



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 719**

51 Int. Cl.:
A61K 38/28 (2006.01)
A61K 47/36 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04251251 .7**
96 Fecha de presentación : **04.03.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1454630**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.09.2004**

54 Título: **Composición de insulina inyectable de acción larga y métodos para la fabricación y el uso de la misma.**

30 Prioridad: **04.03.2003 US 451245 P**
05.05.2003 US 467601 P
09.05.2003 US 469017 P
15.08.2003 US 495097 P

73 Titular/es: **THE TECHNOLOGY DEVELOPMENT
COMPANY Ltd.**
Reid House, 31 Church Street
Hamilton HM FX, BM

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.04.2011

72 Inventor/es: **Sabetsky, Vladimir**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.04.2011

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 357 719 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

Composición de insulina inyectable de acción larga y métodos para la fabricación y el uso de la misma.

5 La presente invención se refiere generalmente a composiciones de insulina y específicamente a una composición de insulina inyectable que contiene insulina y micropartículas de dextrano cristalizadas.

Antecedentes de la invención

10 Los dextranos son polisacáridos de alto peso molecular sintetizados por algunos microorganismos o por métodos bioquímicos. El dextrano con peso molecular medio de aproximadamente 75 kDa tiene una presión osmótica coloidal similar al plasma sanguíneo, de modo que sus soluciones acuosas se usan clínicamente como extensores de plasma. Los dextranos reticulados en forma de perlas son la base del "Sephadex"[®] que se usa en la GPC de proteínas y de "Cytodex"[®] desarrollado por Pharmacia para satisfacer las necesidades especiales de un cultivo celular de microve-
15 hículo. Por ejemplo, las Patente de Estados Unidos N° 6.395.302 y 6.303.148 (Hennink *et al.*) describen la unión de diversos biomateriales a partículas de dextrano reticuladas. Sin embargo, generalmente no pueden usarse perlas basadas en dextrano reticulado para la fabricación de implantes debido a su potencial toxicidad debido a la aplicación de agentes de reticulación (Blain J.F., Maghni K., Pelletier S. y Sirois P. *Inflamm. Res* 48 (1999): 386-392).

20 La Patente de Estados Unidos N° 4.731.249 (Schroder) describe un método para producir una matriz de depósito para sustancias biológicamente activas. De acuerdo con esta patente, la matriz de depósito consiste supuestamente en micropartículas de carbohidratos, estabilizadas mediante cristalización, lo que implica el uso de enlaces no covalentes. El siguiente proceso para producir las supuestas micropartículas de carbohidratos cristalizadas se describe por Schroder. Se forma una solución de un carbohidrato polimérico y una sustancia biológicamente activa en uno o
25 más disolventes hidrófilos. Después la mezcla del carbohidrato y la sustancia biológicamente activa se emulsiona en un medio líquido hidrófobo para formar pequeñas gotas esféricas. La emulsión se introduce después en un medio de cristalización que comprende acetona, etanol o metanol para formar esferas que tengan una matriz de carbohidratos poliméricos cristalinos reticulados de forma no covalente, incorporando dicha matriz 0,001-50% en peso de la sustancia biológicamente activa. Por lo tanto, la sustancia biológicamente activa se proporciona a la solución antes de la
30 cristalización de las esferas. Schroder no describe la microestructura de las micropartículas realizadas por el método multietapa. El método multietapa de Schroder es complejo y usa disolventes orgánicos que son potencialmente tóxicos para células y requieren su eliminación.

Breve resumen de la invención

35 La invención proporciona la composición de la reivindicación 1, composiciones farmacéuticas dosificadas de la reivindicación 6, el método de la reivindicación 13 y el uso de la reivindicación 18.

Breve descripción de los dibujos

40 La Figura 1 es una fotografía de micropartículas de dextrano cristalizadas formadas espontáneamente en una solución acuosa al 55,0% (P/P) de dextrano con un peso molecular de 70,0 kDa.

45 La Figura 2A es una fotografía de una sección transversal de micropartículas de dextrano cristalizadas mostradas en la Figura 1.

La Figura 2B es una fotografía de una sección transversal de una micropartícula mostrada en la Figura 2A. Puede verse la estructura microporosa de la micropartícula.

50 La Figura 3 es una fotografía de agregados de micropartículas de dextrano cristalizadas.

La Figura 4 es una fotografía de una liberación lenta de las macromoléculas marcadas con fluorescencia desde el implante que incluye micropartículas de dextrano cristalizadas en tejido muscular de ratón el 14° día después de la inyección intermuscular.

55 La Figura 5 es una fotografía de una emulsión de una solución acuosa de PEG (en solución acuosa de dextrano (PM 500 kDa) que contiene micropartículas de dextrano cristalizadas mostradas en la Figura 1.

60 La Figura 6 es una fotografía de una emulsión de solución acuosa de dextrano (PM 500 kDa) que contiene micropartículas de dextrano cristalizadas mostradas en la Figura 1 en solución acuosa de PEG.

La Figura 7 es una fotografía de una inyección intramuscular de emulsión de solución de acuosa de PEG en solución acuosa de dextrano (PM 500 kDa) que contiene micropartículas de dextrano cristalizadas mostradas en la Figura 1.

65 La Figura 8 es una fotografía de una inyección subcutánea de emulsión de solución acuosa de PEG en una solución acuosa de dextrano (peso molecular 500 kDa) que contiene micropartículas de dextrano cristalizadas mostradas en la Figura 1.

ES 2 357 719 T3

Las Figuras 9A y 9C ilustran de forma esquemática el comportamiento de reparto de diferentes tipos de partículas y fases en un sistema acuoso de dos fases.

5 La Figura 9B es una fotografía de una sección transversal de una estructura de un implante basándose en el sistema de dos fases.

Las Figuras 10 y 11 ilustran esquemáticamente métodos de suministro de agente terapéutico de acuerdo con realizaciones de la presente invención.

10 Las Figuras 12A y 12B son gráficas de normalización relativa de concentraciones de glucosa en sangre para diversas composiciones que contienen insulina frente a tiempo.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

15 El presente inventor ha descubierto que una composición de micropartículas de dextrano cristalizadas e insulina inyectada en mamíferos prolongó de manera inesperada la duración de la eficacia de la insulina en comparación con inyecciones de la misma dosis de la misma insulina por sí sola. La composición puede ser una composición de una fase o una composición multifase que forma un implante estructurado en un mamífero.

20 La primera sección a continuación describe las micropartículas de dextrano cristalizadas, la segunda sección describe la formación del implante estructurado desde una composición multifase y las siguientes secciones describen ejemplos específicos de inyección de la composición en mamíferos y métodos para realizar la composición inyectable.

A. *Micropartículas de Dextrano Cristalizadas*

25 El presente inventor ha descubierto experimentalmente que se formaron de forma espontánea micropartículas de dextrano cristalizadas con un diámetro medio que variaba de 0,5 a 3,5 micrómetros en soluciones acuosas concentradas de dextranos (40-65% P/P) con pesos moleculares que variaban de 1,0 a 200,0 kDa, a una temperatura que variaba de 20 a 90°C. Si se desea formar las micropartículas a temperatura ambiente, entonces pueden usarse soluciones de dextrano de 2 a 18 kDa. Por supuesto, las micropartículas también pueden formarse con soluciones de 2 a 18 kDa a temperaturas por encima de la temperatura ambiente, si se desea. Las micropartículas pueden formarse espontáneamente a partir de soluciones de dextrano de mayor peso molecular, tales como soluciones de 20 a 75 kDa, a mayores temperaturas por encima de la temperatura ambiente, tales como de aproximadamente 40 a aproximadamente 70°C. Las micropartículas pueden tener cualquier forma adecuada tal como una forma regular o irregular, pero preferiblemente tienen forma esférica, y preferiblemente tienen un diámetro de 10 micrómetros o menos, tal como de 0,5 a 5 micrómetros.

30 La microscopía electrónica de transmisión reveló la estructura microporosa de las micropartículas de dextrano cristalizadas (véanse Figuras 2A, 2B). Preferiblemente, la porosidad de las micropartículas es de al menos un 10 por ciento en volumen, tal como de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 por ciento, más preferiblemente de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 por ciento. Por lo tanto, la estructura comprende micropartículas microporosas con áreas de macroporosidad localizadas entre las partículas.

35 El secado por pulverización de suspensiones acuosas de las micropartículas de dextrano cristalizadas ha mostrado la posibilidad de producir agregados sustancialmente esféricos de micropartículas de dextrano cristalizadas con un diámetro que varía de 10,0 a 150,0 micrómetros (véase Figura 3).

40 Un ejemplo no limitante de un método de formación de las micropartículas dextrano es el siguiente. 50,0 g de dextrano T40 (peso molecular de 40 kDa) de Amersham Biosciences se añaden a 50,0 g de agua destilada estéril en un vaso de precipitado de laboratorio de 500 ml para obtener una solución a 50% p/p en flujo laminar. La mezcla se agita a 60°C (baño en agua) en un agitador magnético a 50 rpm hasta que el dextrano se disuelve completamente y se obtiene una solución transparente. La solución puede someterse a vacío para eliminar todas las inclusiones de aire. La solución transparente se coloca en un horno de laboratorio a 60°C bajo una tapa Tyve®. 3,5 horas después, se desarrolla una suspensión viscosa turbia como resultado de la formación de micropartículas de dextrano cristalizadas.

45 50 55 Para eliminar el dextrano no cristalizado, se lavan las micropartículas por centrifugación, por ejemplo a 3.000 g, 30 minutos, con 3 x 250 ml de agua estéril destilada o por filtración de la suspensión diluida de micropartículas, por ejemplo, un parte de micropartículas y 10 partes de agua (3 x 250 ml de agua estéril destilada a través de un filtro de esterilización). La centrifugación/lavado se realiza en flujo laminar. Las micropartículas se colocan en un vaso de precipitados de laboratorio de 500 ml bajo una tapa Tyvek® y se seca a 60°C en un horno de laboratorio durante 8 horas para alcanzar un nivel de humedad de aproximadamente el 5%. El polvo seco resultante consiste en partículas con un diámetro medio de aproximadamente 2 micrómetros.

