la técnica (Ausubel, et al., Ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY 1987-2001; Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Edición, Cold Spring Harbor, NY, 1989; Harlow and Lane, Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY, 1989; Colligan, et al., ed., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY 1994-2001; Colligan et al., Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, 1997-2001; Kohler et al., Nature, 256:495-7, 1975; Queen et al., Proc Natl Acad Sci USA, 86:10029-33, 1989; Patente de Estados Unidos N° 4.816.567).

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

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

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

"Tamaño de partícula", como se usa en la presente, significa el diámetro medio (D50) de los particulados de la molécula bioactiva en una formulación determinado usando instrumentos de dimensionamiento de partículas bien conocidos, por ejemplo, analizador de tamaño de partícula por difracción láser.

Esta invención describe formulaciones de suspensiones de viscosidad reducida de alta concentración no acuosas que pueden usarse para la administración de moléculas bioactivas como anticuerpos por vía parenteral. Las formulaciones con características de alta viscosidad a alta concentración de proteínas pueden dificultar la inyección de la dosis requerida en un paciente desde la jeringuilla. Las formulaciones de la invención tienen una inyectabilidad mejorada como se mide por la fuerza de inyección de las formulaciones, a la vez que mantienen una alta concentración de molécula bioactiva que proporcionará la dosis requerida para lograr una eficacia terapéutica aceptable.

Las formulaciones de la invención tienen fuerzas de inyección iguales o inferiores a 45 Newton (N), una fuerza máxima que la mayoría de los profesionales de la salud y los pacientes sin discapacidad de la mano son capaces de ejercer sobre una jeringuilla usando la inyección manual. El nivel de fuerza de inyección aceptable depende de la aplicación del fármaco específica y de los dispositivos de administración usados en los productos. Algunos dispositivos son capaces de generar una fuerza de inyección mayor que otros.

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

En la presente se divulga una formulación de suspensión de alta concentración no acuosa, que comprende:

a. un vehículo, que comprende un agente hidrófobo y un agente reductor de la viscosidad; y

b. una molécula bioactiva.

El vehículo puede elaborarse combinando un agente hidrófobo y un agente reductor de la viscosidad en forma líquida, y la mezcla se calienta para formar un material monofásico. Pueden usarse métodos estándar, como la calorimetría de barrido diferencial, para verificar que los componentes incluidos en el vehículo se hayan combinado de manera que se haya formado un material monofásico. Los agentes hidrófobos y reductores de la viscosidad ejemplares se han descrito anteriormente. Los vehículos ejemplares a base de aceite de sésamo se muestran en la Tabla 4. El aceite de sésamo puede reemplazarse con otros agentes hidrófobos ejemplares siempre que el agente reductor de la viscosidad sea miscible con el agente hidrófobo elegido.

Puede usarse cualquier método de formación de partículas adecuado para proporcionar la molécula bioactiva particulada incluida en las formulaciones. Los métodos bien conocidos ejemplares incluyen secado por pulverización, secado por pulverización-por congelación, liofilización, desecación, granulación, trituración, molienda, precipitación, tecnología de fluidos supercríticos o procesos de homogeneización. Las partículas preparadas por estos métodos triturarse aún más en un mezclador Waring y pasar a través de una serie de tamices con tamaños de malla determinados. El tamaño de las partículas resultantes de moléculas bioactivas puede ser, por ejemplo, entre 0,2-250 μm , 0,2-100 μm , 0,2-50 μm , 0,2-20 μm , o 2-13 μm . El tamaño de partícula puede expresarse como un diámetro medio (D50) de los particulados de moléculas bioactivas en una formulación determinada usando instrumentos de dimensionamiento de partículas bien conocidos, por ejemplo el analizador de tamaño de partícula por difracción laser (Malvern Mastersizer 2000, Malvern), o como un diámetro de la malla del tamiz a través del cual no pasan las partículas.

La molécula bioactiva puede proporcionarse en forma pura o puede formularse con excipientes que no interfieran con la eficacia terapéutica de la molécula bioactiva. Por ejemplo, puede ser deseable usar excipientes para mitigar la agregación y la oxidación de la molécula bioactiva en las formulaciones no acuosas, para mejorar la transición de la molécula bioactiva del vehículo no acuoso a un entorno de uso, o para mejorar la capacidad de formación de la molécula bioactiva en partículas. Tales excipientes son, por ejemplo, carbohidratos, surfactantes no iónicos, tampones, sales, antioxidantes y/o aminoácidos, conservantes y similares.

La molécula bioactiva puede formularse, por ejemplo, con un carbohidrato, un surfactante no iónico, y un tampón como excipientes. Los carbohidratos ejemplares son sacarosa, trehalosa, manitol, dextrano y sorbitol. Los surfactantes no iónicos ejemplares son polisorbato 20 (PS-20), polisorbato 80 (PS-80), Triton X-100, Brij-35, Brij-30 y Pluronic F127. La molécula bioactiva puede formularse en un tampón con un pH deseable antes de que se formen las partículas de proteína para prevenir la oxidación, desamidación, hidrólisis, desnaturalización o agregación y mantener la actividad biológica de la molécula bioactiva durante el proceso de formulación y almacenamiento. Los tampones ejemplares son acetato, citrato, formiato, histidina, succinato, fosfato, carbonato, malato, HEPPO, HEPES, borato, glicina, ácido aspártico, prolina y tampones Tris.

Los excipientes adicionales en una formulación pueden incluir un aminoácido. Los aminoácidos ejemplares son histidina, isoleucina, metionina, glicina, arginina, lisina, L-leucina, Tri-leucina, alanina, ácido glutámico, L-treonina y 2-fenilamina.

Los excipientes adicionales pueden incluir sales. Las sales ejemplares son cloruro de sodio, cloruro de calcio y cloruro de magnesio.

Los excipientes adicionales pueden incluir polímeros. Los polímeros ejemplares son polivinilpirrolidona (PVP), dextrano y polietilenglicoles.

Las cantidades de excipientes en la formulación pueden determinarse experimentalmente en base a las actividades de los excipientes y las características deseadas de la formulación, como la estabilidad, la oxidación mínima, y la capacidad de formación de partículas durante el secado por pulverización.

La molécula bioactiva y el excipiente pueden disolverse en una solución, que por ejemplo se liofiliza, se seca por pulverización o se seca por pulverización-congelación para producir partículas de la molécula bioactiva.

Una molécula bioactiva ejemplar es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo. Un anticuerpo ejemplar es un anticuerpo contra el factor de necrosis tumoral α (TNF α) como TNV14, TNV15, TNV148, TNV148B y TNV196 mostrado en la Figura 12 que comprende las secuencias de la región variable de la cadena pesada que se muestran en las SEQ ID NO: 1 (TNV14), 2 (TNV15), 3 (TNV148), 4 (TNV148B) y 5 (TNV196), y las secuencias de la región variable de la cadena ligera que se muestran en la SEQ ID NO: 6 (TNV14 y TNV15), y 7 (TNV148, TNV148B y TNV196). La TNV148B también se denomina CNT0148. Otro anticuerpo anti-TNF α ejemplar es la marca HUMIRA® de anticuerpo anti-TNF α humano (adalimumab), descrito en la Patente de Estados Unidos N° 6.258.652; Número de registro CAS 331731-18-1). Las regiones variables del anticuerpo anti-TNF α pueden acoplarse a cualquier región constante, por ejemplo, una región constante de tipo IgG1 y κ , respectivamente. Una región constante de IgG1 ejemplar se muestra en la SEQ ID NO: 8 y una región constante de κ ejemplar en la SEQ ID NO:

9.

Las formulaciones ejemplares de moléculas bioactivas, por ejemplo, anticuerpos contra el factor de necrosis tumoral α (TNF α), pueden incluir uno o más de los siguientes excipientes: carbohidrato a una proporción de carbohidrato: proteína entre 0-3, 0,5-3, 1-3, o 1-2; aminoácido a una proporción aproximada de aminoácido:proteína entre 0-2 o 0,3-1,8; aminoácido a una proporción aproximada en donde la proporción del peso combinado de carbohidrato y aminoácido con la proteína es de aproximadamente 0-3, 0,5-3, 1-3 o 1-2; aproximadamente 0-40 mM, 5-40 mM, 5-20 mM o 5-10 mM de tampón de histidina; aproximadamente 0-20 mM, 5-20 mM o 5-10 mM de tampón de citrato; donde las proporciones de excipiente: proteína se indican como una proporción p/p, y aproximadamente 0-0,1% (% p/v), 0,01-0,1% (% p/v) o 0,01-0,05% de PS-80 (% p/v). El pH puede ajustarse a aproximadamente 5,5. Las formulaciones de anticuerpos anti-TNF α ejemplares son formulaciones secadas por pulverización de CNTO148 que contienen 32,5 mg/ml de CNTO148, histidina 10 mM, 55 mg/ml de sacarosa, 10 mg/ml de isoleucina, 0,01% de PS-80, pH 5,5; 32,5 mg/ml de CNTO148, histidina 10 mM, 65 mg/ml de sacarosa, 0,01% de PS-80, pH 5,5; 32,5 mg/ml de CNTO148, histidina 5 mM/citrato 5 mM, 65 mg/ml de sacarosa, PS-80 al 0,01%, pH 5,5; 32,5 mg/ml de CNTO148, histidina 10 mM, 5 mg/ml de sacarosa, 22,5 mg/ml de manitol, 0,01% de PS-80, pH 5,5; o 32,5 mg/ml de CNTO148, histidina 10 mM, 55 mg/ml de trehalosa, 10 mg/ml de isoleucina, 0,01% de PS-80, pH 5,5; o 65 mg/ml de CNTO148, histidina 10 mM, 55 mg/ml de sacarosa, 0,01% de PS-80, pH 5,5. La concentración de PS-80 se indica como % p/v en toda la solicitud. Las técnicas de secado por pulverización son conocidas por los expertos en la técnica. Una técnica ejemplar se describe en el Ejemplo 2 a continuación.

Para crear una formulación de suspensión de una molécula bioactiva, el material particulado seco de una molécula bioactiva en estado sólido (por ejemplo, en polvo, cristalino o amorfo) con o sin excipientes se dispersa agitando dentro de un vehículo. La cantidad de molécula bioactiva particulada incluida en la formulación puede variar dependiendo, por ejemplo, de la potencia de la molécula bioactiva y de la vía de administración. Por ejemplo, la molécula bioactiva puede representar entre aproximadamente el 0,1% y el 70% (% p/p) de una formulación, y el vehículo representar entre aproximadamente el 30% y el 99,9% (% p/p). La molécula bioactiva puede estar en suspensión en un vehículo a una concentración de entre aproximadamente 50 mg/ml-1000 mg/ml, 50 mg/ml-500 mg/ml, o 50 mg/ml-250 mg/ml. La formulación ejemplar consiste del 40% (% p/p) de partículas de mAb anti-TNF α elaboradas por secado por pulverización de 65 mg/ml de mAb anti-TNF α , 55 mg/ml de sacarosa, L-histidina 10 mM, 0,01% de PS-80, solución de pH 5,5 y 60% de vehículo (% p/p) con aceite de sésamo y oleato de etilo (proporción 50:50 en volumen). Como la molécula bioactiva está presente a una concentración tan alta, la formulación de suspensión no acuosa puede usarse para administrar una molécula bioactiva que tiene una potencia baja. Como la molécula bioactiva se mantiene en su forma sólida, se espera una estabilidad de vida útil larga.

Aunque las realizaciones ilustradas en los Ejemplos comprenden formulaciones de CNTO148, otros anticuerpos y otros anticuerpos anti-TNF α pueden ser sustituidos por CNTO148 para desarrollar formulaciones con características similares a la formulación de CNTO148 ejemplificada, por ejemplo, formulaciones de suspensión de viscosidad reducida de alta concentración no acuosas con alta estabilidad y buena inyectabilidad que mantienen una bioactividad similar a las formulaciones acuosas.

La viscosidad de los vehículos y las formulaciones de la invención pueden medirse usando instrumentos reológicos bien conocidos como un reómetro. La viscosidad de un vehículo o una formulación puede medirse como una función de la tasa de cizallamiento entre, por ejemplo, 200- 500 s⁻¹ a 25° C usando un reómetro AR2000 (TA Instruments), y calculando la viscosidad media entre las tasas de cizallamiento medidas, o como una función de una tasa de cizallamiento definida, por ejemplo, 250 s⁻¹. La viscosidad de los vehículos y las formulaciones de las invenciones también puede evaluarse midiendo su fuerza de inyección, que se correlaciona positivamente con la viscosidad (Figura 4). La fuerza de inyección puede medirse, por ejemplo, cargando las formulaciones preparadas en una jeringuilla de vidrio con protección de aguja rígida de 1 ml que tienen un diámetro interno de 0,25 pulgadas, equipada con una aguja de calibre de 0,5 pulgadas 26 1/2 y configurando la velocidad de inyección a por ejemplo 250 mm/minuto y registrando la fuerza de desplazamiento del pistón usando un instrumento de prueba Zwick/Roell (Modelo 2005) (Zwick Roell, Kennesaw, GA). Una jeringuilla ejemplar es una jeringuilla BD (Becton, Dickinson and Company, NJ) (jeringuilla precargable de vidrio con protector de aguja rígido de 1 ml BD Hypak SCF™ equipada con una aguja de calibre de 0,5 pulgadas 26 1/2 (Designador de producto PIR6-001 SCF1MLL 26GA1/2 RNSFM27 EB LTP. 8268589). El porcentaje (%) de reducción de la viscosidad o fuerza de inyección se mide para evaluar el efecto de los agentes reductores de la viscosidad en la viscosidad y la inyectabilidad de las formulaciones de la invención. Por ejemplo, las formulaciones de proteína de alta concentración no acuosas de la invención pueden tener una reducción del 81% en la viscosidad o una reducción del 76% en la fuerza de inyección cuando se comparan con las formulaciones sin el agente reductor de la viscosidad.

La viscosidad de las formulaciones de suspensión de alta concentración no acuosas de la invención puede reducirse aún más y, por tanto, mejorar la inyectabilidad de las formulaciones modificando la tasa de cizallamiento. Las formulaciones de la invención pueden analizarse para determinar sus características newtonianas o no newtonianas analizando la dependencia de la viscosidad sobre la tasa de cizallamiento. Las características no newtonianas de las formulaciones pueden depender de la concentración de proteínas y la cantidad de agente reductor de la viscosidad en una formulación. Aumentar la concentración de proteínas en las formulaciones de la

invención puede cambiar las características de la formulación al adelgazamiento por cizallamiento no newtoniano, y aumentar por tanto la tasa de cizallamiento durante la fabricación puede reducir la viscosidad y mejorar el procesamiento de estas formulaciones. Aumentar la cantidad de agente reductor de la viscosidad en una formulación puede cambiar las características de la formulación a Newtoniano, en cuyo caso la modulación de la tasa de cizallamiento tiene poco o ningún efecto sobre la viscosidad. La preparación de las formulaciones de la invención incluye evaluar el efecto de la tasa de cizallamiento sobre la viscosidad, y ajustar la tasa de cizallamiento a, por ejemplo, entre 10-1000 1/s o 50-500 1/s para obtener formulaciones con valores de viscosidad apropiados.

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

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

Otra realización de la divulgación es un método para reducir una fuerza de inyección a aproximadamente 45 Newton (N) o menos de una formulación que contiene ≥ 50 mg/ml de una proteína en un vehículo que comprende un agente hidrófobo, que comprende: añadir por lo menos el 28% en volumen de un agente reductor de la viscosidad en el vehículo que comprende un agente hidrófobo; o utilizar partículas de proteína que tienen un tamaño de partícula de aproximadamente 2 μ m a 13 μ m para preparar la formulación, en donde la fuerza de inyección se mide usando una jeringuilla de vidrio con protector de aguja rígido de 1 ml que tiene un diámetro interior de 0,25 pulgadas, equipada con una aguja de calibre de 0,5 pulgadas 26½ a una velocidad de inyección de 250 mm/min.

Pueden cambiarse varios parámetros para mantener la fuerza de inyección de las formulaciones de suspensión de alta concentración no acuosas de la invención a o por debajo de 45 Newton (N). Estos parámetros son, por ejemplo, la concentración de proteína, el tamaño de partícula y la cantidad de agente reductor de viscosidad en la formulación, y la velocidad de inyección usada para una jeringuilla seleccionada con un calibre de aguja específico. La cantidad de agente reductor de la viscosidad en las formulaciones que tienen una fuerza de inyección de 45 N o menos puede ser, por ejemplo, entre el 0,2% y el 99,9%, la cantidad de proteína puede estar entre el 1 y el 40% (% p/p) y el tamaño de partícula puede ser de aproximadamente 2 μ m a 13 μ m. Las formulaciones no acuosas ejemplares que contienen un agente hidrófobo, un agente reductor de la viscosidad y una molécula bioactiva, y que tienen fuerzas de inyección por debajo de 45 N son formulaciones que tienen por lo menos un 20% (% p/p) de concentración de proteínas con un tamaño de partícula de aproximadamente 2 μ m-13 μ m, y por lo menos un 28% de EO en un vehículo; 20% (% p/p) de suspensiones de partículas BSA 2 μ m en EO/SO/28/72, EO/SO/50/50 o en 100% de EO; 20% (% p/p) de suspensiones de mAb anti-TNF α en EO/SO/50/50, EO/SO/73/30, EO/SO/85/15, o en 100% de EO; 30% y 40% (% p/p) de suspensiones de mAb anti-TNF α en EO/SO/50/50; 40% de suspensiones de partículas BSA 13 μ m en EO/SO/50/50; 50% (% p/p) de suspensiones de partículas BSA 2 μ m en 100% de EO con velocidad de inyección de 50 mm/min; y 50% (% p/p) de suspensiones de partículas BSA 13 μ m con velocidad de inyección entre 50-250 mm/min.

