



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 093**

51 Int. Cl.:
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 9/50 (2006.01)
A61K 38/27 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08864968 .6**
96 Fecha de presentación : **21.11.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2231120**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.09.2010**

54 Título: **Microcápsulas lípidas sólidas que contienen hormona del crecimiento en el núcleo sólido interno.**

30 Prioridad: **21.12.2007 EP 07024906**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.10.2011

73 Titular/es: **MERCK PATENT GmbH**
Frankfurter Strasse 250
64293 Darmstadt, DE

72 Inventor/es: **Richard, Joel;**
Baldascini, Helen, Gabriela;
Agostinetti, Rita;
De Angelis, Luisa y
Deschamps, Frantz

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 367 093 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

Microcápsulas lípidas sólidas que contienen hormona del crecimiento en el núcleo sólido interno

La presente invención hace referencia a formulaciones de hormona del crecimiento (GH) que tienen propiedades de liberación controlada, en particular la hormona del crecimiento humana (hGH) y a métodos para su preparación. Las formulaciones de hormona del crecimiento pueden elaborarse sin la desnaturalización de la proteína y pueden administrarse en forma conveniente a la persona que la necesita mediante la utilización de una jeringuilla convencional, o un dispositivo de inyección mecánico o electrónico, mediante una aguja de diámetro pequeño.

Los regímenes de tratamiento actuales para la deficiencia de hGH en humanos se basan principalmente, por ejemplo, en la administración de hGH mediante una inyección subcutánea. Las hGH desempeñan un papel fundamental en la regulación del crecimiento de células y órganos, y en la función fisiológica a lo largo de diversas etapas del desarrollo y envejecimiento. Por ejemplo, la sobreproducción de hGH produce gigantismo en niños y acromegalia en adultos, mientras que una producción insuficiente lleva al enanismo en niños [Mauras et al., J. Clin. Endocrinology and Metabolism, 85(10), 3653-3660 (2000); Frindik et al., Hormone Research, 51(1), 15-19 (1999); Leger et al., J. Clin. Endocrinology and Metabolism, 83(10), 3512-3516 (1998)], Síndrome de Turner (sólo en mujeres) [Bramswig, Endocrine, 15(1), 5-13 (2001); Pasquino et al., Hormone Research, 46(6), 269-272 (1996)] e insuficiencia renal crónica [Carroll et al., Trends in Endocrinology and Metabolism, 11(6), 231-238 (2000); Ueland et al., J. Clin. Endocrinology and Metabolism, 87(6), 2760-2763 (2002); Simpson et al., Growth Hormone & IGF Research, 12, 1-33 (2002)]. En adultos, la deficiencia de hGH puede afectar el procesamiento metabólico de las proteínas, los carbohidratos, los lípidos, los minerales y los tejidos conjuntivos, y puede dar como resultado atrofia muscular, ósea o cutánea [Mehls and Haas, Growth Hormone & IGF Research, Supplement B, S31-S37 (2000); Fine et al., J. Pediatrics, 136(3), 376-382 (2000); Motoyama et al., Clin. Exp. Nephrology, 2(2), 162-165 (1998)]. Otros trastornos relacionados con la deficiencia de hGH que se caracterizan por la deficiencia o problemas de crecimiento incluyen el síndrome de desgaste por SIDA [Hirschfeld, Hormone Research, 46, 215-221 (1996); Tritos et al., Am. J. Medicine, 105(1), 44-57 (1998); Mulligan et al., J. Parenteral and Enteral Nutrition, 23(6), S202-S209 (1999); Torres and Cadman, BioDrugs, 14(2), 83-91 (2000)] y el síndrome de Prader-Willi [Ritzen, Hormone Research, 56(5-6), 208 (2002); Eiholzer et al., Eur. J. Pediatrics, 157(5), 368-377 (1998)].

La patente US5219572 hace referencia a dispositivos de administración de liberación controlada para las proteínas macromoleculares basados en perlas microencapsuladas. Las últimas comprenden una cubierta de cera rompible, que rodea completamente una matriz del núcleo que contiene una proteína molecular y agentes tensioactivos, ligantes, estabilizadores. En el ejemplo 1 la somatotropina es combinada con arginina y sacarosa en el núcleo.

En la patente US2001044026 una composición insoluble en agua comprende un material de núcleo y un material de cubierta insoluble en agua. La formulación de las composiciones de microcápsulas incluye compuestos de núcleo orgánicos insolubles o ligeramente solubles en agua, y comprende la mezcla de un agente tensioactivo o una sal inorgánica micronizada con dicho material de núcleo.

Se han desarrollado varios productos en un intento por abordar la necesidad de agentes terapéuticos de hGH estables y de larga duración y que, por lo tanto, puedan administrarse mediante una pauta de inyecciones menos frecuentes.

A estos efectos, se han utilizado diversas tecnologías de administración de fármacos, tales como hidrogeles [Katakam et al., J. Controlled Release, 49 (1), 21-26 (1997); Kim and Park, J. Controlled Release, 80(1-3), 69-77 (2002)], liposomas [Weiner et al., J. Pharm. Sci., 74(9), 922-925 (1985)], emulsiones de aceite [Yu et al., J. Pharm. Sci., 85(4), 396-401 (1996); Zhao et al., J. Dairy Sci., 75(11), 3122-3130 (1992)] y microesferas de polímeros biodegradables [Jostel et al., Clin. Endocrinol. (Oxf), 62 (5) :623-627 (2005); Sun et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 289 (3):1523-1532 (1999); Jones et al., Adv. Drug Deliv. Rev., 28(1): 1-84 (1997); Johnson et al., Wat Med, 2(7):795-799 (1996)]. Sin embargo, las formulaciones de hGH resultantes habitualmente presentan una liberación repentina no deseable del fármaco, o bien pueden ser difíciles de elaborar.

Por ejemplo, la Nutropin Depot®, es una suspensión inyectable de microesferas de poliláctido-co-glicólido (PLG) que contienen hormona del crecimiento humana recombinante (r-hGH) (véase <http://www.gene.com>). Los considerables costes de elaboración han ocasionado la retirada de ese producto del mercado. Además, los estudios que incluyen la administración de Nutropin Depot® en pacientes pediátricos llevan a reacciones adversas en el sitio de inyección, dando como resultado nódulos, eritema, dolor, contusiones, picazón, lipoatrofia e hinchazón.

Otro producto actualmente en desarrollo por LG Pharmaceuticals Inc. (Corea del Sur), es una formulación de suspensión de micropartículas que contiene hGH, hialuronato, lecitina y triglicéridos. Los inconvenientes de este producto incluyen medios de administración desfavorables, específicamente, un fluido de administración que se debe inyectar por medio de una aguja calibre 26 [Kim et al., J. Controlled Release, 104: 323-335 (2005); Solicitud de Patente de los Estados Unidos N° 2005/0100605; EP 0918535 B1].

Las solicitudes de patente PCT WO 2004/060310 y WO 2004/060920 hacen referencia a formulaciones de hGH, que incluyen aquellas que comprenden cristales de hGH del complejo formado con polielectrolitos (es decir, policationes). Tales composiciones son estables y capaces de una liberación de hGH controlada por hasta un período de 1 semana. Mientras que los componentes de cristales de hGH del complejo formado por policationes vuelven estables y de larga duración a estas composiciones, existe la posibilidad de que en algunos pacientes, la naturaleza cargada de la superficie de cristal en complejo pueda llevar a una reacción local, que incluye enrojecimiento e hinchazón leves en el sitio de la inyección.

Es objeto de la presente invención proporcionar una formulación de liberación controlada, que evite en gran medida las desventajas de las formulaciones del arte previo tales como los efectos de estallido, propiedades de liberación controlada limitadas y que no contenga auxiliares que causen reacciones adversas tales como los polielectrolitos. Además, la formulación de liberación controlada debería administrarse fácilmente mediante una aguja calibre 27-29 (G) mediante la utilización de una jeringuilla convencional, o a través de un dispositivo de inyección mecánico o electrónico.

De manera sorprendente, se ha descubierto que tal formulación puede obtenerse al proporcionar microcápsulas, que comprenden al menos un núcleo sólido interno que contiene una hormona del crecimiento, un agente de carga y un tensioactivo, y una cubierta externa alrededor de ese núcleo sólido interno que comprende al menos un lípido. En consecuencia, la presente invención hace referencia a una formulación de partículas que comprende (1) al menos un núcleo sólido interno que contiene al menos una hormona del crecimiento, un agente de carga y un tensioactivo y (2) una cubierta externa que comprende al menos un lípido. El núcleo sólido interno está hecho de al menos una micropartícula que contiene una hormona del crecimiento. Las microcápsulas con multinúcleos sólidos, es decir que contienen más de una micropartícula de hormona del crecimiento rodeada por una cubierta externa, también son parte de la invención.

La hormona del crecimiento que puede formularse de acuerdo con la presente invención puede ser de origen animal, tal como la hormona del crecimiento bovina o porcina. Preferentemente, es de origen humano. Una realización preferente de la invención hace referencia a microcápsulas, en donde la hormona del crecimiento es una hormona del crecimiento humana (hGH) o un derivado, fragmento, variante, o análogo funcional, o una sal de la misma que retiene la actividad biológica de la hormona del crecimiento humana.

El término "hormona del crecimiento humana", o "hGH", como se utiliza en la presente invención, preferentemente comprende una secuencia de aminoácidos como se ilustra en la Figura 5. El término "hormona del crecimiento humana" o "hGH" como se utiliza en este documento también pretende incluir a los derivados naturales y sintéticos, como se ha indicado con anterioridad, incluyendo, sin limitación, la hormona del crecimiento humana tanto de 20 kD como de 22 kD, la GH-V, las formas sulfoxiladas y deamidadas de la GH, y otros miembros del locus génico de la hormona del crecimiento.

Se ha informado de que la hGH de 20 kD se encuentra tanto en la pituitaria como en el flujo sanguíneo (Lewis et al, J. Biol. Chem. 253:2679 (1978); Lewis et al, Biochem. Biophys. Res. Comm. 92:511 (1980). Este compuesto, que carece de los 15 residuos de aminoácidos desde Glu-32 hasta Gln-46, surge de un empalme alternativo del ácido ribonucleico mensajero (DeNoto et al, Nucleic Acids Res. 9:3719 (1981)). La 20-K-hGH se expresa en la pituitaria y se segrega en la sangre. Esto representa aproximadamente el 5% de la producción de la hormona del crecimiento en los adultos, y aproximadamente el 20% de la producción de la hormona del crecimiento en los niños. Tiene la misma actividad de promoción de crecimiento que la hormona del crecimiento de 22 kD, y se ha informado de que tiene igual o mayor cantidad de actividad lipolítica que la forma de 22 kD. Se vincula a los receptores de hormona del crecimiento con igual afinidad que la hormona del crecimiento de 22 kD, y tiene una décima parte de la bioactividad lactogénica (similar a la prolactina) que la hormona de 22 kD. A diferencia de la 22 kD, la 20-k-hGH tiene actividad anti-insulina débil.

La GH-V es una variante de la hormona del crecimiento que se encuentra en la placenta. Los derivados conocidos de la GH incluyen las formas deamidada y sulfoxilada de la hGH. Los residuos de asparagina y glutamina en las proteínas son susceptibles a las reacciones de deamidación bajo las condiciones apropiadas. Se ha demostrado que la hGH de la pituitaria sufre este tipo de reacciones, lo que da como resultado la conversión de Asn-152 en ácido aspártico y también, en menor medida, la conversión de Gln-137 en ácido glutámico (Lewis et al, Endocrinology 104:1256 (1979)). Se ha demostrado que la hGH deamidada tiene una susceptibilidad alterada a la proteólisis con la enzima subtilisina, lo que sugiere que la deamidación puede tener importancia fisiológica en la dirección de la división proteolítica de la hGH. Se sabe que la hGH biosintética se degrada bajo ciertas condiciones de almacenamiento, lo que da como resultado la deamidación en una asparagina diferente (Asn-149). Este es el sitio primario de deamidación, pero también se ve la deamidación en la Asn-152 (Becker et al, 1988). Tanto la hGH derivada de la pituitaria como la sintética sufren sulfoxidaciones en Met-14 y Met-125 (Becker et al, 1988). También se ha informado de la oxidación en Met-170 en la hGH pituitaria pero no en la biosintética.

Se ha descubierto que tanto la hGH desamida como la hGH sulfoxida Met-14 exhiben plena actividad biológica (Becker et al, Biotechnol. Appl. Biochem. 10:326 (1988). Appl. Biochem. 10:326 (1988).