60 65 Las micropartículas cristalizadas preferiblemente se comprenden de moléculas de dextrano (es decir, moléculas poliméricas) que se mantienen juntos por una pluralidad de enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van Der Waals y/o enlaces iónicos y que sustancialmente no tienen enlaces covalentes entre las moléculas de dextrano. Por lo tanto, las moléculas en las micropartículas preferiblemente no se reticulan de manera intencionada (es decir, no se lleva a cabo una etapa de reticulación) y las micropartículas no contienen enlaces covalentes entre moléculas o contienen menos del 10% de enlaces covalentes entre moléculas.

La liberación lenta de macromoléculas de los implantes se ha demostrado en experimentos en los que las macromoléculas se disolvieron en suspensiones acuosas de micropartículas de dextrano cristalizadas o sus agregados antes de las inyecciones. La Figura 4 muestra un implante que contiene macromoléculas marcadas con fluorescencia (FITC-dextrano, peso molecular 500 kDa) y la liberación lenta de las macromoléculas del implante a un tejido muscular de ratón en el 14º día después de la inyección intermuscular.

B. Sistema de dos fases

Puede formarse estructuras de implantes autoensambladas basándose en las micropartículas de dextrano cristalizadas y sus agregados basándose en sistemas de dos fases.

Los sistemas coloidales tales como pequeñas gotas de aceite, liposomas, micro y nanopartículas pueden dispersarse en una suspensión de micropartículas de dextrano cristalizadas e inyectarse para formar un implante que libera un agente o agentes terapéuticos después de la administración en el cuerpo del mamífero.

Por ejemplo, en el caso del aceite, puede formarse un tipo especial de estructura de implante en el que el núcleo oleoso se rodea de una cubierta compuesta de micropartículas de dextrano cristalizadas o agregados de las mismas dispersos en agua o soluciones acuosas de polímeros orgánicos tales como polisacáridos (por ejemplo, dextranos). La estructura descrita puede designarse como una cápsula. Debería observarse que la cubierta puede comprender una forma aproximadamente esférica que se produce cuando la cápsula está rodeada por tejido. Sin embargo, cuando la cápsula se localiza cerca de una barrera, tal como un sustrato, hueso o pared intestinal, la cápsula puede comprender un núcleo localizado entre una o más paredes de micropartículas en un lado y la barrera en el otro lado. Además, aunque se usa aceite como un ejemplo ilustrativo, el núcleo puede comprender otros materiales, tales como otros polímeros, células, etc.

Para formar la estructura de la cápsula, se aplican sistemas acuosos de dos fases. Cuando se mezclan soluciones acuosas de diferentes polímeros por encima de ciertas concentraciones frecuentemente forman soluciones líquidas de dos fases inmiscibles. Cada una de las fases consiste habitualmente en más de un 90% de agua y pueden tamponarse y hacerlas isotónicas. Si se añade una suspensión de células o partículas a dicho sistema, frecuentemente se descubre que las células o partículas se han repartido de forma desigual entre fases. Este comportamiento de reparto preferente puede usarse como la base para procedimientos de separación para poblaciones celulares o partículas que difieren puesto que el reparto en estos sistemas se determina directamente por propiedades de la superficie de las células o de las partículas. Las células o partículas que no tienen propiedades de superficie idénticas muestran un comportamiento de reparto suficientemente diferente.

La adsorción competitiva de las dos fases de polímero depende de la naturaleza química de los polímeros. Un método de polímero de dos fases se ha aplicado para separar o repartir células, proteínas, ácidos nucleicos y minerales ("Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems", 1985, eds., H. Walter, D. Brooks y D. Fisher, publs. Academic Press).

Los experimentos con la distribución de las micropartículas de dextrano cristalizadas en sistema de fase derivados de, por ejemplo, mezclas de dextrano/polietilenglicol (PEG), revelaron que las micropartículas de dextrano prefieren estar en la fase de dextrano, mientras que puede dispersarse otra fase de PEG en esta fase de dextrano para formar una emulsión P/P y viceversa en el caso en el que el volumen de la fase de PEG es mayor que el volumen de la fase de dextrano, como se muestra en las Figuras 5 y 6.

La Figura 5 es una fotografía de una emulsión de solución acuosa de PEG en solución acuosa de dextrano que contiene micropartículas de dextrano cristalizadas. En la estructura de la Figura 5, el volumen de la fase de PEG es menor que el volumen de la fase de dextrano. La fase de dextrano contiene el dextrano y las micropartículas de dextrano cristalizadas. Por lo tanto, la fase de PEG forma uno o más núcleos de forma esférica rodeados por cubiertas de dextrano/micropartículas de dextrano (es decir, una estructura porosa cerrada).

La Figura 6 es una fotografía de una emulsión de solución acuosa de dextrano que contiene micropartículas de dextrano cristalizadas en solución acuosa de PEG, en la que el volumen de la fase de PEG es mayor que el volumen de la fase de dextrano. En este caso, la fase de dextrano forma uno o más núcleos de forma esférica que contienen las micropartículas de dextrano rodeadas por una fase de PEG (es decir, una estructura de poro abierto que se forma *in vivo* mientras que PEG se disipa en líquido tisular). Como puede verse en la Figura 6, la fase de dextrano de volumen de menor (gota pequeña) forma un núcleo esférico grande de dextrano/micropartículas de dextrano (parte inferior derecha de la Figura 6) al que se unen y fusionan esferas más pequeñas que comprenden dextrano/micropartículas de dextrano.

De este modo, cuando la relación de volumen de la primera fase (tal como la fase PEG y sus inclusiones, tal como un agente terapéutico) con el volumen de la segunda fase (tal como la fase de dextrano y sus inclusiones, tal como las micropartículas de dextrano) es menor que uno, entonces la cápsula se forma por autoensamblaje con un núcleo de la primera fase rodeado por una cubierta de la segunda fase. Si la composición contiene un agente terapéutico, tal como insulina, que prefiere repartirse en la fase de PEG y las micropartículas de dextrano que prefieren repartirse a la fase de dextrano, entonces el agente terapéutico se reparte selectivamente en el núcleo de PEG mientras que las micropartículas se reparten selectivamente y forman la cubierta alrededor del núcleo de PEG por autoensamblaje.

ES 2 357 719 T3

La emulsión puede prepararse por la mezcla de fases de dextrano y PEG preparadas de forma separada y ambas pueden ser suspensiones de diferentes tipos de partículas que prefieren estar en la fase de PEG o en la fase de dextrano respectivamente. El principio es que el reparto de las partículas en diferentes fases de polímeros depende de su estructura de superficie y de la energía interfacial de las partículas en las soluciones de polímeros.

5

La inyección de sistemas acuosos de dos fases que contienen micropartículas de dextrano cristalizadas en tejidos de animales experimentales reveló la formación de implantes con la estructura de cápsula como se muestra en las Figuras 7 y 8. El volumen de la fase de dextrano es mayor que el volumen de la fase de PEG en el sistema de dos fases. Tanto la Figura 7 como la 8 muestran que una cápsula con un núcleo de PEG y una cubierta de dextrano/micropartículas de dextrano se forma por autoensamblaje *in vivo* (es decir, después de su inyección en tejido de mamífero). La cubierta comprende regiones macroporosas entre las micropartículas adyacentes así como regiones microporosas en las micropartículas mismas.

10

Un ejemplo no limitante de un método para formar una estructura de cápsula a partir de un sistema de dos fases es el que sigue. 10 g de dextrano T40 (peso molecular de 40 kDa) y 2 g de PEG se disuelven en 88 ml de solución de insulina (Actrapid®) que contiene 1.000 UI a la que se añaden 25 g de micropartículas de dextrano cristalizadas. Estas etapas se realizan en condiciones de flujo laminar. La mezcla se agita en un agitador magnético a 100 rpm a temperatura ambiente durante 30 minutos para formar una mezcla homogénea (es decir, una suspensión). 1,0 g de la suspensión contiene 8 UI de insulina.

15

20

Debería observarse que las micropartículas de dextrano pueden prepararse a partir de una solución de dextrano de peso molecular diferente que la solución de dextrano que se proporciona en el sistema de dos fases. Por lo tanto, las micropartículas de dextrano cristalizadas pueden formarse en una solución de dextrano de menor peso molecular, tal como una solución de 2 a 20 kDa, que la solución de dextrano que se proporciona en el sistema de dos fases, que puede ser una solución de dextrano de 40 a 500 kDa, tal como una solución de 40 a 75 kDa. Esto es ventajoso por que las soluciones de dextrano de alto peso molecular, tales como soluciones de 40 y 70 kDa, han recibido una aprobación reguladora más amplia y pueden usarse para formar una cubierta o una cápsula con concentraciones menores. Las soluciones de peso molecular menor pueden usarse para disminuir el tiempo de cristalización sin proporcionarse de hecho la solución de dextrano de menor peso molecular *in vivo*. Además, las micropartículas de menor peso molecular pueden disolverse más fácilmente *in vivo*.

25

30

La estructura de cápsula formada a partir de un sistema de dos fases es ventajosa porque permite una liberación más prolongada y uniforme del agente terapéutico desde el núcleo que desde una composición que comprende una fase única que contiene las micropartículas. Además, se cree que mediante el uso de la estructura de cápsula, puede necesitarse una cantidad menor de micropartículas para conseguir una liberación temporalizada igual o mejor de un agente terapéutico que si se usa un sistema de fase única. Además, controlando la cantidad de micropartículas en el sistema de dos fases, se cree que puede controlarse el grosor de la cubierta de micropartícula. Se produce una cubierta más gruesa a partir de una cantidad mayor de micropartículas en el sistema de dos fases. Por lo tanto, la cantidad, duración y/o temporización de la liberación del agente terapéutico del núcleo de cápsula puede controlarse mediante el control del grosor de la cubierta. Por lo tanto, el perfil de liberación del agente terapéutico puede adaptarse para cada paciente o grupos de pacientes.

35

40

Debería observarse que aunque PEG y dextrano se usan como ejemplo de los materiales de las dos fases puede usarse en su lugar cualquier otro material adecuado que muestre el siguiente comportamiento de reparto. La Figura 9A ilustra esquemáticamente el comportamiento de reparto de diferentes tipos de partículas en un sistema acuoso de dos fases. Por ejemplo, tres tipos de moléculas o agregados moleculares, que son preferiblemente las partículas 10, 12 y 14 y dos fases 16 y 18 se muestran en la Figura 9A. Sin embargo, pueden existir dos o más de tres tipos de partículas. Las partículas pueden ser micropartículas tales como microesferas o nanoesferas preparadas a partir de materiales orgánicos y/o inorgánicos, liposomas, células vivas, virus y macromoléculas. Las partículas de primer tipo 10 preferentemente se segregan a la primera fase 16. Las partículas de segundo tipo 12 preferentemente se segregan al límite de la primera fase 16 y la segunda 18. Las partículas de tercer tipo 14 preferentemente se segregan a la segunda fase 18. De este modo, por analogía con el anterior ejemplo no limitante, las primeras partículas 10 pueden comprender un agente terapéutico, las segundas partículas 12 y/o las terceras 14 pueden comprender micropartículas de dextrano cristalizadas, la primera fase 16 puede comprender una fase de PEG y la segunda fase 18 puede comprender una fase de dextrano.