Otra realización de la divulgación es un método para elaborar una formulación de suspensión de alta concentración no acuosa de una molécula bioactiva, que comprende proporcionar una molécula bioactiva; proporcionar un agente hidrófobo; proporcionar un agente reductor de la viscosidad; mezclar el agente hidrófobo y el agente reductor de la viscosidad para formar un vehículo; y añadir la molécula bioactiva en el vehículo formado en el paso d. a una concentración igual o superior a 50 mg/ml.

Las formulaciones de la invención pueden precargarse en una jeringuilla o en cualquier recipiente de pequeño volumen adecuado usando métodos bien conocidos y, por lo tanto, están listos para inyección sin mezclado, reconstitución, o cualquier otra preparación adicional. Las formulaciones de la invención en la jeringuilla precargada pueden inyectarse a mano o, alternativamente, usando un autoinyector, como una pluma de inyección automática, un autoinyector, varias bombas de inyección automática, incluyendo bomba de parche, y dispositivos de inyección sin aguja. Las formulaciones de la invención pueden introducirse en un huésped por vías parenterales como por inyección subcutánea (SC) o intramuscular (IM). Las formulaciones pueden administrarse a través de agujas de aproximadamente media a dos pulgadas de largo, calibre entre 20-31, con un diámetro interno en el intervalo de 133 a 604 micrones. La formulación de suspensión de alta concentración no acuosa lista para inyección de la invención puede tener tolerancia local favorable (o biocompatibilidad), baja fuerza de inyección, y flexibilidad de formulación. La alta concentración de la molécula bioactiva en la formulación de suspensión no acuosa lista para inyección puede lograrse independientemente de la estructura molecular y el peso molecular de la molécula

bioactiva.

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

Ejemplo 1

Selección de agentes reductores de viscosidad para vehículos no acuosos

Los agentes reductores de viscosidad se añadieron al aceite de sésamo a una concentración del 0,2%-50% en volumen. Todos los agentes reductores de la viscosidad fueron de material GRAS (generalmente reconocido como seguro). La mezcla se colocó en un vial de centelleo cerrado de 20 ml y se agitó en vórtice durante 30 segundos, y se inspeccionó visualmente para detectar cualquier inmiscibilidad. Se descubrió que algunos de los agentes reductores de la viscosidad no eran miscibles con el aceite de sésamo y ya no se seleccionaron más. La Tabla 3 muestra la miscibilidad de agentes reductores de la viscosidad ejemplares con aceite de sésamo. Y y N denotan que el agente reductor de la viscosidad probado era miscible o no miscible, respectivamente, con aceite de sésamo a la concentración probada.

Tabla 3.

Agente reductor de la viscosidad	% de agente reductor de la viscosidad (v/v)								
	0.2	0.7	1.7	3.1	5.4	9.7	17.2	30.0	50.0
Diacetilo	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	N
Etanol	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	N	N
Oleato de etilo	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
Isopropanol	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N/A
Ácido láctico	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Ácido linoleico	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N/A
Ácido propiónico	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N/A
Propilenglicol	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Citrato de trietilo	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	N	N

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

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

Tabla 4

Agente reductor de la viscosidad	Agente reductor de viscosidad (% v/v)	Aceite de sésamo (% v/v)	Viscosidad media (cP)	SD *	Disminución de la viscosidad (cP) **
Oleato de etilo	0	100	51.25	0.32	
	0.2	99.8	50.14	0.06	-1.11
	0.7	99.3	50.09	0.22	-1.16
	1.5	98.5	48.15	0.1	-3.1
	3	97	45.85	0.81	-5.4
	5.5	94.5	43.01	0.05	-8.24
	9.5	90.5	38.8	0.36	-12.45
	17	83	32.65	0.15	-18.6
	28	72	25.64	0.14	-25.61
	50	50	16.7	0.09	-34.55
	75	25			
	85	15			
Ácido linoleico	100	0	5.96	0.19	-45.29
	3	97	50.21	1.26	-1.04
	9.5	90.5	46.98	0.38	-4.27

(continuación)

Agente reductor de la viscosidad	Agente reductor de viscosidad (% v/v)	Aceite de sésamo (% v/v)	Viscosidad media (cP)	SD *	Disminución de la viscosidad (cP) **
5	17	83	42.3	0.74	-8.95
	28	72	38	0.33	-13.25
10	3	97	42.48	0.91	-8.77
	9.5	90.5	30.99	0.49	-20.26
	17	83	21.06	0.14	-30.19
	28	72	12.83	0.22	-38.42
15	3	97	46.33	0.8	-4.92
	9.5	90.5	38.82	0.2	-12.43
	17	83	30.85	0.42	-20.4
	28	72	23.59	0.23	-27.66
20	3	97	45.92	1.3	-5.33
	9.5	90.5	38.55	0.53	-12.7
	17	83	31.88	0.2	-19.37
	28	72	24.09	0.18	-27.16
25	3	97	43.95	0.73	-7.3
	9.5	90.5	33.14	0.13	-18.11
	17	83	25	0.4	-26.25
	28	72	13.81	0.05	-37.44
30	3	97	41.96	0.42	-9.29
	9.5	90.5	31.25	1.58	-20
35	3	97	49.76	0.09	-1.49
	9.5	90.5	45.36	0.74	-5.89
*desviación estándar					
**en comparación con el vehículo SO					

equipado con una geometría de cono acrílico de 40 mm y 1°. La tensión de cizallamiento se registró como una función de la tasa de cizallamiento hasta 500 s⁻¹ a 25° C. La viscosidad fue calculada automáticamente por el software y se informó de la media de la viscosidad entre 200 y 500 s⁻¹.

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

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

Ejemplo 2

Preparación de formulaciones de baja viscosidad de alta concentración no acuosas

Preparación de partículas de moléculas bioactivas

Liofilización

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

La proteína liofilizada o el polvo de mAb se trituraron adicionalmente en un mezclador Waring y se pasaron a través de una serie de tamices con tamaños de malla determinados. El proceso de triturado/dimensionamiento produjo partículas de proteína o mAb con un tamaño de partícula de 0,2-250 μ m.

Secado por pulverización:

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

Tabla 5

Molécula bioactiva	Molécula bioactiva (mg/ml)	Sacarosa (% p/v)	TWEEN® 80 (% p/v)
BSA	65	5.5	0.0065
BSA	65	3	0.0065
BSA	100	4.5	0.0065
mAb anti-TNF α	100	8.5	0.0065

Preparación de vehículos no acuosos

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

Preparación de formulaciones

Los vehículos no acuosos preparados se mezclaron con partículas de moléculas bioactivas preparadas mediante liofilización o secado por pulverización. Se usó un agitador con una pala de espátula de acero inoxidable para mezclar las partículas en el vehículo a 50-1000 rpm durante 5~30 minutos a temperatura ambiente. La carga de partículas fue de aproximadamente el 1-50% en peso llevando a la concentración de proteína en la formulación final de aproximadamente 10-500 mg/ml. Después de que se formase una suspensión homogénea, las formulaciones se introdujeron en una jeringuilla de inyección de vidrio. Las formulaciones se almacenaron a temperatura refrigerada (4° C) antes de la inyección. La tabla 6 muestra las formulaciones preparadas.

Ejemplo 3**Estabilidad de moléculas bioactivas liofilizadas en vehículos no acuosos**

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

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

Tabla 6

Composición del vehículo (% v/v)	Vehículo (% p/p)	Proteína	Concentración de proteína (% p/p)	Concentración de proteína mg/ml*
SO (100)	60	IL-12p40 mAb	40	216.7
EO (100)	60	TNF α mAb	40	214.4
EO (100)	70	TNF α mAb	30	160.8
EO (100)	80	TNF α mAb	20	107.2
EO (100)	90	TNF α mAb	10	53.6
MCT (100)	80	TNF α mAb	20	107.2

Tabla 6

Composición del vehículo (% v/v)	Vehículo (% p/p)	Proteína	Concentración de proteína (% p/p)	Concentración de proteína mg/ml*
MCT (100)	90	TNF α mAb	10	53.6
SO (100)	60	TNF α mAb	40	214.4
SO (100)	70	TNF α mAb	30	160.8
SO (100)	80	TNF α mAb	20	107.2
SO (100)	90	TNF α mAb	10	53.6
SO/EO (50/50)	60	TNF α mAb	40	214.4
SO/EO (50/50)	70	TNF α mAb	30	160.8
SO/EO (50/50)	80	TNF α mAb	20	107.2
SO/EO (50/50)	90	TNF α mAb	10	53.6
SO/EO (50/50)	95	TNF α mAb	5	26.8
SO/EO (50/50)	99	TNF α mAb	1	5.4
SO/EO (72/28)	80	TNF α mAb	20	107.2
SO/EO (72/28)	90	TNF α mAb	10	53.6
SO/EO (15/85)	80	TNF α mAb	20	107.2
SO/EO (25/75)	80	TNF α mAb	20	107.2
SO (100)	50	BSA	50	500.0
SO (100)	60	BSA	40	400.0
SO (100)	70	BSA	30	300.0
SO (100)	80	BSA	20	200.0
SO (100)	90	BSA	10	100.0
SO (100)	95	BSA	5	50.0
SO (100)	99	BSA	1	10.0
SO/EO (50/50)	50	BSA	50	500.0
SO/EO (50/50)	60	BSA	40	400.0
SO/EO (50/50)	70	BSA	30	300.0
SO/EO (50/50)	80	BSA	20	200.0
SO/EO (50/50)	90	BSA	10	100.0
SO/EO (50/50)	95	BSA	5	50.0
SO/EO (50/50)	99	BSA	1	10.0
SO/EO (72/28)	80	BSA	20	200.0
EO (100)	50	BSA	50	500.0
EO (100)	60	BSA	40	400.0
EO (100)	70	BSA	30	300.0
EO (100)	80	BSA	20	200.0
EO (100)	90	BSA	10	100.0
EO (100)	95	BSA	5	50.0
EO (100)	99	BSA	1	10.0
MCT	80	BSA	20	200.0

* concentración final en la formulación de suspensión

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

La estabilidad de almacenamiento de las formulaciones de suspensión probadas que contenían partículas

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

Ejemplo 4

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

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

Efecto de la composición del vehículo.

La inyectabilidad del 20% (% p/p) de BSA y el 20% (% p/p) de las formulaciones de anticuerpos anti-TNF α se evaluó midiendo la fuerza requerida para empujar la suspensión a través de una aguja de calibre usando un instrumento de prueba Zwick/Roell (Modelo 2005). Las partículas de BSA se prepararon mediante secado por pulverización de 100 mg/ml de BSA en agua, y las partículas de mAb anti-TNF α se prepararon mediante secado por pulverización de 65 mg/ml de proteína, 55 mg/ml de sacarosa, L-histidina 10 mM, PS-80 al 0,01%. pH 5,5. Las formulaciones de proteínas se prepararon mezclando partículas de proteína como se ha descrito anteriormente con aceite de sésamo que contiene cantidades crecientes en volumen del agente reductor de la viscosidad oleato de etilo (0%, 3%, 9,5%, 17%, 20%, 25%, 28%, 30%, 40%, 50%, 75%, 85% o 100% (% v/v)). Las formulaciones preparadas se cargaron en jeringuillas BD (Becton, Dickinson and Company, NJ) (jeringuilla precargada de vidrio con protector de aguja rígido de 1 ml BD Hypak SCF™ equipada con una aguja de calibre de 0,5 pulgadas 26½ (designación de producto PIR6-001 SCF1MLL 26GA1/2 RNSFM27 EB LTP. 8268589). Las jeringuillas se llenaron con aproximadamente 0,5 cc de las formulaciones, la velocidad de inyección se estableció a aproximadamente 250 mm/minuto a menos que se indique específicamente lo contrario, y se registró la fuerza de desplazamiento del pistón. La prueba de inyección se realizó a temperatura ambiente.

Aumentar la cantidad de oleato de etilo (OE) en aceite de sésamo (SO) redujo significativamente la fuerza de inyección y mejoró por tanto la inyectabilidad de las formulaciones en suspensión de partículas de proteína de tamaño de tanto 2 μ m como 13 μ m. La fuerza de inyección para una suspensión del 20% (p/p) (200 mg/ml) de partículas de BSA de 2 μ m en EO/SO/28/72 fue de 35,3 N, y en EO/SO/50/50 de 21,5 N, siendo esta última una Disminución del 67% en comparación con el control de aceite de sésamo sin agente reductor de viscosidad (64,65 N) (Figura 2A). Usar un vehículo de EO al 100% redujo aún más la fuerza de inyección a 12,1 N. Se demostró una reducción similar en la fuerza de inyección con formulaciones de mAb anti-TNF α con una cantidad creciente de oleato de etilo en aceite de sésamo. Por ejemplo, la fuerza de inyección para una suspensión del 20% (p/p) (108,6 mg/ml) con partículas de mAb anti-TNF α de 3,1 μ m en EO/SO/50/50 se redujo a 29,5 N, y en EO/SO/70/30 a 21,1 N de la fuerza de inyección de 71,3 N para 20% (p/p) de mAb anti-TNF α en SO (Figura 2B). Los resultados demuestran que la adición del agente reductor de la viscosidad en un vehículo mejoró significativamente la inyectabilidad de formulaciones de suspensión de alta concentración no acuosas reduciendo la fuerza de inyección. Una formulación de suspensión de alta concentración no acuosa que tiene una fuerza de inyección igual o inferior a aproximadamente 45 N puede por tanto fabricarse aumentando la cantidad de oleato de etilo en el vehículo de aceite de sésamo que contiene formulaciones a igual o más del 28% en volumen.

Efecto de la concentración de proteínas.

La fuerza de inyección se vio afectada por la concentración de proteínas en las formulaciones de suspensión no acuosas. La Figura 3A muestra el efecto combinado del aumento de la concentración de anticuerpos de partículas anti-TNF α de 8,2 μ m (20-40% (% p/p); 108,3-216,7 mg/ml) y una cantidad aumentada de agente reductor de la viscosidad en la fuerza de inyección de las formulaciones. El eje X indica la concentración de anticuerpo anti-TNF α usado en cada experimento. Usando hasta un 30% de concentración de mAb en EO/SO/50/50 dio como resultado una fuerza de inyección de 42,8 N. La fuerza de inyección a esta concentración de anticuerpo podría reducirse a 20,5 N utilizando un 100% de OE como vehículo. La Figura 3B muestra el efecto de aumentar la concentración de mAb anti-TNF α (0-40% (% p/p); 0216,7 mg/ml) en formulaciones EO/SO/50/50 tanto en la fuerza de inyección como en la viscosidad. La Figura 3C muestra el efecto de aumentar la concentración de BSA (tamaño de partícula 2 μ m, 0-40% (% p/p); 0-400 mg/ml) en vehículos de 100% de SO, EO/SO/50/50 y en 100% EO. Para reducir la fuerza de inyección a igual o menos de aproximadamente 45N, las formulaciones pueden contener aproximadamente el 20% (% p/p) o menos de proteína y por lo menos el 28% de OE en un vehículo, 30% o menos

de proteína y menos del 50% de EO en un vehículo, o una concentración de proteína de aproximadamente 40% o menos de proteína en 100% de EO. Los experimentos realizados también demostraron que la fuerza de inyección y la viscosidad de las formulaciones de suspensión de alta concentración no acuosas están correlacionadas. La Figura 4a demuestra la correlación en las formulaciones de suspensión de mAb anti-TNF α al 20% (% p/p). La Figura 4b demuestra la correlación en todas las formulaciones de suspensión de mAb anti-TNF α probadas. Por tanto, la fuerza de inyección puede usarse tanto como una medida de la viscosidad como de la inyectabilidad. Modificar apropiadamente tanto de la concentración de proteína como la cantidad de agente reductor de la viscosidad en las formulaciones de suspensión de alta concentración no acuosas tiene un impacto positivo en la inyectabilidad de las formulaciones.

Efecto del tamaño de partícula

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

Ejemplo 5

La viscosidad de las formulaciones de suspensión de alta concentración no acuosas puede reducirse aumentando la tasa de cizallamiento

Se estudió el efecto de tanto la elección del vehículo como de la concentración de proteínas sobre la viscosidad con tasas de cizallamiento variables. Se pipetearon 290 μl de formulaciones que contenían 1-40% (% p/p) de anticuerpo anti-TNF α en EO/SO/50/50 o en SO en el Reómetro AR2000 (TA Instruments) equipado con una geometría de cono acrílica de 1°, 40 mm. La exploración de viscosidad para cada formulación se midió a 25° C cuando la tasa de cizallamiento aumentó de $\sim 8 \text{ s}^{-1}$ a 5000 s^{-1} .

