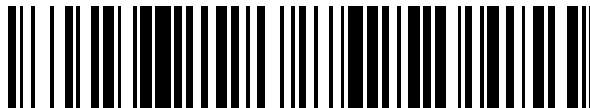


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 775 104**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/50** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61P 27/02** (2006.01)

**A61K 9/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.11.2012 PCT/US2012/065735**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.05.2013 WO13075068**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.11.2012 E 12795967 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.01.2020 EP 2790681**

54 Título: **Método de fabricación de una formulación farmacéutica de liberación prolongada que comprende micropartículas de proteínas recubiertas de polímero utilizando secado por pulverización**

30 Prioridad:

**18.11.2011 US 201161561525 P**

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

**23.07.2020**

73 Titular/es:

**REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.  
(100.0%)  
777 Old Saw Mill River Road  
Tarrytown, NY 10591 , US**

72 Inventor/es:

**CHEN, HUNTER y  
WALSH, SCOTT**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 775 104 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Método de fabricación de una formulación farmacéutica de liberación prolongada que comprende micropartículas de proteínas recubiertas de polímero utilizando secado por pulverización

5

### Campo

La invención se refiere a la fabricación, composición y a una proteína terapéutica de liberación prolongada. Específicamente, la invención se refiere a la fabricación, composición y uso de una pluralidad de microesferas de proteínas recubiertas con polímeros para la liberación prolongada y uniforme de proteínas en un entorno acuoso o fisiológico a lo largo del tiempo.

10

### Antecedentes

La liberación prolongada de una proteína terapéutica administrada hacia una diana biológica, como por ejemplo, la retina o un tumor, o administrada por vía parenteral es deseable para el tratamiento de muchas afecciones diferentes, incluidos cánceres, enfermedades cardiovasculares, afecciones vasculares, trastornos ortopédicos, trastornos dentales, heridas, enfermedades autoinmunes, trastornos gastrointestinales y enfermedades oculares. Los polímeros biocompatibles y biodegradables para el suministro controlado y prolongado de medicamentos han estado en uso durante décadas. A medida que el polímero se degrada con el tiempo, el fármaco terapéutico se libera lentamente.

15

20

En el caso de los terapéuticos intraoculares, existe una importante necesidad médica no satisfecha de formulaciones de liberación prolongada para administrar las proteínas terapéuticas de manera efectiva con el tiempo con la menor cantidad posible de inyecciones intraoculares. En el caso de otras enfermedades, tales como cáncer, enfermedades inflamatorias y otras enfermedades, existe la necesidad de formulaciones de liberación prolongada implantables mejoradas que contengan proteínas terapéuticas.

25

Los solicitantes han descubierto y desvelan y reivindican métodos de fabricación y uso de micropartículas que contienen un polímero biodegradable y una proteína terapéutica, que es capaz de liberar una cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína terapéutica de manera uniforme durante un período prolongado de tiempo.

30

También se hace referencia a los siguientes documentos:

- La patente US2011/0104151 A1 que se refiere a composiciones de micropartículas y métodos para tratar la degeneración macular relacionada con la edad.
- La patente US2008/0305115 A1 que se refiere a formas de dosificación de acción duradera y masa reducida.
- El documento WO03/092665 A2 que se refiere a sistemas de administración ocular de fármacos y sus usos.
- KIM BS ET AL, BIOMATERIALES, vol. 30 (5), 2009, p. 902-909 que se refiere a microcápsulas de PLGA cargadas con albúmina de suero bovino preparadas usando un atomizador ultrasónico de boquilla mono axial, para su uso en la administración *in vivo*.

35

40

### Sumario

En un aspecto, la invención proporciona un método para fabricar una micropartícula, que comprende un núcleo de proteína y una corteza de polímero. Por lo tanto, la presente invención proporciona un método para fabricar una composición farmacéutica de liberación prolongada que comprende una partícula de proteína recubierta con un polímero biodegradable, el método que comprende las etapas de:

45

(a) someter una solución de la proteína terapéutica a dispersión y secado mediante secado por pulverización para formar partículas de proteína micronizadas, en el que la temperatura de entrada del secador por pulverización se ajusta a una temperatura superior al punto de ebullición del agua, y la temperatura de salida se ajusta a una temperatura inferior al punto de ebullición del agua;

50

(b) suspender las partículas de proteína micronizadas en una solución orgánica que comprende un polímero biodegradable y un disolvente orgánico; y

55

(c) secar por pulverización la suspensión de (b) para formar una población de micropartículas de polímero de proteínas,

60

en el que las micropartículas en la composición farmacéutica de liberación prolongada liberan proteína durante al menos 60 días en un ambiente acuoso fisiológico a 37 °C.

En una realización, la micropartícula fabricada tiene un diámetro de aproximadamente dos micrómetros a aproximadamente 70 micrómetros, o un diámetro mediano de aproximadamente 15 micrómetros a aproximadamente 30 micrómetros.

65

La partícula de proteína de la etapa (a) es una partícula de proteína micronizada, que se obtiene mediante secado por pulverización de una solución que comprende la proteína. En algunas realizaciones, la solución de proteína se seca por pulverización mediante sonicación de doble boquilla, sonicación de una sola boquilla o electropulverización.

5 En algunas realizaciones, la partícula de proteína micronizada resultante, que forma el núcleo de la micropartícula fabricada, tiene un diámetro de aproximadamente dos micrómetros a aproximadamente 30 micrómetros, con un diámetro mediano de aproximadamente 10 micrómetros a aproximadamente 12 micrómetros.

10 En algunas realizaciones, la proteína que forma el núcleo es una proteína de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígeno es uno o más de un anticuerpo (por ejemplo, IgG) o fragmento de anticuerpo, un receptor o fragmento soluble del mismo, un fragmento de receptor soluble de células T, un fragmento de MHC soluble, una proteína de fusión del receptor Fc, una proteína de tipo Trap y una proteína VEGF-Trap. En una realización específica, la proteína es una VEGF-Trap que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 1.

15 En una realización, el disolvente se elimina en la etapa (c) creando una dispersión de la mezcla de proteína-polímero-disolvente de la etapa (b) y permitiendo que el disolvente se evapore de las gotas creadas por la dispersión. La dispersión se crea mediante secado por pulverización, que puede realizarse mediante sonicación de doble boquilla, sonicación de una sola boquilla o electropulverización. En una realización, el disolvente se elimina de las gotas aplicando calor o aire, o mediante extracción química.

20 En una realización, el polímero es biodegradable, bioerosionable y/o biocompatible. En algunas realizaciones, el polímero es uno cualquiera o más de ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), copolímero poliláctico-poliglicólico (PLGA), poli-D,L-láctido-co-glicólido (PLGA), PLGA-fumarato de óxido de etileno, PLGA-alfa-tocoferil succinato esterificado a polietilenglicol 1000 (PLGA-TGPS), polianhídrido poli [1,6-bis (p-carboxifenoxi) hexano] (pCPH), poli (ácido hidroxibutírico-ácido cohidroxivalérico) (PHB-PVA), copolímero de polietilenglicol-poli (ácido láctico) (PEG-PLA), poli-ε-caprolactona (PCL), poli-alquil-ciano-acrilato (PAC), poli(etil)cianoacrilato (PEC), poliisobutil-cianoacrilato, poli-N-(2-hidroxiopropil) metacrilamida (poli (HPMA)), poli-β-R-hidroxibutirato (PHB), poli-β-R-hidroxialcanoato (PHA), poli-β-R-ácido málico, polímeros de fosfolípidos y colesterol, 2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina/polietilenglicol-distearoilfosfatidiletanolamina (DOPC/PEG-DSPE)/colesterol, polisacáridos, celulosa, etilcelulosa, metilcelulosa, alginatos, dextrano, y polímeros de hidrogel de dextrano, amilosa, inulina, pectina y goma guar, quitosano, quitina, heparina, ácido hialurónico, polirrotaxanos y poliseudorrotaxanos basados en ciclodextrina (CD), poliaspartatos, poliglutamatos, polileucina, copolímeros de leucina-glutamato, succinato de polibutileno (PBS), gelatina, colágenos, fibrinas, fibroína, poliortoésteres, copolímero de poliortoésteres-poliamidina, copolímeros de poliortoésteres-diamina, poliortoésteres que incorporan ácidos latentes, copolímero de poli (etilenglicol)/poli (tereftalato de butileno) y sus combinaciones y copolímeros. En una realización, el polímero es poli-ε-caprolactona (PCL) o un derivado o copolímero de la misma. En una realización, el polímero es PLGA o un derivado o copolímero del mismo. En una realización, el polímero es etilcelulosa o un derivado o copolímero de la misma. En una realización, el polímero es poliortoéster, o un derivado del mismo, que contiene elementos lábiles a ácidos. En otra realización, el polímero es PLA.

45 En un aspecto, el método proporcionado para fabricar una micropartícula comprende las etapas de (1) formar una partícula de proteína micronizada que tiene un diámetro de aproximadamente dos micrómetros a aproximadamente 30 micrómetros, con un diámetro mediano de aproximadamente 10 micrómetros a 12 micrómetros, mediante secado por pulverización de una solución que contiene una proteína, en la que la proteína es una proteína de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígeno es uno cualquiera o más de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, un receptor o fragmento soluble del mismo, un fragmento de receptor soluble de células T, un fragmento de MHC soluble, una proteína de fusión del receptor Fc, una proteína de tipo Trap y una proteína VEGF-Trap (por ejemplo, una que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 1); (2) suspender la partícula de proteína micronizada en una solución que comprende el polímero y un disolvente, en el que el polímero es uno o más de un polímero biodegradable, un polímero bioerosionable, un polímero biocompatible, ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), copolímero poliláctico-poliglicólico (PLGA), poli-D,L-láctido-co-glicólido (PLGA), PLGA-fumarato de óxido de etileno, succinato de PLGA-alfa-tocoferil esterificado a polietilenglicol 1000 (PLGA-TGPS), polianhídrido poli [1,6-bis (p-carboxifenoxi) hexano] (pCPH), poli (ácido hidroxibutírico-ácido cohidroxivalérico) (PHB-PVA), copolímero de polietilenglicol-poli (ácido láctico) (PEG-PLA), poli-ε-caprolactona (PCL), poli-alquil-ciano-acrilato (PAC), poli(etil)cianoacrilato (PEC), poliisobutil-cianoacrilato, poli-N-(2-hidroxiopropil) metacrilamida (poli (HPMA)), poli-β-R-hidroxibutirato (PHB), poli-β-R-hidroxialcanoato (PHA), poli-β-R-ácido málico, polímeros de fosfolípidos y colesterol, 2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina/polietilenglicol-distearoilfosfatidiletanolamina (DOPC/PEG-DSPE)/colesterol, polisacáridos, celulosa, etilcelulosa, metilcelulosa, alginatos, dextrano, y polímeros de hidrogel de dextrano, amilosa, inulina, pectina y goma guar, quitosano, quitina, heparina, ácido hialurónico, polirrotaxanos y poliseudorrotaxanos basados en ciclodextrina (CD), poliaspartatos, poliglutamatos, polileucina, copolímeros de leucina-glutamato, succinato de polibutileno (PBS), gelatina, colágenos, fibrinas, fibroína, poliortoésteres, copolímero de poliortoésteres-poliamidina, copolímeros de poliortoésteres-diamina, poliortoésteres que incorporan ácidos latentes, copolímero de poli (etilenglicol)/poli (tereftalato de butileno) y sus combinaciones y copolímeros; y (3) eliminar el disolvente mediante secado por pulverización de una suspensión micronizada de partículas de proteína y polímero-disolvente y eliminar el disolvente aplicando calor o aire, o extrayendo el disolvente, en el que se forma una

micropartícula que tiene un diámetro de aproximadamente dos micrómetros a aproximadamente 70 micrómetros, con un diámetro mediano de aproximadamente 15 micrómetros a aproximadamente 30 micrómetros, y que comprende un núcleo de proteína y una corteza de polímero

- 5 En algunas realizaciones, el secado por pulverización de la etapa (1) o la etapa (3) se realiza mediante sonicación de doble boquilla, sonicación de una sola boquilla o electropulverización.