45

50

55

Si se proporciona una cantidad menor de la primera fase 16 en una cantidad mayor de la segunda fase 18, como se muestra en el área 20 de la Figura 9A, entonces se forma una estructura tipo cápsula que comprende esferas discretas de la primera fase 16 que contienen una concentración de las partículas de primer tipo 10, localizada en una segunda fase 18. Las partículas de segundo tipo 12 pueden localizarse en el interfaz de las fases 16, 18 y actuar como una cubierta de la cápsula. Las partículas 14 se dispersan en la segunda fase 18 y/o forman una cubierta de la cápsula.

60

Por el contrario, si se proporciona una cantidad menor de la segunda fase 18 en una cantidad mayor de primera fase 16, como se muestra en el área 22 de la Figura 9A, entonces se forma una estructura de tipo cápsula que comprende esferas discretas de la segunda fase 18 que contiene una concentración de las partículas de tercer tipo 14, localizada en una primera fase 16. Las partículas de segundo tipo 12 pueden localizarse en el interfaz de las fases 16, 18 y actuar como una cubierta de la cápsula. Las partículas 10 se dispersan en la primera fase 16 y/o forman una cubierta de la cápsula. Los sistemas de dos fases 20 y 22 pueden usarse como un implante, tal como inyectándolo en un mamífero, tal

65

como un animal o un ser humano. De este modo, la cápsula forma un implante estructurado, tridimensional, actuando el núcleo como un depósito o almacén para la liberación controlada del agente terapéutico a través de la cubierta. Por el contrario, un implante con una distribución uniforme de micropartículas es un implante no estructurado.

5 Además, las partículas 10, 12 y 14 pueden sustituirse por un material líquido (por ejemplo aceite) o macromoléculas que se reparten de manera selectiva en una de las fases. Por ejemplo, un agente terapéutico, tal como insulina, puede repartirse en la fase de PEG del sistema de dos fases de PEG/dextrano. Puesto que la insulina se reparte de forma selectiva en la fase de PEG, la fase de PEG forma un núcleo que contiene insulina de una estructura de cápsula. Debería observarse que aunque ciertas partículas y agentes terapéuticos se reparten de forma selectiva, la expresión
10 “repartido de forma selectiva” no se refiere necesariamente a que el 100 por cien de las partículas del agente terapéutico se repartan en una de las fases. Sin embargo, una mayoría de la especie repartida de forma selectiva, preferiblemente el 80% de la especie que se reparte, se reparte en una de las fases. Por ejemplo, aunque la mayor parte de la insulina se reparte en la fase de PEG, una porción de insulina puede permanecer en la fase de dextrano.

15 La Figura 9B ilustra una imagen de microscopía electrónica de barrido de una sección transversal de una estructura de implante, basándose en el sistema de dos fases ilustrado esquemáticamente en la Figura 9A. Una composición acuosa de dos fases que comprende una primera fase de dextrano, una segunda fase de PEG y micropartículas de dextrano cristalizadas se inyectó en gel de sepharose. La composición de este gel imita el tejido de mamífero deteniendo la difusión de las micropartículas de dextrano cristalizadas desde el lado de la inyección. La imagen de la Figura 9B
20 ilustra la formación de una estructura de un implante núcleo-cubierta. El núcleo comprende la regiones 30 y 32 rodeadas por una cubierta 34. La región 30 es un vacío que se llena con una región de fase PEG antes de cortar el gel para tomar una imagen de MEP en sección transversal. La región de fase PEG gotea fuera del gel cuando se corta el gel durante la formación de sección transversal. La región 32 es una porción exterior del núcleo que comprende pequeñas gotas de PEG localizadas en las micropartículas de dextrano cristalizadas. La región 34 es la cubierta que comprende
25 las micropartículas de dextrano cristalizadas que rodea y sujeta el núcleo que contiene PEG.

Sin desear quedar ligado a una teoría particular, el presente inventor cree que la estructura de núcleo-cubierta mostrada en la Figura 9B se forma por autoensamblaje como se muestra esquemáticamente en la Figura 9C. Aunque la primera fase 16 y la segunda fase 18, tales como soluciones acuosas de polímeros diferentes incompatibles están
30 en un envase de almacenamiento adecuado 19, tal como un vaso de precipitados de vidrio o un frasco, una fase 16 se eleva sobre la otra fase 18. Cuando la composición de dos fases se inyecta en un material que restringe el flujo libre de las fases 16 y 18, tal como tejido de mamífero o un material de sustrato, tal como un gel que imita el tejido, la composición se autoensambla en la estructura de núcleo-cubierta. Primero, la fase que está presente en el menor volumen toma formas aproximadamente esféricas, como se muestra en la porción media de la Figura 9C. Después las
35 formas esféricas se unen para formar núcleos aproximadamente esféricos de una fase rodeados por cubiertas de la otra fase, como se muestra en la parte inferior de la Figura 9C. Aunque se ha ilustrado un ejemplo de un sistema de dos fases de un sistema de multifase, el sistema de multifase puede tener más de dos fases si se desea.

40 C. Vehículo de suministro de la insulina inyectable

El presente inventor ha descubierto que una composición de micropartículas de dextrano cristalizadas e insulina inyectada en mamíferos, tal como ratones y conejos, prolongó inesperadamente la duración de la eficacia de la insulina en comparación con inyecciones de la misma dosis de la misma insulina por sí sola. La Figura 10 ilustra de forma
45 esquemática la formación de un implante 40 en un mamífero 53 por inyección de una composición de una fase que comprende las micropartículas 12, 14 y la insulina 46 usando una jeringa 56. La Figura 11 ilustra esquemáticamente la formación de un implante estructurado 40 en un mamífero 53 por inyección de una composición de 2 fases que comprende una fase de dextrano 18 que contiene micropartículas de dextrano cristalizadas repartidas selectivamente 12, 14 y una fase de PEG 16 que contiene agente terapéutico repartido selectivamente 10 que comprende insulina. La fase de dextrano 18 forma una cubierta alrededor del núcleo de fase de PEG 16. Puesto que los ratones y conejos son
50 un modelo habitual para seres humanos en el ensayo de fármacos, el presente inventor cree que la composición que comprende micropartículas de dextrano cristalizadas e insulina también sería eficaz en la extensión de la duración de eficacia de la insulina cuando se inyecta en adultos y niños humanos.

Los ejemplos 1-8 ilustran la ventaja de usar micropartículas de dextrano cristalizadas como un vehículo de suministro de insulina inyectable en comparación con la insulina inyectada por sí sola. El experimento implicó ratones y se realizó la observación de su respuesta a una suspensión acuosa inyectada por vía subcutánea que consistió en micropartículas de dextrano cristalizadas e insulina recombinante humana (NovoNordisk Actrapid HP Penfil[®], 40
55 UI/ml).

60 La suspensión se preparó como sigue. Se disolvieron 5,0 g de Dextrano T10 (Farmacia, Uppsala, Suecia) en 20,0 g de agua. La solución se filtro a través de un filtro de 0,22 μm (Millipore, Bedford, MA) y se liofilizó. Se disolvieron 3,0 g del polvo resultante en 3,0 g de agua estéril y se almacenó a 60°C de temperatura. 6 horas después, se lavaron las micropartículas de dextrano cristalizadas por centrifugación a 3.000 g con 3 x 5,0 ml de agua estéril. Finalmente, la suspensión de micropartículas de dextrano cristalizadas producida se mezcló con solución de insulina acuosa y se usó en el experimento con ratones. Se introdujeron muestras de la suspensión en las patas de los ratones y se tomaron muestras de sangre animal de la cola de cada ratón y se analizó con respecto a concentraciones de glucosa. La glucosa en sangre se midió usando el método de la glucosa oxidasa en un analizador de glucosa con sistema One-touch (Lifescan, Johnson & Johnson, Milpitas, CA, Estados Unidos) después de una calibración apropiada.

ES 2 357 719 T3

En el ejemplo comparativo 1, no se inyectó insulina al ratón. En los ejemplos comparativos 2, 3 y 7, se inyectó solamente insulina (0,5 UI) a los tres ratones. Los ejemplos 4-6 y 8, se inyectó insulina (0,5 UI) y un implante de micropartículas de dextrano cristalizadas a los cuatro ratones. Los resultados se resumen en la Tabla I.