De acuerdo con la presente invención, la hGH puede ser una hormona del crecimiento humana natural, por ejemplo purificada a partir de la glándula pituitaria o sangre o suero, o puede ser una hGH recombinante. La GH recombinante se puede expresar en cualquier huésped adecuado, ya sea un huésped procariótico o bien eucariótico. La *E. coli* es un huésped particularmente adecuado para la expresión de la hGH, por ejemplo. Preferentemente, la hGH expresada en *E. coli* comprende una metionina N-terminal adicional con respecto a la secuencia humana, tal hGH también se llama Met-GH. Las células de levaduras, insectos, o mamíferos también son adecuadas para la expresión de la hormona del crecimiento recombinante. La hGH puede expresarse en células humanas o animales, por ejemplo en células de Ovario de Hámster Chino (CHO). Preferentemente, la hGH puede expresarse en líneas celulares murinas tal como por ejemplo la línea celular C127.

El término "hormona del crecimiento", como se utiliza en este documento, también incluye derivados, fragmentos, variantes, o análogos funcionales de la hGH que tiene una secuencia de aminoácidos como se ilustra en la Figura 5, siempre y cuando el derivado, fragmento, variante, o análogo funcional retenga la actividad biológica de la hormona del crecimiento, es decir que actúen como agonistas para el receptor de hormona del crecimiento. En otras palabras, son capaces de unirse al receptor de la hormona del crecimiento para iniciar la actividad de señalización del receptor.

El término "derivados funcionales", o "derivados químicos", tal como se utiliza en este documento abarca los derivados que se pueden preparar a partir de los grupos funcionales que se producen como cadenas laterales en los residuos de los grupos en posición N- o C-terminal, por medios conocidos en el arte, y se incluyen en la invención en la medida en que sigan siendo farmacéuticamente aceptables, y no reduzcan en forma considerable la actividad biológica de la hGH como se describe en este documento, es decir la habilidad de unirse al receptor de la hGH e iniciar la señalización del receptor, y no confieran propiedades tóxicas a las composiciones que los contienen. Los derivados pueden tener fracciones químicas, tales como residuos de carbohidratos o fosfatos, siempre y cuando tal derivado retenga sustancialmente la actividad biológica de la hGH y siga siendo farmacéuticamente aceptable.

Por ejemplo, los derivados pueden incluir ésteres alifáticos de los grupos carboxilo, amidas de los grupos carboxilo mediante reacción con amoníaco o con aminas primarias o secundarias, derivados N-acilo o grupos amino libres de los residuos de aminoácidos formados con fracciones acilo (por ejemplo, grupos alcanoil o aroil carbocíclicos) o derivados O-acilo de grupo hidroxilo libre (por ejemplo, aquellos de los residuos de serilo o treonilo) formados con fracciones acilo. Tales derivados también pueden incluir, por ejemplo, cadenas laterales de polietilenglicol, que pueden enmascarar sitios antigénicos y extender la permanencia de la molécula en los fluidos corporales.

Una hormona del crecimiento que se ha derivado o combinado con un agente formador de complejos puede ser de larga duración. Por lo tanto, una realización de la invención hace referencia a las versiones pegiladas de la hormona del crecimiento humana. Tales versiones pegiladas de la hormona del crecimiento humana se describen por ejemplo en la patente WO 2005/074546. Las hormonas de crecimiento manipuladas genéticamente para exhibir una actividad duradera en el cuerpo también son ejemplos para los derivados de la hGH dentro del alcance de la presente invención. Se ha aislado e identificado la hGH que se encuentra acetilada en el extremo N-terminal (Lewis et al., 1979). No está claro si la acilación desempeña un papel regulador o es simplemente un artefacto de la purificación. Sin embargo, se espera que esta molécula exhiba una actividad GH de modo semejante a otros derivados de la hGH. Por lo tanto, en una realización, la invención hace referencia a un derivado de hormona del crecimiento humana que está acetilada en su extremo N-terminal. Una realización de la formulación de acuerdo con la invención comprende un dímero de hormona del crecimiento humana seleccionado del grupo que consiste en un dímero disulfuro conectado a través de enlaces disulfuro entre cadenas, un dímero no disulfuro covalente irreversible, un dímero no covalente, y las mezclas de éstos.

Como se utiliza en este documento, el término "muteína" hace referencia a equivalentes de una GH, en la cual uno o más de los residuos de los aminoácidos de una GH natural se remplazan por residuos de aminoácidos diferentes, o se borran, o uno o más de los residuos de aminoácidos se agregan a la secuencia natural de una GH, sin reducir considerablemente la actividad de los productos resultantes comparados con la GH de tipo silvestre. Estas muteínas se preparan mediante síntesis conocida y/o mediante técnicas de mutagénesis sitio-dirigida, o cualquier otra técnica conocida adecuada para ello.

La muteínas de acuerdo con la presente invención incluyen proteínas codificadas mediante un ácido nucleico, tal como ADN o ARN, que se hibridan a ADN o ARN, que codifica una GH bajo condiciones rigurosas. Un polinucleótido que codifica hGH es un polinucleótido que codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos que se ilustra en la Figura 5.

El término "condiciones rigurosas" hace referencia a las condiciones de hibridación y posterior lavado, que aquellos con conocimiento en el arte convencionalmente llaman "rigurosas". Véase Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, supra, Interscience, N.Y., §§6.3 and 6.4 (1987, 1992). Sin limitación, los ejemplos de condiciones rigurosas incluyen las condiciones de lavado a 12-20 °C por debajo de la T_m calculada del híbrido que se está estudiando en, por ejemplo, 2 x SSC y 0,5% de SDS por 5 minutos y 0,1 % de SDS por 15 minutos; 0,1 x SSC y 0,5% de SDS a 37°C por 30-60 minutos y después, un 0,1 x SSC y 0,5% de SDS a 68°C por 30-60 minutos. Los

expertos en el arte comprenden que las condiciones rigurosas también dependen de la longitud de las secuencias de ADN, las sondas de oligonucleótidos (tales como las bases 10-40) o las sondas de oligonucleótidos mezcladas. Si se utilizan sondas mezcladas, es preferente utilizar cloruro de amonio tetrametilo (TMAC) en lugar de SSC Véase Ausubel, supra.

- 5 La identidad refleja una relación entre dos o más secuencias de polipéptidos o dos más secuencias de polinucleótidos, determinadas mediante la comparación de las secuencias. En general, la identidad hace referencia a una correspondencia exacta de nucleótido a nucleótido o aminoácido a aminoácido de las secuencias de los dos polinucleótidos o los dos polipéptidos, respectivamente, a lo largo de las secuencias que se comparan.

10 Para las secuencias en donde no existe una correspondencia exacta, puede determinarse un “% de identidad”. En general, las dos secuencias que se van a comparar se alinean para dar una correlación máxima entre las secuencias. Esto puede incluir la inserción de “interrupciones” en una o en ambas secuencias, para mejorar el grado de alineación. Se puede determinar un % de identidad a lo largo de la totalidad de cada una de las secuencias que se comparan (lo que se llama alineación global), que es particularmente adecuada para las secuencias que tienen la misma longitud o una longitud muy semejante, o incluso más cortas (lo que se llama alineación local), que es más adecuada para las secuencias de longitudes desiguales.

15 Los métodos para la comparación de la identidad y homología de dos o más secuencias son conocidos en el arte. Por ejemplo, los programas disponibles en el Paquete de Análisis de Secuencia de Wisconsin, versión 9.1 (Devereux J et al, Nucleic Acids Res, 12, 387-395, 1984), por ejemplo los programas BESTFIT y GAP, también pueden utilizarse para determinar el porcentaje de identidad entre dos polinucleótidos y el porcentaje de identidad y porcentaje de homología entre dos secuencias de polipéptidos. BESTFIT utiliza el algoritmo de “homología local” de Smith y Waterman (Smith and Waterman J Mol Biol, 147,195-197, 1981, Advances in Applied Mathematics (Avances en matemática aplicada), 2, 482-489, 1981) y encuentra la mejor región individual de similitud entre dos secuencias. Otros programas para determinar la identidad y/o similitud entre secuencias también son conocidos en el arte, por ejemplo la familia de programas BLAST (Altschul S F et al, J Mol Biol, 215, 403-410, 1990, Altschul S F et al, Nucleic Acids Res., 25: 389-3402, 19) y FASTA (Pearson W R and Lipman D J, Proc Nat Acad Sci USA, 85,2444-2448,1988).

20 1. Una proteína producto de mutación tal tiene preferentemente una secuencia de aminoácidos lo suficientemente duplicativa de la de una GH (por ejemplo, la secuencia de aminoácidos que se muestra en la figura 5), para tener actividad sustancialmente similar a la GH. Una actividad de GH es su capacidad de unirse al receptor GH. Siempre que la proteína mutante tenga una actividad sustancialmente de unión al receptor GH (GHR), puede considerarse que tiene actividad sustancialmente similar a la GH. Por lo tanto, puede determinarse si una proteína mutante dada tiene sustancialmente la misma actividad que la GH mediante la experimentación de rutina que comprende someter una proteína mutante, por ejemplo, a un simple ensayo de competencia tipo sándwich para determinar si se une o no a una GHR etiquetada de manera apropiada o GHR de expresión de células, tal como un radioinmunoensayo o un ensayo ELISA.

2. En una realización preferente, cualquier proteína mutante tal tiene al menos 60% o 70% o 80 % o 90 % o 95 % o 98 % o 99 % de identidad u homología con la secuencia de aminoácidos o ADN de una GH. La secuencia de aminoácidos de hGH se muestra en la figura 5. La secuencia de ADN que codifica la GH se conoce en el arte, por ejemplo, a partir de DeNoto et al, 1981 o Martial et al., 1979.

3. Cambios preferentes para proteínas mutantes conforme a la presente invención son los que se conocen como sustituciones “conservadoras”. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos de polipéptidos GH pueden incluir aminoácidos sinónimos dentro de un grupo que tiene propiedades fisicoquímicas lo suficientemente similares de modo que la sustitución entre miembros del grupo preservará la función biológica de la molécula (Grantham, 1974). Está claro que las inserciones y eliminaciones de aminoácidos también pueden hacerse en las secuencias definidas con anterioridad sin alterar su función, en particular si las inserciones o eliminaciones sólo involucran pocos aminoácidos, por ejemplo, menos de 20, y preferentemente menos de diez, y no eliminan ni mueven aminoácidos que son fundamentales para una conformación funcional, por ejemplo, residuos de cisteína. Las proteínas y proteínas mutantes producidas mediante tales eliminaciones y/o inserciones se contemplan en la presente invención.

4. El término “proteína de fusión” hace referencia a un polipéptido que comprende GH, o una proteína de fusión o fragmento de ésta, fusionado con otra proteína, que, por ejemplo, tiene un tiempo de permanencia extendido en fluidos corporales. La fusión puede ser directa o a través de un conector tal como por ejemplo un conector de péptidos de 5 a 10 aminoácidos. La GH puede fusionarse con otra proteína, polipéptido o similar, por ejemplo, una inmunoglobulina o fragmento de éstos. Las porciones Fc de IgG, tales como IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 son adecuadas para la preparación de proteínas de fusión-inmunoglobulina. Las proteínas de fusión Ig se describen por ejemplo en EP 314317 A1 (Genentech) o EP 0325224 A2 (Zymogenetics Inc.).

5. Como "fracciones activas" de una GH o proteínas mutantes y proteínas fusionadas, la presente invención cubre cualquier fragmento o precursores de la cadena de polipéptidos de la molécula de proteína sola o junto con moléculas asociadas o residuos conectados con éste, por ejemplo residuos de azúcar o fosfato, o agregados de la molécula de proteína o los residuos de azúcar por sí mismos, siempre que dicha fracción tenga actividad sustancialmente similar a la GH.

6. La GH que ha de formularse conforme a la presente invención puede utilizarse para el tratamiento y/o prevención de una cantidad de enfermedades o trastornos, ya sea sola o en combinación con otros componentes activos. Tales enfermedades o trastornos se relacionan, preferentemente, con la producción de GH endógena insuficiente. La GH purificada puede utilizarse por ejemplo para el tratamiento y/o prevención de deficiencia de GH, síndrome de desgaste por SIDA, lipodistrofia (también llamado HARS - síndrome dismetabólico/dismorfia asociado a VIH), o síndrome de asa corta, en particular pediátrico. Otras enfermedades en las cuales puede indicarse la administración de hormona del crecimiento incluyen cirrosis, deficiencia de crecimiento en adultos, aterosclerosis, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, osteoartritis, caquexia cardíaca, fallo cardíaco congestivo, insuficiencia renal crónica, reconstitución o movilización de células sanguíneas, infertilidad masculina, movilización de células madres hematopoyéticas, esclerosis múltiple, accidente cerebrovascular, atrofia sistémica múltiple o cáncer.

El término "microcápsulas" como se utiliza en la presente invención hace referencia a partículas dentro de la escala de micrones y submicrones, que tienen una estructura que comprende al menos un núcleo sólido interno y una cubierta externa, y tienen una forma más o menos esférica. Las partículas que se conocen como nanocápsulas, que son partículas en la escala de submicrones que tienen la misma estructura que se define, están abarcadas por las "microcápsulas" que se utilizan en la presente invención.