10 En una realización, el método de fabricación de la micropartícula comprende las etapas de (1) formar una partícula de VEGF-Trap micronizada que tiene un diámetro de aproximadamente 10 micrómetros a 12 micrómetros mediante secado por pulverización de una solución que contiene una proteína VEGF-Trap; (2) suspender la partícula de VEGF-Trap micronizada en una solución que comprende poliortoéster que incorpora un ácido latente y un disolvente compatible, o etilcelulosa y un disolvente compatible; y (3) eliminar el disolvente mediante (a) secado por pulverización de la suspensión micronizada de partículas de VEGF-Trap-poliortoéster-ácido latente-disolvente o la suspensión micronizada de partículas de VEGF-Trap-etil celulosa-disolvente y (b) eliminar el disolvente aplicando calor o aire, o extrayendo el disolvente, en el que se forma una micropartícula que tiene un diámetro de aproximadamente 15 micrómetros a aproximadamente 30 micrómetros, y que comprende un núcleo de VEGF-Trap y una corteza polimérica de poliortoéster, y sus copolímeros o derivados.

20 También se desvela una micropartícula que comprende una proteína recubierta con un polímero. En un caso, la micropartícula tiene un diámetro de aproximadamente 2 micrómetros a aproximadamente 70 micrómetros. En un caso, la micropartícula tiene un diámetro de aproximadamente 15 micrómetros.

25 En un caso, la proteína es una proteína de unión a antígeno. En un caso, la proteína comprende un dominio Fc. En un caso, la proteína comprende un dominio receptor. En un caso, la proteína es un anticuerpo. En otro caso, la proteína es una proteína de fusión del receptor Fc. En otro caso, la proteína es una proteína de tipo Trap, que comprende un fragmento de receptor cognado y un dominio Fc. En un caso particular, la proteína es una proteína VEGF-Trap. En un caso, la proteína VEGF-Trap comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 1.

30 En un caso, el polímero es un polímero biodegradable. En algunas realizaciones, el polímero se selecciona del grupo que consiste en ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), copolímero poliláctico-poliglicólico (PLGA), poli-D,L-láctido-co-glicólido (PLGA), PLGA-fumarato de óxido de etileno, succinato de PLGA-alfa-tocoferil esterificado a polietilenglicol 1000 (PLGA-TGPS), polianhídrido poli [1,6-bis (p-carboxifenoxi) hexano] (pCPH), poli (ácido hidroxibutírico-ácido cohidroxivalérico) (PHB-PVA), copolímero de polietilenglicol-poli (ácido láctico) (PEG-PLA), poli-ε-caprolactona (PCL), poli-alquil-ciano-acrilato (PAC), poli(etil)cianoacrilato (PEC), poliisobutil-35 cianoacrilato, poli-N-(2-hidroxipropil) metacrilamida (poli (HPMA)), poli-β-R-hidroxibutirato (PHB), poli-β-R-hidroxialcanoato (PHA), poli-β-R-ácido málico, polímeros de fosfolípidos y colesterol, 2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina/polietilenglicol-distearoilfosfatidiletanolamina (DOPC/PEG-DSPE)/colesterol, polisacáridos, celulosa, etilcelulosa, metilcelulosa, alginatos, dextrano, y polímeros de hidrogel de dextrano, amilosa, inulina, pectina y goma 40 guar, quitosano, quitina, heparina, ácido hialurónico, polirrotaxanos y poliseudorrotaxanos basados en ciclodextrina (CD), poliaspartatos, poliglutamatos, polileucina, copolímeros de leucina-glutamato, succinato de polibutileno (PBS), gelatina, colágenos, fibrinas, fibroína, poliortoésteres, copolímero de poliortoésteres-poliamidina, copolímeros de poliortoésteres-diamina, poliortoésteres que incorporan ácidos latentes, copolímero de poli (etilenglicol)/poli (tereftalato de butileno) y sus combinaciones y copolímeros. En un caso, el polímero es poli-ε-caprolactona (PCL) o 45 un derivado o copolímero de la misma. En un caso, el polímero es PLGA o un derivado o copolímero del mismo. En una realización, el polímero es etilcelulosa o un derivado o copolímero de la misma. En un caso, el polímero es poliortoéster o un derivado o copolímero del mismo.

50 En un caso, la micropartícula comprende un núcleo de proteína micronizada de menos de diez micrómetros y una corteza de polímero. En un caso, el núcleo de proteína micronizada está recubierto al menos al 50 % con polímero, lo que significa que no está expuesto más del 50 % de la superficie del núcleo de proteína micronizada. En un caso, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 99 % o el 100 % de la superficie del núcleo de proteína micronizada está recubierta con polímero.

55 En un caso, la micropartícula de más de 10 micrómetros de tamaño comprende (a) un núcleo de proteína micronizada de menos de 10 micrómetros, en el que la proteína es uno o más de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, un receptor o fragmento soluble del mismo, un fragmento de receptor de células T soluble, un fragmento de MHC soluble, una proteína de fusión del receptor Fc, una proteína de tipo Trap y una proteína VEGF-Trap; y (b) una cubierta polimérica, en la que el polímero es uno o más de un polímero biocompatible, un polímero 60 biodegradable, un polímero bioerosionable, ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), copolímero poliláctico-poliglicólico (PLGA), poli-D,L-láctido-co-glicólido (PLGA), PLGA-fumarato de óxido de etileno, succinato de PLGA-alfa-tocoferil esterificado a polietilenglicol 1000 (PLGA-TGPS), polianhídrido poli [1,6-bis (p-carboxifenoxi) hexano] (pCPH), poli (ácido hidroxibutírico-ácido cohidroxivalérico) (PHB-PVA), copolímero de polietilenglicol-poli (ácido láctico) (PEG-PLA), poli-ε-caprolactona (PCL), poli-alquil-ciano-acrilato (PAC), poli(etil)cianoacrilato (PEC), 65 poliisobutil-cianoacrilato, poli-N-(2-hidroxipropil) metacrilamida (poli (HPMA)), poli-β-R-hidroxibutirato (PHB), poli-β-R-hidroxialcanoato (PHA), poli-β-R-ácido málico, polímeros de fosfolípidos y colesterol, 2-dioleoil-sn-glicero-3-

fosfatidilcolina/polietilenglicol-distearoilfosfatidiletanolamina (DOPC/PEG-DSPE)/colesterol, polisacáridos, celulosa, etilcelulosa, metilcelulosa, alginatos, dextrano, y polímeros de hidrogel de dextrano, amilosa, inulina, pectina y goma guar, quitosano, quitina, heparina, ácido hialurónico, polirrotaxanos y poliseudorrotaxanos basados en ciclodextrina (CD), poliaspartatos, poliglutamatos, polileucina, copolímeros de leucina-glutamato, succinato de polibutileno (PBS),  
 5 gelatina, colágenos, fibrinas, fibroína, poliortoésteres, copolímero de poliortoésteres-poliamidina, copolímeros de poliortoésteres-diamina, poliortoésteres que incorporan ácidos latentes, copolímero de poli (etilenglicol)/poli (tereftalato de butileno) y sus combinaciones y copolímeros.

En un caso, la micropartícula de un diámetro promedio de aproximadamente 15 micrómetros a aproximadamente 30 micrómetros comprende (a) un núcleo de proteína micronizada de aproximadamente 10 a aproximadamente 12 micrómetros, en el que la proteína es una proteína VEGF-Trap; y (b) una cubierta polimérica, en la que el polímero es uno cualquiera o más de PCL, PLGA, etilcelulosa y poliortoéster, y sus copolímeros o derivados.

También se desvela una pluralidad de micropartículas, que varían en tamaño de aproximadamente dos micrómetros a aproximadamente 70 micrómetros, y que comprenden un núcleo de proteína micronizada de aproximadamente dos micrómetros a aproximadamente 30 micrómetros, y una corteza de polímero.

En un caso, la proteína es una proteína de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígeno es uno o más de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, un receptor o fragmento soluble del mismo, un fragmento de receptor soluble de células T, un fragmento de MHC soluble, una proteína de fusión del receptor Fc, una proteína de tipo Trap y una proteína VEGF-Trap. En una realización, la proteína comprende un dominio Fc. En un caso, la proteína es un anticuerpo. En otro caso, la proteína es una proteína de fusión del receptor Fc. En otra realización, la proteína es una proteína de tipo Trap, que comprende un fragmento de receptor cognado y un dominio Fc. En un caso particular, la proteína es una proteína VEGF-Trap. En un caso específico, la proteína VEGF-Trap comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 1.

En un caso, el polímero es un polímero biocompatible. En una realización, el polímero es un polímero bioerosionable. En un caso, el polímero es un polímero biodegradable. En algunas realizaciones, el polímero se selecciona del grupo que consiste en ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), copolímero poliláctico-poliglicólico (PLGA), poli-D,L-láctido-co-glicólido (PLGA), PLGA-fumarato de óxido de etileno, succinato de PLGA-alfa-tocoferil esterificado a polietilenglicol 1000 (PLGA-TGPS), polianhídrido poli [1,6-bis (p-carboxifenoxi) hexano] (pCPH), poli (ácido hidroxibutírico-ácido cohidroxivalérico) (PHB-PVA), copolímero de polietilenglicol-poli (ácido láctico) (PEG-PLA), poli-ε-caprolactona (PCL), poli-alquil-ciano-acrilato (PAC), poli(etil)cianoacrilato (PEC), poliisobutil-cianoacrilato, poli-N-(2-hidroxiopropil) metacrilamida (poli (HPMA)), poli-β-R-hidroxibutirato (PHB), poli-β-R-hidroxialcanoato (PHA), poli-β-R-ácido málico, polímeros de fosfolípidos y colesterol, 2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina/polietilenglicol-distearoilfosfatidiletanolamina (DOPC/PEG-DSPE)/colesterol, polisacáridos, celulosa, etilcelulosa, metilcelulosa, alginatos, dextrano, y polímeros de hidrogel de dextrano, amilosa, inulina, pectina y goma guar, quitosano, quitina, heparina, ácido hialurónico, polirrotaxanos y poliseudorrotaxanos basados en ciclodextrina (CD), poliaspartatos, poliglutamatos, polileucina, copolímeros de leucina-glutamato, succinato de polibutileno (PBS),  
 30 gelatina, colágenos, fibrinas, fibroína, poliortoésteres, copolímero de poliortoésteres-poliamidina, copolímeros de poliortoésteres-diamina, poliortoésteres que incorporan ácidos latentes, copolímero de poli (etilenglicol)/poli (tereftalato de butileno) y sus combinaciones y copolímeros. En un caso, el polímero es poli-ε-caprolactona (PCL) o un derivado o copolímero de la misma. En un caso, el polímero es PLGA o un derivado o copolímero del mismo. En un caso, el polímero es etilcelulosa o un derivado o copolímero de la misma. En un caso, el polímero es un poliortoéster que incorpora un ácido latente.

En un caso, el núcleo de proteína micronizada de la mayoría de las micropartículas de la pluralidad de micropartículas está recubierto al menos al 50 % con polímero, lo que significa que no está expuesto más del 50 % de la superficie del núcleo de proteína micronizada. En un caso, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 99 % o el 100 % de la superficie del núcleo de proteína micronizada está recubierta con polímero.

En un caso, la pluralidad de micropartículas, que varían en tamaño de aproximadamente dos micrómetros a aproximadamente 70 micrómetros, comprenden (a) un núcleo de proteína micronizada de aproximadamente dos micrómetros a aproximadamente 30 micrómetros, en el que la proteína es uno o más de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, un receptor o fragmento soluble del mismo, un fragmento de receptor soluble de células T, un fragmento de MHC soluble, una proteína de fusión del receptor Fc, una proteína de tipo Trap y una proteína VEGF-Trap; y (b) una corteza polimérica, en la que el polímero es uno o más de un polímero biocompatible, un polímero biodegradable, un polímero bioerosionable, ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), copolímero poliláctico-poliglicólico (PLGA), poli-D,L-láctido-co-glicólido (PLGA), PLGA-fumarato de óxido de etileno, succinato de PLGA-alfa-tocoferil esterificado a polietilenglicol 1000 (PLGA-TGPS), polianhídrido poli [1,6-bis (p-carboxifenoxi) hexano] (pCPH), poli (ácido hidroxibutírico-ácido cohidroxivalérico) (PHB-PVA), copolímero de polietilenglicol-poli (ácido láctico) (PEG-PLA), poli(etil)cianoacrilato (PEC), poliisobutil-cianoacrilato, poli-N-(2-hidroxiopropil) metacrilamida (poli (HPMA)), poli-β-R-hidroxibutirato (PHB), poli-β-R-hidroxialcanoato (PHA), poli-β-R-ácido málico, polímeros de fosfolípidos y colesterol, 2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina/polietilenglicol-distearoilfosfatidiletanolamina (DOPC/PEG-DSPE)/colesterol, polisacáridos, celulosa, etilcelulosa, metilcelulosa, alginatos, dextrano, y polímeros

de hidrogel de dextrano, amilosa, inulina, pectina y goma guar, quitosano, quitina, heparina, ácido hialurónico, polirrotaxanos y poliseudorrotaxanos basados en ciclodextrina (CD), poliaspartatos, poliglutamatos, polileucina, copolímeros de leucina-glutamato, succinato de polibutileno (PBS), gelatina, colágenos, fibrinas, fibroína, poliortoésteres, copolímero de poliortoésteres-poliamidina, copolímeros de poliortoésteres-diamina, poliortoésteres que incorporan ácidos latentes, copolímero de poli (etilenglicol)/poli (tereftalato de butileno) y sus combinaciones y copolímeros.