Dependiendo del vehículo usado, las formulaciones de mAb anti-TNF α al 20% (% p/p) demostraron comportamiento de adelgazamiento por cizalladura newtoniano (mAb anti-TNF α en EO/SO/50/50) o no newtoniano (mAb anti-TNF α en SO) comportamiento (Figura 6a). A concentraciones de proteína del 30% (% p/p) o más altas, las formulaciones de mAb anti-TNF α de EO/SO/50/50 cambiaron su comportamiento de adelgazamiento por cizalladura newtoniana a no newtoniana (Figura 6b).

La evaluación del comportamiento de adelgazamiento por cizalladura de las formulaciones de la invención es fundamental para su procesamiento y fabricación en sentido descendente. Las formulaciones de proteínas altamente concentradas a menudo dan como resultado una viscosidad aumentada que plantea un desafío significativo durante el proceso, la fabricación y el almacenamiento. Como se muestra en las Figura 6a y 6b, la evaluación del efecto de la tasa de cizallamiento sobre la viscosidad y el aumento de la tasa de cizallamiento apropiadamente durante el procesamiento y la fabricación de las formulaciones en la invención puede reducir significativamente la viscosidad y, por lo tanto, mejorar la capacidad de procesamiento de las formulaciones.

Ejemplo 6

Ajuste de la velocidad de inyección para modificar la fuerza de inyección.

La fuerza de inyección se evaluó para partículas de BSA de 2 μm y 13 μm al 40-50% (% p/p) (400-500 mg/ml) en EO (Figura 7A, 7B) y para anticuerpo anti-TNF α al 20-40% (% p/p) (108,33-216,67 mg/ml) en EO/SO/50/50 (Figura 7C) usando varias velocidades de inyección. La velocidad de inyección afectó a la fuerza de inyección de una manera dependiente de la concentración de proteínas. Al 40% (% p/p) BSA, la fuerza de inyección dependía menos de la velocidad de inyección. Sin embargo, al 50% (% p/p) la concentración de BSA, disminuyendo la velocidad de inyección de 250 mm/min a 50 mm/min, redujo significativamente la fuerza de inyección de 111,4 N a

32,4 N (Figura 7A). El efecto sobre la fuerza de inyección por la velocidad de inyección también se vio afectado por el tamaño de partícula. La fuerza de inyección de formulaciones con tamaños de partículas más grandes se vio menos afectada por la velocidad de inyección, mientras que la fuerza de inyección de formulaciones con tamaños de partículas más pequeños se vio afectada significativamente por la velocidad de inyección (Figura 7B). Utilizar partículas de BSA de 13 µm con velocidades de inyección entre 50-250 mm/min dio como resultado velocidades de inyección iguales a o menores de 45 N. La velocidad de inyección también afectó a la fuerza de inyección de las formulaciones de anticuerpos anti-TNFα, las velocidades de inyección reducidas reduciendo la fuerza de inyección (Figura 7C).

Ejemplo 7

Optimización de formulaciones de partículas secas.

Las formulaciones de CNT0148de anticuerpo anti-TNFα, como las que se muestran en la Tabla 7, se prepararon mediante secado por pulverización o liofilización como se describe en el Ejemplo 2. Las formulaciones para el secado por pulverización o liofilización de CNT0148 pueden incluir uno o más de los excipientes siguientes: sacarosa a aproximadamente una proporción de sacarosa:proteína entre 0-3, sacarosa + aminoácido a una proporción de (sacarosa + aminoácido):proteína entre 0-3, aproximadamente 0-40 mM tampón de histidina, aproximadamente 0-10 mM tampón citrato, trehalosa a aproximadamente una proporción de trehalosa:proteína entre 0-1,8, manitol a aproximadamente una proporción de manitol:proteína entre 0-1,8, sorbitol a aproximadamente una proporción de sorbitol:proteína entre 0-1,8, aminoácido a aproximadamente una proporción de (aminoácido):proteína entre 0-1,8; las proporciones anteriormente indicadas como proporción p/p, y aproximadamente 0,01-0,1% PS-80 (% p/v). El pH se puede ajustar a aproximadamente 5,5.

Tabla 7

Experimento	ID de la Formulación	Descripción
SD_1	Form-1	32.5 mg/ml prot, 10mM His, 27.5mg/ml Suc, 0.01% PS-80, pH 5.5
SD_1	Form-5	16.25 mg/ml prot, 10mM His, 27.5mg/ml Suc, 0.01% PS-80, pH 5.5
SD_1	Form-7	32.5 mg/ml prot, 10mM Cit, 27.5mg/ml Suc, 0.01% PS-80, pH 5.5
SD_2	Form-1	65mg/ml prot, 10mM His, 55mg/ml Suc, 0.01% PS-80, pH 5.5
SD_2	Form-2	32mg/ml prot, 10mM His, 27.5mg/ml Man, 0.01% PS-80, pH 5.5
SD_2	Form-3	32mg/ml prot, 10mM His, 5mg/ml Suc and 22.5 Man, 0.01% PS-80, pH 5.5
SD_2	Form-4	32mg/ml prot, 10mM His, 18mg/ml Suc /9mg/ml Met, 0.01% PS-80, pH 5.5
SD_2	Form-5	16mg/ml prot, 10mM His, 27.5mg/ml Suc, 0.01% PS-80, pH 5.5
SD_2	Form-6	32mg/ml prot, 5mM His/5mM Cit, 27.5mg/ml Suc, 0.01% PS-80, pH 5.5
SD_2	Form-7	32mg/ml prot, 10mM Cit, 27.5mg/ml Suc, 0.01% PS-80, pH 5.5
SD_2	Form-8	32mg/ml prot, 10mM Cit, 0.01% PS-80, pH 5.5
SD_2	Form-9	32mg/ml prot, 10mM Cit, 13.8 mg/ml Suc, 0.01% PS-80, pH 5.5
lyo	1	65 mg/ml prot, 10 mM His, 55mg/ml Suc, 0.01% PS-80, pH5.5
lyo	2	32 mg/ml prot, 10 mM His, 27.5 mg/ml Suc, 0.01% PS-80
lyo	3	16 mg/ml prot, 10 mM His, 27.5 mg/ml Suc, 0.01% PS-80
lyo	4	16 mg/ml prot, 10 mM His, 32.5 mg/ml Suc, 0.01% PS-80
lyo	5	16 mg/ml prot, 10 mM His, 13.75 mg/ml Suc, 13.75 mg/ml Man, 0.01% PS-80
lyo	6	16 mg/ml prot, 10 mM His, 27.5 mg/ml Suc, 5 mg/ml Man, 0.01% PS-80
lyo	7	16 mg/ml prot, 10 mM His, 22.5 mg/ml Suc, 5 mg/ml Man, 0.01% PS-80
lyo	8	16 mg/ml prot, 10 mM His, 32 mg/ml Suc, 12 mg/ml Man, 0.01% PS-80
lyo	9	16 mg/ml prot, 10 mM His, 20.5 mg/ml Suc, 7 mg/ml Man, 0.01% PS-80
lyo	10	16 mg/ml prot, 10 mM His, 27.5 mg/ml Man, 0.01% PS-80
lyo	11	16 mg/ml prot, 10 mM His, 7mg/ml Suc, 20.5 mg/ml Man, 0.01% PS-80
lyo	12	32 mg/ml prot, 10 mM His, 13.75 mg/ml Suc, 13.75 mg/ml Man, 0.01% PS-80
lyo	13	16 mg/ml prot, 27.5 mg/ml Suc, 0.01% PS-80 (auto-tamponada)
lyo	14	16 mg/ml prot, 10 mM His, 27.5 mg/ml Sor, 0.01% PS-80
lyo	15	16 mg/ml prot, 10 mM His, 27.5 mg/ml Tre, 0.01% PS-80
lyo	16	16 mg/ml prot, 10 mM His, 22.5 mg/ml Suc, 5 mg/ml Sor, 0.01% PS-80
lyo	17	16 mg/ml prot, 10 mM His, 22.5 mg/ml Suc, 5 mg/ml Tre 0.01% PS-80
lyo	18	16 mg/ml prot, 10 mM His, 27.5 mg/ml Suc, 5 mg/ml Tre 0.01% PS-80

(continuación)

Experimento	ID de la Formulación	Descripción
lyo	19	16 mg/ml prot, 10 mM His, 13.75 mg/ml Suc, 13.75 mg/ml Tre 0.01% PS-80
lyo	20	16 mg/ml prot, 10 mM His, 5 mg/ml Suc, 22.5 mg/ml Tre 0.01% PS-80
lyo	21	16 mg/ml prot, 10 mM His, 22.5 mg/ml Suc, 5 mg/ml Ile, 0.01% PS-80
lyo	22	16 mg/ml prot, 10 mM His, 27.5 mg/ml Suc, 5 mg/ml Ile, 0.01% PS-80
lyo	23	16 mg/ml prot, 10 mM His, 22.5 mg/ml Suc, 5 mg/ml Arg 0.01% PS-80
lyo	24	16 mg/ml prot, 10 mM His, 22.5 mg/ml Suc, 5 mg/ml Gly, 0.01% PS-80
lyo	25	16 mg/ml prot, 10 mM His, 22.5 mg/ml Suc, 5 mg/ml Lys, 0.01% PS-80
lyo	26	16 mg/ml prot, 5 mM His, 27.5 mg/ml Suc, 0.01% PS-80
lyo	27	16 mg/ml prot, 20 mM His, 27.5 mg/ml Suc, 0.01% PS-80
lyo	28	16 mg/ml prot, 40 mM His, 27.5 mg/ml Suc, 0.01% PS-80
lyo	29	16 mg/ml prot, 10 mM His, 27.5 mg/ml Pro, 0.01% PS-80
lyo	30	16 mg/ml prot, 10 mM His, 27.5 mg/ml Suc, 5 mg/ml Pro, 0.01% PS-80
lyo	31	16 mg/ml prot, 10 mM His, 27.5 mg/ml Suc, 0.02% PS-80
lyo	32	16 mg/ml prot, 10 mM His, 27.5 mg/ml Suc, 0.05% PS-80
lyo	33	16 mg/ml prot, 10 mM His, 27.5 mg/ml Suc, 0.1% PS-80
lyo	34	16 mg/ml prot, 10 mM Cit, 5 mg/ml Suc, 22.5 mg/ml Man, 0.01% PS-80
lyo	35	16 mg/ml prot, 5 mM His, 5 mM Cit, 5 mg/ml Suc, 22.5 mg/ml Man, 0.01% PS-80
lyo	36	16 mg/ml prot, 10 mM Cit, 27.5 mg/ml Suc, 0.01% PS-80
lyo	37	16 mg/ml prot, 5 mM Cit, 27.5 mg/ml Suc, 0.01% PS-80
SD_3	Form-1	65 mg/ml prot, 10 mM His, 55 mg/ml Suc, 0.01% PS-80, pH5.5
SD_3	Form-2	32.5 mg/ml prot, 10 mM His, 65 mg/ml Suc, 0.01% PS-80, pH5.5
SD_3	Form-3	32.5 mg/ml prot, 10 mM His, 97 mg/ml Suc, 0.01% PS-80, pH5.5
SD_3	Form-4	32.5 mg/ml prot, 10 mM His, 55 mg/ml Suc, 10 mg/ml Ile, 0.01% PS-80, pH5.5
SD_3	Form-5	32.5 mg/ml prot, 10 mM His, 65 mg/ml Suc, 0.1% PS-80, pH5.5
SD_3	Form-6	32.5 mg/ml prot, 10 mM His, 60 mg/ml Suc, 5 mg/ml Sor, 0.01% PS-80, pH5.5
SD_3	Form-7	32.5 mg/ml prot, 10 mM His, 55 mg/ml Suc, 10 mg/ml Sor 0.01% PS-80, pH5.5
SD_3	Form-8	32.5 mg/ml prot, 10 mM His, 55 mg/ml Tre, 10 mg/ml Sor, 0.01% PS-80, pH5.5
SD_3	Form-9	32.5 mg/ml prot, 5 mM His/5 mM Cit, 65mg/ml Suc, 0.01% PS-80, pH5.5
His=histidina; Cit=citrato; Suc=sacarosa, Man=manitol; Sor=sorbitol Tre=trehalosa; Ile=isoleucina; Arg=arginina; Gly=glicina; Lys=lisina Pro=prolina		

Ciertas formulaciones mostradas en la Tabla 7 se probaron para determinar su estabilidad durante 0-6 meses a 5° C, 25° C o 40° C. Las formulaciones seleccionadas se suspendieron en vehículos no acuosos para estudios adicionales en el Ejemplo 8.

Ejemplo 8

Formulaciones de suspensión de CNTO148

Las formulaciones seleccionadas del Ejemplo 7 se suspendieron a 100 mg/ml o 200 mg/ml en los vehículos no acuosos SO, EO o EO/SO/50/50 (Tabla 8). La estabilidad de tanto las formulaciones de secado por pulverización como de la suspensión se probó en 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 meses después del almacenamiento a 5° C, 25° C o 40° C usando HPLC de exclusión por tamaño (SE-HPLC), SDS-PAGE capilar, enfoque isoeléctrico capilar (cIEF), dicroísmo circular (CD) o mapeo de péptidos por espectrometría de masas. Las formulaciones seleccionadas se trataron con óxido de aluminio para eliminar los peróxidos usando métodos estándar. En la SE-HPLC, se evaluó el % de retención del pico de HPLC principal a lo largo del tiempo como un indicador de la estabilidad de CNTO148 en las

formulaciones.

Tabla 8

Tabla 6		
Formulación SD	Descripción	Suspensiones
Form-1	32.5 mg/ml de proteína, histidina 10 mM, 27.5 mg/ml de sacarosa, 0.01% de PS-80, pH 5.5 (SD al 6% de sólidos totales)	200 mg/ml en SO
		200 mg/ml en SO/EO
		200 mg/ml en EO
		100 mg/ml en SO
		100 mg/ml en SO/EO
Form-5	16,25 mg/ml de proteína, histidina 10 mM, 27,5 mg/ml de sacarosa, 0,01% de PS-80, pH 5,5 (SD al 4,3% de sólidos totales)	100 mg/ml en SO
		100 mg/ml en SO/EO
Form-7	32,5 mg/ml de proteína, citrato 10 mM, 27,5 mg/ml de sacarosa, 0,01% de PS-80, pH 5,5 (SD al 6% de sólidos totales)	200 mg/ml en SO/EO
		200 mg/ml en EO
		100 mg/ml en SO/EO
		100 mg/ml en SO/EO *
* (sin tratamiento de eliminación de peróxido)		

Las Figuras 8A y 8B y las Figuras 9A y 9B muestran la estabilidad de formulaciones secadas por pulverización y suspensiones seleccionadas de aquellas en SO, EO y SO/EO/50/50 después del almacenamiento a 25° C (Figuras 8A y 8B) y a 40° C (Figuras 9A y 9B) hasta 6 meses como una medida de la estabilidad del pico principal de SE-HPLC. Las formulaciones parecen agruparse juntas en base a un tipo de formulación secada por pulverización (SD) (Form-1 frente a Form-5 frente a Form-7 del experimento SD_1 en la Tabla 7), sugiriendo que el % de carga y la composición del vehículo pueden tener menos efecto sobre la estabilidad según se evaluó usando SE-HPLC. Tanto las formulaciones secas por pulverización (SD) como las de suspensión fueron más estables cuando se compararon con la formulación acuosa de control (101 mg/ml de proteína, histidina 10 mM, 4,5 mg/ml de sacarosa, 0,015% de PS-80, pH 5.6).

Se midió inicialmente la bioactividad de CNTO148 (inhibición de la actividad de TNF α sobre células usando métodos rutinarios) y después del almacenamiento a 25° C durante hasta 6 meses y a 40° C durante hasta 4,5 meses desde el secado por pulverización y 100 mg/ml de formulaciones en suspensión de SO/EO/50/50. La bioactividad de CNTO148 se mantuvo después del secado por pulverización y en las formulaciones secadas por pulverización después de 6 meses de almacenamiento a 25° C, así como en las formulaciones de suspensión (Figura 10).

Se evaluaron los posibles cambios en la estructura secundaria tanto en las formulaciones secadas por pulverización como de suspensión usando una exploración UV CD lejana (Figura 11). No se identificaron cambios después del secado por pulverización o después del almacenamiento de las formulaciones tanto de secado por pulverización como de suspensión.

Ejemplo 9

Formulaciones de CNTO148

Se usó CNTO148 como un anticuerpo anti-TNF α en los Ejemplos 1-7. Se elaboran formulaciones de suspensión adicionales de CNTO148 como se muestra en la Tabla 9 usando formulaciones de partículas secadas por pulverización de CNTO148 descritas en el Ejemplo 7. Las formulaciones de suspensión resultantes se evalúan para determinar su estabilidad e inyectabilidad usando los métodos descritos en la presente.