Habitualmente, el diámetro medio ponderado de las microcápsulas de la invención oscila entre aproximadamente 100nm y aproximadamente 500 μm . Más preferentemente, el diámetro promedio de partículas es de entre aproximadamente 1 μm y aproximadamente 100 μm . En otra realización, el diámetro medio de las microesferas es de entre aproximadamente 10 μm y aproximadamente 80 μm , que es un rango de tamaño muy útil que ha de ser aplicado a través de una jeringuilla equipada con una aguja que tiene un diámetro pequeño. Las microcápsulas de la presente invención son muy útiles para lograr la retención de tejido local después de una inyección intramuscular o subcutánea, de modo tal que puede formarse un depósito proporcionando liberación controlada de la hormona del crecimiento incorporada en las partículas.

El agente de carga empleado en las partículas conforme a la invención es preferentemente un alcohol de azúcar, un azúcar, un alcohol de azúcar y/o amino azúcar. Si el agente de carga es un azúcar, es preferentemente un mono-, di-, o trisacárido. Ejemplos de monosacáridos que podemos mencionar son glucosa, manosa, galactosa, fructosa y sorbosa; ejemplos de disacáridos que podemos mencionar son sucrosa, lactosa, maltosa y trehalosa y un ejemplo de un trisacárido que podemos mencionar es rafinosa. Se da preferencia a la sucrosa, lactosa, maltosa y trehalosa, particularmente preferente es la sucrosa. Los alcoholes de azúcar deben ser monosacáridos cuyo grupo carbonil reactivo se ha reducido al grupo alcohol, tal como, por ejemplo, hexitoles o pentitoles. Los alcoholes de azúcar que pueden utilizarse como agentes de carga comprenden preferentemente hexitoles, tales como, por ejemplo, manitol, sorbitol, dulcitol, xilitol o ribitol. Se da preferencia particular a la presencia de manitol y/o sorbitol, se prefiere muy particularmente manitol.

Los aminoazúcares, que pueden utilizarse como agentes de carga, son monosacáridos que contienen un grupo amino primario, secundario o terciario o un grupo amino acilado (-NH-CO-R) en lugar de un grupo hidroxil. Para los fines de la invención, se da preferencia particular en la presente invención a glucosamina, N-metilglucosamina, galactosamina y ácido neuramínico.

Las micropartículas que constituyen los núcleos de las microcápsulas pueden contener un agente de carga o una mezcla de diferentes agentes de carga. Si se utiliza una mezcla, tal mezcla puede contener agentes de carga del mismo grupo que, por ejemplo, de azúcares, alcoholes de azúcar o amino azúcares o puede contener agentes de carga de grupos diferentes como, por ejemplo, azúcares junto con alcoholes de azúcar.

Los agentes de carga están presentes en las micropartículas que constituyen los núcleos de las micropartículas según la invención en una proporción de entre 20 y 99% del peso total, preferentemente de 30 a 90% del peso total, y en particular preferentemente de 35 a 75% del peso total.

Los agentes tensioactivos que pueden ser empleados son todos agentes tensioactivos utilizados habitualmente en preparaciones farmacéuticas. Los agentes tensioactivos son agentes tensioactivos no iónicos, en particular preferentemente ésteres de ácidos grasos de sorbitán polioxietileno (polisorbatos) y copolímeros de bloque polioxietileno-polioxipropileno. Las micropartículas que constituyen los núcleos de las microcápsulas pueden contener uno o más agentes tensioactivos. El agente tensioactivo o mezcla de agentes tensioactivos está presente en tales micropartículas en una parte de 0,01 a 2% del peso total, preferentemente de 0,05 a 0,5% del peso total, más preferentemente de aproximadamente 0,1% del peso total.

Los ésteres de ácidos grasos de sorbitán polioxietileno también se conocen como Polisorbato y con el nombre comercial Tween®. Los ésteres de ácidos grasos de sorbitán polioxietileno son, en particular, monolaurato de sorbitán polioxietileno (20), monopalmitato de sorbitán polioxietileno (20) y monoestearato de sorbitán polioxietileno (20). Se da preferencia al monopalmitato de sorbitán polioxietileno (20) y monoestearato de sorbitán polioxietileno (20), en particular se da preferencia al monooleato de sorbitán polioxietileno (20). Los copolímeros de bloque polioxietileno-polioxipropileno se conocen con el nombre Poloxamer. Un copolímero de bloque polioxietileno-polioxipropileno particularmente preferente es Poloxamer 188, comercializado con el nombre comercial de Lutrol® F68.

Los lípidos empleados en la cubierta de la preparación según la invención pueden ser puros o mezclas de alcoholes grasos, los ésteres de ácidos grasos y/o ésteres de poliol en donde el poliol puede ser glicerol o un polietilenglicol. En un modo particular de la invención, se seleccionan lípidos entre el grupo de fosfolípidos, mono-, di- y triglicéridos de C₈ - C₂₂ ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, alcoholes grasos, glicoglicerolípidos, (cuyos compuestos contienen uno o dos azúcares enlazados mediante unión glicosídica a glicerol o diacilglicerol), ésteres de sucrosa o sus mezclas. El lípido empleado preferentemente tiene un punto de fusión superior a la temperatura del cuerpo humano o animal sobre el cual se aplicará para evitar la entrega rápida de la proteína debido a la fusión del lípido. Preferentemente, el lípido empleado tiene un punto de fusión de al menos aproximadamente 40°C, preferentemente en el rango de 45°C a 80°C y más preferentemente en el rango de 48°C a 75°C.

En un modo preferente de la invención, los fosfolípidos utilizados para formar la cubierta se seleccionan entre el grupo compuesto de fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol, difosfatidilglicerol, dipalmitoilfosfatidilcolina, dioleilfosfatidiletanolamina, dioleilfosfatidilcolina, dimiristol-fosfatidilglicerol, y sus mezclas.

Los ésteres de glicerol y ácidos grasos pueden ser monoésteres, diésteres y/o triésteres de glicerol y ácidos grasos de cadena media y/o larga (C₈ a C₂₂) y/o mezclas de éstos. En un modo preferente de la invención, los mono-, di-, triglicéridos se seleccionan entre el grupo de mono-, di-, y triglicéridos de ácidos grasos de C₈ - C₂₂, particularmente entre el grupo de mono-, di-, y triglicéridos de ácidos grasos de ácidos cáprico, caprílico, láurico, mirístico, palmítico, esteárico y sus mezclas. Los triglicéridos puros, tales como los comercializados con el nombre comercial Dynasan®, por ejemplo Dynasan® 114 (trimiristina), Dynasan® 118 (tristearina) también pueden utilizarse para formar la cubierta de las microcápsulas. Los aceites vegetales también pueden ser particularmente adecuados para ser parte de la cubierta de lípidos, preferentemente aceites vegetales hidrogenados de cadena larga de tipo I, tal como aceite de palma, aceite de soja o aceite de semilla de algodón. Un aceite vegetal particularmente preferente es aceite de palma hidrogenado, tal como el comercializado con el nombre comercial de Dynasan® P 60.

Los ésteres de ácidos grasos son ácidos grasos monoésteres y un alcohol mono- o divalente. Los ésteres de ácidos grasos que pueden utilizarse en la presente invención se seleccionan preferentemente de ésteres de ácidos C₁₂ - C₂₂ con C₁ - C₁₀ alcoholes alifáticos lineales o ramificados y sus mezclas, tales como etil palmitato, etil miristato, isopropil miristato, etil estearato, octil estearato y sus mezclas.

Los alcoholes grasos que pueden utilizarse en la presente invención son alcoholes de cadena larga (C₁₂ - C₂₂) y sus mezclas, tales como cetil alcohol, miristil alcohol, cetearil alcohol, estearil alcohol, behenil alcohol y sus mezclas. Los ejemplos de glicoglicerolípidos que pueden ser utilizados en la presente invención son monogalactosil diacilglicerol (MGDG) y digalactosil diacilglicerol (DGDG), sus mezclas y sus derivados acilados y sulfonados.

Un ejemplo utilizable en la presente invención es un éster de glicerol con ácido behénico (C₂₂) (INCI: tribehenin, USP: gliceril behenato), que también se comercializa con el nombre comercial Compritol® 888. Consiste en mono- (12 - 18%), di- (52%) y tri-glicéridos (28 - 32%) y ácido behénico (>85%), además contiene ácidos grasos C₁₆ - C₂₀. El gliceril behenato tiene un punto de fusión entre 69° y 74°C.

Otro ejemplo de un éster de glicerol y ácidos grasos utilizables en la presente invención es un lípido comercializado con el nombre de Precirol® ATO 5 (Precirol), que es una mezcla de ésteres de glicerol con ácido palmítico y ácido esteárico (gliceril palmitoestearato) y consiste en mono- (8 - 17%), di-(54%) y triglicéridos (29 - 38%) con ácido palmítico y ácido esteárico. Precirol® ATO 5 tiene un punto de fusión entre 50 y 60°C y un valor HLB de aproximadamente 2.

Los ésteres de polietilenglicol y ácidos grasos también conocidos como glicéridos poliglicolisados pueden prepararse mediante reacción de alcoholisis de aceites naturales con polietilenglicoles (PEG). Son mezclas de monoésteres, diésteres y/o triésteres de glicéridos de ácidos grasos de cadena larga (C₁₂ a C₁₈) y PEG (mono-y/o di-) ésteres de ácidos grasos de cadena larga (C₁₂ a C₁₈) y pueden incluir PEG libre.

Los glicéridos poliglicolisados están, por ejemplo, comercialmente disponibles a través de Gattefosse con el nombre comercial de Gelucire®. Habitualmente el lípido comercializado con el nombre comercial Gelucire® se especifica mediante dos números de dos dígitos que indican su punto de fusión y valor HLB. El punto de fusión se expresa en grados Celsius y el valor HLB (balance hidrófilo-lipófilo) es una escala numérica que se extiende de 0 a

aproximadamente 20. Los valores HLB más bajos denotan más sustancias lipofílicas e hidrofóbicas y valores más altos denotan más sustancias hidrofílicas e lipofóbicas. Se determina la afinidad de un compuesto para agua y para sustancias aceitosas y su valor HLB se asigna de manera experimental. Los ejemplos de glicéridos poliglicolisados, que están presentes en la cubierta de las micropartículas, son Gelucire® 50/13, Gelucire® 53/10 y preferentemente Gelucire® 50/02.

La cubierta de la formulación de partículas puede contener un lípido o una mezcla de diferentes lípidos. Si se utiliza una mezcla, tal mezcla puede contener lípidos del mismo grupo como, por ejemplo, de ésteres de glicerol y ácidos grasos o glicéridos poliglicolisados o puede contener lípidos de diferentes grupos tales como, por ejemplo, ésteres de glicerol y ácidos grasos juntos con glicéridos poliglicolisados.

Según una realización preferente de la invención, el lípido que está presente en la cubierta de microcápsulas es un glicérido poliglicolisado y/o un éster de glicerol y ácidos grasos.

Además del lípido, la cubierta puede contener aditivos tales como plastificantes, que pueden mejorar la capacidad de formar una película del lípido. Los plastificantes son sustancias, que se disuelven dentro del lípido y de este modo incrementan la plasticidad y fluidez del lípido y habitualmente son líquidos a temperatura ambiente. La adición de plastificantes limita la formación de dominios cristalinos en el recubrimiento y reduce la porosidad del material de recubrimiento (lípido). En consecuencia, una realización preferente de la presente invención hace referencia a microcápsulas, en donde la cubierta externa también contiene un plastificante.

El lípido o mezcla de lípidos junto con aditivos, que puede estar presente dentro de la cubierta de las microcápsulas tales como plastificantes y agentes dispersantes, se indican en la presente aplicación como "fase lípida".

Los plastificantes que pueden estar presentes en la fase lípida son, por ejemplo, lípidos que tienen un punto de fusión significativamente inferior en comparación con el lípido utilizado como material de recubrimiento como, por ejemplo, triglicéridos de cadena media (MCT) o copolímeros de polioxietileno-polipropilenglicol de bloque anfifílico (Poloxamers), tal como Lutrol® F127. Su concentración con respecto al peso total de la fase lípida está dentro del rango de 0 a 10%, preferentemente en el rango de 1 a 6%. La cubierta también puede contener uno o más agentes de dispersión que facilitan la dispersión de las micropartículas de núcleo hGH en el lípido fusionado. En consecuencia, otra realización preferente hace referencia a micropartículas, en donde la fase lípida que constituye la cubierta externa que contiene un agente de dispersión para el núcleo interno. Conforme a una realización preferente en particular, el agente de dispersión hace referencia a un fosfolípido o derivado de éste, por ejemplo lecitinas de soja, preferentemente lecitina de soja. Su concentración con respecto al peso total de toda la fase lípida que forma la cubierta está dentro del rango de 0 a 2 %, preferentemente en el rango de 0,1 a 1 %.