En un caso, la pluralidad de micropartículas, que varían en tamaño de aproximadamente dos micrómetros a aproximadamente 70 micrómetros, con una mediana de tamaños de aproximadamente 15 micrómetros a aproximadamente 30 micrómetros, comprenden (a) un núcleo de proteína micronizada de aproximadamente dos micrómetros a aproximadamente 30 micrómetros, con una mediana de tamaños de aproximadamente 10 micrómetros a aproximadamente 12 micrómetros, en el que la proteína es una proteína VEGF-Trap; y (b) una corteza polimérica, en la que el polímero es uno o más de PLA, PCL, PLGA, etilcelulosa y poliortoéster, y sus copolímeros o derivados.

También se desvela una formulación de liberación prolongada de una proteína terapéutica para la liberación o administración de un nivel constante de la proteína terapéutica a lo largo del tiempo. La formulación de liberación prolongada comprende una pluralidad de micropartículas, que varían en tamaño de aproximadamente dos micrómetros a aproximadamente 70 micrómetros, cada una de las cuales comprende un núcleo de proteína micronizada de aproximadamente dos micrómetros a aproximadamente 30 micrómetros, y una corteza de polímero.

En un caso, la proteína terapéutica es una proteína de unión a antígeno. En algunos casos, la proteína de unión a antígeno es uno o más de un anticuerpo (por ejemplo, IgG) o fragmento de anticuerpo, un receptor o fragmento soluble del mismo, un fragmento de receptor soluble de células T, un fragmento de MHC soluble, una proteína de fusión del receptor Fc, una proteína de tipo Trap y una proteína VEGF-Trap (por ejemplo, una de los cuales tiene una estructura primaria de la SEQ ID NO: 1). En un caso, la proteína terapéutica comprende un dominio Fc. En un caso, la proteína es un anticuerpo. En otro caso, la proteína es una IgG. En otro caso, la proteína terapéutica es una proteína de fusión del receptor Fc. En otro caso, la proteína terapéutica es una proteína de tipo Trap, que comprende un fragmento de receptor cognado y un dominio Fc. En un caso particular, la proteína terapéutica es una proteína VEGF-Trap. En otra realización más, la de VEGF-Trap comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 1.

En un caso, la corteza polimérica comprende un polímero biocompatible. En una realización, la corteza polimérica comprende un polímero bioerosionable. En un caso, la corteza polimérica comprende un polímero biodegradable. En algunos casos, la corteza polimérica comprende un polímero seleccionado del grupo que consiste en ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), copolímero poliláctico-poliglicólico (PLGA), poli-D,L-láctido-co-glicólido (PLGA), PLGA-fumarato de óxido de etileno, succinato de PLGA-alfa-tocoferil esterificado a polietilenglicol 1000 (PLGA-TGPS), polianhídrido poli [1,6-bis (p-carboxifenoxi) hexano] (pCPH), poli (ácido hidroxibutírico-ácido cohidroxivalérico) (PHB-PVA), copolímero de polietilenglicol-poli (ácido láctico) (PEG-PLA), poli-ε-caprolactona (PCL), poli-alquil-ciano-acrilato (PAC), poli(etil)cianoacrilato (PEC), poliisobutil-cianoacrilato, poli-N-(2-hidroxiopropil) metacrilamida (poli (HPMA)), poli-β-R-hidroxiobutirato (PHB), poli-β-R-hidroxi-alcanoato (PHA), poli-β-R-ácido málico, polímeros de fosfolípidos y colesterol, 2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina/polietilenglicol-distearoilfosfatidiletanolamina (DOPC/PEG-DSPE)/colesterol, polisacáridos, celulosa, etilcelulosa, metilcelulosa, alginatos, dextrano, y polímeros de hidrogel de dextrano, amilosa, inulina, pectina y goma guar, quitosano, quitina, heparina, ácido hialurónico, polirrotaxanos y poliseudorrotaxanos basados en ciclodextrina (CD), poliaspartatos, poliglutamatos, polileucina, copolímeros de leucina-glutamato, succinato de polibutileno (PBS), gelatina, colágenos, fibrinas, fibroína, poliortoésteres, copolímero de poliortoésteres-poliamidina, copolímeros de poliortoésteres-diamina, poliortoésteres que incorporan ácidos latentes, copolímero de poli (etilenglicol)/poli (tereftalato de butileno) y sus combinaciones y copolímeros. En una realización, el polímero es poli-ε-caprolactona (PCL) o un derivado o copolímero de la misma. En un caso, la corteza polimérica comprende un PLGA. En un caso, la corteza polimérica comprende una etilcelulosa. En un caso, la corteza polimérica comprende uno o más de PLA, PLGA, etilcelulosa y poliortoéster, y sus copolímeros o derivados.

En una realización, la pluralidad de micropartículas comprende una colección de micropartículas que tienen un intervalo de espesores de la corteza polimérica, de modo que las micropartículas individuales de la colección de micropartículas se degradan a una velocidad diferente, lo que permite una velocidad uniforme de liberación de la proteína terapéutica.

En una realización, la pluralidad de micropartículas comprende una mezcla de partículas de proteína micronizada no recubiertas y micropartículas que tienen un intervalo de espesores de la corteza polimérica, lo que permite la liberación de proteínas terapéuticas a intervalos periódicos basados en el espesor de la corteza.

En una realización, la pluralidad de micropartículas comprende una mezcla de micropartículas que tienen cortezas poliméricas de niveles variables de hidrofobicidad para controlar el momento o la duración de la degradación y la posterior liberación. En una realización, las micropartículas cada una comprenden una capa interna de polímero y una capa externa de polímero, en la que la capa externa de polímero limita la hidratación de la capa interna de

polímero para controlar la liberación de la proteína terapéutica.

En una realización, la proteína terapéutica se libera de la pluralidad de micropartículas a una velocidad de aproximadamente 0,01 mg/semana a aproximadamente 0,30 mg/semana durante un periodo de al menos 60 días, cuando las micropartículas están en un entorno acuoso. En una realización, el entorno acuoso es tampón *in vitro*. En una realización, el entorno acuoso es *in vivo*. En una realización, el entorno acuoso es *ex vivo*. En una realización, el ambiente acuoso es un humor vítreo.

En una realización, la formulación de liberación prolongada comprende una pluralidad de micropartículas, que varían en tamaño de aproximadamente dos micrómetros a aproximadamente 70 micrómetros y que comprenden (a) un núcleo de proteína terapéutica micronizada de aproximadamente dos micrómetros a aproximadamente 30 micrómetros, en el que la proteína terapéutica es una proteína de unión a antígeno, que en algunos casos puede ser uno o más de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, un receptor o fragmento soluble del mismo, un fragmento de receptor soluble de células T, un fragmento de MHC soluble, una proteína de fusión del receptor Fc, una proteína de tipo Trap y una proteína VEGF-Trap; y (b) una corteza polimérica de un intervalo de espesores, en el que el polímero es uno o más de un polímero biocompatible, un polímero biodegradable, un polímero bioerosionable, ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), copolímero poliláctico-poliglicólico (PLGA), poli-D,L-láctido-co-glicólido (PLGA), PLGA-fumarato de óxido de etileno, succinato de PLGA-alfa-tocoferil esterificado a polietilenglicol 1000 (PLGA-TGSPS), polianhídrido poli [1,6-bis (p-carboxifenoxi) hexano] (pCPH), poli (ácido hidroxibutírico-ácido cohidroxivalérico) (PHB-PVA), copolímero de polietilenglicol-poli (ácido láctico) (PEG-PLA), poli-ε-caprolactona (PCL), poli-alquil-ciano-acrilato (PAC), poli(etil)cianoacrilato (PEC), poliisobutil-cianoacrilato, poli-N-(2-hidroxipropil) metacrilamida (poli (HPMA)), poli-β-R-hidroxibutirato (PHB), poli-β-R-hidroxialcanoato (PHA), poli-β-R-ácido málico, polímeros de fosfolípidos y colesterol, 2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina/polietilenglicol-distearoilfosfatidiletanolamina (DOPC/PEG-DSPE)/colesterol, polisacáridos, celulosa, etilcelulosa, metilcelulosa, alginatos, dextrano, y polímeros de hidrogel de dextrano, amilosa, inulina, pectina y goma guar, quitosano, quitina, heparina, ácido hialurónico, polirrotaxanos y poliseudorrotaxanos basados en ciclodextrina (CD), poliaspartatos, poliglutamatos, polileucina, copolímeros de leucina-glutamato, succinato de polibutileno (PBS), gelatina, colágenos, fibrinas, fibroína, poliortoésteres, copolímero de poliortoésteres-poliamidina, copolímeros de poliortoésteres-diamina, poliortoésteres que incorporan ácidos latentes, copolímero de poli (etilenglicol)/poli (tereftalato de butileno) y sus combinaciones y copolímeros, en el que las micropartículas liberan o proporcionan un nivel estable de la proteína terapéutica a una velocidad de aproximadamente 0,01 mg/semana a aproximadamente 0,30 mg/semana durante al menos 60 días.

En una realización, la formulación de liberación prolongada comprende una pluralidad de micropartículas, que varían en tamaño de aproximadamente dos micrómetros a aproximadamente 70 micrómetros, con una mediana de tamaños de aproximadamente 15 micrómetros a aproximadamente 30 micrómetros, y que comprenden (a) un núcleo de proteína micronizada de aproximadamente dos micrómetros a aproximadamente 30 micrómetros, con una mediana de tamaños de aproximadamente 10 micrómetros a aproximadamente 12 micrómetros, en el que la proteína es una proteína VEGF-Trap; y (b) una corteza polimérica de un intervalo de espesores, en el que el polímero es uno cualquiera o más de PLGA, etilcelulosa y poliortoéster, y sus copolímeros o derivados, de modo que en un ambiente acuoso las micropartículas liberan o proporcionan un nivel estable de VEGF-Trap a una velocidad de aproximadamente 0,06 ± 0,02 mg/semana durante al menos 60 días.

También se desvela una formulación farmacéutica para usar en un método para modular la liberación de una proteína. En un caso, el método comprende la etapa de preparar una pluralidad de micropartículas como se describe en el aspecto anterior, seguido de la etapa de poner las micropartículas en un disolvente. El disolvente en algunos casos es acuoso. El disolvente puede ser *in vitro*, como en una solución tamponada con fosfato. El disolvente puede ser *in vivo*, como por ejemplo, humor vítreo.

## 50 Dibujos

La Figura 1 representa la cantidad relativa (% de volumen) de partículas de proteínas sin una corteza polimérica de un diámetro determinado (DCE (µm)) en una población de partículas de proteínas fabricadas a partir de 50 mg/ml de proteína VEGF-Trap, 25 mg/ml de proteína VEGF-Trap y 25 mg/ml de proteína VEGF-Trap más el 0,1 % de polisorbato 80.

La Figura 2 representa la cantidad relativa (% de volumen determinado por MFI) de micropartículas de un diámetro determinado (DCE (µm)) en una población de micropartículas fabricadas a partir de 50 mg/ml de proteína VEGF-Trap más 50 mg/ml de POE, 250 mg/ml de POE y 50 mg/ml de EC.

La Figura 3 representa la cantidad de proteína VEGF-Trap en miligramos liberados de micropartículas fabricadas a partir de 50 mg/ml de POE, 250 mg/ml de POE o 50 mg/ml de EC durante aproximadamente 60 días.