5

TABLA I

Nº de Ej.		mmol de glucosa/l 0 min	mmol de glucosa/l 15 min	mmol de glucosa/l 30 min	mmol de glucosa/l 45 min	mmol de glucosa/l 120 min	mmol de glucosa/l 210 min	mmol de glucosa/l 270 min	mmol de glucosa/l 390 min
1	ratón intacto	7,9	8,1	8,2	8,4	-	-	-	-
2	Insulina 0,5 UI	5,9	3,3	2,7	1,8	0,9	3,5	3,0	3,2
3	Insulina 0,5 UI	8,1	3,8	2,8	1,9	0,9	3,7	3,4	3,5
4	Insulina 0,5 UI con micropartículas de dextrano cristalizadas	6,0	4,3	3,2	2,5	0,8	0,8	0,9	0,6
5	Insulina 0,5 UI con micropartículas de dextrano cristalizadas	6,9	5,6	4,1	3,4	-	1,2	-	1,6
6	Insulina 0,5 UI con micropartículas de dextrano cristalizadas	5,9	3,5	2,9	1,9	1,2	1,0	1,0	0,7
7	Insulina 0,5 UI (media)	7	3,6	2,8	1,9	0,9	3,6	3,2	3,4
8	Insulina 0,5 micropartículas de dextrano cristalizadas (media)	6,3	4,5	3,4	2,6	1,0	1,0	1,0	1,0

65

La reducción media de azúcar en la sangre (es decir, glucosa en sangre) de los animales es muy diferente cuando se aplicaron 0,5 UI i.m. con y sin micropartículas de dextrano cristalizadas. Como se muestra en la Tabla 1, el nivel de glucosa en los ratones de los ejemplos comparativos 2, 3 y 7 es aproximadamente el mismo o menor que el nivel

ES 2 357 719 T3

de glucosa en ratones de los ejemplos 4-6 y 8 durante los primeros 45 minutos después de la inyección. El nivel de glucosa es aproximadamente el mismo en ratones de ambos ejemplos comparativos 2, 3 y 7 y los ejemplos 4-6 y 8, 120 minutos después de la inyección. Sin embargo, el nivel de glucosa en los ratones de los ejemplos comparativos 2, 3 y 7 es aproximadamente 3 veces mayor que el nivel de glucosa en los ratones de los ejemplos 4-6 y 8 de 210 a 390 minutos después de la inyección. De hecho, el nivel de glucosa en sangre de los ratones en los ejemplos 4-6 y 8 no aumentó sustancialmente (es decir, no aumentó más del 10%, permaneció igual o disminuyó) de 120 minutos a 390 minutos después de la inyección. Por el contrario, el nivel de glucosa en sangre en ratones en los ejemplos comparativos 2, 3 y 7 inyectados con la misma cantidad de insulina aumentó sustancialmente de 120 a 390 minutos después de la inyección. La inyección de micropartículas de dextrano cristalizadas/insulina disminuye la glucosa en sangre durante un tiempo mayor que una inyección de insulina de la misma dosis por sí sola. Por lo tanto, la composición que contiene micropartículas de dextrano cristalizadas y la insulina puede dosificarse para inyección.

Los siguientes experimentos en conejos también demuestran como la inyección de micropartículas de dextrano cristalizadas/insulina disminuye la glucosa en sangre y mantiene un nivel basal de insulina de sangre durante un tiempo mayor que una inyección de la misma insulina de la misma dosis por sí sola. Se descubrió inesperadamente que una composición inyectada por vía subcutánea que comprende insulina de acción corta de Actrapid HM[®] y micropartículas de dextrano cristalizadas prolongaba la duración de la eficacia de esta insulina de acción corta hasta superar la de la insulina de acción larga inyectada por vía subcutánea Monotard HM[®] por sí sola.

La expresión duración de la eficacia se refiere a la disminución de la concentración de glucosa en sangre y/o el mantenimiento de un nivel basal de concentración de insulina en sangre a niveles deseados independientemente de acontecimientos externos que provoquen adiciones de glucosa en sangre, tal como comer. Por lo tanto, la expresión duración de la eficacia es una expresión relativa que compara la eficacia de la composición de insulina y micropartículas con la de la misma dosis de la misma insulina por sí sola. En otras palabras, la duración de eficacia es una duración de acción o una duración del efecto farmacológico, que puede medirse en un paciente en un estado de ayuno para comparar la eficacia de la composición de insulina y micropartículas con la de la misma dosis de la misma insulina por sí sola.

Como se muestra en las Figuras 12A y 12B, la composición que comprende la insulina de acción corta Actrapid HM[®] y micropartículas de dextrano cristalizadas prolongó la absorción de insulina y extendió el efecto hipoglucémico (es decir, la duración de la eficacia de la insulina) hasta al menos 24 horas, tal como de aproximadamente 28 a aproximadamente 31 horas, en comparación con aproximadamente 2 a aproximadamente 8 horas para la insulina Actrapid HM[®] por sí sola (Figura 12B) y de aproximadamente 17 a aproximadamente 24 horas para la insulina de acción larga "Monotard HM"[®] por sí sola (Figura 12A). Tanto la insulina Actrapid HM[®] como Monotard HM[®] son productos de Novo Nordisk y la duración de eficacia publicitada en estas composiciones de insulina en seres humanos obtenida de la información de la compañía son de 8 y 24 horas, respectivamente.

En las Figuras 12A y 12B, la línea superior ilustra la línea de control para conejos intactos a los que no se administró insulina. El eje y de las Figuras 12A y 12B es una escala normalizada relativa de la concentración de glucosa en sangre para la misma dosis de 8 UI de insulina. Los datos de las Figuras se ajustaron para mostrarse en una representación para cada figura y muestran niveles de glucosa en la sangre de los animales después de las inyecciones de insulina.

Los datos mostrados en las Figuras 12A y 12B se obtuvieron como sigue. Se controlaron conejos chinchilla (2,3 ± 0,3 kg) con respecto a su respuesta a inyecciones de una formulación que consiste en micropartículas de dextrano cristalizadas e insulina de acción corta Actrapid HM[®]. Las muestras de la formulación se inyectaron por vía subcutánea a los conejos. La insulina de acción larga Monotard HM[®] (40 UI/ml) y la insulina de acción corta Actrapid HM[®] se inyectaron por vía subcutánea en conejos separados sin las micropartículas y se usaron como controles. Se tomaron muestras de sangre animal de la vena del oído del conejo y se analizaron con respecto a concentración de glucosa. La concentración de glucosa en sangre se midió con un analizador de glucosa (One-Touch[®] Lifescan, Johnson & Johnson, Milpitas, CA, Estados Unidos) después de la calibración apropiada.

En los ejemplos comparativos 9 y 10, a dos conejos intactos no se les proporcionó insulina. En los ejemplos comparativos 11 y 12 se introdujo una solución acuosa de insulina de acción larga Monotard HM[®] por vía subcutánea a dos conejos en una dosis de 8 UI. En los ejemplos 13-15, se introdujo una suspensión de micropartículas de dextrano cristalizadas con insulina de acción corta Actrapid HM[®] por vía subcutánea a tres conejos en una dosis de 8 UI. Los resultados de los experimentos se resumen en la Tabla II.

TABLA II

Nº de Ej.	Dosis de insulina	mmol de glucosa/l 0 horas	mmol de glucosa/l 0,5 hora	mmol de glucosa/l 1 hora	mmol de glucosa/l 1,5 horas	mmol de glucosa/l 2 horas	mmol de glucosa/l 2,5 horas	mmol de glucosa/l 16 horas	mmol de glucosa/l 24 horas	mmol de glucosa/l 31 horas
9	0,0	5,4	5,0	5,2	5,2	5,2	5,4	4,7	5,4	5,4
10	0,0	6,0	6,3	6,3	6,3	6,3	6,5	5,7	5,6	5,8
11	8 UI	5,4	5,8	3,8	3,2	2,4	2,6	3,9	5,6	N.D
12	8 UI	5,4	5,0	4,2	2,9	2,5	2,4	4,0	5,1	N.D
13	8 UI	5,8	3,7	1,9	1,9	1,9	2,8	4,1	4,3	4,1
14	8 UI	6,6	5,7	4,3	3,9	3,7	3,9	4,6	4,1	3,9
15	8 UI	6,2	5,1	3,6	3,2	3,1	2,9	4,2	4,4	4,7

ES 2 357 719 T3

Los ejemplos anteriores 13-15 ilustran que la composición de micropartículas de dextrano cristalizadas con insulina de acción corta Actrapid HM[®] proporciona un efecto prolongado que supera el efecto de la insulina de acción larga Monotard HM[®] y se cree que es comparable al efecto de la insulina de acción larga (dosificación una vez diaria) glargine Lantus[®] de Aventis (véase www.aventis-us.com/Pls/lantus_TXT.html). Además, la insulina Lantus[®] no debe diluirse o mezclarse con ninguna otra insulina o solución. Si la insulina Lantus[®] se diluye o se mezcla, el perfil farmacocinético/farmacodinámico (por ejemplo, comienzo de la acción, tiempo hasta el efecto máximo) de Lantus[®] y/o la insulina mezclada puede alterarse de manera impredecible. Por el contrario, la composición de las micropartículas de dextrano cristalizadas con insulina no está limitada de este modo porque puede usarse cualquier insulina adecuada, tal como insulina humana. En la composición de micropartículas de dextrano cristalizadas e insulina, la relación de insulina y micropartículas puede variarse según se desee. Además, puede usarse cualquier insulina adecuada para ajustar de forma personalizada una terapia de insulina a un paciente individual. Por lo tanto, Actrapid HM[®] se usó en la composición como un ejemplo ilustrativo de una insulina típica y la composición no está limitada a esta marca de insulina.

Como se muestra en los ejemplos 9-15, la composición que contiene las micropartículas de dextrano cristalizadas y la insulina es eficaz en el mantenimiento de una duración de la eficacia de la insulina durante al menos un tiempo el 30% más largo, tal como al menos el 100% más largo, preferiblemente del 100 al 400% más largo que la misma dosis de la misma insulina sin las micropartículas. La composición de insulina que contiene micropartículas es eficaz en el mantenimiento de un nivel basal deseado de insulina en sangre y concentración de glucosa en sangre durante un tiempo al menos el 30% más largo, tal como del 100% al 400% más largo, que la misma dosis de la misma insulina sin las micropartículas. Por lo tanto, la duración de la eficacia de la composición que contiene micropartículas es de al menos 24 horas, lo que permite que se inyecte sólo una vez diariamente al mamífero, tal como un ser humano que lo necesite.

La composición de micropartículas de dextrano cristalizadas con insulina de larga duración es más segura que las composiciones de insulina de larga duración de la técnica anterior porque puede conseguir la eficacia de larga duración sin usar una dosis mayor de insulina que en las composiciones de la técnica anterior. Por ejemplo, si se ha determinado que una dosis de 8 UI de insulina de acción corta es médicamente segura para un paciente sin un riesgo significativo de sobredosis, entonces la composición que comprende la misma insulina de acción corta y las micropartículas de dextrano cristalizadas puede proporcionar una eficacia de duración de acción más larga a la misma dosis de 8 UI de insulina de acción corta sin un riesgo significativo de sobredosis, incluso si toda la insulina se libera al paciente en una sola vez. Además, esta composición proporciona un ahorro de costes en comparación con las composiciones de la técnica anterior debido a que prolonga la eficacia sin aumentar la cantidad de insulina. Las terapias actuales de actuación larga para diabetes de la técnica anterior se realizan con análogos de la insulina, tales como insulina Lantus[®] de Aventis. Por el contrario, la composición que contiene micropartículas de dextrano cristalizadas preferiblemente contiene insulina recombinante humana cuyo perfil de seguridad está establecido. Por lo tanto, esta composición reduce el riesgo de una reacción o reacciones adversas y el número de inyecciones a los diabéticos, mejorando de este modo la calidad de vida de los diabéticos.