Las microcápsulas de la presente invención pueden fabricarse mediante un procedimiento de dos pasos. En el primer paso, se proporcionan las partículas que constituyen los núcleos internos de las microcápsulas, a las cuales, en el segundo paso se les proporciona una cubierta externa.

Preferentemente, el primer paso en la fabricación de microcápsulas se realiza utilizando una técnica de secado por pulverización y el segundo paso se realiza mediante un proceso utilizando un fluido presurizado a una presión cerca de su presión crítica (P_c). La expresión "fluido presurizado a una presión cerca de su presión crítica P_c " designa un fluido presurizado a una presión comprendida entre $0,4 P_c$ y $3 P_c$. En consecuencia, otro objeto de la presente invención hace referencia al proceso de preparación de las microcápsulas de la presente invención, en donde el núcleo interno se prepara utilizando una técnica de secado por pulverización y la cubierta externa se prepara utilizando un proceso basado en fluido presurizado. Según una realización preferente, el proceso se opera a una presión supercrítica (SC). La expresión "fluido a presión SC" designa un fluido presurizado a una presión más alta que su presión crítica (P_c), cualquiera que sea su temperatura. Significa que la temperatura puede elegirse más baja o más alta que la temperatura crítica (T_c). En un modo preferente de la invención, se utiliza un proceso de microencapsulación que utiliza un Fluido Supercrítico (SCF), que significa que tanto la presión como la temperatura del fluido serán más altas que P_c y T_c , respectivamente, al menos en una parte del proceso.

Como ya se mencionó el primer paso, es decir, la fabricación de las partículas que constituyen los núcleos internos pueden realizarse utilizando la técnica de secado por pulverización. El secado por pulverización es, en principio, un proceso de extracción de disolvente. Los constituyentes del producto que se ha de obtener se disuelven/dispersan en un líquido y después se alimentan, por ejemplo utilizando una bomba peristáltica, a un atomizador de un secador por pulverización. Un atomizador adecuado, que puede utilizarse para la atomización del líquido, incluye boquillas o discos rotativos. Con boquillas, la atomización ocurre debido a la acción del gas comprimido, mientras que en caso de utilizar discos rotativos, la atomización ocurre debido a la rotación rápida del disco. En ambos casos, la atomización conduce a la deshomogeneización del líquido en pequeñas gotas en la cámara de secado, en donde el disolvente se extrae de las gotas de aerosol y se descarga, por ejemplo a través de un tubo de escape a un colector de disolvente.

Las técnicas de secado por pulverización que pueden utilizarse para la preparación de las partículas son conocidas y se describen, por ejemplo, en K. Masters en "Spray-drying Handbook" (Manual de secado por pulverización), John Wiley & Sons, New York, 1984. En una realización preferente, la atomización del líquido se realiza utilizando una boquilla. Los ejemplos de secadores por pulverización adecuados incluyen secadores por pulverización a escala de laboratorio de Buchi, tal como el Mini Spray Dryer 290 (Minisecador por pulverización), o un MOBILE MINOR™, o un Pharma Spray Dryer PharmaSD® de Niro.

Las condiciones de secado por pulverización tienen un gran impacto en las propiedades, humedad, tamaño de partículas, morfología y el grado de agregación y degradación de proteína de los productos. La temperatura es el parámetro del proceso más importante, dado que la exposición de proteínas a alta temperatura podría causar degradación. Para el secado por pulverización, deben controlarse dos temperaturas: temperatura de entrada y temperatura de salida. La primera es un parámetro de proceso independiente y puede fijarse por el operador, la segunda depende de la tasa de alimentación de líquido, la tasa de flujo volumétrico de aire atomizador, la tasa de flujo volumétrico de secado y la temperatura de entrada seleccionada.

Según una realización apropiada de la invención la temperatura de entrada está en el rango de 90°C a 150°C, preferentemente de 95°C a 130°C, y más preferentemente de 100°C a 120°C.

Según la invención, las soluciones que contienen proteínas, agentes de carga y tensioactivos utilizadas para la fabricación de los núcleos de la preparación de formulación de partículas comprenden un tensioactivo en una cantidad de 0,001 a 2% en peso, preferentemente de 0,05 a 1 % en peso, y más preferentemente de 0,1 % a 0,2 % en peso. Las soluciones/dispersiones utilizadas para el secado por pulverización contienen todos los ingredientes presentes en el núcleo interno de las cápsulas, es decir, una hormona del crecimiento, un agente de carga y un agente tensioactivo. La solución/dispersión puede contener otros auxiliares, por ejemplo para mejorar la estabilidad de la hormona del crecimiento dentro de tal solución/dispersión o para la mejora de su procesabilidad. Por ejemplo, la solución/dispersión puede contener un tampón como, por ejemplo, un tampón de fosfato, un tampón de citrato, un tampón de acetato y/o tampón de succinato. Tales tampones pueden presentarse en una concentración de 1mM a 100mM, preferentemente de 5mM a 50mM, más preferentemente de 10mM a 20mM.

Preferentemente, la solución/dispersión tiene un pH en el rango de pH 5,0 a pH 8,5, preferentemente de pH 5,5 a pH 7,5, más preferentemente de pH 5,85 a pH 7,4. Los valores de pH específicos preferentes son pH 5,85 y pH 7,4.

Según una realización apropiada, la hormona del crecimiento está presente en una concentración de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml.

Según otra realización, la solución/dispersión para el secado por pulverización comprende el agente de carga en una concentración de 1 mg/ml a 20 mg/ml, preferentemente de 2 mg/ml a 10 mg/ml, más preferentemente 5 mg/ml.

La cubierta que contiene al menos un lípido puede aplicarse a los núcleos cargados con proteína utilizando un proceso donde las micropartículas del núcleo se ponen en contacto con un fluido presurizado a una presión P cerca de P_c , a una temperatura cerca de T_c , de modo que puede dilatar el material de la cubierta. La expresión "temperatura cercana a T_c " hace referencia a un fluido a una temperatura T en la escala Kelvin (K) comprendida entre $0,8 T_c$ (expresada en K) y $1,5 T_c$ (expresada en K). Por ejemplo, esto puede ser un proceso de encapsulado como se describe en la patente US 5057342 (H.F. Bok et al., 1989), US 5066522 (T.A. Cole et al., 1989), y más recientemente en la US 2003/0157183 A1. Tal proceso consiste en disolver un fluido presurizado, en el lípido fundido que contiene las micropartículas de núcleo dispersadas, lo cual da como resultado una llamada suspensión saturada de gas que se expande a través de una boquilla para formar micropartículas de lípidos sólidas que contienen los núcleos cargados de proteínas. El fluido presurizado se selecciona preferentemente en el grupo que comprende óxido nitroso, propano, etano y dióxido de carbono (CO_2 utilizado solo o en presencia de co-disolventes). CO_2 es el fluido presurizado preferente utilizado en la invención. Pueden utilizarse disolventes para favorecer la disolución del fluido presurizado en la fase lípida y reducir la viscosidad de la dispersión. Los co-disolventes utilizados en la invención pueden ser cetonas, alcoholes, ésteres e hidrocarburos livianos que tienen entre 3 y 8 átomos de carbono, y preferentemente acetona, etanol, n-propanol, isopropanol o etil acetato. Se utilizaron en una concentración baja, inferior al 10% y preferentemente cerca del 1%. El co-disolvente se eliminó de las microcápsulas finales durante la fase de despresurización/expansión final del proceso. A diferencia del proceso descrito en la patente EP 0784506 B, la fase lípida utilizada en la presente invención no necesita solubilizarse en un fluido supercrítico para implementar el proceso. Esta es una ventaja clave de la presente invención comparada con la EP 0784506 B, que considerablemente amplía el rango de lípidos sólidos utilizables para formar la cubierta, conduce a un rendimiento de producción mucho más alto y garantiza una cubierta de lípidos sólidos bien definida de la misma composición que la del material original introducido en la formulación. En una realización preferente de la presente invención, el valor de la presión de fluido P está en el rango de entre aproximadamente $0,75 P_c$ y aproximadamente $1,5 P_c$, durante la fase de dispersión de las micropartículas de núcleo de hGH en la fusión de lípidos. Por lo tanto, un objeto preferente de la invención es un proceso para preparar microcápsulas, en donde el núcleo interno se prepara utilizando la técnica de secado por pulverización y la cubierta externa se prepara utilizando un fluido presurizado a

una presión comprendida entre $0,5P_c$ y $2 P_c$, estando la presión crítica del fluido más preferentemente dentro del rango de entre aproximadamente $0,75 P_c$ y aproximadamente $1,5 P_c$, P_c .

5 En el proceso de encapsulado de la presente invención, las micropartículas de núcleo cargado de hormona del crecimiento y el agente lípido entran en contacto con el fluido presurizado, tal como dióxido de carbono (CO_2) lo cual conduce a una suspensión de partículas de proteína en un agente o agentes lípidos fundidos saturados de gas. Si se utiliza CO_2 como el fluido presurizado, la presión utilizada durante esta fase se selecciona preferentemente del rango entre 5 MPa a 15 MPa, preferentemente de 5,8 MPa a 11.0 MPa. La disolución del fluido presurizado en el excipiente generalmente induce la dilatación/fusión del excipiente a una temperatura mucho más baja (~ 10 a $50^\circ C$) que su temperatura de transición vítrea/fusión, que produce una fusión saturada con una viscosidad reducida. La temperatura de la fusión saturada se encuentra preferentemente en el rango de $30^\circ C$ a $70^\circ C$, más preferentemente de $35^\circ C$ a $65^\circ C$.

15 Después de la dispersión homogénea de las micropartículas con núcleo cargado de proteína en el lípido fundido dilatado por el fluido presurizado, la despresurización de la suspensión saturada a través de una boquilla lleva a una expansión de gran volumen del fluido disuelta en las gotas, dividiéndolas en gotas pequeñas que se solidifican con rapidez debido a la gran disminución de temperatura asociada con la expansión del fluido (es decir, el llamado efecto Joule-Thomson). La disolución de fluido en el lípido, las condiciones de dispersión y despresurización se ajustan para poder generar microcápsulas con una morfología cuasi esférica, una porosidad baja y alta cohesión, lo que lleva a una liberación baja. La presión a la que la dispersión homogénea se despresuriza se encuentra preferentemente en el rango de entre la presión ambiente y 5,5 MPa, más preferentemente de 1,5 MPa a 3,5 MPa, y más preferentemente a aproximadamente 3MPa.

Según una realización preferente, las microcápsulas de la presente invención se preparan mediante un proceso que comprende los pasos de

- (a) preparar una solución/dispersión acuosa que comprende al menos una hormona del crecimiento, un agente de carga y un tensioactivo;
- 25 (b) secar por pulverización la solución/dispersión acuosa preparada en el paso (a) para producir micropartículas que contienen proteína;
- (c) recoger las micropartículas obtenidas en el paso (b);
- (d) preparar una dispersión homogénea que comprende las micropartículas obtenidas en el paso (c) y el lípido en un fluido presurizado, bajo condiciones de presión y temperatura donde el fluido presurizado se disuelve en la fase lípida;
- 30 (e) despresurizar la dispersión preparada en el paso (d) a través de una boquilla y recolectar las microcápsulas obtenidas en el paso (e).

En una realización más preferente de la invención, el fluido presurizado utilizado para implementar el proceso es CO_2 ; la presión para la disolución y dispersión de fluido de las micropartículas de hGH es de 6.MPa o 100 MPa, la temperatura está en el rango de entre aproximadamente $60^\circ C$ y aproximadamente $70^\circ C$, y la presión post - expansión (es decir, la presión en la válvula de despresurización) está en el rango de entre aproximadamente 3,0 MPa, y aproximadamente 5,0 MPa.

40 Las microcápsulas de la presente invención pueden administrarse a una persona que las necesite después de la suspensión en un medio inyectable adecuado farmacéuticamente aceptable, por ejemplo a través de una aguja que tiene un diámetro pequeño y utiliza una jeringuilla convencional (calibre 25 - 30). Preferentemente, el medio de suspensión es un medio acuoso, que también puede contener un agente tensioactivo y/o de carga. El término "acuoso" como se utiliza en la presente patente hace referencia a agua o mezclas de agua con otros disolventes, en especial disolventes orgánicos. Las soluciones/suspensiones acuosas están presentes si uno o más componentes se disuelven o suspenden en agua o mezclas de agua con otros disolventes. Si la solución/suspensión acuosa contiene uno o más ingredientes farmacológicos activos y tal solución/suspensión es adecuada para el tratamiento terapéutico o profiláctico de un ser humano o animal, dicha solución/suspensión es una preparación farmacéutica. Si un disolvente orgánico está presente en la solución/suspensión acuosa o preparación farmacéutica, preferentemente si están presentes disolventes orgánicos adecuados para la administración parenteral tales como dimetil sulfóxido (DMSO), pero preferentemente alcoholes tales como por ejemplo etanol, 1,2-propanediol, glicerol, polietilenglicoles y glicofurol.