## Descripción detallada

La micropartícula y la partícula de núcleo de proteína en la presente invención tienen una forma más o menos esférica. Algunas micropartículas y núcleos de proteínas se acercarán a la esfericidad, mientras que otras tendrán una forma más irregular. Por lo tanto, como se usa en este documento, el término "diámetro" significa cada uno de

los siguientes: (a) el diámetro de una esfera que circunscribe la micropartícula o el núcleo de la proteína, (b) el diámetro de la esfera más grande que se ajusta dentro de los límites de la micropartícula o el núcleo de la proteína, (c) cualquier medida entre la esfera circunscrita de (a) y la esfera confinada de (b), incluida la media entre las dos, (d) la longitud del eje más largo de la micropartícula o el núcleo de la proteína, (e) la longitud del eje más corto de la micropartícula o el núcleo de la proteína, (f) cualquier medida entre la longitud del eje largo (d) y la longitud del eje corto (e), incluyendo la media entre los dos, y/o (g) el diámetro circular equivalente ("DCE"), según lo determinado por imágenes de micro flujo (MFI), análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) o métodos de oscurecimiento de la luz como la dispersión dinámica de la luz (DLS). Ver, en general, Sharma et al., Micro-flow imaging: flow microscopy applied to subvisible particulate analysis in protein formulations, AAPS J. 2010 Sep; 12 (3): 455-64. El diámetro generalmente se expresa en micrómetros ( $\mu\text{m}$  o micras). El diámetro puede determinarse por medición óptica.

"Partícula de proteína micronizada" o "partícula de proteína" significa una partícula que contiene múltiples moléculas de proteína con cantidades bajas, muy bajas o cercanas a cero de agua (por ejemplo, <3 % de agua en peso). Como se usa en el presente documento, la partícula de proteína micronizada generalmente es de forma esférica y tiene un DCE que varía de 2 micrómetros a aproximadamente 35 micrómetros. La partícula de proteína micronizada no está limitada a ninguna entidad proteica particular, y es adecuada para la preparación y administración de una proteína terapéutica. Las proteínas terapéuticas comunes incluyen, entre otras, proteínas de unión a antígeno, como por ejemplo, fragmentos de receptor solubles, anticuerpos (incluidas IgG) y derivados o fragmentos de anticuerpos, otras proteínas que contienen Fc, incluidas proteínas de fusión de Fc, y proteínas de fusión del receptor Fc, incluidas las proteínas de tipo Trap (Huang, C., Curr. Opin. Biotechnol 20: 692-99 (2009)) como por ejemplo VEGF-Trap.

Se puede hacer una partícula de proteína micronizada por cualquier método conocido en la técnica para hacer partículas de proteína de un tamaño de micrómetros. Por ejemplo, la partícula de proteína puede prepararse, entre otros, mediante secado por pulverización (más abajo), liofilización, molienda por chorro, cristalización por gota colgante (Ruth et al., Acta Crystallographica D56: 524-28 (2000)), precipitación gradual (Patente US 7.998.477 (2011)), liofilización de una mezcla acuosa de proteína-PEG (polietilenglicol) (Morita et al., Pharma. Res. 17: 1367-73 (2000)), precipitación de fluido supercrítico (Patente US 6.063.910 (2000)), o la formación de partículas inducidas por dióxido de carbono a alta presión (Bustami et al., Pharma. Res. 17: 1360-66 (2000)). La presente invención emplea secado por pulverización.

Como se usa en el presente documento, el término "proteína" se refiere a una molécula que comprende dos o más restos de aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos. Los péptidos, polipéptidos y proteínas también incluyen modificaciones que incluyen, pero no se limitan a, glicosilación, unión de lípidos, sulfatación, gamma-carboxilación de restos de ácido glutámico, hidroxilación y ADP-ribosilación. Los polipéptidos pueden ser de interés científico o comercial, incluidos los medicamentos basados en proteínas. Los polipéptidos incluyen, entre otros, anticuerpos y proteínas quiméricas o de fusión. Los polipéptidos se producen mediante líneas celulares animales recombinantes usando métodos de cultivo celular.

Está previsto que un "anticuerpo" se refiera a moléculas de inmunoglobulina que consisten en cuatro cadenas de polipéptidos, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada tiene una región variable de cadena pesada (HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de la cadena pesada contiene tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera tiene una región variable de cadena ligera y una región constante de cadena ligera. La región constante de la cadena ligera consta de un dominio (CL). Las regiones VH y VL pueden subdividirse en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxilo en el orden siguiente: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. El término "anticuerpo" incluye la referencia a inmunoglobulinas glicosiladas y no glicosiladas de cualquier isotipo o subclase. El término "anticuerpo" incluye, pero no se limita a, aquellos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos aislados de una célula huésped transfectada para expresar el anticuerpo. Una IgG comprende un subconjunto de anticuerpos.

Las "proteínas de fusión Fc" comprenden parte o la totalidad de dos o más proteínas, una de las cuales es una porción Fc de una molécula de inmunoglobulina, que no están fusionadas en su estado natural. La preparación de proteínas de fusión que comprenden ciertos polipéptidos heterólogos fusionados a diversas porciones de polipéptidos derivados de anticuerpos (incluido el dominio Fc) ha sido descrita, por ejemplo, por Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 88: 10535, 1991; Byrn et al., Nature 344: 677, 1990; y Hollenbaugh y col., "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", en Current Protocols in Immunology, Supl. 4, páginas 10.19.1-10.19.11, 1992. Las "proteínas de fusión del receptor Fc" comprenden uno o más de uno o más dominios extracelulares de un receptor acoplado a un resto Fc, que en algunas realizaciones comprende una región bisagra seguida de un dominio CH2 y CH3 de una inmunoglobulina. En algunas realizaciones, la proteína de fusión Fc contiene dos o más cadenas receptoras distintas que se unen a uno o más ligandos. Por ejemplo, una proteína de fusión Fc es una trampa, como por ejemplo una trampa IL-1 (por ejemplo, Rilonacept, que contiene la región de unión al ligando IL-1RAcP fusionada a la región extracelular IL-1R1 fusionada a Fc de hIgG1; véase Patente de EE.UU. n.º 6,927,004) o una VEGF-Trap (por ejemplo, Aflibercept, que contiene el dominio 2 de Ig del receptor de VEGF Flt1 fusionado al dominio 3 de Ig del



receptor de VEGF Flk1 fusionado a Fc de hlgG1; por ejemplo, SEQ ID NO: 1; véanse Patentes de EE.UU. 7.087.411 y 7.279.159, que se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad).

Como se usa en el presente documento, el término "polímero" se refiere a una macromolécula que comprende monómeros repetidos conectados por enlaces químicos covalentes. Los polímeros utilizados en la práctica de esta invención son biocompatibles y biodegradables. Un polímero biocompatible y biodegradable puede ser natural o sintético. Los polímeros naturales incluyen polinucleótidos, polipéptidos, tales como proteínas naturales, proteínas recombinantes, gelatina, colágenos, fibrinas, fibroína, poliaspartatos, poliglutamatos, polileucina, copolímeros de leucina-glutamato; y polisacáridos, tales como alginatos de celulosa, dextrano y polímeros de hidrogel de dextrano, amilosa, inulina, pectina y goma guar, quitosano, quitina, heparina y ácido hialurónico. Los polímeros sintéticos biocompatibles o biodegradables incluyen ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), copolímero poliláctico-poliglicólico (PLGA), poli-D,L-láctido-co-glicólido (PLGA), PLGA-fumarato de óxido de etileno, PLGA-alfa-tocoferil succinato esterificado a polietilenglicol 1000 (PLGA-TGPS), polianhídrido poli [1,6-bis (p-carboxifenoxi) hexano] (pCPH), poli (ácido hidroxibutírico-ácido cohidroxivalérico) (PHB-PVA), copolímero de polietilenglicol-poli (ácido láctico) (PEG-PLA), poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL), poli-alkil-ciano-acrilato (PAC), poli(etil)cianoacrilato (PEC), poliisobutil-cianoacrilato, poli-N-(2-hidroxipropil) metacrilamida (poli (HPMA)), poli- $\beta$ -R-hidroxibutirato (PHB), poli- $\beta$ -R-hidroxialcanoato (PHA), poli- $\beta$ -R-ácido málico, polímeros de fosfolípidos y colesterol, 2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina/polietilenglicol-distearoilfosfatidiletanolamina (DOPC/PEG-DSPE)/colesterol, etilcelulosa, polirrotaxanos y poliseudorrotaxanos basados en ciclodextrina (CD), succinato de polibutileno (PBS), copolímero de poliortoésteres-poliamidina, copolímeros de poliortoésteres-diamina, poliortoésteres que incorporan ácidos latentes para controlar las tasas de degradación, y, entre otros, copolímeros de poli (etilenglicol)/poli (tereftalato de butileno).

La etilcelulosa (EC) es un biomaterial bien conocido y fácilmente disponible utilizado en las ciencias farmacéuticas y alimentarias. Es un derivado de celulosa en el que algunos de los grupos hidroxilo de glucosa se reemplazan con éter etílico. Véase Martinac et al., *J. Microencapsulation*, 22 (5): 549-561 (2005) y las referencias allí citadas, que describen métodos para usar etilcelulosa como polímeros biocompatibles en la fabricación de microesferas. Véase también la patente de EE.UU. 4.210.529 (1980) y sus referencias para una descripción detallada de la etilcelulosa y los métodos para elaborar derivados de etilcelulosa.

El poli-D,L-láctido-co-glicólido (PLGA) también es un polímero biocompatible y biodegradable aprobado por la Administración de Fármacos y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) conocido en la ingeniería de tejidos y sistemas de administración farmacéutica. El PLGA es un poliéster que comprende ácido glicólico y monómeros de ácido láctico. Para una descripción de la síntesis de PLGA y la fabricación de nanopartículas de PLGA, véase Astete y Sabliov, *Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 17 (3): 247-89 (2006) y las referencias allí citadas.

La poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL) es otro polímero biocompatible y biodegradable aprobado por la FDA para su uso en seres humanos como dispositivo de administración de medicamentos. La PCL es un poliéster de  $\epsilon$ -caprolactona, que se hidroliza rápidamente en el cuerpo para formar un ácido hidroxicarboxílico no tóxico o de baja toxicidad. Para obtener una descripción de la fabricación de PCL, consulte Labet y Thielemans, *Chemical Society Reviews* 38: 3484-3504 (2009) y las referencias allí citadas. Para obtener una descripción de la fabricación y el uso de microesferas y nanoesferas basadas en PCL como sistemas de administración, consulte Sinha et al., *Int. J. Pharm.*, 278 (1): 1-23 (2004) y las referencias allí citadas.

El poliortoéster (POE) es un polímero bioerosionable diseñado para la administración de fármacos. Generalmente es un polímero de un acetal de ceteno, preferiblemente un acetal de diceteno cíclico, tal como, por ejemplo, 3,9-dimetilen-2,4,8,10-tetraoxa espiro[5,5]-undecano, que se polimeriza mediante condensación de glicol para formar los enlaces ortoéster. Se puede encontrar una descripción de la síntesis de poliortoésteres y varios tipos, por ejemplo, en la patente US 4.304.767. Los poliortoésteres se pueden modificar para controlar su perfil de liberación del fármaco y las tasas de degradación sustituyendo varios dioles y polioles hidrófobos, como por ejemplo, reemplazando un hexanotriol con un decanotriol; además de añadir ácidos latentes, tales como, por ejemplo, ácido octanodioico o similares, a la cadena principal para aumentar la sensibilidad al pH. Otras modificaciones al poliortoéster incluyen la integración de una amina para aumentar la funcionalidad. La formación, descripción y uso de poliortoésteres se describen en las patentes US 5.968.543; US 4.764.364; Heller y Barr, *Biomacromolecules*, 5 (5): 1625-32 (2004); y Heller, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 57: 2053-62 (2005).

Como se usa en el presente documento, la frase "secado por pulverización" significa un método para producir un polvo seco que comprende partículas de un tamaño de micrómetros a partir de una suspensión usando un secador por pulverización. Los secadores por pulverización emplean un atomizador o una boquilla de pulverización para dispersar la suspensión en una pulverización de tamaño de gota controlado. Se pueden generar tamaños de gota de 10 a 500  $\mu\text{m}$  mediante secado por pulverización. A medida que se seca el disolvente (agua o disolvente orgánico), la sustancia proteica se seca en una partícula de un tamaño de micrómetros, formando una sustancia en forma de polvo; o en el caso de una suspensión de proteína-polímero, durante el secado, la cubierta endurecida con polímero en torno a la carga de proteína.