La composición inyectable puede comprender un sistema de fase sencilla que comprende insulina y micropartículas o un sistema de dos fases que forma un núcleo de PEG e insulina y una cubierta de dextrano y micropartículas de dextrano para una duración de la eficacia aún mayor. Además, la composición comprende un sistema coloidal fluido de una fase o multifase (es decir, una suspensión o una emulsión) que relativamente fácil de inyectar en un mamífero.

El siguiente ejemplo ilustra el uso de una composición inyectable de dos fases que comprende una fase de dextrano, una fase de PEG, insulina y micropartículas de dextrano cristalizadas. Se cree que cuando se inyecta en un mamífero, esta composición forma un implante de tipo depósito estructurado que tiene una estructura de cápsula tridimensional. La estructura de cápsula, las micropartículas se reparten de forma selectiva en la fase de dextrano y la insulina se reparte de forma selectiva en la fase de PEG. La fase de dextrano que contiene las micropartículas forma una cubierta alrededor de un núcleo que comprende la fase de PEG que contiene la insulina. Este implante estructurado permite la liberación controlada desde el núcleo a través de la cubierta.

En el ejemplo comparativo 16, se inyectan 0,5 UI de insulina Actrapid HM[®] (100 UI/ml) por vía subcutánea a un ratón. En el ejemplo 17, se dispersan 0,4 g de micropartículas de dextrano cristalizadas en 0,6 ml de solución acuosa de dextrano al 20% (P/P) que tiene un peso molecular de 70 kDa (Pharmacia, Suecia) para formar una suspensión. Se disuelven 10 mg de PEG que tiene un peso molecular de 6 kDa (Fluka) en 0,1 ml de insulina Actrapid HM[®] (100 UI/ml) para formar una solución. Se mezclan 0,05 ml de la solución de PEG e insulina con 0,15 ml de la suspensión de micropartículas y dextrano para formar una composición o mezcla de dos fases. Se inyectan 0,02 ml de la mezcla de dos fases que contiene 0,5 UI de insulina por vía subcutánea al ratón. Los resultados se muestran en la Tabla III.

65

TABLA III

Nº de Ejemplo	mmol de glucosa/l 0 min	mmol de glucosa/l 15 min	mmol de glucosa/l 30 min	mmol de glucosa/l 45 min	mmol de glucosa/l 60 min	mmol de glucosa/l 120 min
16	7,8	3,7	2,3	1,7	2,9	6,7
17	7,9	5,9	4,3	4,1	4,3	4,0

Como se puede ver en la Tabla III, la duración de eficacia de la composición de dos fases fue mayor que la de la insulina por sí sola. Además, la composición de dos fases disminuyó la concentración de glucosa en sangre de forma más gradual que la insulina por sí sola. Sin desear quedar ligado a una teoría particular, se cree que estos efectos se deben a la liberación controlada de insulina desde el núcleo de la estructura de cápsula.

Además, la composición que contiene micropartículas puede adaptarse individualmente para cada paciente ajustando la cantidad de insulina y/o micropartículas para permitir que el paciente se inyecte la composición en el mismo momento cada día (es decir, una cada vez cada 24 horas, una vez cada 48 horas, etcétera). Por lo tanto, la duración de la eficacia de la composición puede ajustarse para cada paciente. Para un sistema de dos fases, el perfil de liberación de insulina desde el núcleo de la cápsula puede ajustarse mediante el control de la cantidad de micropartículas para controlar el grosor de la cubierta de la cápsula.

Aunque el inventor no desea quedar ligado a ninguna teoría particular, se cree que el efecto de larga duración de la misma dosis de insulina en ratones y conejos con micropartículas de dextrano cristalizadas puede explicarse por la difusión de las moléculas de insulina desde el implante basado en micropartículas de dextrano cristalizadas (es decir, una liberación autocontrolada de insulina). Puesto que ratones y conejos son un modelo habitual para seres humanos en ensayo de fármacos, los datos mostrados en las anteriores Tablas I a III sugiere que el uso de implantes basados en micropartículas de dextrano cristalizadas hace posible desarrollar sistemas de suministro de liberación controlada con características farmacocinéticas y dinámicas mejoradas y que satisfacen mejor las necesidades de pacientes de insulina basal, tales como seres humanos.

D. Materiales

En las realizaciones preferidas de la presente invención, el agente terapéutico comprende insulina. En otras palabras, el agente terapéutico puede consistir esencialmente de insulina solamente o comprender insulina en combinación con otro agente. El término "insulina" se interpretará que engloba análogos de insulina, insulina humana extraída natural, insulina humana producida recombinante, insulina extraída de fuentes bovinas y/o porcinas, insulina porcina y bovina producida recombinante y mezclas de cualquiera de estos productos de insulina. Se pretende que el término abarque el polipéptido normalmente usado en el tratamiento de diabéticos en una forma sustancialmente purificada pero abarca el uso del término en su forma farmacéutica disponible en el mercado, que incluye excipientes adicionales. La insulina se produce preferiblemente de forma recombinante y puede deshidratarse (secarse completamente) o estar en solución.

Las expresiones "análogo de insulina", "insulina monomérica" y similares se usan de forma intercambiable en este documento y se pretende que abarquen cualquier forma de "insulina" como se ha definido anteriormente, en la que uno o más de los aminoácidos dentro de la cadena polipeptídica se ha remplazado con un aminoácido alternativo y/o en la que uno o más de los aminoácidos se ha eliminado o en la que uno o más aminoácidos adicionales se han añadido a la cadena polipeptídica o secuencias de aminoácidos, que actúan como insulina en la disminución de los niveles de glucosa en sangre. En general, la expresión "análogos de insulina" de las realizaciones preferidas de la presente invención incluyen "análogos de insulina lispro", como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.547.929; análogos de insulina que incluyen insulina LysPro e insulina humalog y otros "análogos de súper insulina", en los que la capacidad del análogo de insulina para influir en los niveles de glucosa en suero mejora sustancialmente en comparación con insulina convencional así como análogos de insulina hepatoselectivos que están más activos en el hígado que en el tejido adiposo. Los análogos preferidos son análogos de insulina monoméricos, que son compuestos tipo insulina usados para el mismo propósito general que la insulina, tales como insulina lispro, es decir, compuestos que se administran para reducir los niveles de glucosa en sangre.

El término "análogo" se refiere a una molécula que comparte una actividad funcional común con la molécula a la que se considera comparable y típicamente comparte también características estructurales comunes.

El término "recombinante" se refiere a cualquier tipo de compuesto terapéutico clonado expresado en células procariontas o una molécula desarrollada por ingeniería genética o una biblioteca combinatoria de moléculas que puede procesarse adicionalmente a otro estado para formar una segunda biblioteca combinatoria, especialmente moléculas que contienen grupos protectores que mejoran la seguridad físico química, farmacológica y clínica del agente terapéutico.

ES 2 357 719 T3

La expresión micropartículas de dextrano incluye micropartículas de dextrano no sustituido y micropartículas de dextrano sustituido. Por ejemplo, las micropartículas de dextrano sustituido incluyen dextrano sustituido con un grupo adecuado, tal como un grupo metilo, hasta un grado que no obstaculiza la cristalización de las micropartículas de dextrano, tal como hasta una ramificación del 3,5 por ciento o menos. El diámetro de micropartícula medio es preferiblemente de 0,5 a 5 micrómetros, más preferiblemente de 1 a aproximadamente 2 micrómetros.

Preferiblemente, se usan micropartículas porosas. Más preferiblemente, las micropartículas tienen suficiente porosidad para contener el agente terapéutico dentro de los poros y para proporcionar una liberación temporalizada del agente terapéutico desde los poros. En otras palabras, el agente terapéutico se libera durante un tiempo desde los poros, tal como en más cinco minutos, preferiblemente en más de 30 minutos, más preferiblemente en más de una hora, tal como de varias horas a varios días, en lugar de todo a la vez. Por lo tanto, el material de partículas, el tamaño de poro y volumen de poro puede seleccionarse basándose en el tipo de agente terapéutico usado, el volumen del agente terapéutico requerido para el suministro, la duración del suministro del agente terapéutico, el ambiente en el que el agente terapéutico se suministrará y otros factores.

Por lo tanto, en un aspecto preferido de la presente invención, el agente terapéutico se localiza al menos parcialmente en los poros de las micropartículas porosas. El agente terapéutico no está encapsulado en la micropartícula (es decir, la micropartícula no actúa como una cubierta con un núcleo de agente terapéutico dentro de la cubierta). Preferiblemente, el agente terapéutico no está unido a la superficie de la micropartícula. Sin embargo, si se desea, una porción del agente terapéutico está unida a la superficie de la micropartícula además de estar localizado en los poros de la micropartícula. La localización del agente terapéutico en los poros proporciona una liberación temporalizada óptima del agente terapéutico. Por el contrario, el agente terapéutico unido a la superficie de micropartícula con frecuencia se libera demasiado rápido, mientras que el agente terapéutico encapsulado en la micropartícula con frecuencia no se libera lo suficientemente pronto y se libera por lo tanto todo a la vez a medida que se desintegra la cubierta de la micropartícula. En un sistema de dos fases, al menos el 80% del agente terapéutico se localiza preferiblemente en un núcleo rodeado por una pared o cubierta que comprende las micropartículas.

E. Métodos de Fabricación

Las micropartículas pueden formarse por cualquier método adecuado. Las micropartículas se combinan con el agente terapéutico después de que se formen las micropartículas. De este modo, las micropartículas, tal como las micropartículas de dextrano cristalizadas se forman por cualquier método adecuado y después el agente terapéutico y las micropartículas se combinan por cualquier método adecuado. Por el contrario, en algunos métodos de la técnica anterior, el agente terapéutico se encapsula en una cubierta de micropartícula proporcionando el material precursor de la partícula y el agente terapéutico en una solución y cristalizando o reticulando después el material precursor, tal como un material monomérico u oligomérico, para encapsular un núcleo de agente terapéutico en una cubierta de micropartícula.

Preferiblemente, el agente terapéutico se proporciona en los poros de las micropartículas porosas después de que se formen las micropartículas. Por lo tanto, las micropartículas porosas se forman primero y después se proporciona el agente terapéutico en una solución que contiene las micropartículas para permitir que el agente terapéutico permee en los poros de las micropartículas. Por supuesto, algunos de los agente terapéuticos también pueden unirse a la superficie de la micropartícula en este proceso.