Para incrementar la tolerabilidad de la administración parenteral, la osmolalidad de la suspensión se encuentra preferentemente en el rango isotónico, es decir, a una osmolalidad de aproximadamente de 250 a 350 mOsmol/kg.

La preparación puede administrarse directamente de modo intravenoso, intraarterial y también subcutáneo sustancialmente sin dolor.

5 Para lograr osmolalidad el medio acuoso puede contener un modificador de isotonicidad, preferentemente una sal tolerada fisiológicamente, tal como, por ejemplo, cloruro de sodio o cloruro de potasio, o un poliol tolerado fisiológicamente, tal como, por ejemplo, glucosa o glicerol, en una concentración necesaria para la modificación de isotonicidad. En una realización preferente de la presente invención el medio de dispersión acuosa para las microcápsulas es solución salina fisiológica.

10 El medio de dispersión también puede contener otros auxiliares tales como agentes tensioactivos adecuados (Poloxamer 188 y 407, Solutol® HS 15, Tween® 20) y/o alcoholes de azúcar adecuados tales como, por ejemplo, manitol y/o sorbitol. De manera alternativa, el medio de suspensión para la administración de las microcápsulas puede ser un líquido no acuoso inyectable de baja viscosidad, tal como mezclas de triglicéridos de cadena media (ésteres de ácidos grasos de glicerol). Los triglicéridos de cadena media preferentes son Mygliol® 812 (de la compañía Dynamit Nobel), Labrafac® WL1349 (triglicérido de ácido caprílico de la compañía Gattefossé, Francia), o Lipoid MCT (de la compañía Lipoid, Alemania).

15 Para hacer que las microcápsulas sean adecuadas para la administración parenteral disponibles para la aplicación se presentan de manera ventajosa en la forma, en donde están herméticamente cerradas en una condición de esterilización dentro de un envase adecuado para el almacenamiento antes de su utilización. Por lo tanto, un objeto ventajoso de la presente invención es una forma de presentación de las microcápsulas herméticamente cerradas en una condición de esterilización dentro de un envase adecuado para su almacenamiento antes de su utilización. Los
20 elementos utilizados para proporcionar una suspensión de las microcápsulas adecuada para la administración parenteral pueden colocarse de manera ventajosa en un kit. En consecuencia, otro objeto de la invención es un kit que comprende un envase que contiene las microcápsulas que comprenden (1) un núcleo interno que contiene una hormona del crecimiento, un agente de carga, un agente tensioactivo y (2) una cubierta externa que comprende al menos un lípido y un envase con un medio de dispersión.

25 Tras haber descrito la invención en forma completa, los expertos en el arte comprenderán que ésta puede realizarse dentro de un amplio rango de parámetros equivalentes, concentraciones y condiciones sin alejarse del espíritu y alcance de la invención y sin experimentación indebida.

30 Aunque esta invención se ha descrito con referencia a realizaciones específicas de la misma, se comprenderá que otras modificaciones son posibles. Esta solicitud pretende cubrir cualquier variación, usos o adaptaciones de la invención siguiendo, en general, los principios de la invención e incluyendo tales desviaciones de la presente revelación en la medida que ocurran dentro de la práctica conocida o habitual dentro del arte al que pertenece la invención y que puedan aplicarse a las características esenciales establecidas con anterioridad en el presente documento en el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

35 Todas las referencias citadas en la presente invención, incluyendo artículos o resúmenes de revistas, solicitudes de patentes estadounidenses o extranjeras publicadas o no publicadas, patentes estadounidenses o extranjeras otorgadas o cualquier otra referencia, se incorporan en su totalidad a modo de referencia al presente documento, incluyendo todos los datos, tablas, figuras y textos presentados en las referencias citadas. Además, todos los contenidos de las referencias citadas dentro de las referencias citadas en el presente documento también se incorporan en su totalidad a modo de referencia al presente documento.

40 La referencia a pasos de métodos conocidos, pasos de métodos convencionales, métodos conocidos o convencionales no es una admisión de que ningún aspecto, descripción o realización de la presente invención se revela, enseña o sugiere en el arte relevante.

45 La siguiente descripción de las realizaciones específicas revelará de forma completa la naturaleza general de la invención que otros pueden, aplicando los conocimientos dentro del arte (incluyendo los contenidos de las referencias citadas en este documento), modificar y/o adaptar para varias aplicaciones tales realizaciones específicas, sin experimentación indebida, sin alejarse del concepto general de la presente invención. Por lo tanto, tales adaptaciones y modificaciones pretenden estar incluidas dentro del significado de un rango de equivalentes de las realizaciones divulgadas, en base a los contenidos y guía presentados en la presente invención. Debe entenderse que la fraseología y terminología en el presente documento se proporciona con fines descriptivos y no
50 limitativos, de modo tal que la fraseología y terminología de la presente especificación debe interpretarse por los expertos en el arte a la luz de los contenidos y guía presentadas en la presente invención, en combinación con los conocimientos de un experto en el arte.

A menos que se especifique lo contrario todos los datos en porcentajes (%) revelados en esta solicitud de patente deben entenderse como porcentaje en peso (% (w/w)).

Los ejemplos prácticos explican la invención sin que ésta se vea restringida a ellos.

Secado por pulverización

Se utilizó un Minisecador por pulverización de Büchi. El gas caliente fue aire deshumidificado o nitrógeno. La temperatura del gas osciló entre aproximadamente 80 °C y aproximadamente 150°.

5 Análisis de distribución de tamaño de partículas

La distribución de tamaño de partículas de polvos preparados utilizando el método de secado por pulverización fue caracterizada por el Sistema de Difracción Láser (Mastersizer 2000, Malvern Instruments) y por el analizador de imagen de partículas (Morphologi G2, Malvern Instruments). Se utilizó Mastersizer 2000 para medir la distribución de tamaño de partículas del polvo secado por pulverización en una suspensión líquida utilizando isopropanol como disolvente. Cada suspensión fue sometida a ultrasonidos durante aproximadamente 2 minutos antes de ser cargada en la célula muestra.

Aparte de este procedimiento general se midió el tamaño de partículas de referencias en lote DM5, GP5 b, D5 y DM10 después de la resuspensión en una solución acuosa que contenía Tween 20, cada suspensión se había mezclado con un mezclador vorticial (10s) y sometido a ultrasonidos durante aproximadamente 5 minutos.

15 De manera alternativa, el polvo se examinó mediante microscopía óptica utilizando Morphologi G2 (Malvern) para determinar la morfología de partículas y distribución de tamaño de partículas utilizando el diámetro equivalente circular. Los resultados del tamaño de partículas se expresan en micrómetros como distribución media numérica y parámetros (D(n, 0,9), D(n, 0,5) y D(n, 0,1), lo que significa que 90, 50 y 10% del número de muestras de partículas está por debajo del valor correspondiente D (v, 0,9), D(v, 0,5) y D(v, 0,1), lo que significa que 90, 50 y 10% del volumen de muestras de partículas está por debajo del valor correspondiente D).

Caracterización físico-química de proteínas - Cromatografía de exclusión por tamaños y fase inversa

Se analizaron muestras de micropartículas con núcleo de GH obtenidas mediante secado por pulverización utilizando cromatografía de exclusión por tamaños (SEC, por sus siglas en inglés) (para determinar el contenido de proteínas y el porcentaje de agregación) y utilizando Cromatografía Líquida de Alta Eficacia de Fase Inversa (RP-HPLC, por sus siglas en inglés) (para determinar el % de formas oxidadas y deamidadas). Para la RP-HPLC, los principales productos de degradación química de GH (formas oxidadas y deamidadas) fueron separados de la forma original utilizando una columna C4 que se mantuvo a 45°C. Los picos de proteínas se monitorearon a 220 nm. La proteína se eluyó de la columna mediante elución isocrática con un disolvente compuesto de 71 % de tampón Tris 50 mM y 29% de isopropanol. El análisis de SEC se realizó con una columna TSK gel G2000 SWXL que se mantuvo a temperatura ambiente. Los picos de proteínas se monitorearon a 214nm. La proteína se eluyó de la columna mediante elución isocrática con un disolvente compuesto de 97% v/v de tampón de fosfato 63 mM y 3% de isopropanol.

Ejemplo 1: Evaluación y selección de condiciones operativas apropiadas para la atomización

Temperatura de entrada (°C)

35 Se sabe que las tensiones térmicas y mecánicas a las que se expone la proteína durante el secado por pulverización producen la degradación de proteínas. Las condiciones operativas aplicadas durante el secado por pulverización se optimizaron para retener la estabilidad de proteínas durante el proceso de secado por pulverización. La temperatura de entrada y concentración de proteínas en el material de alimentación se variaron para evaluar el efecto en la recuperación de GH y el nivel de productos de degradación en las micropartículas producidas. Se obtuvieron distintos polvos comenzando con dos concentraciones (20 mg/mL y 10 mg/mL) y fijando diferentes temperaturas de entrada (80°C, 90°C, 120°C y 150°C). Para el análisis, los polvos se disolvieron en solución salina tamponada (PBS) pH 7,4 (a una concentración teórica de 1mg/mL) y se analizaron mediante SE-HPLC para evaluar la cantidad de hGH y la presencia de sustancias de alto peso molecular (HMWS, por sus siglas en inglés) en el polvo. En la Tabla 1 se resumen los resultados para la recuperación e integridad de hGH mediante SEC-HPLC.

45

Tabla 1: Resultados de SEC-HPLC obtenidos de los polvos secados por pulverización

Carga de hGH	T° de entrada (Fija)	T° de salida (medida)	Recuperación de hGH mediante SE-HPLC %	HMWS mediante SE-HPLC %	% de humedad
20mg/mL	80°C	35°C	nt	nt	nt
20mg/mL	90°C	45°C	32	0,68	2,2
20mg/mL	120°C	65°C	36	0,59	1,5
20mg/mL	150 °C	100°C	30	1,14	0,5
10mg/mL	90°C	45°C	29	0,80	2,2
10mg/mL	120°C	65°C	36	0,80	1,1
10mg/mL	150 °C	100°C	27	1,50	0,6

Según los resultados que se muestran en la Tabla 1, el secado por pulverización de la proteína pura puede tener un impacto profundo en la estabilidad de la proteína si no se utilizan agentes protectores. Se recupera menos del 40% de hGH después del secado por pulverización, independientemente de la concentración de hGH durante la alimentación y de la temperatura de entrada empleada. Esta baja recuperación puede asociarse a la formación de grandes agregados insolubles, que son visibles como partículas blancas residuales después de la reconstitución.

Un mayor porcentaje de HMWS de hGH se determinó para polvos producidos a una temperatura de entrada más alta, lo cual confirma el riesgo de degradación inducida por calor causado por la exposición de la proteína a altas temperaturas. La utilización de altas temperaturas de entrada también puede favorecer la producción de micropartículas con un contenido de humedad más bajo (Tabla 1). Sin embargo, un contenido de humedad de hasta 7 - 10% obtenido para estas micropartículas de núcleo con una temperatura de entrada más baja es aceptable, y consistente con una buena estabilidad de la proteína.

Ejemplo 2: Investigación de los efectos de agentes de carga y tensioactivos

Para poder investigar la capacidad de los excipientes de prevenir la degradación de hGH durante el secado por pulverización, se prepararon varias soluciones que contenían azúcar (trehalosa, sucrosa, manitol a 10mg/mL) con o sin la adición del agente tensioactivo (Polisorbato 20 y Poloxamer 188 a 0,1%) para secado por pulverización. La concentración de hGH se fijó en 2mg/mL. Las soluciones se prepararon disolviendo el tensioactivo y el agente de carga en tampón de fosfato a un pH de 7,4 y después disolviendo la carga de hGH mezclando suavemente. Las soluciones se atomizaron a una temperatura de entrada de 120°C, una tasa de flujo de aire de 538 Uh, u na tasa de flujo de solución de 5 mL/min y una velocidad de aspirador de 38 m³/h. Las muestras de polvo se evaluaron en cuanto a la recuperación y pureza de hGH (mediante SE-HPLC) y se caracterizaron en cuanto a distribución de tamaño de partículas (mediante Mastersizer 2000). Las formulaciones que contienen tensioactivos también se analizaron para ver el % de incremento en formas oxidadas y deamidadas (mediante RP-HPLC), en comparación con el material de hGH de referencia no secado por pulverización.