Las micropartículas en la invención comprenden un núcleo de proteína rodeado por una corteza o recubrimiento de polímero. Brevemente, se forma una partícula de proteína micronizada, que a continuación se dispersa en una

solución de polímero (polímero disuelto en disolvente) para formar una suspensión de proteína-polímero. La suspensión de proteína-polímero se dispersa a continuación en gotas micronizadas (atomizadas), y el disolvente se elimina para formar la micropartícula.

- 5 En una realización, la partícula de proteína micronizada se forma preparando una solución de la proteína y a continuación sometiendo esa solución de proteína a dispersión y calor para formar un polvo seco que comprende la proteína. En el método de la invención, las partículas de proteína micronizadas se forman mediante secado por pulverización. En una realización, la proteína es una proteína terapéutica que está formulada para incluir tampones, estabilizadores y otros excipientes farmacéuticamente aceptables para preparar una formulación farmacéutica de la proteína terapéutica. Formulaciones farmacéuticas ejemplares se describen en las patentes US 7.365.165, US 7.572.893, US 7.608.261, US 7.655.758, US 7.807.164, US 2010-0279933, US 2011-0171241 y PCT/US11/54856.

15 La cantidad de proteína terapéutica contenida dentro de las formulaciones farmacéuticas producidas por la presente invención puede variar dependiendo de las propiedades específicas deseadas de las formulaciones, así como de las circunstancias particulares y los fines para los cuales se pretende usar las formulaciones. En ciertas realizaciones, las formulaciones farmacéuticas pueden contener de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 500 mg/ml de proteína; de aproximadamente 5 mg/ml a aproximadamente 400 mg/ml de proteína; de aproximadamente 5 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml de proteína; de aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 180 mg/ml de proteína; de aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml de proteína; o de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 180 mg/ml de proteína. Por ejemplo, las formulaciones producidas por la presente invención pueden comprender aproximadamente 1 mg/ml; aproximadamente 2 mg/ml; aproximadamente 5 mg/ml; aproximadamente 10 mg/ml; aproximadamente 15 mg/ml; aproximadamente 20 mg/ml; aproximadamente 25 mg/ml; aproximadamente 30 mg/ml; aproximadamente 35 mg/ml; aproximadamente 40 mg/ml; aproximadamente 45 mg/ml; aproximadamente 50 mg/ml; aproximadamente 55 mg/ml; aproximadamente 60 mg/ml; aproximadamente 65 mg/ml; aproximadamente 70 mg/ml; aproximadamente 75 mg/ml; aproximadamente 80 mg/ml; aproximadamente 85 mg/ml; aproximadamente 86 mg/ml; aproximadamente 87 mg/ml; aproximadamente 88 mg/ml; aproximadamente 89 mg/ml; aproximadamente 90 mg/ml; aproximadamente 95 mg/ml; aproximadamente 100 mg/ml; aproximadamente 105 mg/ml; aproximadamente 110 mg/ml; aproximadamente 115 mg/ml; aproximadamente 120 mg/ml; aproximadamente 125 mg/ml; aproximadamente 130 mg/ml; aproximadamente 131 mg/ml; aproximadamente 132 mg/ml; aproximadamente 133 mg/ml; aproximadamente 134 mg/ml; aproximadamente 135 mg/ml; aproximadamente 140 mg/ml; aproximadamente 145 mg/ml; aproximadamente 150 mg/ml; aproximadamente 155 mg/ml; aproximadamente 160 mg/ml; aproximadamente 165 mg/ml; aproximadamente 170 mg/ml; aproximadamente 175 mg/ml; aproximadamente 180 mg/ml; aproximadamente 185 mg/ml; aproximadamente 190 mg/ml; aproximadamente 195 mg/ml; aproximadamente 200 mg/ml; aproximadamente 205 mg/ml; aproximadamente 210 mg/ml; aproximadamente 215 mg/ml; aproximadamente 220 mg/ml; aproximadamente 225 mg/ml; aproximadamente 230 mg/ml; aproximadamente 235 mg/ml; aproximadamente 240 mg/ml; aproximadamente 245 mg/ml; aproximadamente 250 mg/ml; aproximadamente 255 mg/ml; aproximadamente 260 mg/ml; aproximadamente 265 mg/ml; aproximadamente 270 mg/ml; aproximadamente 275 mg/ml; aproximadamente 280 mg/ml; aproximadamente 285 mg/ml; aproximadamente 290 mg/ml; aproximadamente 295 mg/ml; o aproximadamente 300 mg/ml de proteína terapéutica.

40 Las formulaciones farmacéuticas producidas por la presente invención comprenden uno o más excipientes. El término "excipiente", como se usa en el presente documento, significa cualquier agente no terapéutico añadido a la formulación para proporcionar una consistencia, viscosidad o efecto estabilizador deseados.

45 Las formulaciones farmacéuticas producidas por la presente invención también pueden comprender uno o más carbohidratos, por ejemplo, uno o más azúcares. El azúcar puede ser un azúcar reductor o un azúcar no reductor. Los "azúcares reductores" incluyen, por ejemplo, azúcares con un grupo cetona o aldehído y contienen un grupo hemiacetal reactivo, que permite que el azúcar actúe como agente reductor. Los ejemplos específicos de azúcares reductores incluyen fructosa, glucosa, gliceraldehído, lactosa, arabinosa, manosa, xilosa, ribosa, ramnosa, galactosa y maltosa. Los azúcares no reductores pueden comprender un carbono anomérico que es un acetal y no es sustancialmente reactivo con aminoácidos o polipéptidos para iniciar una reacción de Maillard. Ejemplos específicos de azúcares no reductores incluyen sacarosa, trehalosa, sorbosa, sucralosa, melejitosa y rafinosa. Los ácidos de azúcar incluyen, por ejemplo, ácidos sacáricos, gluconato y otros azúcares polihidroxilados y sus sales.

55 La cantidad de azúcar contenida dentro de las formulaciones farmacéuticas producidas por la presente invención variará dependiendo de las circunstancias específicas y los fines previstos para los que se usan las formulaciones. En ciertas realizaciones, las formulaciones pueden contener de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 20 % de azúcar; de aproximadamente el 0,5 % a aproximadamente el 20 % de azúcar; de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 20 % de azúcar; de aproximadamente el 2 % a aproximadamente el 15 % de azúcar; de aproximadamente el 3 % a aproximadamente el 10 % de azúcar; de aproximadamente el 4 % a aproximadamente el 10 % de azúcar; o de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 10 % de azúcar. Por ejemplo, las formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender aproximadamente el 0,5 %; aproximadamente el 1,0 %; aproximadamente el 1,5 %; aproximadamente el 2,0 %; aproximadamente el 2,5 %; aproximadamente el 3,0 %; aproximadamente el 3,5 %; aproximadamente el 4,0 %; aproximadamente el 4,5 %; aproximadamente el 5,0 %; aproximadamente el 5,5 %; aproximadamente el 6,0 %; aproximadamente el 6,5 %; aproximadamente el 7,0 %; aproximadamente el 7,5 %; aproximadamente el 8,0 %; aproximadamente el 8,5 %;

aproximadamente el 9,0 %; aproximadamente el 9,5 %; aproximadamente el 10,0 %; aproximadamente el 10,5 %; aproximadamente el 11,0 %; aproximadamente el 11,5 %; aproximadamente el 12,0 %; aproximadamente el 12,5 %; aproximadamente el 13,0 %; aproximadamente el 13,5 %; aproximadamente el 14,0 %; aproximadamente el 14,5 %; aproximadamente el 15,0 %; aproximadamente el 15,5 %; aproximadamente el 16,0 %; 16,5 %; aproximadamente el 17,0 %; aproximadamente el 17,5 %; aproximadamente el 18,0 %; aproximadamente el 18,5 %; aproximadamente el 19,0 %; aproximadamente el 19,5 %; o aproximadamente el 20,0 % de azúcar (por ejemplo, sacarosa).

Las formulaciones farmacéuticas producidas por la presente invención también pueden comprender uno o más tensioactivos. Como se usa en el presente documento, el término "tensioactivo" significa una sustancia que reduce la tensión superficial de un fluido en el que se disuelve y/o reduce la tensión interfacial entre el aceite y el agua. Los tensioactivos pueden ser iónicos o no iónicos. Los ejemplos de tensioactivos no iónicos que pueden incluirse en las formulaciones de la presente invención incluyen, por ejemplo, alquil poli (óxido de etileno), alquil poliglucósidos (por ejemplo, octil glucósido y decil maltósido), alcoholes grasos tales como alcohol cetílico y alcohol oleílico, cocamida MEA, cocamida DEA y cocamida TEA. Los tensioactivos no iónicos específicos que pueden incluirse en las formulaciones producidas por la presente invención incluyen, por ejemplo, polisorbato 20, polisorbato 28, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 65, polisorbato 80, polisorbato 81 y polisorbato 85; poloxámeros tales como poloxámero 188, poloxámero 407; polietilen-polipropilenglicol; o polietilenglicol (PEG). El polisorbato 20 también se conoce como TWEEN 20, monolaurato de sorbitán y monolaurato de polioxietilensorbitán.

La cantidad de tensioactivo contenido dentro de las formulaciones farmacéuticas producidas por la presente invención puede variar dependiendo de las propiedades específicas deseadas de las formulaciones, así como de las circunstancias y fines particulares para los que se pretende usar las formulaciones. En ciertas realizaciones, las formulaciones pueden contener de aproximadamente el 0,05 % a aproximadamente el 5 % de tensioactivo; o de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 0,2 % de tensioactivo. Por ejemplo, las formulaciones pueden comprender aproximadamente el 0,05 %; aproximadamente el 0,06 %; aproximadamente el 0,07 %; aproximadamente el 0,08 %; aproximadamente el 0,09 %; aproximadamente el 0,10 %; aproximadamente el 0,11 %; aproximadamente el 0,12 %; aproximadamente el 0,13 %; aproximadamente el 0,14 %; aproximadamente el 0,15 %; aproximadamente el 0,16 %; aproximadamente el 0,17 %; aproximadamente el 0,18 %; aproximadamente el 0,19 %; aproximadamente el 0,20 %; aproximadamente el 0,21 %; aproximadamente el 0,22 %; aproximadamente el 0,23 %; aproximadamente el 0,24 %; aproximadamente el 0,25 %; aproximadamente el 0,26 %; aproximadamente el 0,27 %; aproximadamente el 0,28 %; aproximadamente el 0,29 %; o aproximadamente el 0,30 % de tensioactivo (por ejemplo, polisorbato 20).

Las formulaciones farmacéuticas producidas por la presente invención también pueden comprender uno o más tampones. En algunas realizaciones, el tampón tiene un rango de tamponamiento que se superpone completamente o en parte al intervalo de pH 5,5-7,4. En una realización, el tampón tiene un pKa de aproximadamente  $6,0 \pm 0,5$ . En ciertas realizaciones, el tampón comprende un tampón fosfato. En ciertas realizaciones, el fosfato está presente a una concentración de  $5 \text{ mM} \pm 0,75 \text{ mM}$  a  $15 \text{ mM} \pm 2,25 \text{ mM}$ ;  $6 \text{ mM} \pm 0,9 \text{ mM}$  a  $14 \text{ mM} \pm 2,1 \text{ mM}$ ;  $7 \text{ mM} \pm 1,05 \text{ mM}$  a  $13 \text{ mM} \pm 1,95 \text{ mM}$ ;  $8 \text{ mM} \pm 1,2 \text{ mM}$  a  $12 \text{ mM} \pm 1,8 \text{ mM}$ ;  $9 \text{ mM} \pm 1,35 \text{ mM}$  a  $11 \text{ mM} \pm 1,65 \text{ mM}$ ;  $10 \text{ mM} \pm 1,5 \text{ mM}$ ; o aproximadamente  $10 \text{ mM}$ . En ciertas realizaciones, el sistema tampón comprende histidina a  $10 \text{ mM} \pm 1,5 \text{ mM}$ , a un pH de  $6,0 \pm 0,5$ .

Las formulaciones farmacéuticas producidas por la presente invención pueden tener un pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 8,0. Por ejemplo, las formulaciones de la presente invención pueden tener un pH de aproximadamente 5,0; aproximadamente 5,2; aproximadamente 5,4; aproximadamente 5,6; aproximadamente 5,8; aproximadamente 6,0; aproximadamente 6,2; aproximadamente 6,4; aproximadamente 6,6; aproximadamente 6,8; aproximadamente 7,0; aproximadamente 7,2; aproximadamente 7,4; aproximadamente 7,6; aproximadamente 7,8; o aproximadamente 8,0.