De este modo, un método para fabricar micropartículas de dextrano cristalizadas porosas no reticuladas incluye la preparación de una solución de dextrano, tal como una solución de dextrano acuosa, realizar un proceso de cristalización para formar micropartículas de dextrano porosas cristalizadas, y si se desea, aislar micropartículas de dextrano porosas cristalizadas de la solución. Un agente terapéutico permea después a los poros de las micropartículas proporcionando el agente terapéutico a la solución de cristalización que contiene las micropartículas o proporcionando las micropartículas aisladas y el agente terapéutico a una segunda solución, tal como una segunda solución acuosa. Por ejemplo, las micropartículas de dextrano cristalizadas pueden formarse en una primera solución acuosa de dextrano de bajo peso molecular, tal como una solución de dextrano de 2 a 20 kDa. Las micropartículas se retiran después de la primera solución y se colocan después en una segunda solución de dextrano acuosa que tiene un dextrano de mayor peso molecular, tal como una solución de 40 a 500 kDa, por ejemplo una solución de 40 a 75 kDa. La segunda solución puede comprender una primera fase de un sistema de dos fases, que se combina después con una segunda fase, tal como una fase de PEG que contiene un agente terapéutico. Puede usarse un método similar con otras micropartículas porosas, en el que un agente terapéutico permea después a los poros de las micropartículas después de que se formen las micropartículas porosas por cristalización. Los componentes de la composición tales como insulina, micropartículas y una o más fases acuosas pueden combinarse en cualquier orden adecuado secuencial o simultáneamente.

Preferiblemente, las micropartículas se forman por autoensamblaje de una solución que no contiene disolventes orgánicos y promotores de la reacción orgánicos que dejan un resto orgánico en las micropartículas. Por lo tanto, las micropartículas de dextrano se forman preferiblemente por autoensamblaje de una solución de dextrano acuosa. Sin embargo, si se desea también pueden usarse disolventes orgánicos y/o promotores de reacción orgánicos. En este caso, las micropartículas pueden purificarse antes de su uso posterior para eliminar los restos orgánicos perjudiciales. Como se ha descrito anteriormente, la estructura de cápsula que tiene un núcleo de una primera fase y una pared o cubierta de una segunda fase pueden formarse *in vivo* o *in vitro* de una composición de dos fases. La composición puede ser

ES 2 357 719 T3

polvo seco, tal como liofilizado y almacenarse como un polvo o aglutinado poroso. Cuando la composición está lista para administrarse a un mamífero, se hidrata y se administra a un mamífero por inyección.

5 Preferiblemente, la composición que incluye las micropartículas y el agente terapéutico es un sistema coloidal fluido cuando la composición dosifica para inyección. Los ejemplos de sistemas coloidales fluidos incluyen emulsiones y suspensiones que pueden inyectarse a un mamífero usando una jeringa o aguja de calibre habitual sin dificultades indebidas. Por el contrario, algunas composiciones de la técnica anterior incluyen un agente terapéutico en un hidrogel de dextrano o en una matriz de dextrano reticulada. Un hidrogel de dextrano y una matriz de dextrano reticulada no son composiciones fluidas si no se preparan específicamente.

10 En otro aspecto preferido de la presente invención, las micropartículas comprenden micropartículas que son adhesivas a la mucosa de mamíferos. Preferiblemente las micropartículas adhesivas son micropartículas porosas descritas anteriormente. Esto mejora adicionalmente el suministro eficaz del agente terapéutico.

15 En otro aspecto preferido de la presente invención, las micropartículas comprenden micropartículas cuya superficie se ha modificado especialmente para mejorar la adhesión del agente terapéutico a la superficie de micropartícula y para optimizar el suministro del agente terapéutico. La superficie de micropartícula puede contener cualquier modificación adecuada que aumentaría la adhesión del agente terapéutico.

20 La presente invención también posibilita el uso de una composición que comprende micropartículas de dextrano cristalizadas e insulina en la fabricación de un medicamento para disminuir la glucosa en sangre en un mamífero, en la que la insulina no está encapsulada en las micropartículas y las micropartículas se forman antes de la combinación de insulina y las micropartículas en la composición.

25 La descripción anterior de la invención se ha presentado con fines ilustrativos y descriptivos. No se pretende que sea exhaustiva o que limite la invención a la forma precisa descrita y son posibles modificaciones y variaciones a la luz de las enseñanzas anteriores o que pueden adquirirse a partir de la práctica de la invención. Los dibujos y la descripción se eligieron para explicar los principios de la invención y su aplicación práctica. El alcance de la invención se define por las reivindicaciones adjuntas a este documento.

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Una composición que comprende micropartículas de dextrano cristalizadas e insulina para disminuir la glucosa en sangre en un mamífero mediante la inyección de una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición al mamífero, en la que la insulina no está encapsulada en las micropartículas y las micropartículas se forman antes de la combinación de la insulina y las micropartículas en la composición.

10 2. La composición de la reivindicación 1, en la que la composición comprende una composición coloidal fluida y las micropartículas comprenden micropartículas de dextrano cristalizadas que tienen un diámetro medio de 0,5 a 5 micrómetros.

3. La composición de la reivindicación 2, en la que:

15 la composición comprende una composición de dos fases que comprende una fase de dextrano y una fase de PEG;

la insulina se reparte selectivamente en la fase de PEG y las micropartículas se reparten selectivamente en la fase de dextrano; y

20 la composición forma un implante estructurado que comprende un núcleo de fase de PEG y una cubierta de fase de dextrano después de su inyección en un cuerpo de mamífero.

25 4. La composición de la reivindicación 3, en la que el grosor de la cubierta es controlable basándose en el cuerpo del mamífero que recibe la composición para controlar la liberación de insulina desde el implante.

5. La composición de la reivindicación 1, siendo la composición para su administración a un ser humano que padece diabetes para disminuir la concentración de glucosa en sangre en el ser humano.

30 6. Una composición farmacéutica dosificada, que comprende micropartículas de dextrano cristalizadas y una cantidad terapéuticamente eficaz de insulina, dosificándose la composición para inyección a un ser humano y no estando encapsulada la insulina en las micropartículas y formándose la micropartículas antes de la combinación de la insulina y las micropartículas de la composición.

35 7. La composición farmacéutica dosificada de la reivindicación 6, en la que:

la composición comprende una composición coloidal fluida; y

40 las micropartículas comprenden micropartículas de dextrano cristalizadas que tienen un diámetro medio de 0,5 a 5 micrómetros.

8. La composición farmacéutica dosificada en la reivindicación 7, en la que:

45 la composición comprende una composición de dos fases que comprende una fase de dextrano y una fase de PEG; y

50 la insulina se reparte selectivamente en la fase de PEG y las micropartículas se reparten selectivamente en la fase de dextrano; y

la composición forma un implante estructurado que comprende un núcleo de fase de PEG y una cubierta de fase de dextrano después de su inyección en un cuerpo humano.

55 9. La composición farmacéutica dosificada de la reivindicación 6, en la que las micropartículas de dextrano cristalizadas son porosas y la insulina se localiza al menos parcialmente en los poros de las micropartículas porosas, de modo que la insulina se libera a lo largo del tiempo de los poros.

60 10. La composición farmacéutica dosificada de la reivindicación 9, en la que la insulina se libera de los poros en un periodo de varias horas a varios días.

65 11. La composición de la reivindicación 1, en la que las micropartículas de dextrano cristalizadas son porosas y la insulina se localiza al menos parcialmente en los poros de las micropartículas porosas, de modo que la insulina se libera a lo largo del tiempo de los poros.

12. La composición de la reivindicación 11, en la que la insulina se libera de los poros en un periodo de varias horas a varios días.

ES 2 357 719 T3

13. Un método para realizar una composición farmacéutica dosificada, que comprende:

proporcionar micropartículas de dextrano cristalizadas;

combinar una cantidad terapéuticamente eficaz de insulina y las micropartículas de dextrano cristalizadas en una solución después de que las micropartículas se hayan cristalizado para formar una composición de insulina y micropartículas de dextrano cristalizadas en la que la insulina no esté encapsulada en las micropartículas; y

dosificar la composición para su inyección a un mamífero.

14. El método de la reivindicación 13, en el que:

la composición comprende una composición coloidal fluida; y

las micropartículas comprenden micropartículas de dextrano cristalizadas que tienen un diámetro de medio de 0,5 a 5 micrómetros.

15. El método de la reivindicación 14, en el que:

la composición comprende una composición de dos fases que comprende una fase de dextrano y una fase de PEG;

la insulina se reparte selectivamente en la fase de PEG y las micropartículas se reparten selectivamente en la fase de dextrano; y

la composición forma un implante estructurado que comprende un núcleo de fase de PEG y una cubierta de fase de dextrano después de su inyección al cuerpo del mamífero.

16. El método de la reivindicación 13, en el que las micropartículas de dextrano cristalizadas son porosas y la insulina se localiza al menos parcialmente en los poros de las micropartículas porosas, de modo que la insulina se libera a lo largo del tiempo de los poros.

17. El método de la reivindicación 16, en el que la insulina se libera de los poros en un periodo de varias horas a varios días.

18. Uso de una composición que comprende micropartículas de dextrano cristalizadas e insulina en la fabricación de un medicamento para disminuir la glucosa en sangre en un mamífero, en el que la insulina no está encapsulada en las micropartículas y las micropartículas se forman antes de la combinación de la insulina y las micropartículas en la composición.

19. El uso de la reivindicación 18, en el que la composición va a administrarse por inyección al mamífero.

20. El uso de la reivindicación 18 o reivindicación 19, en el que la composición comprende una composición coloidal fluida y las micropartículas comprenden micropartículas de dextrano cristalizadas que tienen un diámetro medio de 0,5 a 5 micrómetros.

21. El uso de la reivindicación 20, en el que:

la composición comprende una composición de dos fases que comprende una fase de dextrano y una fase de PEG;

la insulina se reparte selectivamente en la fase de PEG y las micropartículas se reparten selectivamente en la fase de dextrano; y

la composición forma un implante estructurado que comprende un núcleo de fase de PEG y una cubierta de fase de dextrano después de su inyección en un cuerpo de mamífero.