Las composiciones utilizadas para el secado por pulverización y los datos analíticos (recuperación y % HMWS (mediante SE-HPLC)) de las formulaciones obtenidas se resumen en la Tabla 2. Para el análisis, los polvos se disolvieron en PBS con pH 7,4 (a una concentración teórica de 1mg/mL) y se evaluaron mediante SE-HPLC en cuanto a la recuperación e integridad de hGH.

Tabla 2: Caracterización físico-química de micropartículas de hGH obtenidas mediante secado por pulverización como una función de concentración de agentes de carga (carbohidratos) y tipo y concentración de tensioactivos.

Agente de carga	Conc. de agente de carga (mg/mL)	Polisorbato 20 (w/w %)	Poloxamer 188 (w/w %)	Recuperación de proteína %	HMWS %	Aumento de formas oxidadas y deamidadas por RP-HPLC (%)
<i>Trehalosa</i>	2	-	0,1	97	2,7	2
<i>Trehalosa</i>	5	-	-	47	0,80	
<i>Trehalosa</i>	10	-	-	43	1,26	
<i>Trehalosa</i>	10	0,1	-	97	4,7	0
<i>Trehalosa</i>	10	-	0,1	97	3	0
<i>Trehalosa</i>	20	-	-	43	0,36	-
<i>Sucrosa</i>	2	0,1	-	97	3,3	0
<i>Sucrosa</i>	2	-	0,1	98,3	1,7	0
<i>Sucrosa</i>	10	-	-	20	0,03	
<i>Sucrosa</i>	10	0,1	-	90	10,7	0
<i>Sucrosa</i>	10	-	0,1	98	2,8	0
<i>Manitol</i>	10	0,1	-	94	9	3,22
<i>Manitol</i>	10	-	0,1	97	5,8	
<i>Manitol</i>	10	-	-	44	0,64	0

- 5 Cuando se formuló la hGH sólo con carbohidratos, se midió una recuperación baja (de 20% a 44%), independientemente de la concentración de carbohidratos. Esto puede asociarse a la formulación de grandes agregados insolubles que son visibles como partículas blancas después de la restitución, y que no están presentes cuando se utiliza un tensioactivo. La adición de Polisorbato 20 o Poloxamer 188 a 0,1% wt mejora considerablemente la recuperación independientemente del tipo de tensioactivo, probablemente mediante la limitación de la exposición interfacial de la proteína, y permite una distribución total del polvo antes del análisis, la hGH formulada con carbohidratos y tensioactivos se analizó también en cuanto al % de formas oxidadas y deamidadas mediante RP-HPLC. Los polvos se disolvieron en PBS con pH 7,4 para obtener una concentración teórica de 2mg/mL. En paralelo, se probó una carga de hGH no secada por pulverización como referencia.

- 15 Los resultados obtenidos, que se muestran en la Tabla 2, mostraron que el porcentaje de formas oxidadas y deamidadas de hGH no incrementaron para las muestras atomizadas en comparación con una carga no secada por pulverización a modo de referencia.

Ejemplo 3: Distribución de tamaño de partículas

El tamaño de partículas de los polvos descritos en la Tabla 2 se muestra en la Tabla 4: los diámetros se expresan tanto como distribución de volumen como una distribución de número.

- 20 El diámetro medio de las partículas secadas por pulverización es menor a 5 μm cuando se expresa como una distribución de número que indica que el polvo atomizado tiene una textura fina. La distribución de volumen mostró un diámetro medio mayor, lo cual indica que están presentes aglomerados grandes en un porcentaje muy bajo.

Tabla 4: Distribución de tamaño de partículas de polvo que contiene hGH secado por pulverización

FORMULACIÓN	Distribución de número			Distribución de volumen		
	D(0,1) μM	D(0,5) μM	D(0,9) μM	D(0,1) μM	D(0,5) μM	D(0,9) μM
hGH 2mg/mL + Sucrosa 10 mg/mL + Polisorbato 20 0,1%	1,09	1,74	3,46	6,01	28,24	66,69
hGH 2mg/mL + Sucrosa 10 mg/mL + Poloxamer 188 0,1%	0,54	0,86	3,86	3,69	8,18	8,56
hGH 2mg/mL + Trehalosa 10 mg/mL + Polisorbato 20 0,1%	1,54	2,37	4,08	2,95	6,55	49,95
hGH 2mg/mL + Trehalosa 10 mg/mL + Poloxamer 188 0,1%	0,54	0,78	4,00	9,10	49,22	160,74
hGH 2mg/mL + Manitol 10 mg/mL + Polisorbato 20 0,1%	0,76	1,21	2,90	1,63	5,32	12,01
hGH 2mg/mL + Manitol 10 mg/mL + Poloxamer 188 0,1%	0,61	0,88	1,74	1,65	6,70	15,62

Recubrimiento de micropartículas utilizando un proceso de fluido presurizado

- 5 Se utilizó un equipo SCF como se representa en forma esquemática en la Figura 1. En todos los experimentos, se utilizó el siguiente procedimiento.
- La mezcla de partícula/agente o agentes de recubrimiento (2) se colocó en una célula de mezclado (1) y se contactó con CO_2 presurizado, bombeado de un tanque de CO_2 (4) bajo condiciones de mezclado durante diez minutos.
- 10
- Después la mezcla se agitó durante una hora con un agitador (3). Durante este paso, se fijaron las condiciones de pulverización en el recipiente de recolección (7) equipado con un regulador de presión trasero (8).
 - Después de una hora, se detuvo la agitación y se comenzó la pulverización a través de la boquilla (6) activando la válvula.
 - Al final de la pulverización, el recipiente de recolección (7) fue lentamente despresurizado; se recogió la muestra y se tamizó (500 μm).
- 15 Se prepararon ocho formulaciones de micropartículas lípidas cargadas de hGH con una carga de 5% w/w de micropartículas en las microcápsulas lípidas utilizando este proceso de encapsulación basado en fluido presurizado y se caracterizaron analíticamente (caracterización físico-química de hGH, perfil de liberación de hGH in vitro). Además, también se preparó una formulación de carga de 10wt% para el proceso preliminar y evaluación analítica. Los parámetros de proceso y datos de formulaciones se resumen en la Tabla 5.
- 20 Las muestras producidas con una carga de 5 wt% son aceptables en términos de distribución de tamaño de partículas, aspecto y rendimiento de producción. Además, la formulación preliminar con una carga de 10 wt% muestra que producir partículas con una carga tan alta, que es potencialmente necesaria para alcanzar la dosis diana, parece viable.

Tabla 5: Microcápsulas lípidas cargadas de hGH; parámetros operativos de proceso y composición de formulaciones (10bar = 1,0MPa)

Referencia de lote	Carga	Agente de recubrimiento	Aditivos	Temperatura/Presión de pre-expansión	Presión de pos-expansión
1 P5	5%	Precirol ATO 5	0,5% lecitina de soja	60 bar/60°C	30 bar
2P5	5%	Precirol ATO 5	0,5% lecitina de soja	60 bar/60°C	30 bar
3P5	5%	Precirol ATO 5 Prec.ro)ATO 5	0,5% lecitina de soja 5% MCT (Migliol)	60 bar/60°C 60 bar/60°C	30 bar 30 bar
4P5	5%	Precirol ATO 5	0,5% lecitina de soja 2,5% Lutrol F127	60 bar/60°C	30 bar
5P5	5%	Precirol ATO 5	0,5% lecitina de soja 2,5% Lutrol F127	60 bar/60°C	30 bar
1G5	5%	Gelucire 50/02	0,5% lecitina de soja	100 bar/60°C	50 bar
2G5	5%	Gelucire 50/02	0,5% lecitina de soja	100 bar/60°C	30 bar
3G5	5%	Gelucire 50/02	0,5% lecitina de soja	100 bar/60°C	30 bar
1GP5	5%	50% Gelucire 50/02 50% Precirol ATO 5	0,5% lecitina de soja	100 bar/60°C	50 bar
1G10	10%	Gelucire 50/02	0,5% lecitina de soja	100 bar/60°C	50 bar
DM5	5%	Dynasan P60F	5% MCT 10 lecitina de soja	110 bar/70°C	30 bar
GP5 b	5%	Gelucire 50/02/ Precirol ATO 5 50/50	0,5% lecitina de soja	70 bar/60°C	30 bar
D5	5%	Dynasan P60F	0,5% lecitina de soja	10 bar/70°C	30 bar

(continuación)

Referencia de lote	Carga	Agente de recubrimiento	Aditivos	Temperatura/Presión de pre-expansión	Presión de pos-expansión
DM10	10%	Dynasan P60F	5% MCT 0,5% lecitina de soja	10 bar/70°C	30 bar

5 - Los resultados analíticos se resumen en la Tabla 6, las microcápsulas lípidas cargadas de hGH producidas utilizando este proceso mostraron una recuperación de proteína alta (> 98 %) y casi no se observó degradación de proteínas inducida por el proceso, dado que el aumento en los productos de degradación asociados (mediante RP-HPLC) sigue siendo menor al 6%.

Tabla 6: Microcápsulas lípidas cargadas de hGH; datos analíticos

Composición	Contenido de hGH teórico (%)	SEC HPLC			RP HPIC * Proteínas relacionadas	Contenido de humedad (%)
		Contenido hGH total w/w (%)	Pureza w/w (%)	HMWS w/w (%)		
Micropartículas de hGH*	38	37,5	99,48	0,52	6,3	7-10
Micropartículas de hGH**	38	32,34	99,44	0,56	6,5	s/d
Micropartículas de hGH***	38	35,21	99,44	0,56	6,66	7,42
1P5	1,75	1,55	99,05	0,95	8,04	0,78
2P5	1,7	1,59	98,89	1,11	8,76	0,79
3P5	1,75	1,22	98,52	1,48	10,69	1,0
4P5	1,75	1,5	99,05	0,95	10,70	1,14
5P5	1,75	1,48	99,15	0,85	11,3	0,97
1G5	1,88	1,63	99,17	0,83	7,35	1,0
2G5	1,75	1,52	98,45	1,55	7,00	0,7
3G5	1,7	1,79	98,83	1,17	8,25	0,93
1 GP5	1,7	1,72	99,04	0,96	8,12	0,62
1G10	3,4	3,26	99,35	0,65	7,43	1,3
DM5	1,7	1,40	99,52	0,48	5,89	1,19
GP5 b	1,7	1,54	99,14	0,86	8,30	1,37

(continuación)

Composición	Contenido de hGH teórico (%)	SEC HPLC			RP HPLC * Proteínas relacionadas	Contenido de humedad (%)
		Contenido hGH total w/w (%)	Pureza w/w (%)	HMWS w/w (%)		
D5	1,7	1,46	99,56	0,54	6,93	1,18
DM10	3,4	2,85	99,14	0,86	5,69	0,6

* referencia para lotes 1 G5, 1GP5, 1G10.
 ** referencia para lotes 1P5, 2P5, 3P5, 4P5.
 *** referencia para lotes 2G5, 3G5, 5P5.

Composición	PSD (µm)			Rendimiento (%)
	d(0,1)	d(0,5)	d(0,9)	
1P5	7,6	38,4	100,0	78
2P5	3,9	34,4	86,8	79
3P5	6,8	39,6	111,1	81
4P5	3,1	19,8	71,6	76
5P5	6,6	31,9	98,7	75
1G5	3,0	77,3	242,0	69
2G5	2,9	31,9	101,8	79
3G5	2,5	14,1	117,4	81
1 GP5	2,8	27,8	161,6	82
1G10	1	4,5	14,6	63
DM5	6,3	62,2	157,8	N.D.
GP5 b	3,6	34,7	100,1	N.D.
D5	5,0	49,7	129,7	N.D.
DM10	5,6	65,7	184,9	N.D.

5 Además, las características de liberación in vitro de estas formulaciones también se cuantificaron. Se presentan los resultados para formulaciones a base de Gelucire® en las figuras 2a & 2b, formulaciones a base de Precirol® en la figura 3, y formulaciones a base de Precirol®/Gelucire® en la figura 4. Los resultados para otra formulación a base de Precirol®/Gelucire® y también formulaciones a base de Dynasan® se presentan en la figura 6.

Las formulaciones a base de Gelucire® exhiben una liberación in vitro baja (aproximadamente 20-30%) y un perfil de liberación controlada. Los perfiles de liberación in vitro de dos lotes diferentes de formulaciones Gelucire® 50/02 (1 G5 y 3G5) son similares, y permiten concluir que el proceso es altamente reproducible. También se encontró una liberación baja con la formulación producida con una carga de 10wt% de micropartículas de hGH.

5 Es notable que para la misma carga de hGH (5%) el estallido in vitro se reduce más en las formulaciones a base de Dynasan® y un estallido tan bajo se combina con un perfil de liberación controlada mejorado.