En una realización particular, la proteína terapéutica es una proteína VEGF-Trap. Las formulaciones farmacéuticas para la formación de partículas micronizadas de proteína VEGF-Trap pueden contener de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml de proteína VEGF-Trap, aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 15 mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 25 mg/ml, aproximadamente 30 mg/ml, aproximadamente 35 mg/ml, aproximadamente 40 mg/ml, aproximadamente 45 mg/ml, aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 55 mg/ml, aproximadamente 60 mg/ml, aproximadamente 65 mg/ml, aproximadamente 70 mg/ml, aproximadamente 75 mg/ml, aproximadamente 80 mg/ml, aproximadamente 85 mg/ml, aproximadamente 90 mg/ml, aproximadamente 95 mg/ml o aproximadamente 100 mg/ml de proteína VEGF-Trap. Las soluciones pueden contener uno o más tampones de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 50 mM. En una realización, el tampón es fosfato aproximadamente 10 mM a un pH de aproximadamente  $6 \pm 0,5$ . Las soluciones también pueden contener sacarosa a una concentración de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 10 %. En una realización, la solución contiene sacarosa a aproximadamente el 2 % en p/p.

En algunas realizaciones, la solución de proteína terapéutica contiene proteína VEGF-Trap a aproximadamente 25 mg/ml o aproximadamente 50 mg/ml en fosfato 10 mM, pH 6,2, sacarosa al 2 % y opcionalmente polisorbato al 0,1 %.

La formulación terapéutica de proteínas a continuación se somete a dispersión y secado para formar partículas de proteínas micronizadas. Las partículas de proteína micronizadas se preparan sometiendo la solución de proteína a secado por pulverización. El secado por pulverización se conoce generalmente en la técnica y se puede realizar en equipos tales como, por ejemplo, un secador por pulverización BÜCHI Mini Spray Dryer B-290 (Buchi Labortechnik AG, Flawil, CH). En una realización particular, la solución de proteína (por ejemplo, pero sin limitarse a cualquiera de las formulaciones de VEGF-Trap descritas anteriormente) se bombea al secador por pulverización a una velocidad de aproximadamente 2 ml/min a aproximadamente 15 ml/min, o aproximadamente 7 ml/min. La temperatura de entrada del secador por pulverización se ajusta a una temperatura superior al punto de ebullición del agua, como por ejemplo, a aproximadamente 130 °C. La temperatura de salida a una temperatura por debajo del punto de ebullición del agua y por encima de la temperatura ambiente, como por ejemplo, 55 °C. En una realización específica, se bombea una solución de proteína (por ejemplo, solución de VEGF-Trap o solución de IgG) en un secador por pulverización BÜCHI Mini Spray Dryer B-290 a aproximadamente 7 ml/min, con una temperatura de entrada de aproximadamente 130 °C y una temperatura de salida de aproximadamente 55 °C, con el aspirador ajustado a 33 m<sup>3</sup>/h y el gas de pulverización a 530 l/h.

Las partículas de proteína micronizadas resultantes varían en tamaño desde aproximadamente 1 µm hasta aproximadamente 100 µm de diámetro, dependiendo de la formulación particular y la concentración de proteínas y excipientes. En algunas realizaciones, las partículas de proteína micronizadas tienen un diámetro de aproximadamente 1 µm a aproximadamente 100 µm, de aproximadamente 1 µm a aproximadamente 40 µm, de aproximadamente 2 µm a aproximadamente 15 µm, de aproximadamente 2,5 µm a aproximadamente 13 µm, de aproximadamente 3 µm a aproximadamente 10 µm, de aproximadamente 5 µm, de aproximadamente 6 µm, de aproximadamente 7 µm, de aproximadamente 8 µm, de aproximadamente 9 µm, de aproximadamente 10 µm, de aproximadamente 11 µm o de aproximadamente 12 µm.

Las partículas de proteína micronizadas se recubren a continuación con un polímero biocompatible y biodegradable. Esto se puede lograr suspendiendo las partículas de proteína micronizadas en una solución de polímero. Una solución de polímero es esencialmente un polímero disuelto en un disolvente. Por ejemplo, el polímero biocompatible y biodegradable se puede disolver, entre otros, en cloruro de metileno, tetrahidrofurano, acetato de etilo o algún otro disolvente útil. El acetato de etilo es ampliamente conocido como disolvente seguro y a menudo se usa en la preparación de medicamentos, implantes y alimentos.

En algunas realizaciones, el polímero puede ser etilcelulosa ("EC"), poli (ácido láctico) ("PLA"), poliortoéster ("POE"), poli-D,L-láctido-co-glicólido ("PLGA") o poli-ε-caprolactona ("PCL"). El polímero se puede disolver en el disolvente (por ejemplo, acetato de etilo) a una concentración de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml, de aproximadamente 15 mg/ml a aproximadamente 295 mg/ml, de aproximadamente 20 mg/ml a aproximadamente 290 mg/ml, de aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 280 mg/ml, de aproximadamente 30 mg/ml a aproximadamente 270 mg/ml, de aproximadamente 35 mg/ml a aproximadamente 265 mg/ml, de aproximadamente 40 mg/ml a aproximadamente 260 mg/ml, de aproximadamente 45 mg/ml a aproximadamente 260 mg/ml, de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 255 mg/ml, de aproximadamente 55 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml, de aproximadamente 20 mg/ml, de aproximadamente 25 mg/ml, de aproximadamente 30 mg/ml, de aproximadamente 35 mg/ml, de aproximadamente 40 mg/ml, de aproximadamente 45 mg/ml, de aproximadamente 50 mg/ml, de aproximadamente 75 mg/ml, de aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 125 mg/ml, de aproximadamente 150 mg/ml, de aproximadamente 175 mg/ml, de aproximadamente 200 mg/ml, de aproximadamente 225 mg/ml o de aproximadamente 250 mg/ml.

Las partículas de proteína micronizadas se añaden a la solución de polímero de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 15 mg/ml a aproximadamente 95 mg/ml, de aproximadamente 20 mg/ml a aproximadamente 90 mg/ml, de aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 85 mg/ml, de aproximadamente 30 mg/ml a aproximadamente 80 mg/ml, de aproximadamente 35 mg/ml a aproximadamente 75 mg/ml, de aproximadamente 40 mg/ml a aproximadamente 70 mg/ml, de aproximadamente 45 mg/ml a aproximadamente 65 mg/ml, de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 60 mg/ml, aproximadamente a 25 mg/ml, aproximadamente a 30 mg/ml, aproximadamente a 35 mg/ml, aproximadamente a 40 mg/ml, aproximadamente a 45 mg/ml, o aproximadamente a 50 mg/ml. Las partículas se mezclan para formar una suspensión, que a continuación se somete a dispersión y secado para formar la partícula de proteína recubierta de polímero (es decir, micropartícula).

La suspensión de la solución de partículas de proteína y polímero se somete a secado por pulverización, que se realiza de manera similar al método para fabricar las partículas de proteína micronizadas, pero con una temperatura de admisión reducida para proteger contra la ignición del disolvente orgánico o polímero. Brevemente, la suspensión de solución de partículas de proteína y polímero se bombea al secador por pulverización a una velocidad de aproximadamente 5 ml/min a aproximadamente 20 ml/min, o aproximadamente 12,5 ml/min. La suspensión se bombeó a 12,5 ml/min en el secador por pulverización con un caudal de aire de aspiración y gas de pulverización de aproximadamente 530 l/h y 35 m<sup>3</sup>/h (mm), respectivamente. La temperatura de entrada se ajustó a 90 °C y la temperatura de salida se ajustó a aproximadamente 54 °C. La temperatura de entrada del secador por pulverización se ajusta a una temperatura superior al punto de inflamación del disolvente, como por ejemplo, a aproximadamente 90 °C. La temperatura de salida a una temperatura inferior a la temperatura de admisión y superior a la temperatura

ambiente, como por ejemplo, a aproximadamente 54 °C. En una realización particular, una suspensión que contiene aproximadamente 50 mg/ml de partículas de proteína (por ejemplo, VEGF-Trap) en aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml de solución de polímero/acetato de etilo se bombea a un BÜCHI Mini Spray Dryer B-290 a aproximadamente 12,5 ml/min, con una temperatura de entrada de aproximadamente 90 °C y una temperatura de salida de aproximadamente 54 °C, con el aspirador ajustado a aproximadamente 35 m<sup>3</sup>/h y el gas de pulverización a aproximadamente 530 l/h.

Las micropartículas resultantes, que contienen un núcleo de partículas de proteína dentro de una corteza polimérica, tienen un rango de diámetros de aproximadamente 2 µm a aproximadamente 70 µm, de aproximadamente 5 µm a aproximadamente 65 µm, de aproximadamente 10 µm a aproximadamente 60 µm, de aproximadamente 15 µm a aproximadamente 55 µm, de aproximadamente 20 µm a aproximadamente 50 µm, de aproximadamente 15 µm, de aproximadamente 20 µm, de aproximadamente 25 µm o de aproximadamente 30 µm. La variación de tamaño en gran parte refleja el espesor de la corteza del polímero, aunque el diámetro del núcleo de la proteína podría contribuir en cierta medida a la variación de tamaño. La manipulación de la concentración inicial de la solución de polímero y/o el propio polímero puede controlar el diámetro de la micropartícula. Por ejemplo, las micropartículas que se fabricaron con polímero de 50 mg/ml tienen una mediana de tamaños de aproximadamente 15 µm a 20 µm, mientras que las micropartículas que se fabricaron con polímero de 250 mg/ml tenían una mediana de tamaños de aproximadamente 30 µm.

Las micropartículas producidas por la presente invención son útiles en la liberación prolongada o en el tiempo de proteínas terapéuticas. Por ejemplo, se prevé que las micropartículas de VEGF-Trap sean útiles en la liberación prolongada de la proteína terapéutica de VEGF-Trap en, por ejemplo, el vítreo para el tratamiento de trastornos vasculares oculares, o la implantación subcutánea para la liberación prolongada de VEGF-Trap para tratar el cáncer u otros trastornos.

Las micropartículas producidas por la presente invención liberan proteínas en un entorno acuoso fisiológico a aproximadamente 37 °C a una velocidad relativamente constante durante un período prolongado de tiempo, hasta al menos 60 días. En general, las micropartículas fabricadas con una mayor concentración de polímero (por ejemplo, 250 mg/ml) tendían a mostrar un perfil de liberación de proteínas relativamente lineal; mientras que las micropartículas fabricadas con una concentración más baja de polímero (por ejemplo, 50 mg/ml) tendían a mostrar una liberación súbita inicial seguida de un inicio de liberación retardada de la liberación súbita. Además, las micropartículas formadas a partir de una concentración más alta de polímero mostraron una velocidad de liberación de proteína más lenta que las formadas a partir de una concentración más baja de partículas. La calidad de la proteína liberada de las micropartículas a lo largo del tiempo fue consistente con la calidad del material de proteína de partida. Se produjo poca o ninguna degradación de proteínas.

### Ejemplos

Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la materia una divulgación y una descripción completas de cómo hacer y usar los métodos y composiciones de la invención. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, tamaños, etc.) pero se deben tener en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales.

En los siguientes ejemplos, la proteína VEGF-Trap ("VGT"), que es un dímero del polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, sirve como proteína de fusión del receptor Fc ejemplar.

#### Ejemplo 1: Proteínas micronizadas

Soluciones que contenían 25 mg/ml de proteína VEGF-Trap ("VGT"), 25 mg/ml de VGT más el 0,1 % de polisorbato 80 y 50 mg/ml de VGT en fosfato 10 mM, 2 % de sacarosa, a pH 6,2 se atomizaron cada una independientemente en una micronizador de pulverización seco (BÜCHI Mini Spray Dryer B-290, Buchi Labor Technik AG, Flawil, CH) para formar gotas que contienen VEGF-Trap. Se aplicó calor para evaporar el agua de las gotas, dando como resultado un polvo que contiene VEGF-Trap. La temperatura de entrada se ajustó a 130 °C y la temperatura de salida a aproximadamente 55 °C. El aspirador se ajustó a 33 m<sup>3</sup>/h y el gas de pulverización a 530 l/h. La solución de VGT se bombeó a aproximadamente 7 ml/min.