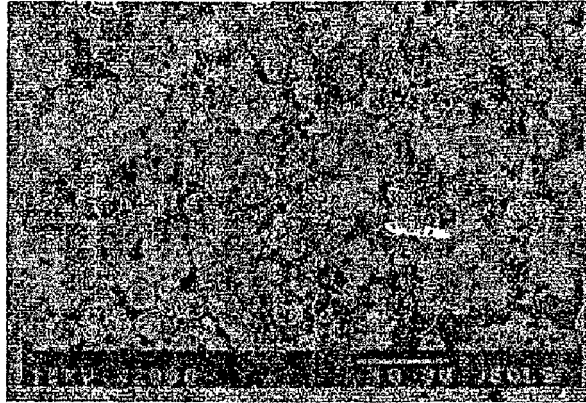


FIG. 1



FIG. 2A

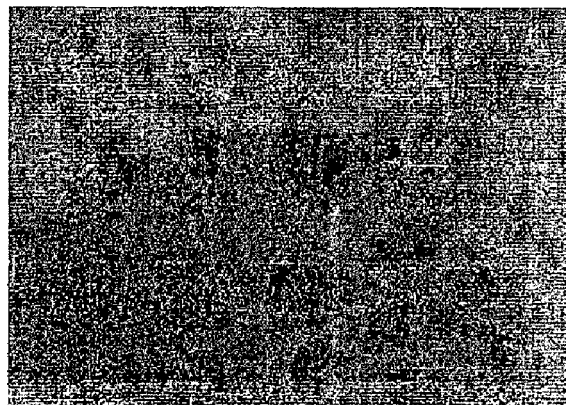


FIG. 2B

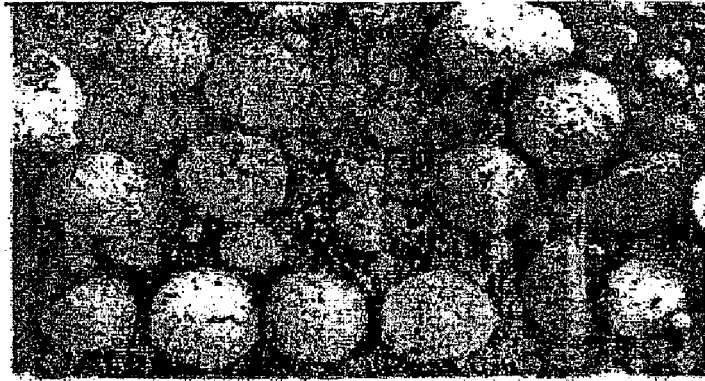


FIG. 3

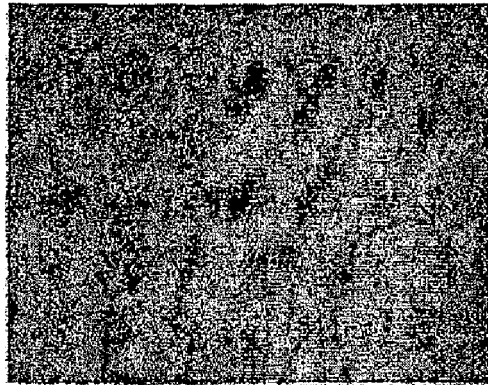


FIG. 4

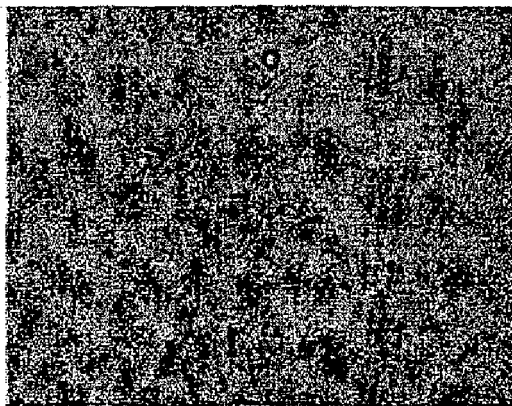


FIG. 5

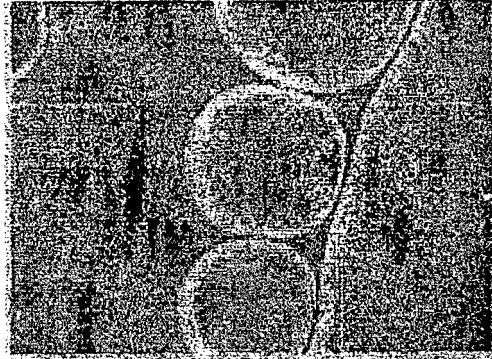


FIG. 6

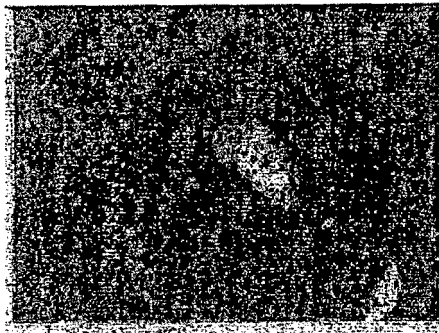


FIG. 7

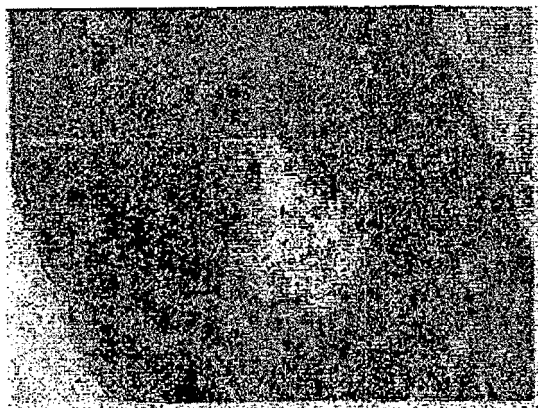