Para la misma carga de hGH (5%), las formulaciones a base de Precirol® exhibieron un estallido más alto pero una tasa de liberación más baja. Los perfiles de liberación in vitro de dos lotes diferentes de formulaciones de Precirol® (1 P5 y 5P5) permiten concluir que el proceso es sumamente consistente.

10 También se demostró que, partiendo de partículas de hGH micronizadas secadas por pulverización, pueden producirse microcápsulas lípidas sólidas inyectables cargadas con hGH que exhiben una liberación in vitro baja y un perfil de liberación controlada in vitro utilizando el proceso de fluido presurizado. Se mostró que estas formulaciones pueden producirse sin desnaturalización de hGH (nivel bajo de HMWS y aumento de productos de degradación de proteína asociados).

15 Se realizó un estudio para evaluar la estabilidad de almacenamiento de las microcápsulas lípidas inyectables cargadas de hGH, colocadas en viales de vidrio de 3 mL bajo nitrógeno, a 2-8 °C y 25 °C. Las muestras se analizaron mediante SEC para la determinación del contenido de proteína y el nivel de agregado de la proteína y se realizó un análisis RP-HPLC para determinar las formas oxidadas y deamidadas. Para el análisis, se extrajo la hGH de las micropartículas lípidas utilizando diclorometano. El disolvente disuelve el lípido en las micropartículas y precipita la proteína. El precipitado de proteína se lava con el disolvente, se seca y después se reconstituye con una fase acuosa antes del análisis HPLC. Los análisis por cromatografía se realizaron como se describe con anterioridad. Las muestras también se analizaron para determinar el contenido de humedad mediante determinación coulométrica. Las muestras se extrajeron y analizaron al comienzo, después de 2 semanas, 1 mes y 2 meses. Los resultados en las Tablas 8 y 9 muestran que la hGH en micropartículas lípidas obtenidas mediante el proceso fue estable a 2-8°C y 25°C al menos durante 2 meses.

Los expertos en el arte reconocerán, o podrán determinar utilizando experimentación de rutina, muchos equivalentes de las realizaciones específicas de la invención descritas específicamente en la presente invención. Tales equivalentes están abarcados por el alcance de las siguientes realizaciones.

Tabla 8: Estabilidad de las microcápsulas lípidas cargadas de hGH a 2-8 °C

MUESTRA	Contenido de hGH teórico w/w (%)	SEC HPLC			RP HPLC Proteínas relacionadas	Contenido de humedad (%)
		Contenido hGH total w/w (%)	Pureza w/w (%)	HMWS w/w (%)		
T cero						
3G5	1,7	1,5	99,1	0,9	10,15	1,3
2P5	1,7	1,6	98,9	1,1	8,5	1,0
1GP5	1,7	1,7	99,1	0,9	9,5	0,8
1G10	3,4	3,2	99,0	1,0	8,0	1,1
2 semanas 2-8 °C						
3G5	1,7	1,4	98,9	1,1	11,6	1,0
2P5	1,7	1,5	98,6	1,4	9,5	1,3
1GP5	1,7	1,6	98,8	1,3	9,5	1,2

30

(continuación)

MUESTRA	Contenido de hGH teórico w/w (%)	SEC HPLC			RP HPLC Proteínas relacionadas	Contenido de humedad (%)
		Contenido hGH total w/w (%)	Pureza w/w (%)	HMWS w/w (%)		
2 semanas 2-8 °C						
1G10	3,4	3,1	98,8	1,2	8,0	2,8
1 mes 2-8 °C						
3G5	1,7	1,5	99,0	1,0	9,9	0,8
2P5	1,7	1,8	98,8	1,2	9,2	1,0
1GP5	1,7	1,7	99,0	1,0	9,7	0,9
1G10	3,4	3,2	99,0	1,0	7,7	1,2
2 meses 2-8 °C						
3G5	1,7	1,6	99,0	1,0	9,5	0,8
2P5	1,7	1,8	98,8	1,2	9,0	0,9
1GP5	1,7	1,8	98,9	1,1	9,0	0,9
1G10	3,4	3,3	98,9	1,1	7,4	1,9

Tabla 9: Estabilidad de las microcápsulas lípidas cargadas de hGH a 25 °C

MUESTRA	Contenido de hGH teórico w/w (%)	SEC HPLC			RP HPLC Proteínas relacionadas	Contenido de humedad (%)
		Contenido hGH total w/w (%)	Pureza w/w (%)	HMWS w/w (%)		
T cero						
3G5	1,7	1,4	99,0	1,0	nt	1,3
2P5	1,7	1,8	98,8	1,2	9,8	0,9
1GP5	1,7	1,6	98,9	1,1	10,7	0,8
1G10	3,4	3,2	99,0	1,0	7,7	1,1
2 semanas 25 °C						
3G5	1,7	1,4	98,9	1,1	11,7	1,1

(continuación)

MUESTRA	Contenido de hGH teórico w/w (%)	SEC HPLC			RP HPLC Proteínas relacionadas	Contenido de humedad (%)
		Contenido hGH total w/w (%)	Pureza w/w (%)	HMWS w/w (%)		
2 semanas 25 °C						
2P5	1,7	1,6	98,6	1,4	8,8	1,5
1GP5	1,7	1,5	98,8	1,2	11,0	1,2
1G10	3,4	3,1	98,8	1,3	9,2	1,8
1 mes 25 °C						
3G5	1,7	1,5	98,9	1,2	12,3	0,9
2P5	1,7	1,5	98,9	1,1	10,1	1,0
1GP5	1,7	1,7	98,5	1,5	10,5	0,9
1G10	3,4	3,3	98,8	1,2	8,7	1,3
2 meses 25 °C						
3G5	1,7	1,5	98,8	1,2	12,7	0,7
2P5	1,7	1,8	98,5	1,5	10,7	0,9
1GP5	1,7	1,7	98,7	1,3	12,2	1,0
1G10	3,4	3,4	98,7	1,3	9,3	1,3

Listado de secuencias

<110> Merck Patent GmbH

5 <120> Microcápsulas lípidas sólidas que contienen micropartículas con un núcleo interno de GH

<130> P07/137-Ig/bs

<140> PCT/EP2008/009849

<141> 2008-11-21

<160> 1

10 <170> Versión de patente int. 3.5

<210> 1

<211> 191

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> hormona del crecimiento humana

5 <400> 1

```

Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg
1           5           10           15

Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu
20           25           30

Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro
35           40           45

Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg
50           55           60

Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu
65           70           75           80

Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val
85           90           95

Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp
100          105          110

Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu
115          120          125

Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser
130          135          140

```

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Microcápsulas que comprenden (1) al menos un núcleo sólido interno que contiene al menos una hormona del crecimiento, un agente de carga, que es un alcohol de azúcar, un azúcar y/o un amino azúcar, un tensioactivo, que es un polisorbato o un copolímero de bloque polioxietileno-polioxipropileno, y (2) una cubierta externa que comprende al menos un lípido.
- 2.** Microcápsulas conforme a la reivindicación 1, en donde la hormona del crecimiento es una hormona del crecimiento humana (hGH) o un derivado, fragmento, variante, análogo funcional, o una sal de ésta que retiene la actividad biológica de la hormona del crecimiento humana.
- 3.** Microcápsulas conforme a la reivindicación 2, en donde el azúcar es un mono-, di- o trisacárido.
- 10 **4.** Microcápsulas conforme a la reivindicación 3, en donde el azúcar es sucrosa, lactosa, maltosa o trehalosa, preferentemente sucrosa.
- 5.** Microcápsulas conforme a la reivindicación 2, en donde el amino azúcar es glucosamina, N-metilglucosamina, galactosamina o ácido neuramínico.
- 15 **6.** Microcápsulas conforme a la reivindicación 2, en donde el alcohol de azúcar es manitol, sorbitol, dulcitol, xilitol o ribitol, preferentemente manitol.
- 7.** Microcápsulas conforme a una o más de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el tensioactivo es éster de ácidos grasos de sorbitán polioxietileno, monooleato de sorbitán polioxietileno (20) o monolaurato de sorbitán polioxietileno (20).
- 20 **8.** Microcápsulas conforme a una o más de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el lípido tiene un punto de fusión de al menos aproximadamente 40°C, preferentemente en el rango de 45°C a 80°C y más preferentemente en el rango de 48°C a 75°C.
- 9.** Microcápsulas conforme a una o más de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el lípido es un alcohol graso, un éster de ácidos grasos, un éster de polioliol o un éster de al menos un ácido graso y al menos un polioliol.
- 25 **10.** Microcápsulas conforme a una o más de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el lípido es un glicérido poliglicolizado y/o un éster de glicerol y ácidos grasos.
- 11.** Microcápsulas conforme a una o más de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el lípido es glicéridos poliglicolizados saturados que tienen un punto de fusión de 50°C y un valor HLB igual a 2, un gliceril (palmitoestearato) o una mezcla de éstos.
- 30 **12.** Microcápsulas conforme a una o más de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la fase que constituye la cubierta externa contiene un agente de dispersión para el núcleo interno.
- 13.** Microcápsulas conforme a la reivindicación 12, en donde el agente dispersante es un fosfolípido o derivado de éste, preferentemente lecitina de soja.
- 14.** Microcápsulas conforme a una o más de las reivindicaciones 1 a 13, en donde la cubierta externa también contiene un plastificante.
- 35 **15.** Microcápsulas conforme a la reivindicación 14, en donde el plastificante es un triglicérido de cadena media de un Poloxamer.
- 16.** Formulación farmacéutica que comprende microcápsulas conforme a una o más de las reivindicaciones 1 a 15 en suspensión en un medio de dispersión.
- 40 **17.** Forma de presentación de la formulación conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 herméticamente cerrada en una condición de esterilización dentro de un envase adecuado para el almacenamiento antes de su utilización.
- 18.** Kit que comprende un envase que contiene las microcápsulas conforme a una o más de las reivindicaciones 1 a 15 que comprenden (1) un núcleo interno que contiene una hormona del crecimiento, un agente de carga, que es un alcohol de azúcar, un azúcar, y/o un amino azúcar, un agente tensioactivo, que es un polisorbato o un copolímero de

bloque polioxi-etileno-polioxi-propileno, y (2) una cubierta externa que comprende al menos un lípido y un envase con un medio de dispersión.

5 **19.** Proceso para preparar una formulación conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde el núcleo interno se prepara utilizando la técnica de secado por pulverización y la cubierta externa se prepara utilizando un proceso basado en un fluido presurizado.

20. Proceso para preparar microcápsulas conforme a la reivindicación 19, que comprende los pasos de:

(a) preparar una solución/dispersión acuosa que comprende al menos una hormona del crecimiento, un agente de carga, que es un alcohol de azúcar, un azúcar, y/o un amino azúcar, y un tensioactivo, que es un polisorbato o un copolímero de bloque polioxi-etileno-polioxi-propileno;

10 (b) secar por pulverización la solución/dispersión acuosa preparada en el paso (a) para producir micropartículas que contienen proteína;

(c) recoger las micropartículas obtenidas en el paso (b);

15 (d) preparar una dispersión homogénea que comprende las micropartículas obtenidas en el paso (c) y la fase que constituye la cubierta externa en un fluido presurizado, bajo condiciones de presión y temperatura donde el fluido presurizado se disuelve en la fase lípida;

(e) despresurizar la dispersión preparada en el paso (d) a través de una boquilla y recolectar las microcápsulas obtenidas en el paso (e).

20 **21.** Proceso para preparar microcápsulas conforme a cualquiera de las reivindicaciones 19 a 20 en donde el núcleo interno se prepara utilizando la técnica de secado por pulverización y la cubierta externa se prepara utilizando un fluido presurizado cuya presión durante el paso de disolución y dispersión se encuentra comprendida entre $0,4 P_c$ y $3 P_c$, preferentemente entre $0,5 P_c$ y $2 P_c$, más preferentemente entre $0,75 P_c$ y $1,5 P_c$, siendo P_c la presión crítica del fluido.

22. Proceso para preparar microcápsulas conforme a cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21 en donde el fluido presurizado es dióxido de carbono.

25 **23.** Proceso conforme a la reivindicación 22 en donde el dióxido de carbono dilata el lípido para formar una fusión saturada durante el paso de disolución y dispersión (d).

24. Proceso conforme a cualquiera de las reivindicaciones 22 y 23 en donde la temperatura durante el paso de disolución y dispersión (d) se encuentra en el rango de 30°C a 70°C , preferentemente entre 35°C y 65°C , y más preferentemente es de aproximadamente 60°C .

30 **25.** Proceso conforme a cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24 en donde la presión durante el paso de disolución y dispersión (d) se encuentra en el rango de 6,0 MPa a 11,0 MPa, preferentemente cerca de aproximadamente 6 MPa o aproximadamente 10 MPa, y la presión pos-expansión se encuentra en el rango de 1,0 MPa a 5,5 MPa, preferentemente en el rango de 1,5 MPa a 3,5 MPa, y más preferentemente en el rango de 3,0 MPa a 5,0 MPa.