El tamaño de las partículas VGT resultantes se midió mediante imágenes de micro flujo (MFI) e imágenes de dispersión dinámica de luz (DLS). La Figura 1 representa la distribución del tamaño de partícula determinada por MFI para las partículas de VGT derivadas de cada una de las concentraciones de 25 mg/ml de VGT, 25 mg/ml de VGT más el 0,1 % de polisorbato 80 y 50 mg/ml de VGT. Para todas las concentraciones, el diámetro circular equivalente (DCE) de las partículas VGT varió de aproximadamente 1 µm a aproximadamente 39 µm, con un tamaño para la mayoría de las partículas de aproximadamente 2 µm a aproximadamente 14 µm. Para la solución de 25 mg/ml de VGT, las partículas se agruparon en el rango de aproximadamente 2,5 µm a aproximadamente 8,8 µm, con una moda de aproximadamente 6 µm. Para la solución de 25 mg/ml de VGT más el 0,1 % de polisorbato 80, las partículas se agruparon en el rango de aproximadamente 2,5 µm a aproximadamente 9,7 µm, con una moda de aproximadamente 6 µm. Para la solución de VGT de 50 mg/ml, las partículas se agruparon en el rango de

aproximadamente 2,7  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 12,8  $\mu\text{m}$ , con una moda de aproximadamente 7  $\mu\text{m}$ . Las medianas de los diámetros para cada formulación, según lo determinado por los métodos MFI y DLS, se describen en la Tabla 1.

5 Las partículas de VGT se reconstituyeron en agua para inyección y se examinaron mediante exclusión por tamaños, es decir, exclusión por tamaños-cromatografía líquida de ultra rendimiento (SE-UPLC) para determinar la pureza de la proteína. No se observó ningún cambio en la pureza después de la micronización en relación con el material de partida (ver Tabla 3).

**Tabla 1: Mediana de los tamaños de partículas de proteína ( $\mu\text{m}$ ) según lo determinado por MFI y DLS**

Formulación	Mediana del tamaño por MFI ( $\mu\text{m}$ )	Mediana del tamaño por DLS ( $\mu\text{m}$ )
50 mg/ml de VEGF-Trap	7	7,6
25 mg/ml de VEGF-Trap	6	5,9
25 mg/ml de VEGF-Trap, 0,1 % de polisorbato 80	6	7,1

10

### **Ejemplo 2: Suspensiones de proteína micronizadas en soluciones de polímero orgánico**

15 Se usaron varios polímeros o se contemplan para su uso en la fabricación de la corteza polimérica de las micropartículas. Esos polímeros incluyen, entre otros, etilcelulosa ("EC"), polioctoéster ("POE"), poli-D,L-láctido-co-glicólido ("PLGA") y poli- $\epsilon$ -caprolactona ("PCL").

#### Recubrimiento de etilcelulosa

20 Las partículas de VEGF-Trap micronizadas se suspendieron en una solución de 50 mg/ml de etilcelulosa en acetato de etilo a una concentración de aproximadamente 50 mg/ml de VGT; en el presente documento se denomina "suspensión VGT-50-EC".

25 Las partículas de VEGF-Trap micronizadas se suspendieron en una solución de 100 mg/ml de etilcelulosa en acetato de etilo a una concentración de aproximadamente 50 mg/ml de VGT; en el presente documento se denomina "suspensión VGT-100-EC".

30 Las partículas de VEGF-Trap micronizadas se suspenden en una solución de 250 mg/ml de etilcelulosa en acetato de etilo a una concentración de aproximadamente 50 mg/ml de VGT; en el presente documento se denomina "suspensión VGT-250-EC".

#### Recubrimiento de polioctoéster

35 Las partículas de VEGF-Trap micronizadas se suspendieron en una solución de polioctoéster de 50 mg/ml que contenía aproximadamente el 5 % de ácido latente en acetato de etilo a una concentración de aproximadamente 50 mg/ml de VGT; en el presente documento se denomina "suspensión VGT-50-POE".

40 Las partículas de VEGF-Trap micronizadas se suspendieron en una solución de polioctoéster de 250 mg/ml que contenía aproximadamente el 5 % de ácido latente en acetato de etilo a una concentración de aproximadamente 50 mg/ml de VGT; en el presente documento se denomina "suspensión VGT-250-POE".

#### Recubrimiento de poli-D,L-láctido-co-glicólido

45 Las partículas de VEGF-Trap micronizadas se suspendieron en una solución de 50 mg/ml de PLGA en acetato de etilo a una concentración de aproximadamente 50 mg/ml de VGT; en el presente documento se denomina "suspensión VGT-50-PLGA".

50 Las partículas de VEGF-Trap micronizadas se suspendieron en una solución de 200 mg/ml de PLGA en acetato de etilo a una concentración de aproximadamente 50 mg/ml de VGT; en el presente documento se denomina "suspensión VGT-200-PLGA".

55 Las partículas de VEGF-Trap micronizadas se suspendieron en una solución de 250 mg/ml de PLGA en acetato de etilo a una concentración de aproximadamente 50 mg/ml de VGT; en el presente documento se denomina "suspensión VGT-250-PLGA".

#### Recubrimiento de poli- $\epsilon$ -caprolactona

60 Las partículas de VEGF-Trap micronizadas se suspenden en una solución de 50 mg/ml de PCL en acetato de etilo a una concentración de aproximadamente 50 mg/ml de VGT; en el presente documento se denomina "suspensión VGT-50-PCL".

Las partículas de VEGF-Trap micronizadas se suspenden en una solución de 250 mg/ml de PCL en acetato de etilo

a una concentración de aproximadamente 50 mg/ml de VGT; en el presente documento se denomina "suspensión VGT-250-PCL".

5 La PCL tiene una Tg baja y puede no ser adecuada para el secado por calor como se describe a continuación, pero puede usarse para la extracción con disolvente en un baño acuoso con alcohol polivinílico (PVA), por ejemplo.

### Ejemplo 3: Dispersión de gotas finas de proteína-polímero y eliminación de disolventes

10 Cada suspensión de polímero VGT, que se preparó de acuerdo con el Ejemplo 2 (más arriba), se sometió a secado por pulverización usando un secador por pulverización BÜCHI Mini Spray Dryer B-290 (Buchi Labortechnik AG, Flawil, CH). Brevemente, cada suspensión se atomizó para formar microgotas, que posteriormente se secaron con calor para eliminar el disolvente y formar las micropartículas de proteínas recubiertas con polímero. La suspensión se bombeó a 12,5 ml/min en el secador por pulverización con un caudal de aire de aspiración y gas de pulverización de aproximadamente 530 l/h y 35 m<sup>3</sup>/h, respectivamente. La temperatura de entrada se ajustó a 90 °C y la temperatura de salida se ajustó a aproximadamente 54 °C.

### Ejemplo 4: Caracterización de micropartículas de proteína-polímero

20 Las partículas de proteína recubiertas de polímero secadas por pulverización fabricadas de acuerdo con el proceso ejemplificado generan una pluralidad de micropartículas que tienen un intervalo de diámetros circulares equivalentes de aproximadamente 2,5 µm a aproximadamente 65 µm (Figura 2). La variación de tamaño en gran parte refleja el espesor de la corteza del polímero, aunque el diámetro del núcleo de la proteína podría contribuir en cierta medida a la variación de tamaño.

25 El diámetro de la micropartícula se correlaciona con la concentración inicial de la solución de polímero (Tabla 2, Figura 2). Las micropartículas que se fabricaron usando 50 mg/ml de polímero tenían una mediana de tamaños de aproximadamente 17 µm ± 2,8 µm. Las micropartículas que se fabricaron usando 250 mg/ml de polímero tenían una mediana de tamaños de aproximadamente 29 µm.

### 30 Ejemplo 5: Estabilidad de la proteína después del secado por pulverización

La estabilidad de la proteína VEGF-Trap se evaluó mediante cromatografía de exclusión por tamaños cuantitativa (SE-UPLC), que permite la cuantificación de productos de degradación más pequeños y productos de agregación más grandes en relación con el monómero intacto. Los resultados se describen en la Tabla 3. Esencialmente, la proteína se mantuvo estable durante los procesos de secado por pulverización y recubrimiento por pulverización.

40 La proporción promedio en peso de proteína a polímero también se determinó para las micropartículas fabricadas. Se extrajo una colección de micropartículas fabricadas con polímeros y concentración de polímeros variados y se sometió a cromatografía cuantitativa en fase inversa (RP-HPLC). Los resultados se presentan en la Tabla 3. Los datos pueden interpretarse para respaldar la teoría de que una concentración inicial más alta de polímero produce una corteza polimérica más gruesa en la micropartícula.

**Tabla 2: Valores de diámetro circular equivalente**

Material	Intervalo (µm)	Mediana (µm)	Moda (µm)
VEGF-Trap ("VGT") (50 mg/ml)	2,5 - 29,4	10 - 12	8,3
VGT (50 mg/ml) + POE (50 mg/ml)	2,5 - 64,5	15	9,4
VGT (50 mg/ml) + POE (250 mg/ml)	2,5 - 49,4	29	28,5
VGT (50 mg/ml) + EC (50 mg/ml)	2,5 - 49,6	19	16,5

**Tabla 3: Estabilidad y carga de proteínas**

Material	Material de partida VGT % nativo	VGT extraído de polímeros recubiertos <sup>1</sup>	
		% nativo <sup>2</sup>	% en p/p de VGT/polímero <sup>3</sup>
Material de partida VGT	97,7	-	-
VGT reconstituido	97,6	-	-
VGT (50 mg/ml) + POE (50 mg/ml)	-	96,3	14,6
VGT (50 mg/ml) + POE (250 mg/ml)	-	97,7	1,8
VGT (50 mg/ml) + EC (50 mg/ml)	-	97,1	6,1

<sup>1</sup> Basado en la VEGF-Trap extraída después de una reconstitución de 1 hora para eliminar la VEGF-Trap sin recubrimiento.

<sup>2</sup> Promedio del porcentaje nativo por SE-UPLC (n = 4).

<sup>3</sup> Promedio del porcentaje en peso a peso de carga de VGT a polímero por RP-HPLC (n = 4).

### Ejemplo 6: Liberación de proteína de las micropartículas

La liberación de proteína de las micropartículas se determinó suspendiendo varios lotes de micropartículas en

tampón (fosfato 10 mM, polisorbato 20 al 0,03 %, pH 7,0) y midiendo la cantidad y la calidad de la proteína liberada en la solución a lo largo del tiempo mientras se incubaban a 37 °C. A intervalos de 1-2 semanas, las micropartículas se sedimentaron mediante centrifugación suave y se recogió el 80 % del sobrenadante que contenía la proteína liberada para su posterior análisis. Se reemplazó una cantidad equivalente de tampón fresco y las micropartículas se resuspendieron mediante agitación con vórtex suave y se devolvieron a la cámara de incubación a 37 °C. La cantidad y calidad de la proteína en el sobrenadante se evaluó mediante cromatografía de exclusión por tamaños.

En general, las micropartículas fabricadas con una mayor concentración de polímero (por ejemplo, 250 mg/ml) tendían a mostrar un perfil de liberación de proteínas relativamente lineal; mientras que las micropartículas fabricadas con una concentración más baja de polímero (por ejemplo, 50 mg/ml) tendían a mostrar una liberación súbita inicial seguida de un inicio de liberación retardada de la liberación súbita. Los datos que muestran la liberación prolongada de proteína, que se mantuvo estable, durante aproximadamente 60 días se muestran en la Figura 3 (datos de liberación). La Tabla 4 resume los datos de la tasa de liberación lineal.

**Tabla 4: Dinámica de liberación de proteínas**

Material	VEGF-Trap de liberación de proteínas (mg VGT/semana)
VGT (50 mg/ml) + POE (50 mg/ml)	0,14 ± 0,16
VGT (50 mg/ml) + POE (250 mg/ml)	0,06 ± 0,02
VGT (50 mg/ml) + EC (50 mg/ml)	0,031 ± 0,02

**Ejemplo 7: El tamaño de las partículas se puede manipular por la concentración de polímeros y el flujo de gases de pulverización**

Las distribuciones del tamaño de partícula se controlaron mediante la concentración de polímero y el flujo de atomización del gas de pulverización. El aumento de la concentración de polímero desplazó la distribución hacia partículas más grandes (200 mg/ml de PLGA a 45 µm de flujo de gas de pulverización frente a 100 mg/ml de PLGA a 45 µm de flujo de gas de pulverización; ver Tabla 5). De manera similar, un flujo de gas de pulverización de atomización más bajo dio como resultado gotas más grandes y, por lo tanto, partículas más grandes (PLGA de 100 mg/ml a un flujo de gas de pulverización de 25 µm frente a PLGA de 100 mg/ml a un flujo de gas de pulverización de 45 µm; ver Tabla 5).