FIG. 8

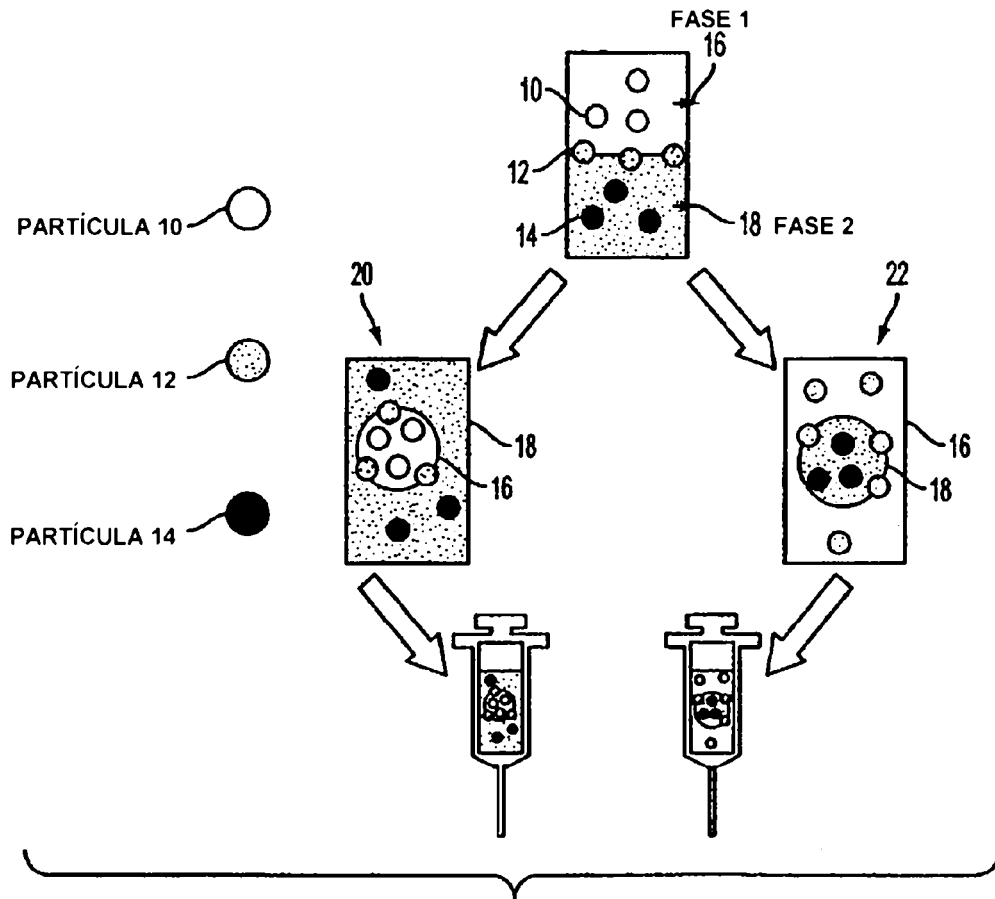


FIG. 9A

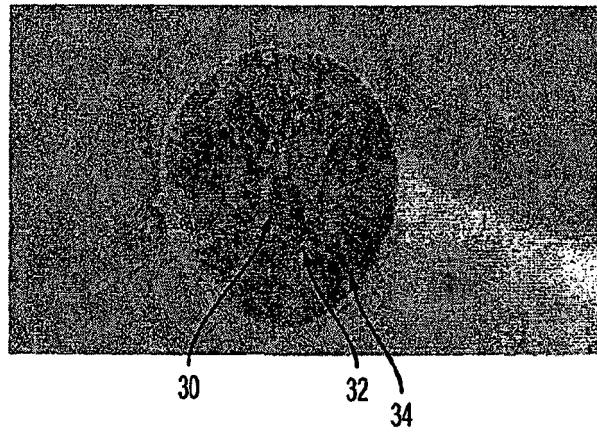


FIG. 9B

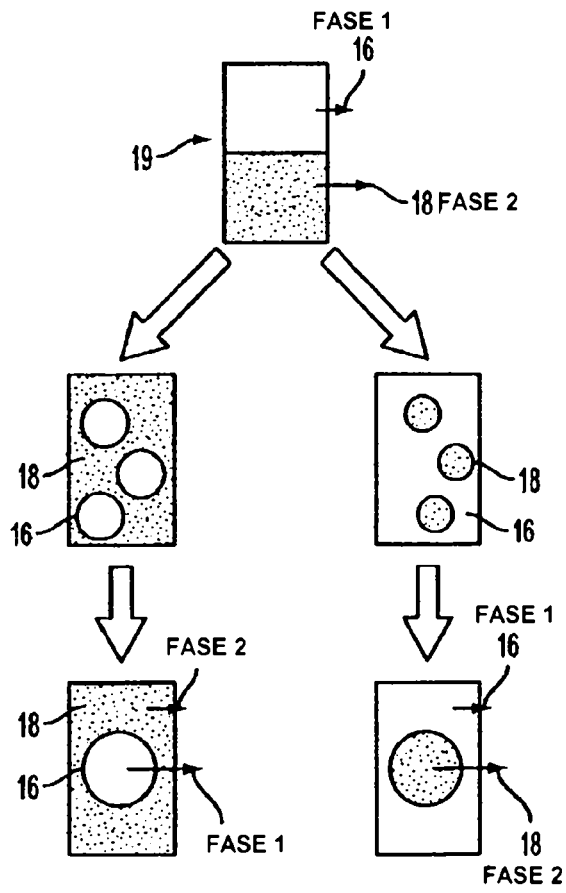


FIG. 9C

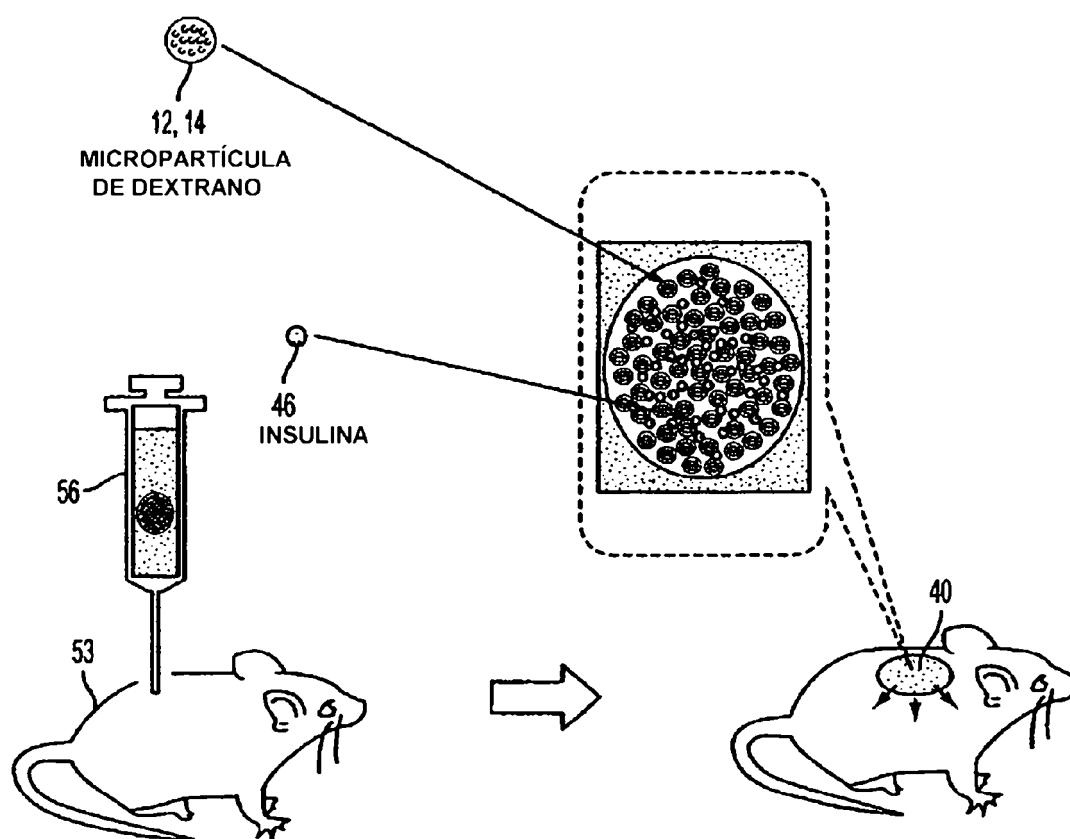


FIG. 10

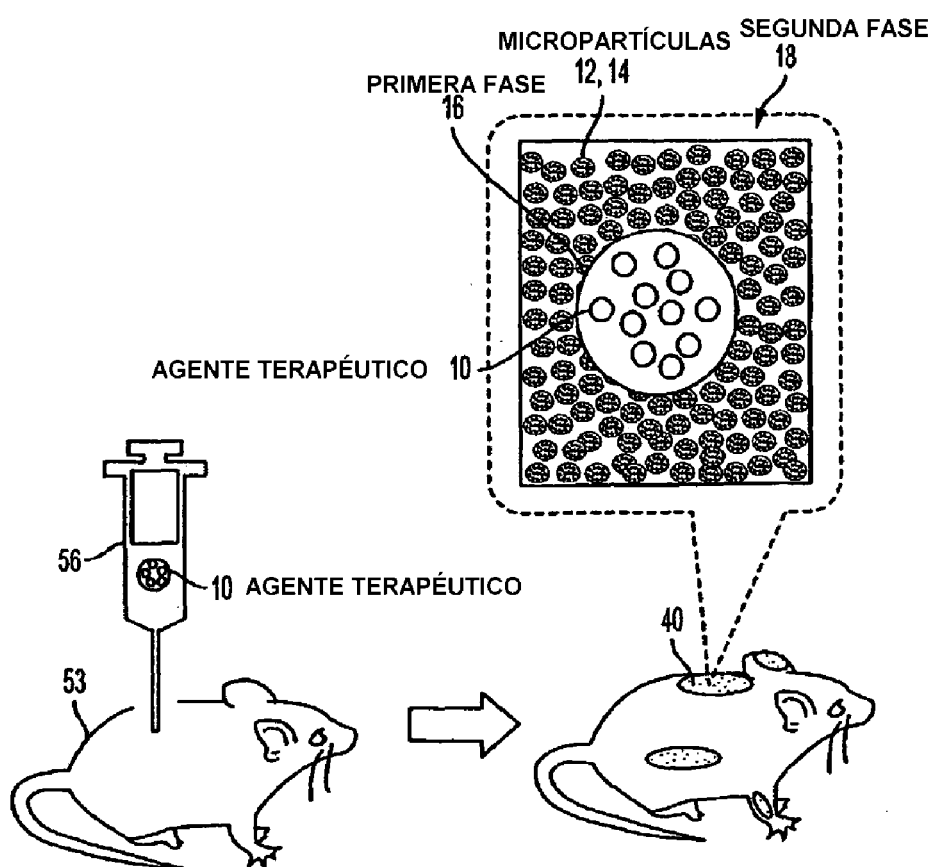


FIG. 11

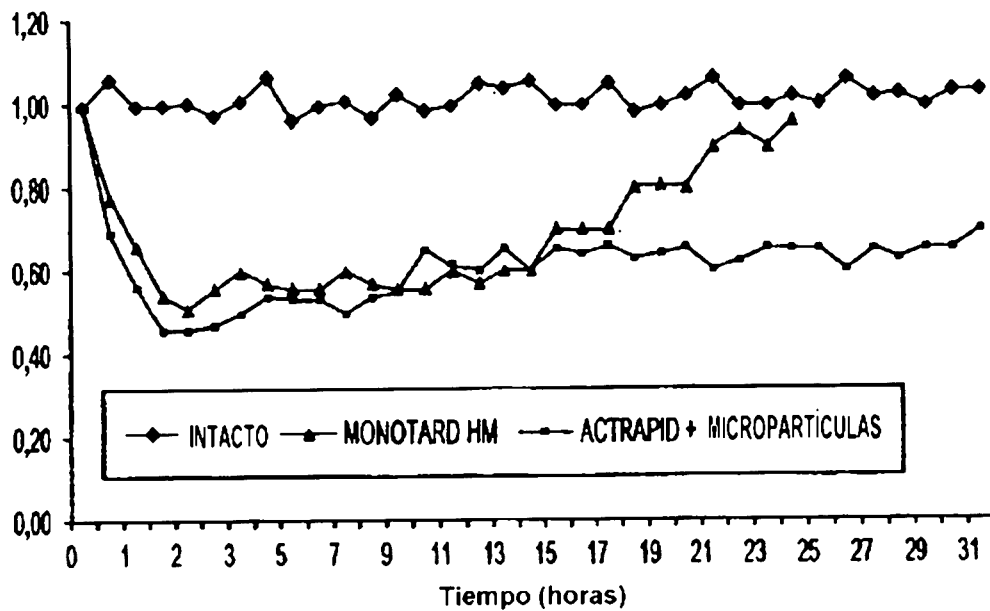


FIG. 12A

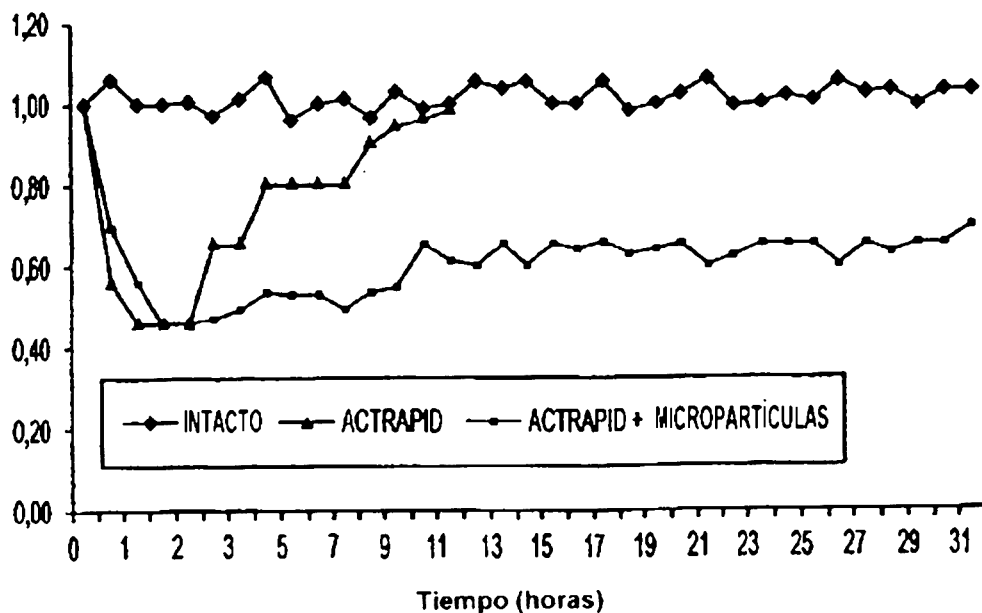


FIG. 12B