Tabla 9.

Composición del vehículo (% v/v)	Concentraciones de CNTO148 en vehículo (% p/p)	Concentración de CNTO148 mg/ml *
OE (100)	10, 20, 30 50, 60	53.6, 107.2, 160.8, 268.0, 321.6
SO/EO (5/95)	1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60	5.4, 26.8, 53.6, 107.2, 160.8, 214.4, 268.0, 321.6
SO/EO (10/90)	1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60	5.4, 26.8, 53.6, 107.2, 160.8, 214.4, 268.0, 321.6
SO/EO (15/85)	1, 5, 10, 30, 40, 50, 60	5.4, 26.8, 53.6, 160.8, 214.4, 268.0, 321.6

(continuación)

Composición del vehículo (% v/v)	Concentraciones de CNTO148 en vehículo (% p/p)	Concentración de CNTO148 mg/ml *
SO/EO (25/75)	1, 5, 10, 30, 40, 50, 60	5.4, 26.8, 53.6, 160.8, 214.4, 268.0, 321.6
SO/EO (30/70)	1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60	5.4, 26.8, 53.6, 107.2, 160.8, 214.4, 268.0, 321.6
SO/EO (50/50)	50, 60	268.0, 321.6

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Janssen Biotech, Inc. Dao, Weiguo Hill, Beth Liu, Kui Mieczkowski, Carl

<120> FORMULACIONES DE SUSPENSION DE ANTICUERPOS DE VISCOSIDAD REDUCIDA DE ALTA CONCENTRACION NO ACUOSAS

<130> CEN5287WOPCT1

<140> A SER ASIGNADO

<141> 2011-09-30

<150> 13/043925

<151> 2011-03-09

<150> 61/311896

<151> 2010-03-09

<160> 9

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 126

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 743 687 T3

	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg	
	1 5 10 15	
5	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr	
	20 25 30	
10	Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
	35 40 45	
15	Ala Ile Ile Leu Tyr Asp Gly Ser Ser Lys Lys Tyr Ala Asp Ser Val	
	50 55 60	
20	Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	
	65 70 75 80	
25	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
	85 90 95	
30	Ala Arg Asp Arg Gly Ile Ser Ala Gly Gly Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Gly	
	100 105 110	
	Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
35	115 120 125	
40	<210> 2 <211> 126 <212> PRT <213> Homo sapiens	
	<400> 2	
45		
50		
55		
60		
65		

ES 2 743 687 T3

	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg	
	1				5					10					15		
5	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	
				20					25					30			
10	Ala	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
			35					40					45				
15	Ala	Phe	Ile	Leu	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Lys	Lys	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
		50					55					60					
20	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Ala	Leu	Tyr	
	65					70					75					80	
25	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85						90					95		
30	Ala	Arg	Asp	Arg	Gly	Val	Ser	Ala	Gly	Gly	Asn	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	
				100					105					110			
35	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser			
			115					120					125				
	<210> 3																
	<211> 126																
	<212> PRT																
	<213> Homo sapiens																
40	<400> 3																
	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg	
	1				5					10					15		
45	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Ile	Phe	Ser	Ser	Tyr	
				20					25					30			
50	Ala	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Asn	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
			35					40					45				
55	Ala	Phe	Met	Ser	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Lys	Lys	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
		50					55					60					
60																	
65																	

ES 2 743 687 T3

	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Pro	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	65	70	75	80
5	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys		85	90	95
10	Ala	Arg	Asp	Arg	Gly	Ile	Ala	Ala	Gly	Gly	Asn	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly		100	105	110
15	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser				115	120	125
20	<210> 4																			
	<211> 126																			
	<212> PRT																			
	<213> Homo sapiens																			
	<400> 4																			
25	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg	1	5	10	15
30	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Ile	Phe	Ser	Ser	Tyr		20	25	30
35	Ala	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Asn	Gly	Leu	Glu	Trp	Val		35	40	45
40	Ala	Phe	Met	Ser	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Lys	Lys	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val		50	55	60
45	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	65	70	75	80
50	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys		85	90	95
55	Ala	Arg	Asp	Arg	Gly	Ile	Ala	Ala	Gly	Gly	Asn	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly		100	105	110
60	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser				115	120	125
	<210> 5																			
	<211> 126																			
	<212> PRT																			
	<213> Homo sapiens																			
	<400> 5																			
65																				

ES 2 743 687 T3

	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg	
	1 5 10 15	
5	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr	
	20 25 30	
10	Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
	35 40 45	
15	Ala Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Lys Ser Ala Asp Ser Val	
	50 55 60	
20	Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe	
	65 70 75 80	
25	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Phe Tyr Cys	
	85 90 95	
30	Ala Arg Asp Arg Gly Ile Gly Ala Gly Gly Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Gly	
	100 105 110	
35	Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
	115 120 125	
40	<210> 6 <211> 108 <212> PRT <213> Homo sapiens	
45	<400> 6	
50	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly	
	1 5 10 15	
55	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr	
	20 25 30	
60	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile	
	35 40 45	
65	Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly	
	50 55 60	
70	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro	
	65 70 75 80	
75	Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro	

ES 2 743 687 T3

	85	90	95
5	Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys		
	100	105	
10	<210> 7 <211> 108 <212> PRT <213> Homo sapiens <400> 7		
15	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
	1	5	10 15
20	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Tyr Ser Tyr		
	20	25	30
25	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile		
	35	40	45
30	Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly		
	50	55	60
35	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro		
	65	70	75 80
40	Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro		
	85	90	95
45	Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys		
	100	105	
50	<210> 8 <211> 330 <212> PRT <213> Homo sapiens <400> 8		
55	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys		
	1	5	10 15
60	Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr		
	20	25	30
65	Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser		
	35	40	45
70	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser		
	50	55	60

ES 2 743 687 T3

	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	65	70	75	80
5	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	85	90	95	
10	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	100	105	110	
15	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	115	120	125	
20	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	130	135	140	
25	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	145	150	155	160
30	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	165	170	175	
35	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	180	185	190	
40	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	195	200	205	
45	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	210	215	220	
50	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	225	230	235	240
55	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	245	250	255	
60	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	260	265	270	
65	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	275	280	285	
	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	290	295	300	

ES 2 743 687 T3

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

5

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

10

<210> 9
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15

<400> 9

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

20

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

25

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

30

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

35

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

40

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

45

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Una formulación de suspensión de alta concentración no acuosa, que comprende:

un vehículo, que comprende un agente hidrófobo y un agente reductor de la viscosidad, en donde el agente hidrófobo es aceite de sésamo y el agente reductor de la viscosidad es oleato de etilo; y un anticuerpo formulado con un excipiente, en donde el anticuerpo es un anticuerpo anti-TNF α que comprende una región variable de la cadena ligera (VL) de la SEQ ID NO: 6 y una región variable de la cadena pesada (VH) de las SEQ ID NO: 1 o 2, o una VL de la SEQ ID NO: 7 y una VH de las SEQ ID NO: 3, 4 o 5.

2. La formulación de la reivindicación 1, en la que el anticuerpo anti-TNF α :

(i) está presente a aproximadamente el 0,5%, 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% o 60% en peso (% p/p) de la formulación; (ii) se seca por aspersion o se liofiliza; o (iii) comprende una región variable de la cadena ligera (VL) de la SEQ ID NO: 6 y una región variable de la cadena pesada (VH) de las SEQ ID NO: 1 o 2, o una VL de la SEQ ID NO: 7 y una VH de las SEQ ID NO: 3, 4 o 5, opcionalmente en donde el anticuerpo anti-TNF α es de tipo IgG1/ κ .

3. La formulación de la reivindicación 1, en la que la fuerza de inyección de la formulación es igual o inferior a 45 Newton (N), en la que la fuerza de inyección se mide usando una jeringuilla de vidrio con protector de aguja rígido de 1 ml que tiene un diámetro interior de 0,25 pulgadas, equipada con una aguja de calibre de 0,5 pulgadas 26½ a una velocidad de inyección de 250 mm/min.

4. La formulación de la reivindicación 1, que es estable a 40°C durante por lo menos un mes.

5. La formulación de la reivindicación 1, en la que el excipiente es un carbohidrato, un aminoácido, un tampón, o un surfactante no iónico, opcionalmente en la que:

(i) el carbohidrato es sacarosa, trehalosa, manitol o sorbitol, el aminoácido es histidina, isoleucina, metionina, glicina, arginina o lisina, el tampón es un tampón de histidina o un tampón de citrato, y el surfactante no iónico es PS 80; o (ii) la proporción en peso (p/p) del carbohidrato con el anticuerpo anti-TNF α está entre 0-3 o 1-2, la proporción en peso del aminoácido con el anticuerpo anti-TNF α está entre 0-2 o 0,3-1,8, la concentración del tampón de histidina es aproximadamente 0-40 mM o aproximadamente 5-10 mM, la concentración del tampón citrato es aproximadamente 0-10 mM o aproximadamente 5-10 mM, y el detergente no iónico está presente a aproximadamente el 0%-0,5% (% p/v) o aproximadamente el 0,01-0,1% (% p/v).

6. Una formulación de suspensión de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende:

(i) una formulación de partículas de anticuerpo anti-TNF α que tiene una región variable de la cadena ligera (VL) de la SEQ ID NO: 6 y una región variable de la cadena pesada (VH) de las SEQ ID NO: 1 o 2, o una VL de la SEQ ID NO: 7 y una VH de las SEQ ID NO: 3, 4 o 5, que comprende

- a. 32,5 mg/ml del anticuerpo anti-TNF α , histidina 10 mM, 27,5 mg/ml de sacarosa, 0,01% (% p/v) de PS-80;
- b. 16,25 mg/ml del anticuerpo anti-TNF α , histidina 10 mM, 27,5 mg/ml de sacarosa, 0,01% (% p/v) de PS-80;
- c. 32,5 mg/ml del anticuerpo anti-TNF α , citrato 10 mM, 27,5 mg/ml de sacarosa, 0,01% (% p/v) de PS-80;
- d. 32,5 mg/ml del anticuerpo anti-TNF α , histidina 10 mM, 55 mg/ml de sacarosa, 10 mg/ml de isoleucina, 0,01% (% p/v) de PS-80;
- e. 32,5 mg/ml del anticuerpo anti-TNF α , histidina 10 mM, 65 mg/ml de sacarosa, 0,01% (% p/v) de PS-80;
- f. 32,5 mg/ml del anticuerpo anti-TNF α , histidina 5 mM, citrato 5 mM, 65 mg/ml de sacarosa, 0,01% (% p/v) de PS-80;
- g. 32,5 mg/ml del anticuerpo anti-TNF α , histidina 10 mM, 5 mg/ml de sacarosa, 22,5 mg/ml de manitol, 0,01% (% p/v) de PS-80;
- h. 32,5 mg/ml del anticuerpo anti-TNF α , histidina 10 mM, 55 mg/ml de trehalosa, 10 mg/ml de isoleucina, 0,01% (% p/v) de PS-80; o
- i. 65 mg/ml del anticuerpo anti-TNF α , histidina 10 mM, 55 mg/ml de sacarosa, 0,01% de PS-80,

en donde las formulaciones mostradas en a-i están dispersas en un vehículo no acuoso que comprende aceite de sésamo y oleato de etilo, en donde la cantidad de oleato de etilo en el vehículo está entre el 0,2%-95% en volumen (% v/v) del vehículo no acuoso; o

(ii) una formulación de partículas de un anticuerpo anti-TNF α que tiene una región variable de la cadena

ligera (VL) de la SEQ ID NO: 6 y una región variable de la cadena pesada (VH) de las SEQ ID NO: 1 o 2, o una VL de la SEQ ID NO: 7 y una VH de las SEQ ID NO: 3, 4 o 5, que comprende

- a. 32,5 mg/ml del anticuerpo anti-TNF α , histidina 10 mM, 27,5 mg/ml de sacarosa, 0,01% (% p/v) de PS-80;
- b. 16,25 mg/ml del anticuerpo anti-TNF α , histidina 10 mM, 27,5 mg/ml de sacarosa, 0,01% (% p/v) de PS-80;
- c. 32,5 mg/ml del anticuerpo anti-TNF α , citrato 10 mM, 27,5 mg/ml de sacarosa, 0,01% (% p/v) de PS-80;
- d. 32,5 mg/ml del anticuerpo anti-TNF α , histidina 10 mM, 55 mg/ml de sacarosa, 10 mg/ml de isoleucina, 0,01% (% p/v) de PS-80;
- e. 32,5 mg/ml del anticuerpo anti-TNF α , histidina 10 mM, 65 mg/ml de sacarosa, 0,01% (% p/v) de PS-80;
- f. 32,5 mg/ml del anticuerpo anti-TNF α , histidina 5 mM, citrato 5 mM, 65 mg/ml de sacarosa, 0,01% (% p/v) de PS-80;
- g. 32,5 mg/ml del anticuerpo anti-TNF α , histidina 10 mM, 5 mg/ml de sacarosa, 22,5 mg/ml de manitol, 0,01% (% p/v) de PS-80;
- h. 32,5 mg/ml del anticuerpo anti-TNF α , histidina 10 mM, 55 mg/ml de trehalosa, 10 mg/ml de isoleucina, 0,01% (% p/v) de PS-80; o
- i. 65 mg/ml del anticuerpo anti-TNF α , histidina 10 mM, 55 mg/ml de sacarosa, 0,01% (% p/v) de PS-80,

en donde las formulaciones mostradas en a-i se dispersan en un vehículo no acuoso que comprende oleato de etilo.

7. La formulación de suspensión de la reivindicación 6(i), en la que la cantidad de oleato de etilo en el vehículo es del 5%, 10%, 15%, 30% o 50% (% v/v) del vehículo no acuoso.

8. La formulación de suspensión de la reivindicación 6, en la que el anticuerpo anti-TNF α es del tipo IgG1/k.

9. Un método para reducir una fuerza de inyección a aproximadamente 45 Newton (N) o menos de una formulación que contiene ≥ 50 mg/ml de anticuerpo anti-TNF α en un vehículo que comprende un agente hidrófobo, que comprende:

añadir por lo menos el 28% en volumen de un agente reductor de la viscosidad en el vehículo que comprende un agente hidrófobo; o
utilizar partículas de proteína con un tamaño de partícula entre aproximadamente 2 μ m - 13 μ m para preparar la formulación,
en donde la fuerza de inyección se mide usando una jeringuilla de vidrio con protector de aguja rígido de 1 ml con un diámetro interior de 0,25 pulgadas, equipada con una aguja de calibre de 0,5 pulgadas 26½ a una velocidad de inyección de 250 mm/min,
en donde el anticuerpo anti-TNF α tiene una región variable de la cadena ligera (VL) de la SEQ ID NO: 6 y una región variable de la cadena pesada (VH) de las SEQ ID NO: 1 o 2, o una VL de la SEQ ID NO: 7 y una VH de las SEQ ID NO: 3, 4 o 5, y
en donde el agente hidrófobo es aceite de sésamo y el agente reductor de la viscosidad es oleato de etilo.

10. El método de la reivindicación 9, en el que el anticuerpo anti-TNF α es de tipo IgG1/k.

11. Un método para elaborar una formulación de suspensión de alta concentración no acuosa de un anticuerpo anti-TNF α que tiene una región variable de la cadena ligera (VL) de la SEQ ID NO: 6 y una región variable de la cadena pesada (VH) de las SEQ ID NO: 1 o 2, o una VL de la SEQ ID NO: 7 y una VH de las SEQ ID NO: 3, 4 o 5, que comprende

proporcionar el anticuerpo anti-TNF α ;
proporcionar un agente hidrófobo;
proporcionar un agente reductor de la viscosidad;
mezclar el agente hidrófobo y el agente reductor de la viscosidad para formar un vehículo; y
añadir el anticuerpo anti-TNF α en el vehículo formado en el paso d a una concentración igual o mayor de 50 mg/ml, y
en donde el agente hidrófobo es aceite de sésamo y el agente reductor de la viscosidad es oleato de etilo.