**Tabla 5: Tamaño de partícula (todas las métricas son aproximadas)**

[PLGA] (mg/ml)	Caudal de gas (m³/h)	Rango de tamaño de partícula (micrómetros)	Moda del tamaño de partícula (micrómetros)	Porcentaje de volumen total de partículas con un tamaño de partículas de 15 micrómetros
Proteína sola	ND	2,5-25	3,5	1,5 %
100	25	2,5-40	9,4	3,7 %
100	45	2,5-30	9,4	3,7 %
200	45	2,5-30	10,2-15,4	5,4 %

**Ejemplo 8: Tamaño de las partículas y liberación de proteína a través de varios polímeros**

La VEGF-Trap o la IgG se recubrieron por pulverización con poli (ácido láctico) de bajo peso molecular (202S) (PLA-LMW), poli (ácido láctico) de alto peso molecular (203S) (PLA-HMW), polianhídrido poli [1,6-bis(p-carboxifenoxi) hexano] (pCPH), poli (ácido hidroxibutírico-ácido cohidroxivalérico) (PHB-PVA), copolímero en bloque de PEG-poli (ácido láctico) (PEG-PLA) y poli-D,L-láctido-co-glicólido (PLGA). Se combinaron 25 mg/ml de proteína seca por pulverización con 50-100 mg/ml de polímero. Los ensayos de liberación *in vitro* se realizaron en tampón fosfato 10 mM, a pH 7,2 y 37 °C. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

**Tabla 6: Tamaño de partícula dependiente de polímero y liberación de proteína (todas las métricas son aproximadas)**

Polímero	Proteína	Número relativo de partículas a 15 micrómetros	Tiempo hasta la liberación del 100 % de proteína
PLA-LMW	VEGF-Trap	0,8 x 10 <sup>2</sup>	3 días
PLA-HMW	VEGF-Trap	0,8 x 10 <sup>2</sup>	3 días
pCPH	VEGF-Trap	1 x 10 <sup>2</sup>	3 días
PHB-PVA	VEGF-Trap	5 x 10 <sup>2</sup>	1 días
PEG-PLA	VEGF-Trap	0,6 x 10 <sup>2</sup>	6 horas
PLGA	IgG	1 x 10 <sup>2</sup>	8 días

**Ejemplo 9: Estabilidad de la proteína en varios polímeros**

Se extrajeron la VEGF-Trap y la IgG de sus respectivas capas de polímero y se midió la pureza por SE-UPLC. Los resultados se resumen en la Tabla 7. Las proteínas generalmente eran compatibles con el proceso de recubrimiento



por pulverización para los polímeros probados. La proteína permaneció estable durante al menos 14 días para aquellos polímeros que continuaron liberando proteína.

**Tabla 7**

Proteína	Polímero	% de pureza por cromatografía de exclusión por tamaños			
		Después del recubrimiento por pulverización	1 día de liberación <i>in vitro</i> (LIV)	3 días de LIV	14 días de LIV
VEGF-Trap	POE (AP141)	97,7	98,3	98,2	96,7
VEGF-Trap	PLA-LMW	97,0	97,4	92,8	-
VEGF-Trap	PLA-HMW	93,9	97,3	95,4	-
VEGF-Trap	PEG-PLA	89,9	91,2	-	-
VEGF-Trap	pCPH	89,2	94,2	84,8	-
VEGF-Trap	PHB-PVA	97,4	96,2	-	-
VEGF-Trap	PLGA	96,6	97,8	-	93,6
IgG	PLGA	99,2	98,0	-	92,0

5

**Listado de secuencias**

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

10 <120> Micropartículas de proteínas poliméricas

<130> 1110<sup>a</sup>

<140> No disponible

15 <141> 18/11/2012

<150> US 61/561.525

<151> 18/11/2011

20 <160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

25 <211> 415

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> sintético

<400> 1

ES 2 775 104 T3

Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val  
 1 5 10 15

Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr  
 20 25 30

Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe  
 35 40 45

Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu  
 50 55 60

Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg  
 65 70 75 80

Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile  
 85 90 95

Glu Leu Ser Val Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr  
 100 105 110

Glu Leu Asn Val Gly Ile Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys  
 115 120 125

His Gln His Lys Lys Leu Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly  
 130 135 140

ES 2 775 104 T3

Ser Glu Met Lys Lys Phe Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr  
145 150 155 160

Arg Ser Asp Gln Gly Leu Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met  
165 170 175

Thr Lys Lys Asn Ser Thr Phe Val Arg Val His Glu Lys Asp Lys Thr  
180 185 190

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
195 200 205

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
210 215 220

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
225 230 235 240

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
245 250 255

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
260 265 270

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
275 280 285

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
290 295 300

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
305 310 315 320

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
325 330 335

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
340 345 350

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
355 360 365

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
370 375 380

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
385 390 395 400

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
405 410 415

## REIVINDICACIONES

1. Un método para fabricar una composición farmacéutica de liberación prolongada que comprende una partícula de proteína recubierta con un polímero biodegradable, el método que comprende las etapas de:
- 5 (a) someter una solución de la proteína terapéutica a dispersión y secado mediante secado por pulverización para formar partículas de proteína micronizadas, en el que la temperatura de entrada del secador por pulverización se ajusta a una temperatura superior al punto de ebullición del agua, y la temperatura de salida se ajusta a una temperatura inferior al punto de ebullición del agua;
- 10 (b) suspender las partículas de proteína micronizadas en una solución orgánica que comprende un polímero biodegradable y un disolvente orgánico; y
- (c) secar por pulverización la suspensión de (b) para formar una población de micropartículas de polímero de proteínas,
- 15 en el que las micropartículas en la composición farmacéutica de liberación prolongada liberan proteína durante al menos 60 días en un ambiente acuoso fisiológico a 37 °C.
2. El método de la reivindicación 1, en el que cada partícula de proteína de dicha población de partículas de proteína comprende agua a menos del 3 % (p/p).
- 20 3. El método de la reivindicación 1, en el que:
- (i) el secado por pulverización se realiza mediante sonicación de doble boquilla, sonicación de una sola boquilla o electropulverización; y/o
- 25 (ii) el polímero es polioctoéster (POE) o etilcelulosa (EC), preferiblemente en el que el disolvente orgánico es acetato de etilo.
4. El método de la reivindicación 1, en el que las partículas de proteína micronizadas de (a) varían en tamaño desde 2 µm hasta 15 µm.
- 30 5. El método de la reivindicación 1, en el que dicha solución de (a) comprende de 10 mg/ml a 100 mg/ml de dichas partículas de proteína micronizadas.
6. El método de la reivindicación 1, en el que dicha solución acuosa comprende sacarosa.
- 35 7. El método de la reivindicación 1, en el que dicha solución acuosa comprende polisorbato.
8. El método de la reivindicación 1, en el que dicha solución acuosa comprende tampón fosfato.
- 40 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha proteína es un anticuerpo o una proteína de fusión del receptor Fc.
10. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha proteína es VEGF-Trap.
- 45 11. El método de la reivindicación 10, en el que dicha solución acuosa comprende 25 mg/ml o 50 mg/ml de VEGF-Trap, fosfato 10 mM, sacarosa al 2 % y polisorbato al 0,1 %, a un pH de 6,2.
- 50 12. El método de la reivindicación 10, en el que las micropartículas presentes en la composición tienen un diámetro promedio de aproximadamente 15 micrómetros a aproximadamente 30 micrómetros comprende (a) un núcleo de proteína micronizada de aproximadamente 10 a aproximadamente 12 micrómetros, en el que la proteína es una proteína VEGF-Trap; y (b) una cubierta polimérica, en la que el polímero es uno cualquiera o más de PCL, PLGA, etilcelulosa y polioctoéster, y sus copolímeros o derivados.

FIGURA 1

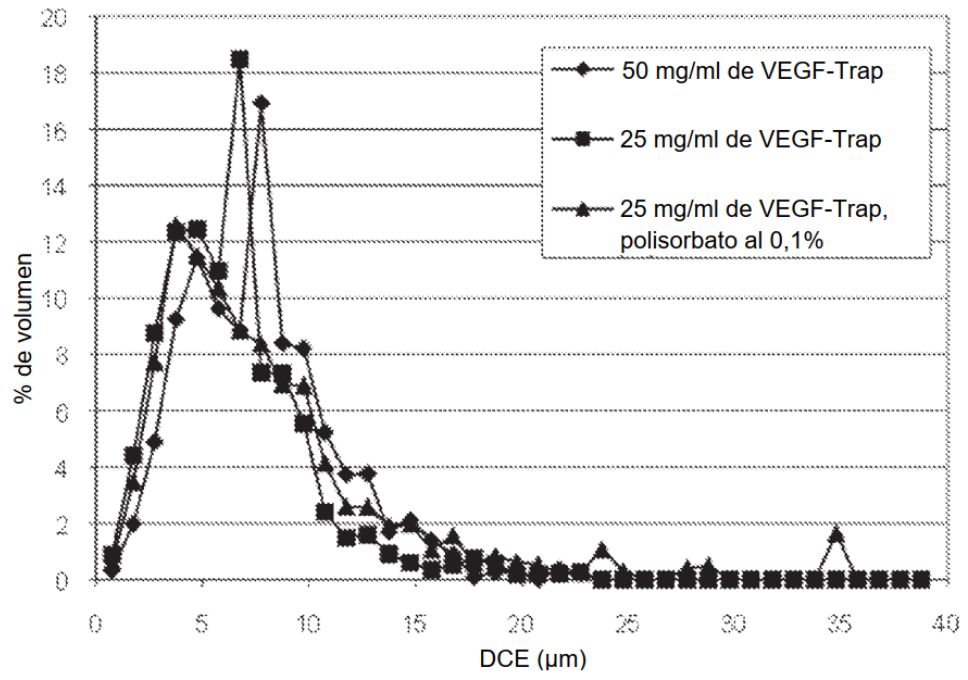


FIGURA 2

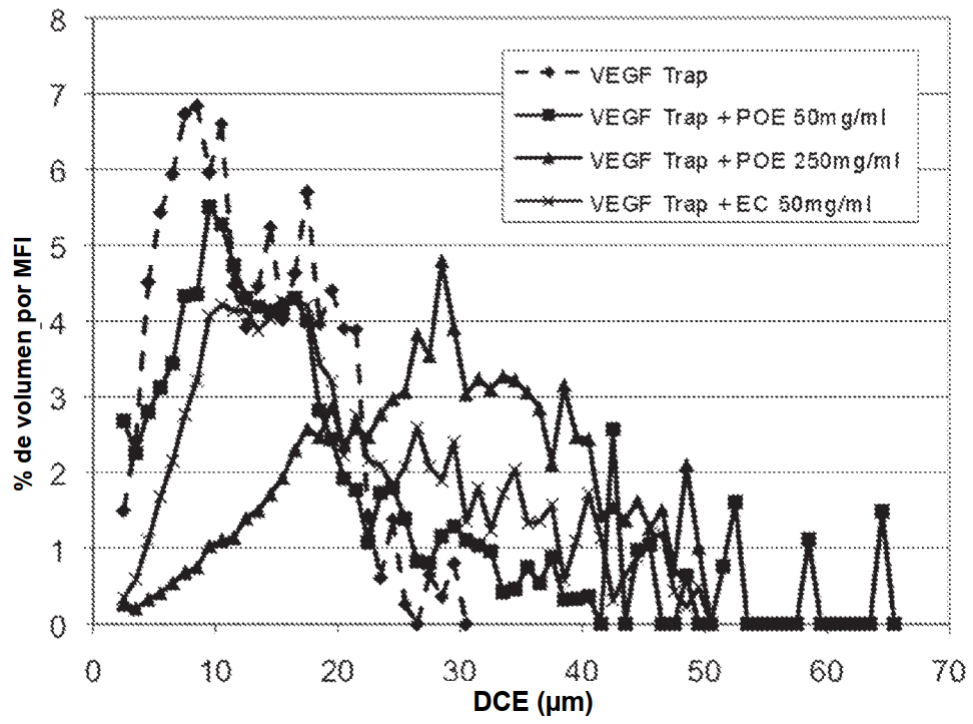


FIGURA 3