12. El método de la reivindicación 11, en el que el anticuerpo anti-TNF α es de tipo IgG1/k.

μ

Figura 1

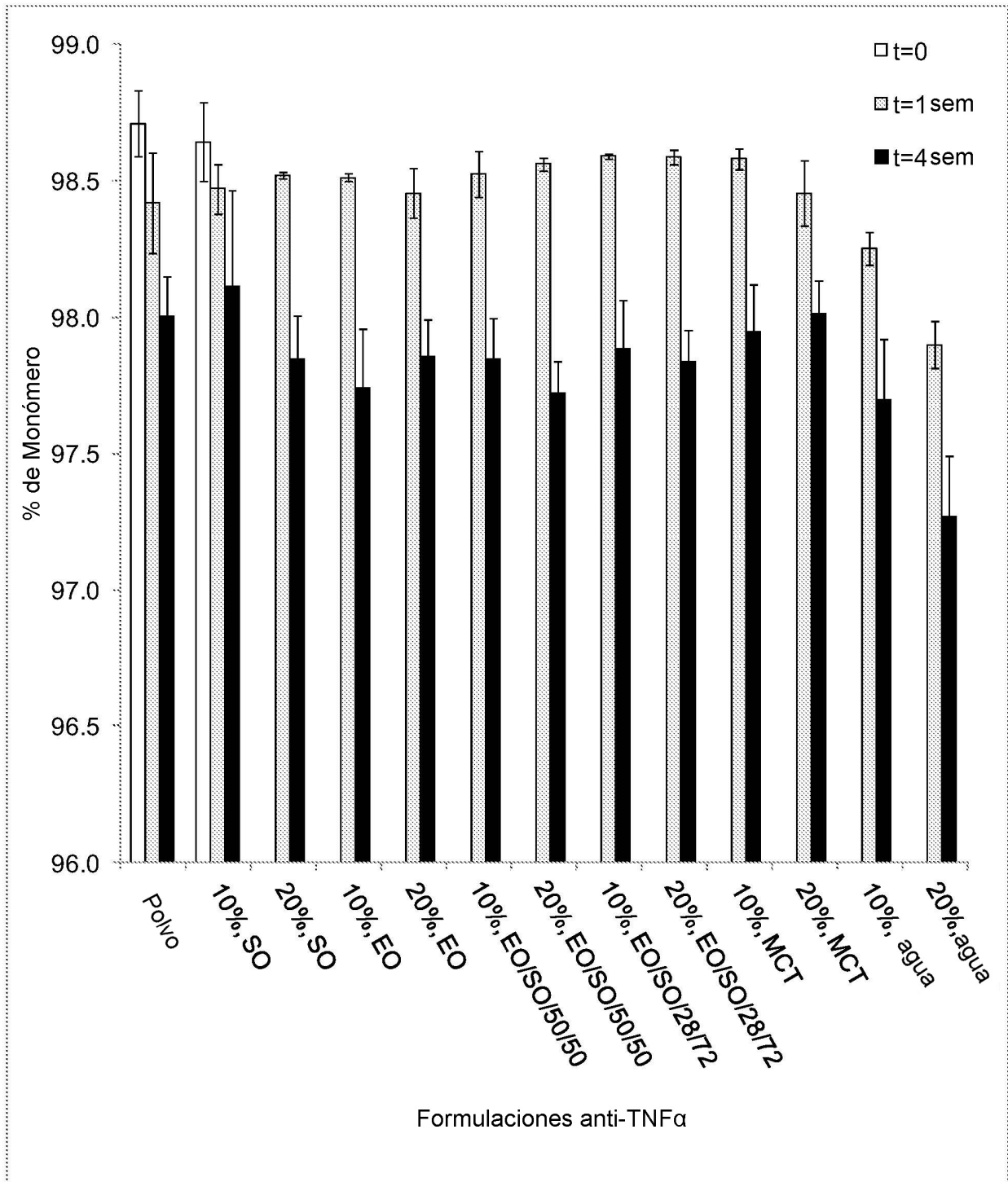


Figura 2A

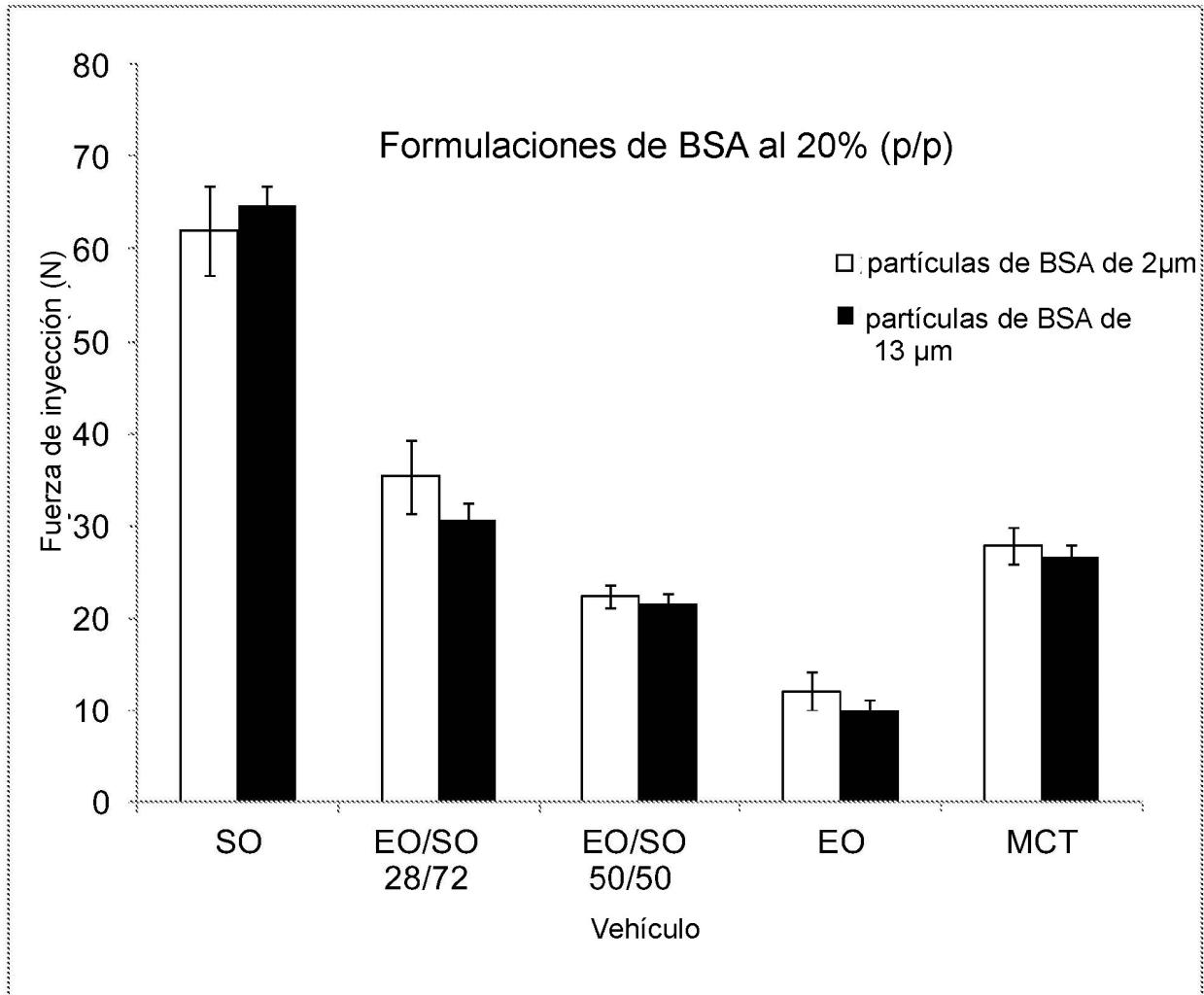


Figura 2B

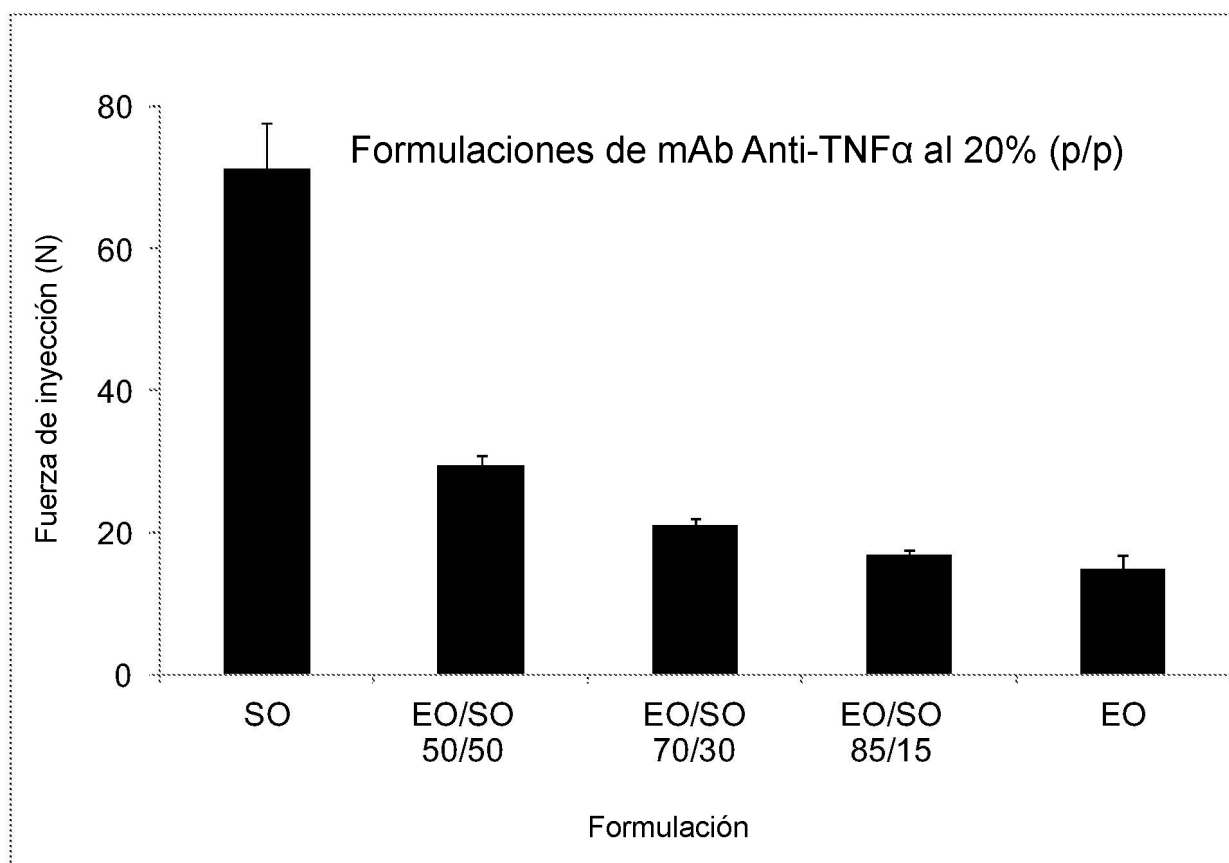


Figura 3A

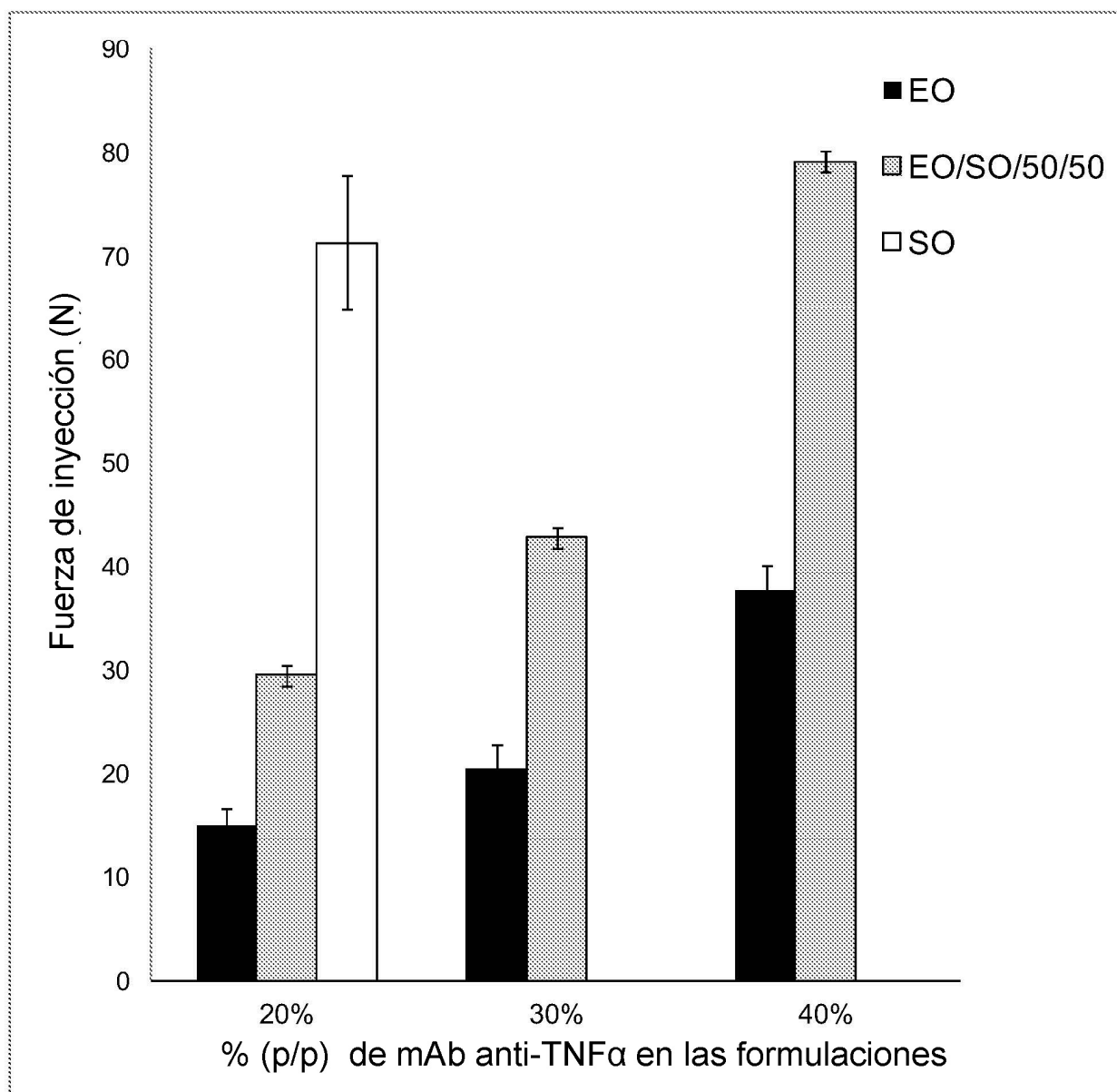


Figura 3B

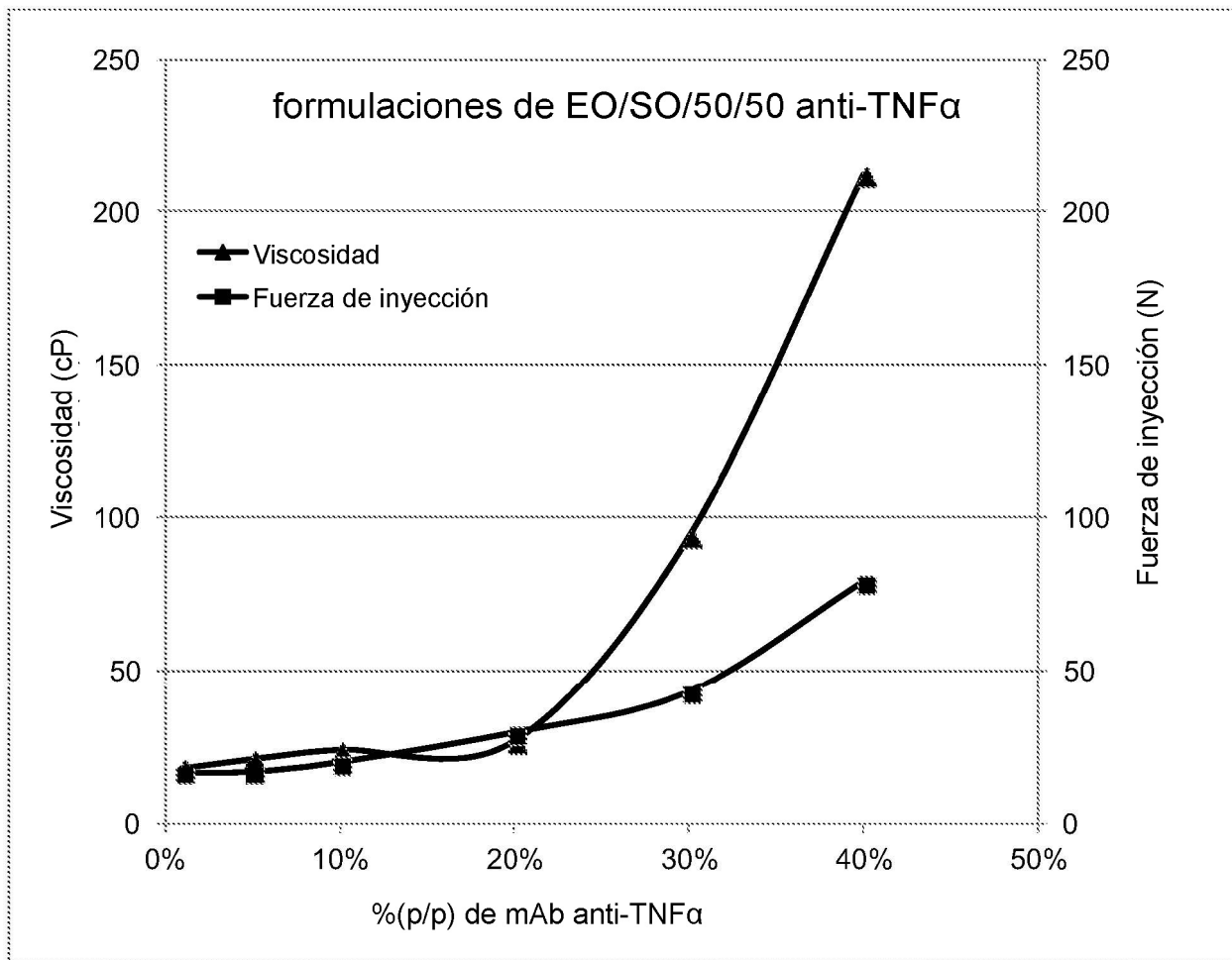


Figura 3C

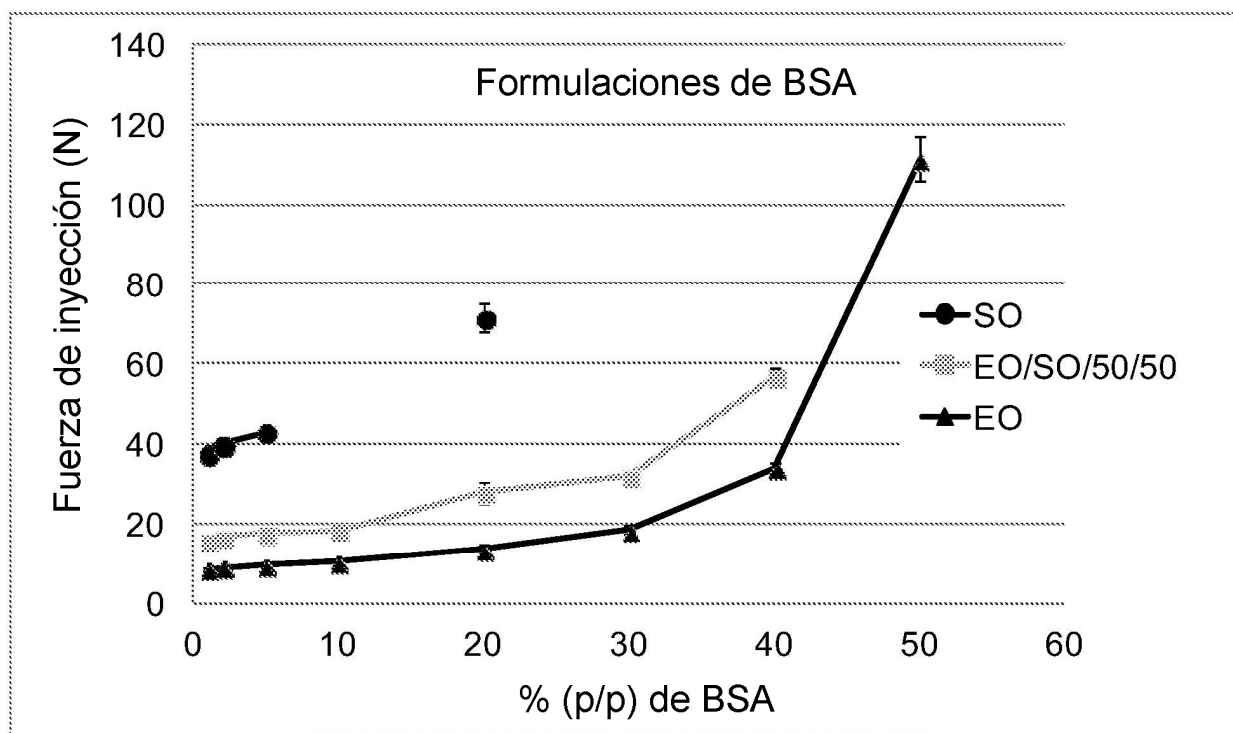


Figura 4A

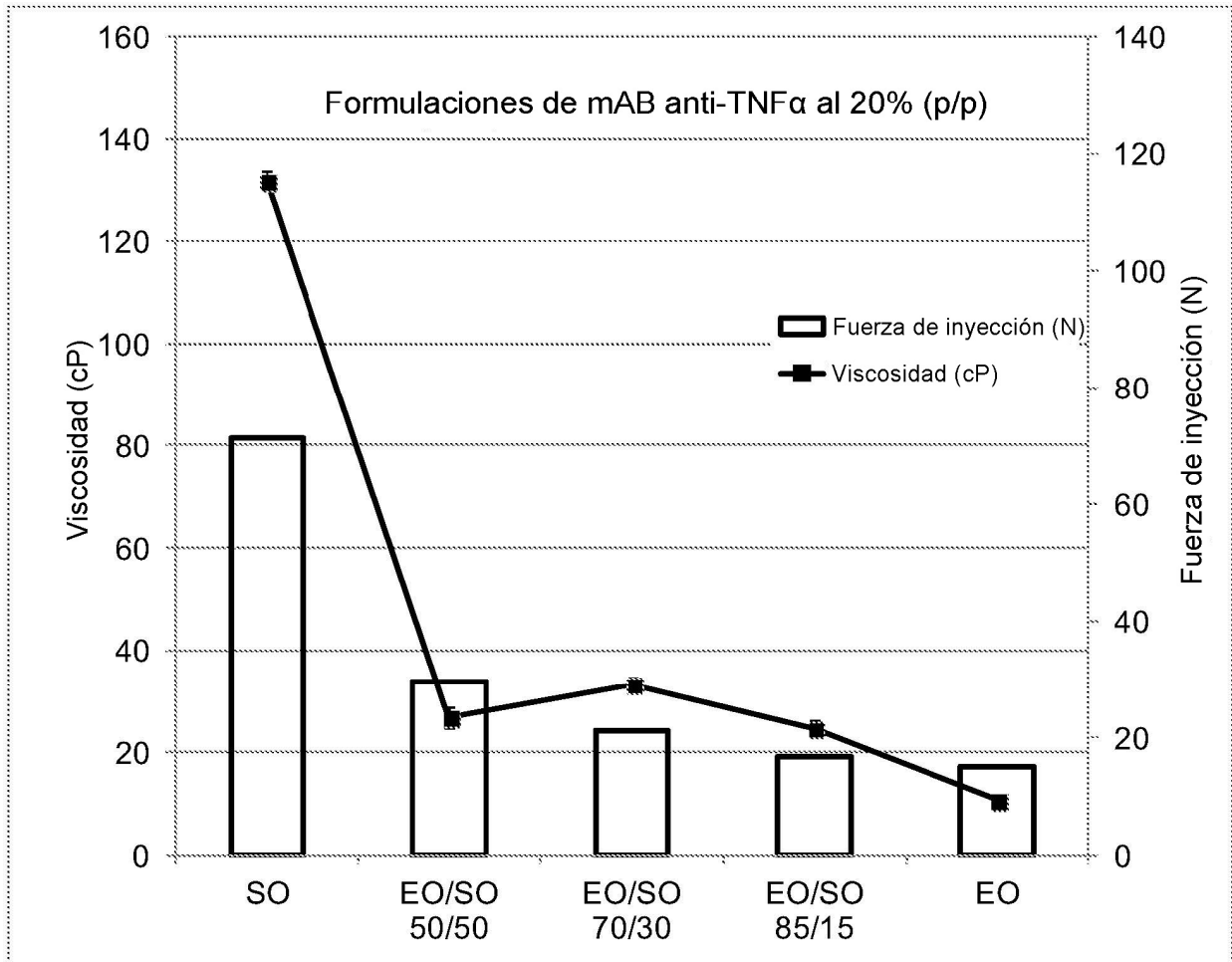


Figura 4B

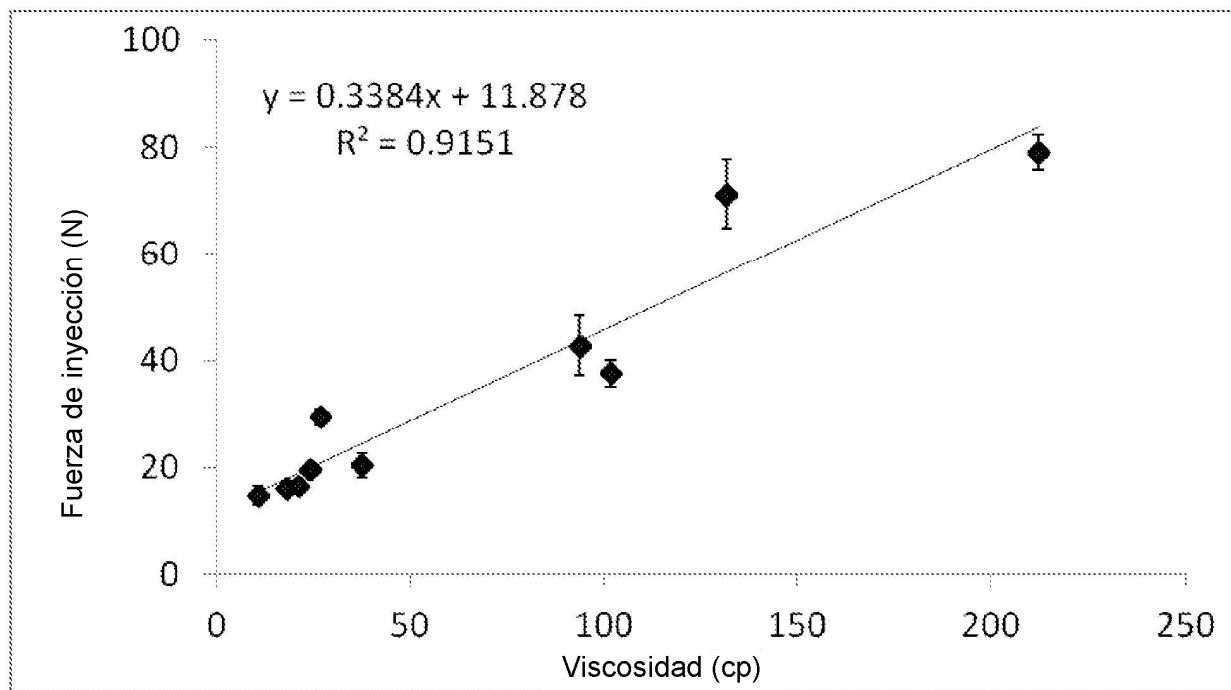


Figura 5

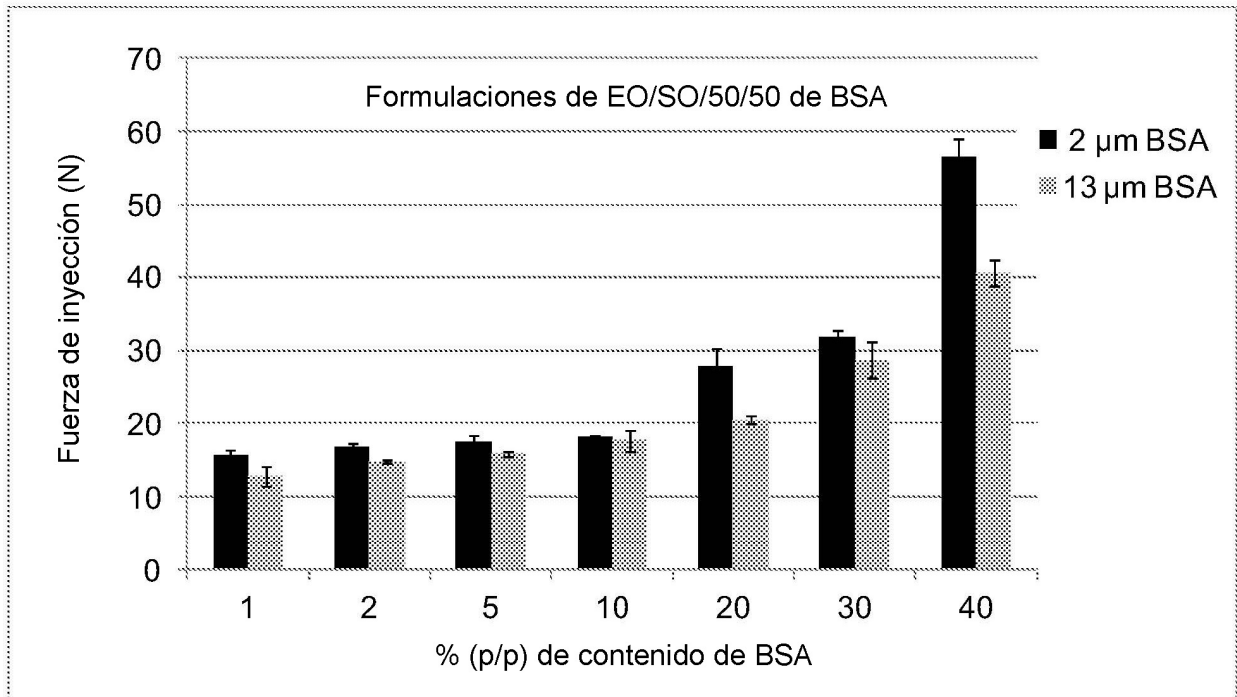


Figura 6A

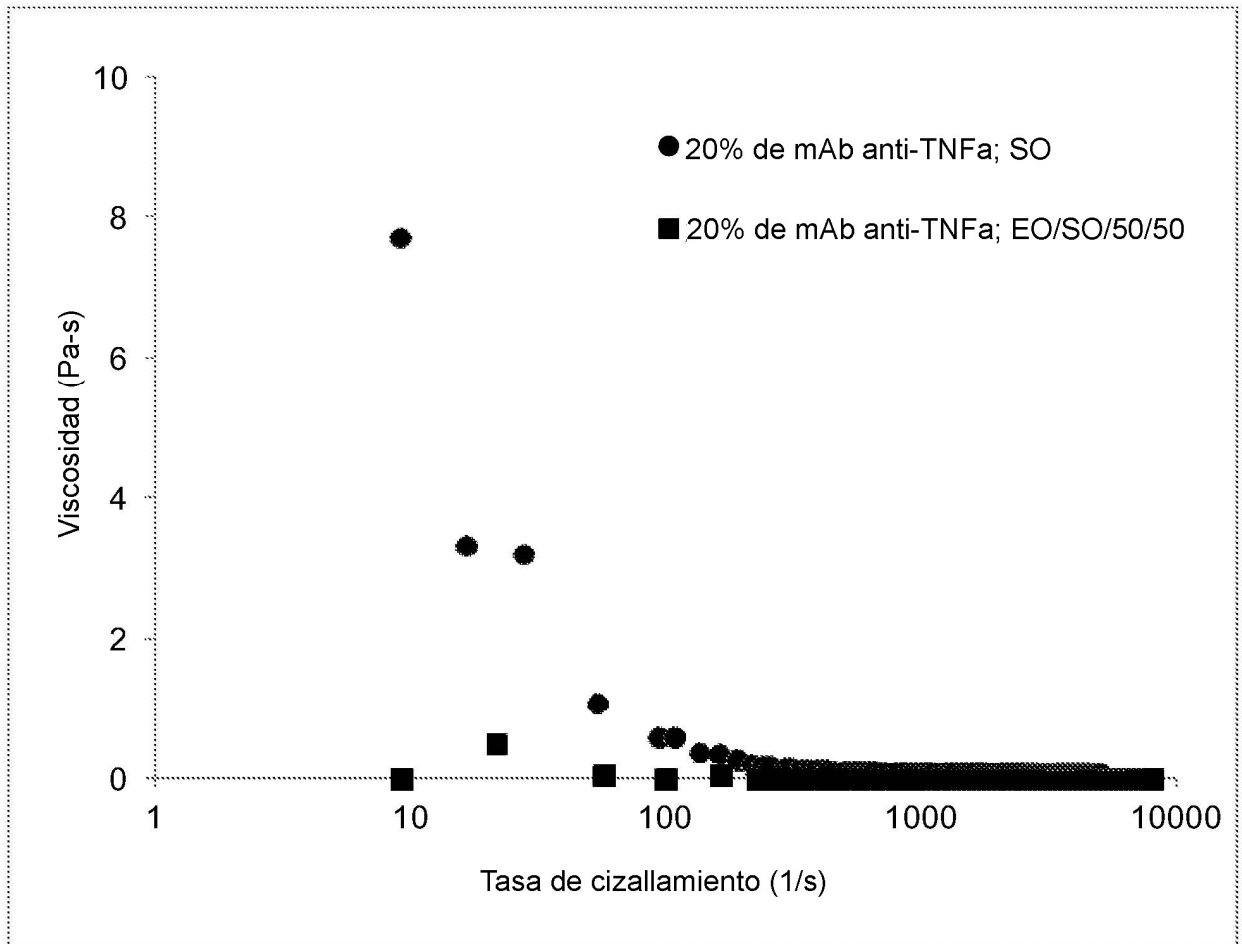


Figura 6B

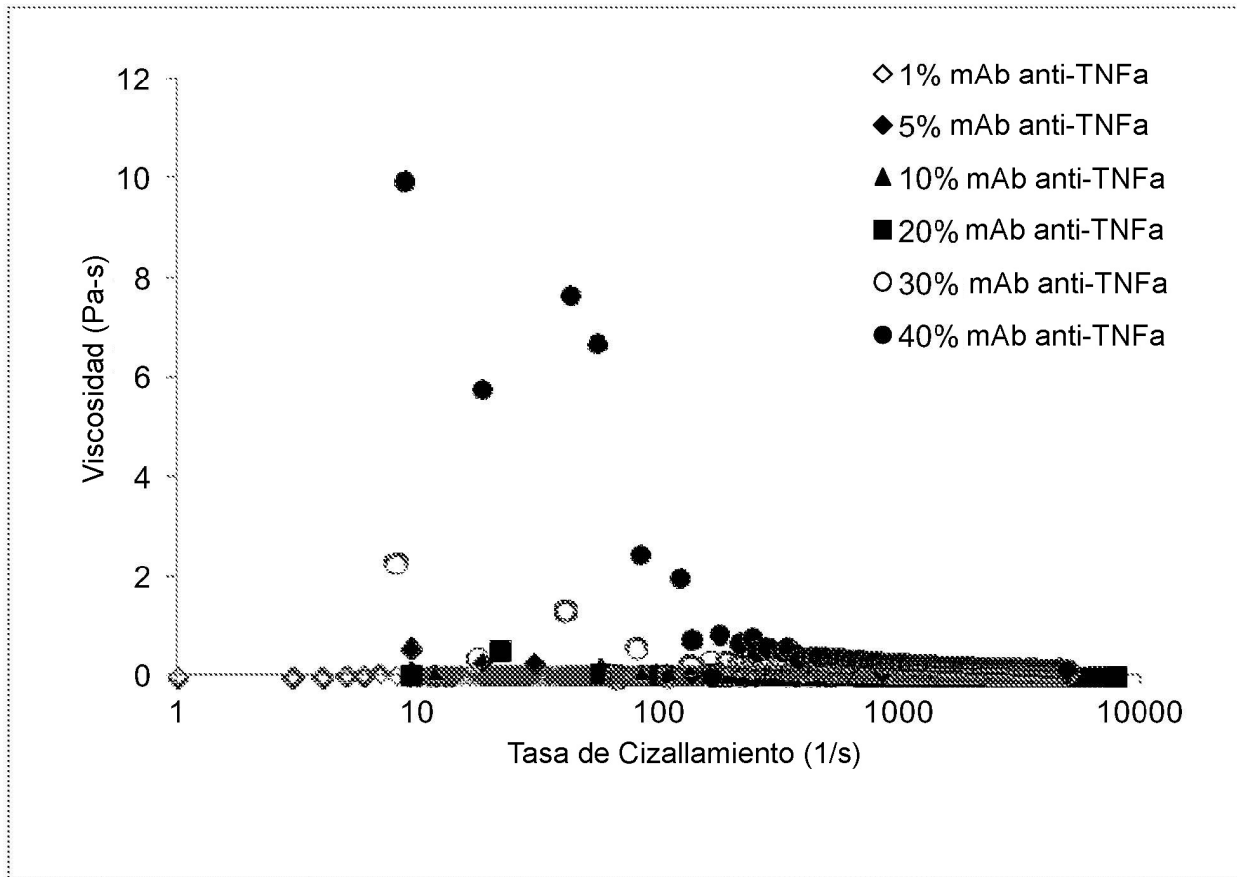


Figura 7A

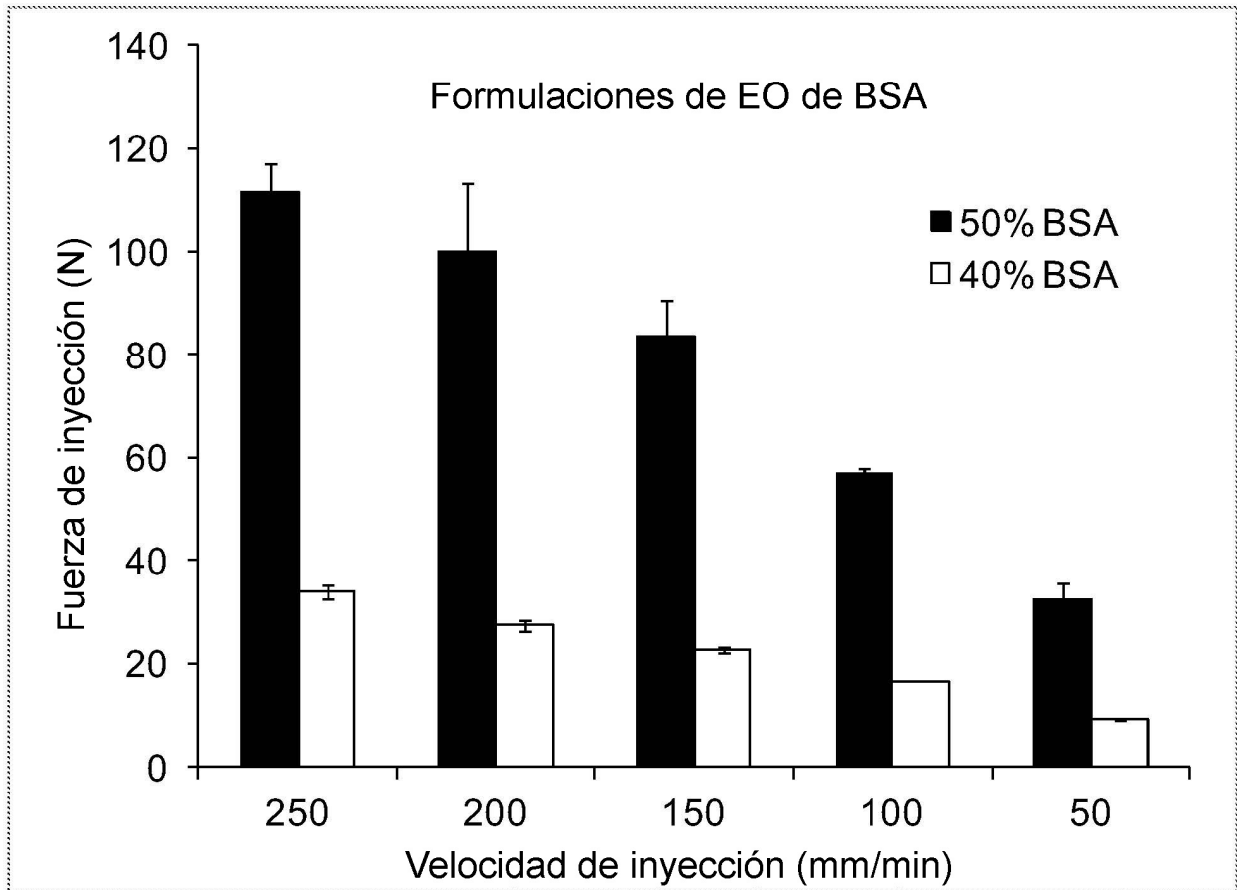


Figura 7B

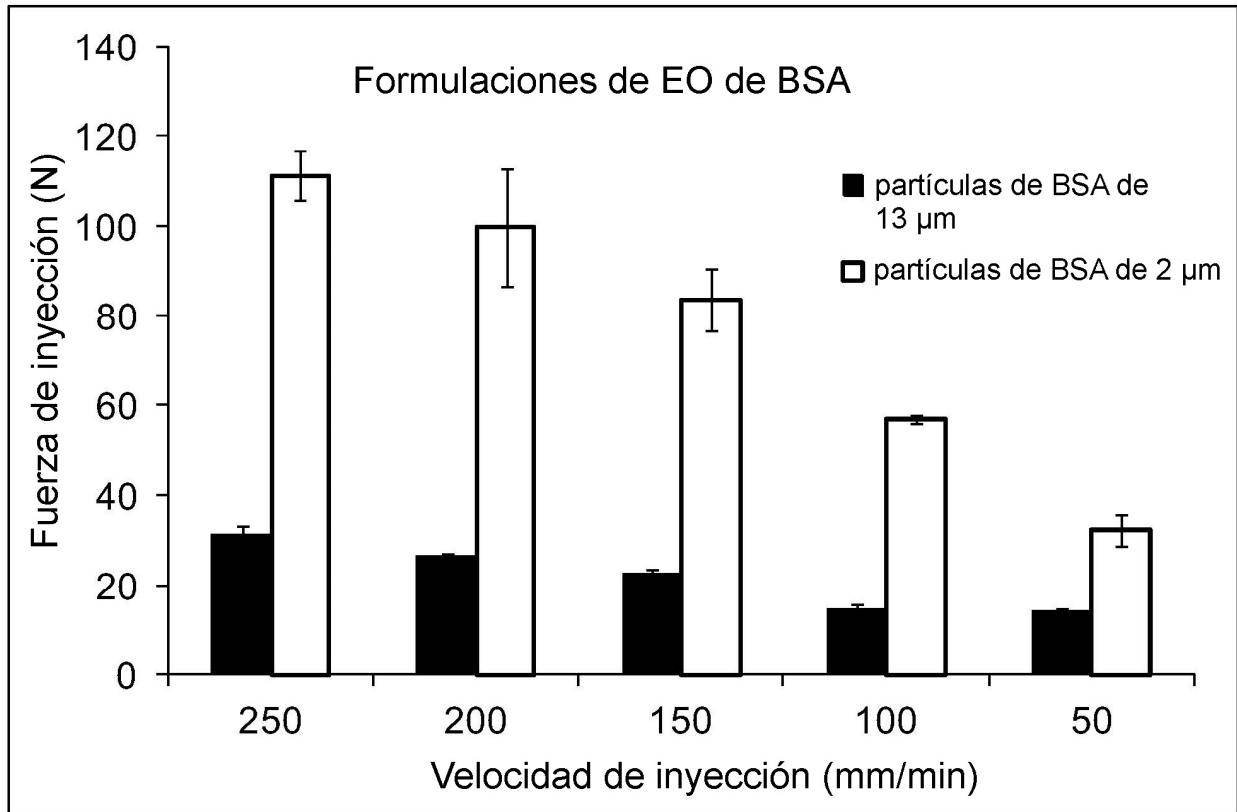


Figura 7C

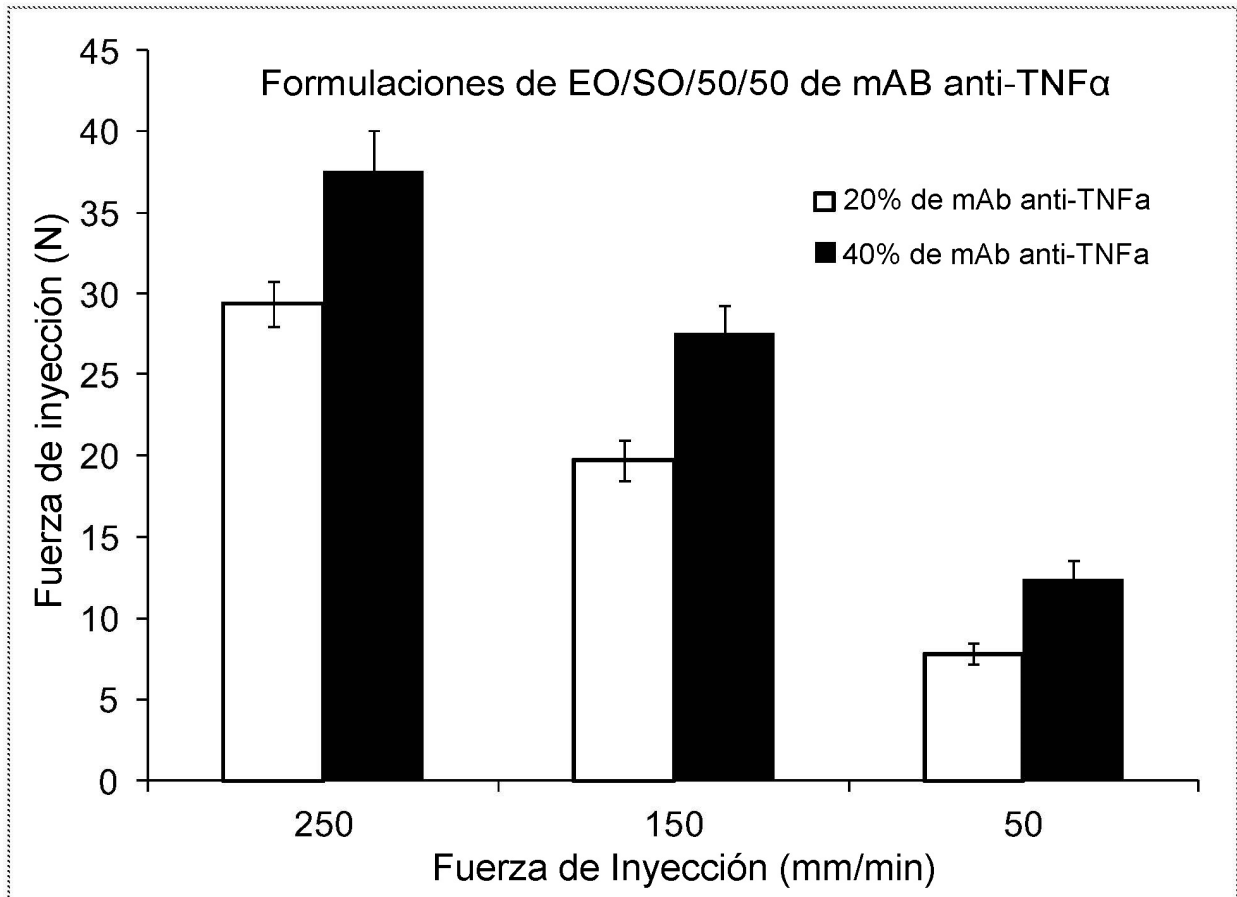


Figura 8A

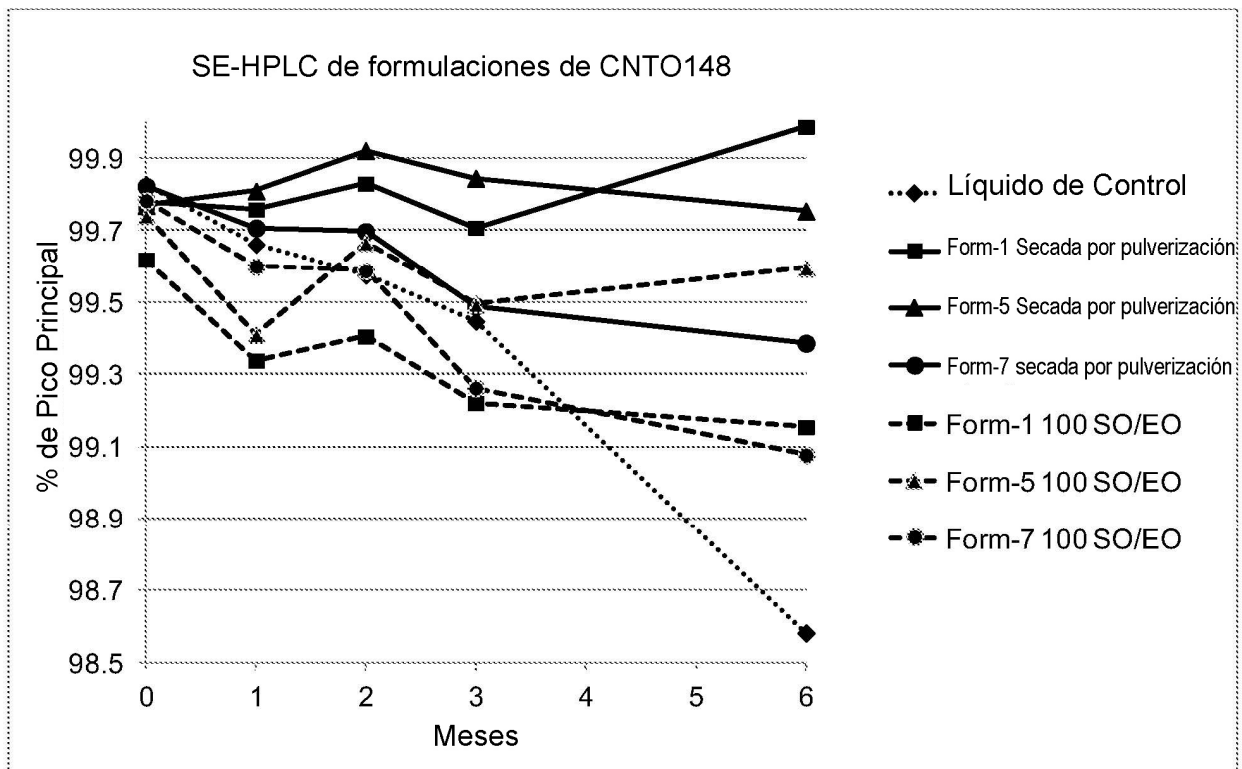


Figura 8B

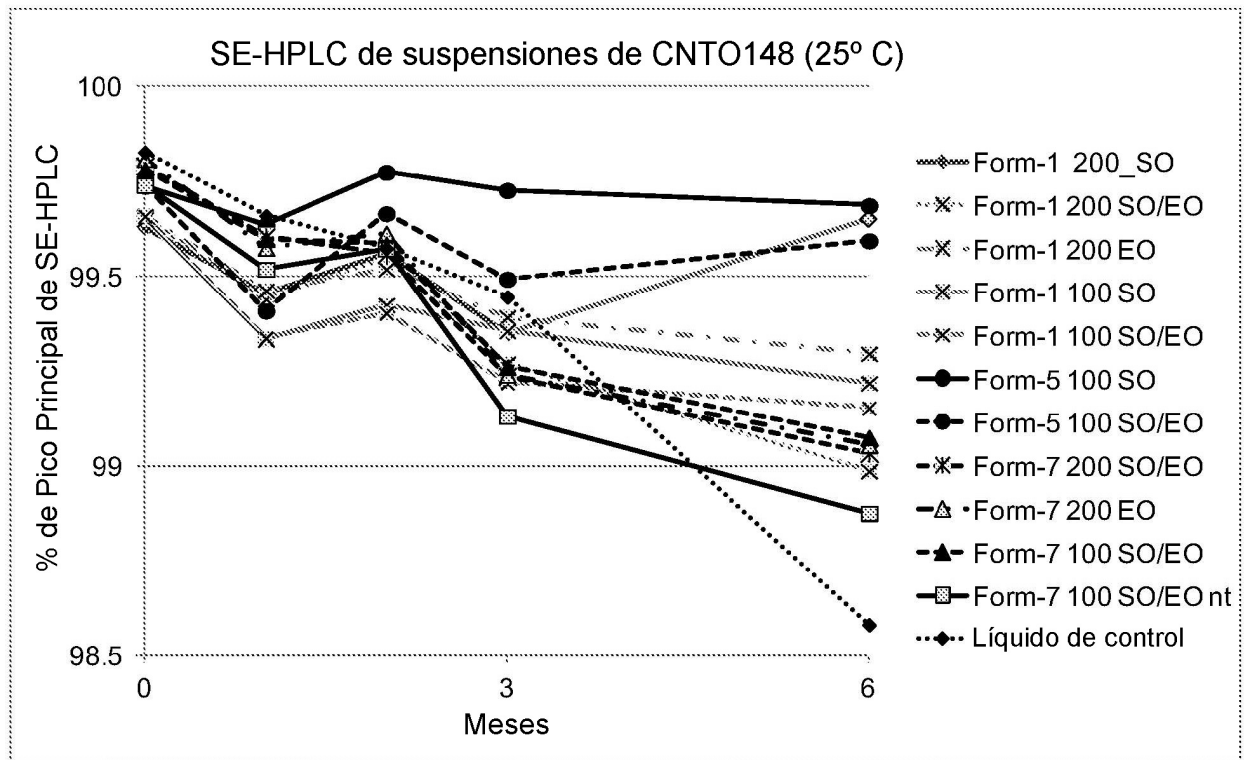


Figura 9A

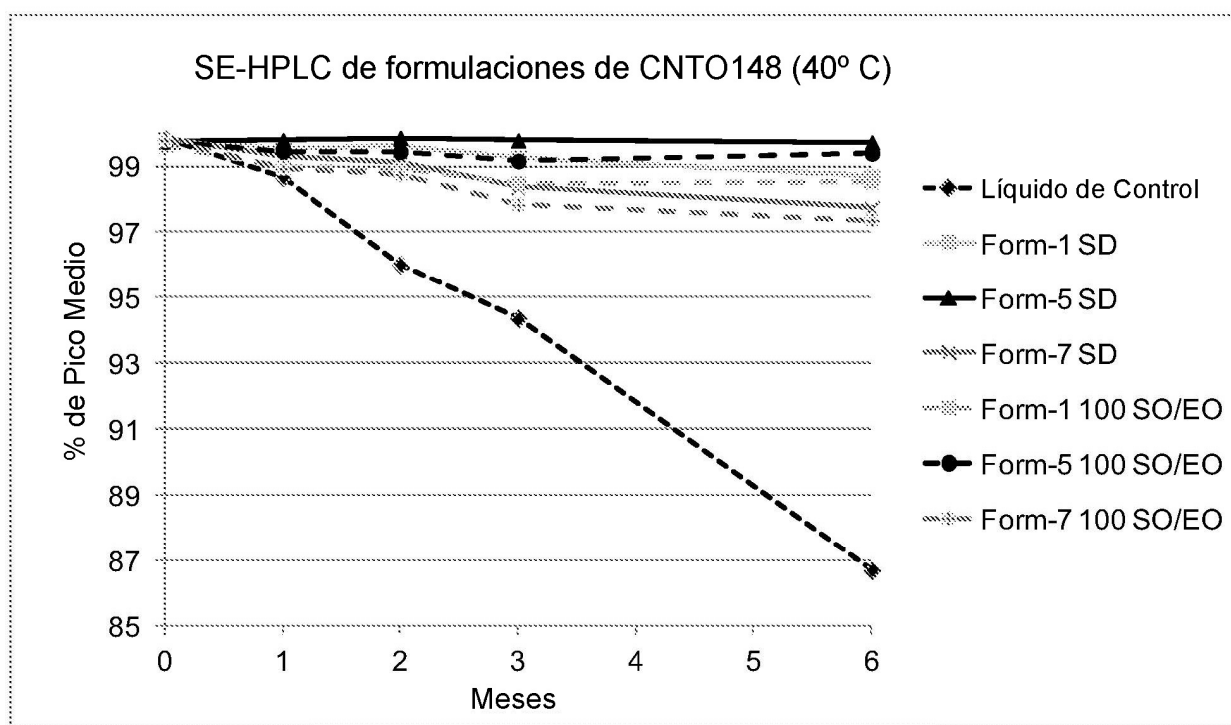


Figura 9B

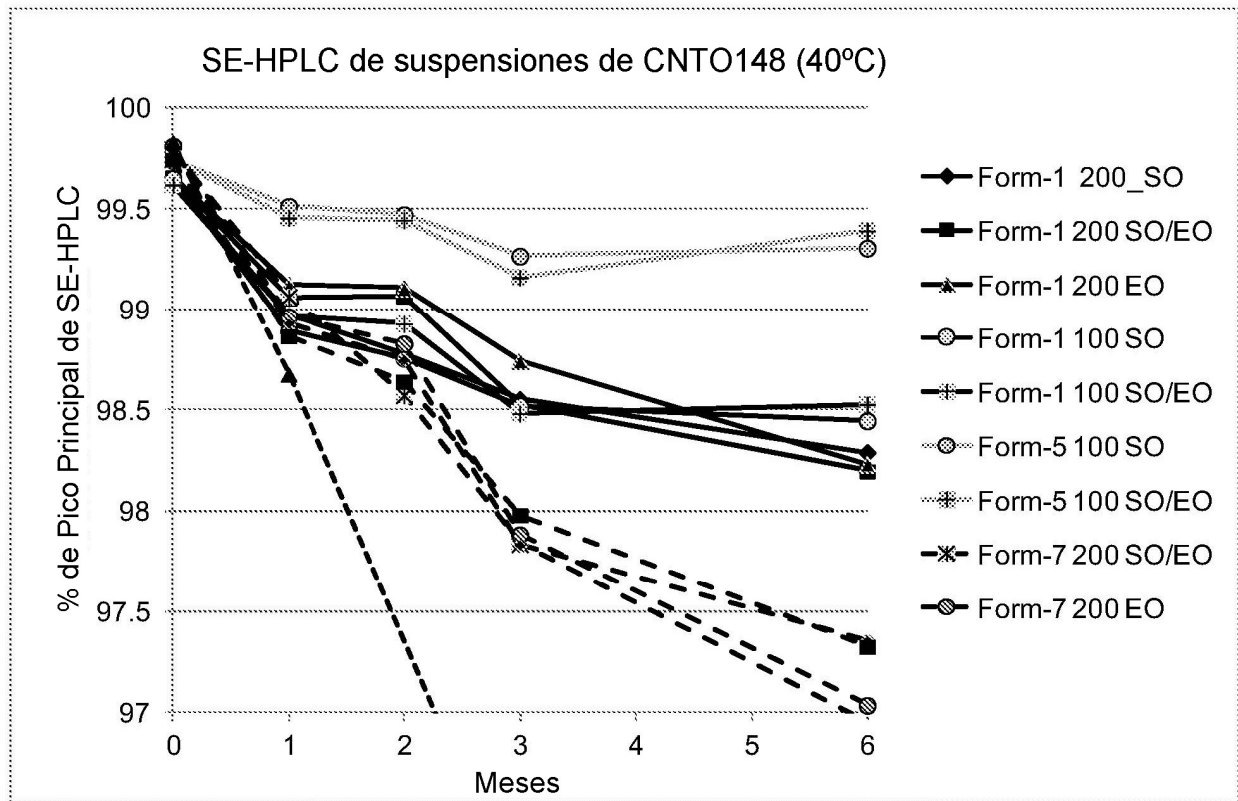


Figura 10

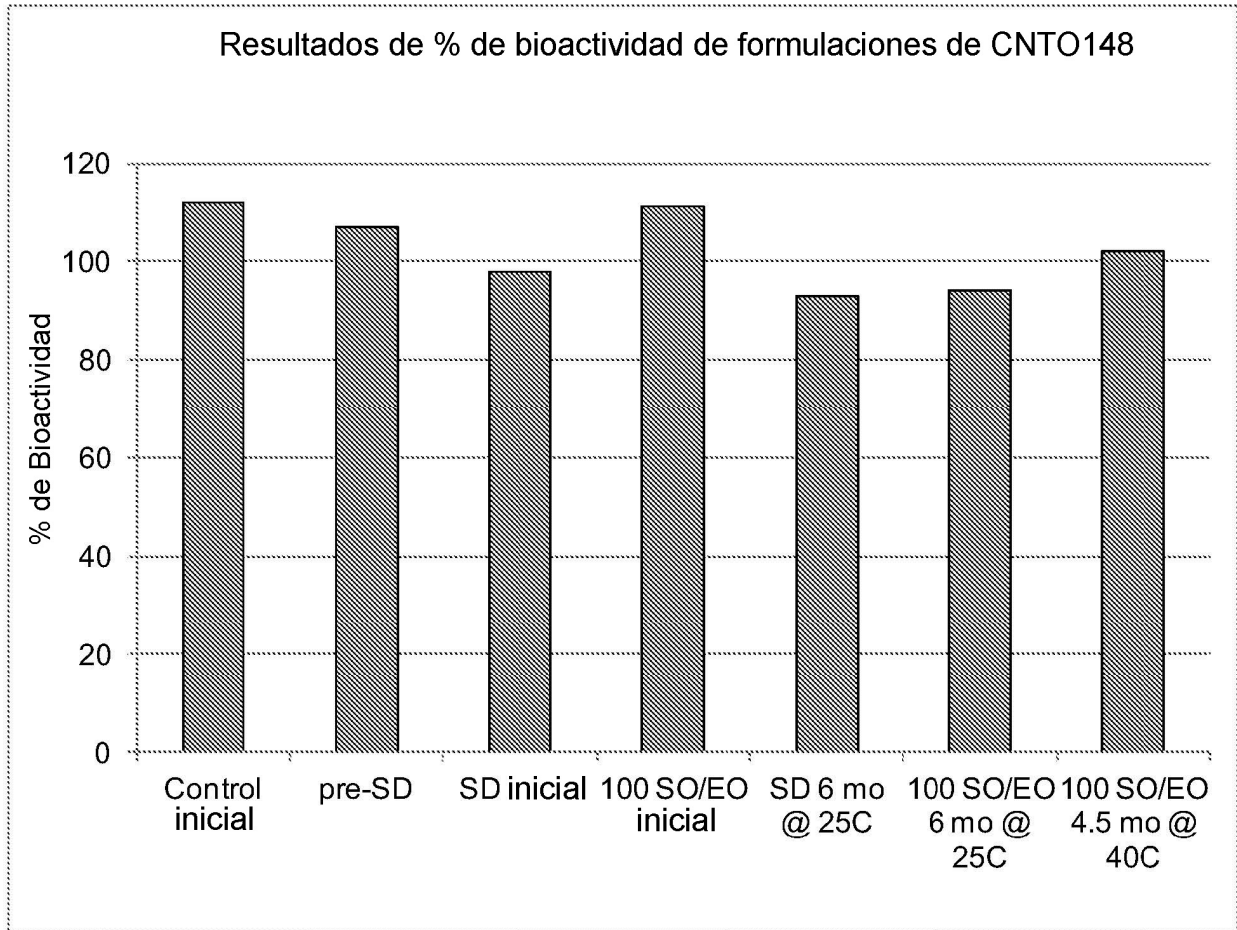


Figura 11

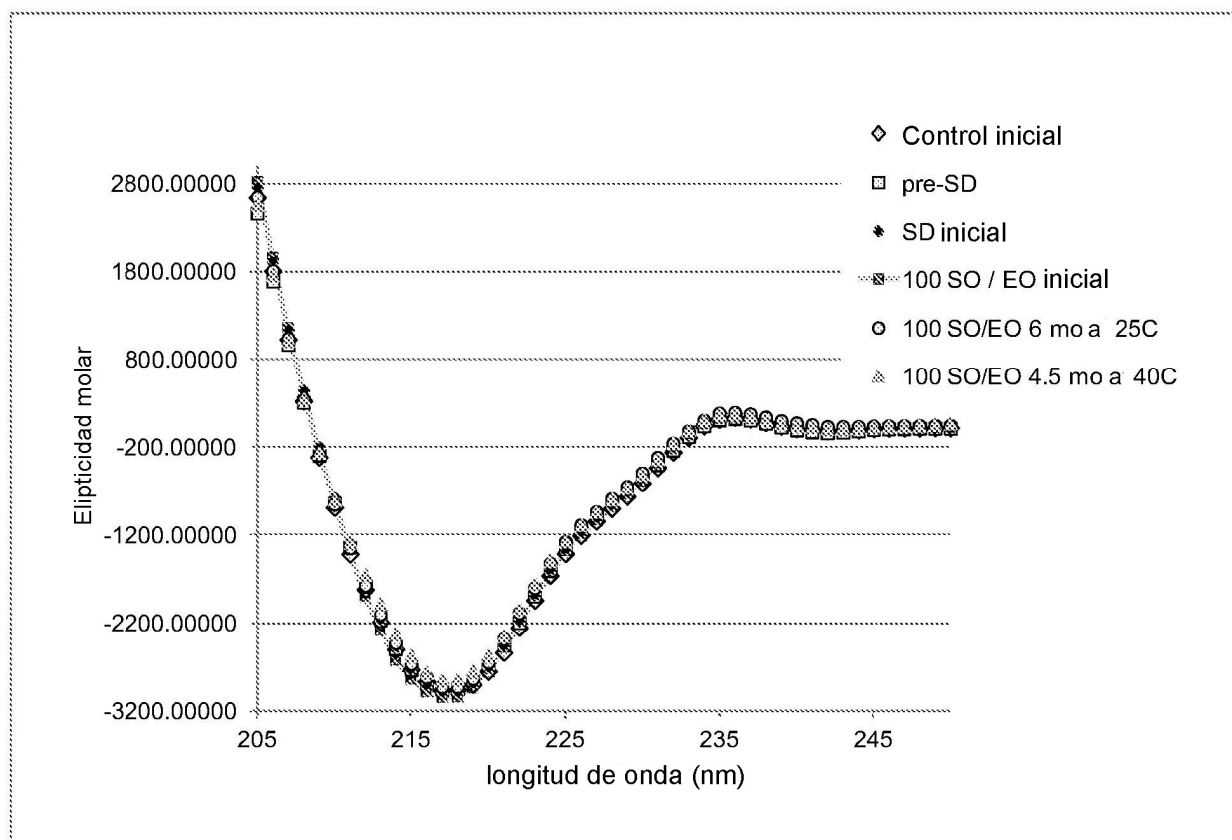


Figura 12A

TVN14 (1)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAIIILYDGSSKKY	(60)
TVN15	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAFILYDGSNKKY	
TVN148	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAFMSYDGSNKKY	
TVN148B	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAFMSYDGSNKKY	
TVN196	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAFISYDGSNKKK *****:*****:****.***	
TVN14 (61)	ADSVKDRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGISAGGNYYYYGMDVWGQGT	(120)
TVN15	ADSVKGRFTISRDN SKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGVSAGGNYYYYGMDVWGQGT	
TVN148	ADSVKGRFTISRDN PKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGIAAGGNYYYYGMDVWGQGT	
TVN148B	ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGIAAGGNYYYYGMDVWGQGT	
TVN196	ADSVKGRFTVSRDN SKNTLFLQMNSLRAEDTAVFYCARDRGIGAGGNYYYYGMDVWGQGT *****:***:****.***:***:*****:*****:*****	
TVN14 (121)	TVTVSS	(126)
TVN15	TVTVSS	
TVN148	TVTVSS	
TVN148B	TVTVSS	
TVN196	TVTVSS *****	

Figura 12B

TNV14	(1)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA	(60)
TNV15		EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA	
TNV148		EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA	
TNV148 (B)		EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA	
TNV196		EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA	

TNV14	(61)	RFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIK	(108)
TNV15		RFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIK	
TNV148		RFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIK	
TNV148 (B)		RFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIK	
TNV196		RFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIK	