35

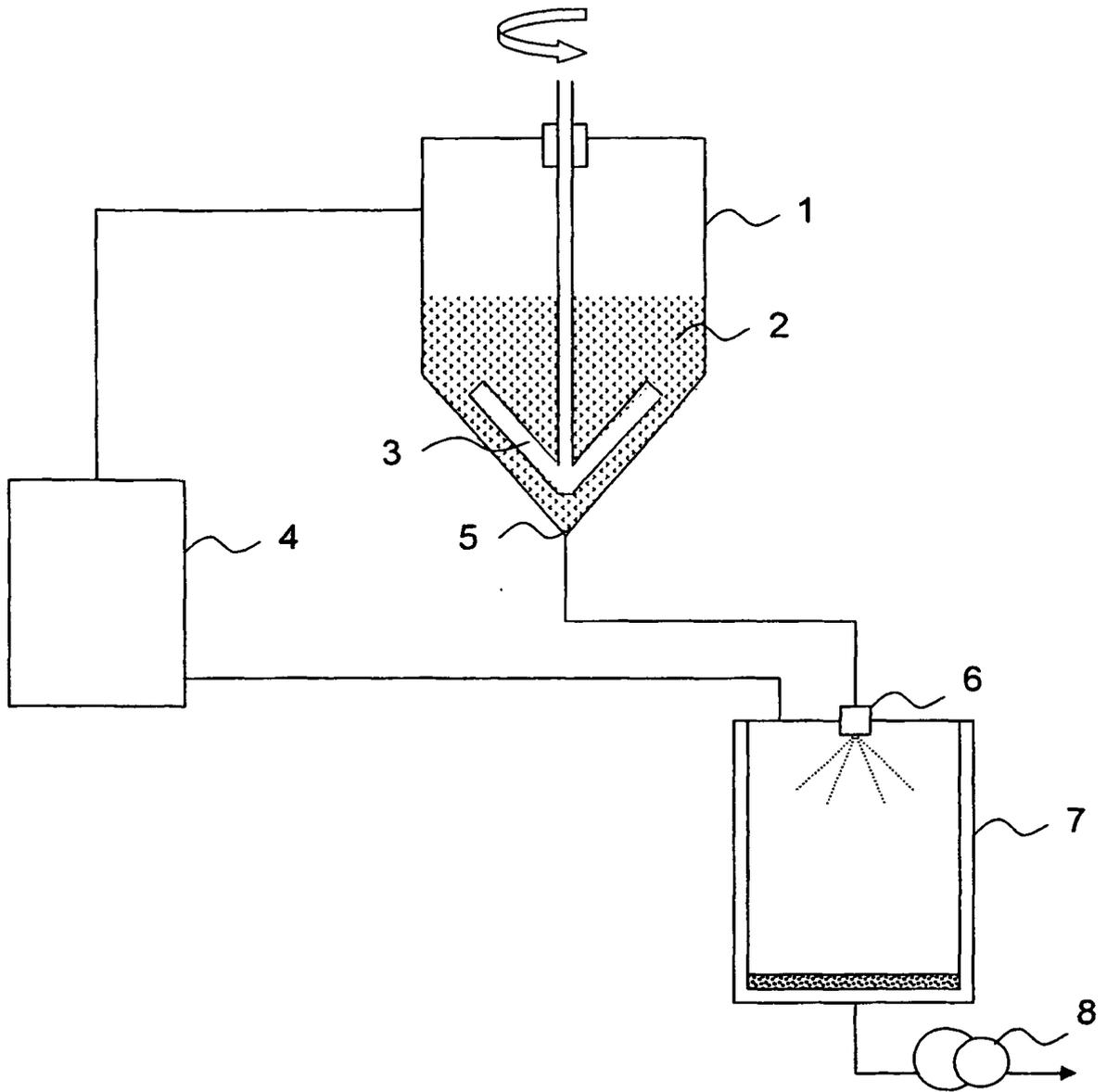


Figura 1

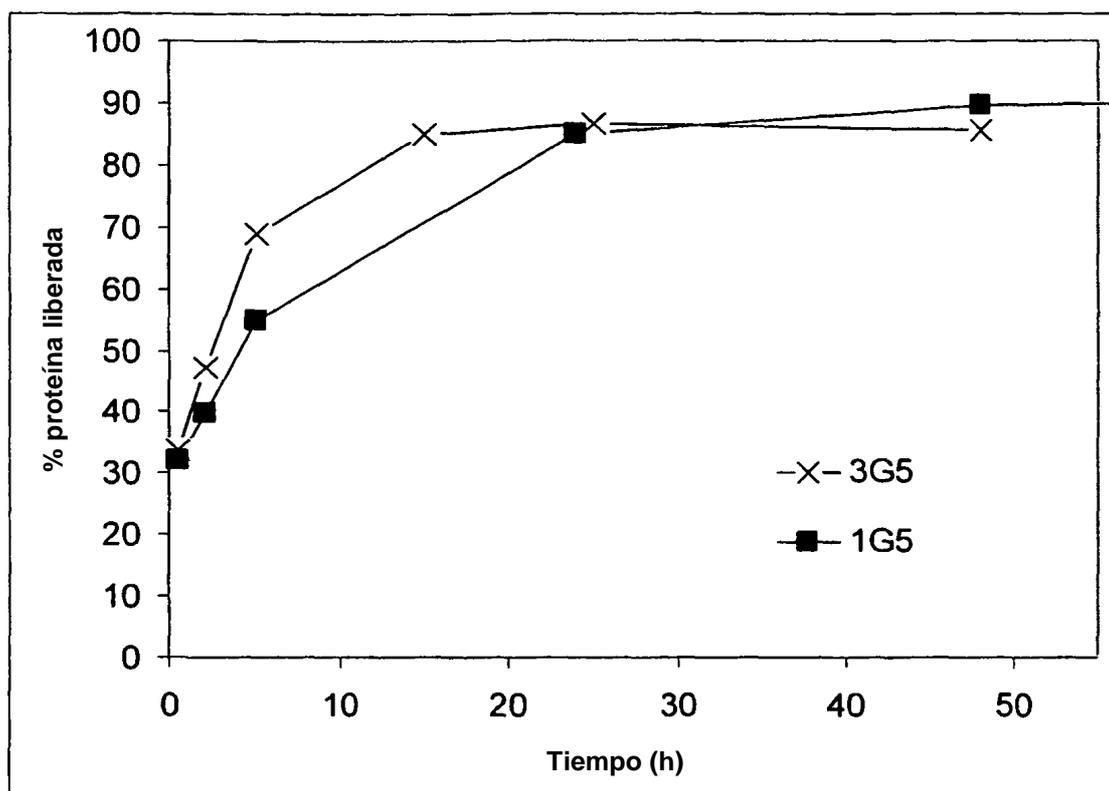


Figura 2a: Perfiles de liberación in vitro para 2 formulaciones de microcápsulas a base de Gelucire® (1G5, 3G5), que contienen 5% de micropartículas con núcleo de hGH. El % de proteína liberada se calcula en base a la carga de hGH de las micropartículas determinada de manera experimental.

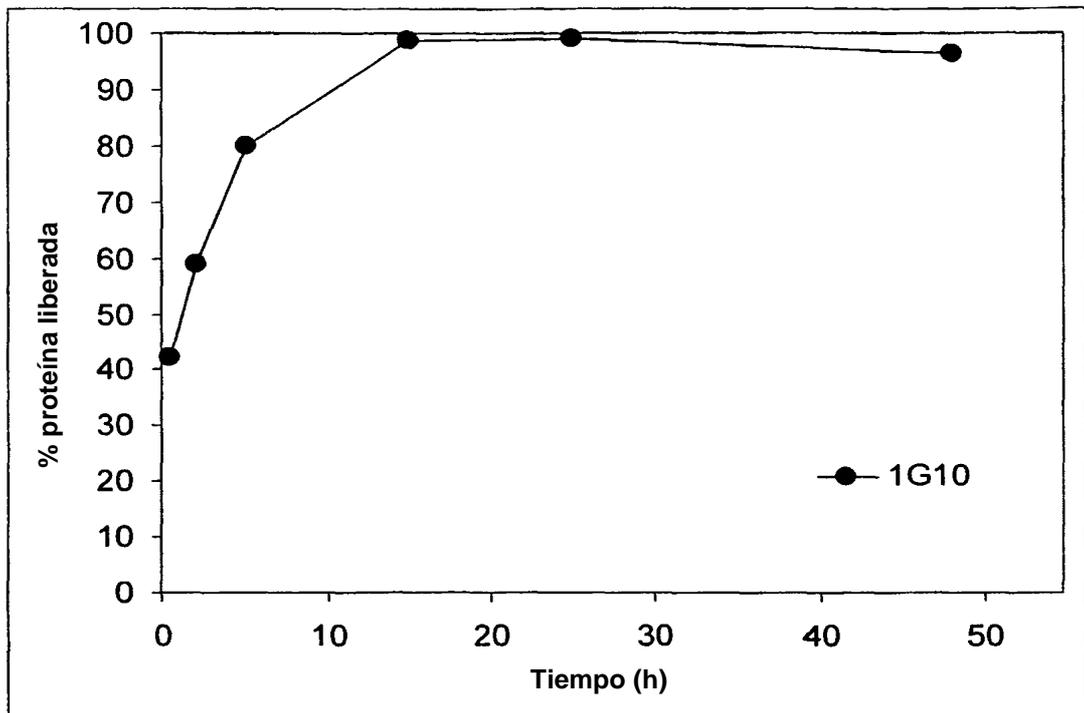


Figura 2b: Perfiles de liberación in vitro para una formulación de microcápsulas a base de Gelucire® con 10% de carga de micropartículas de hGH. El perfil de liberación se muestra calculado con respecto a la carga de hGH determinada de manera experimental.

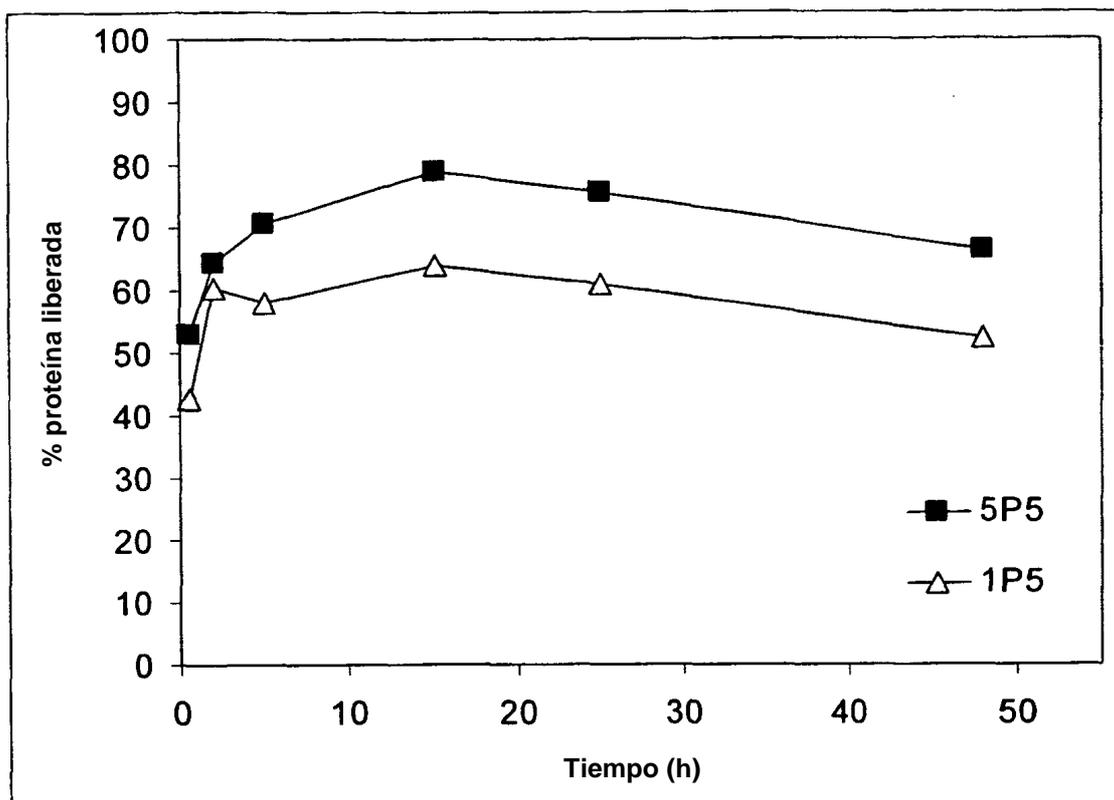


Figura 3: Perfiles de liberación in vitro para 2 formulaciones de microcápsulas a base de Precirol® (1P5, 5P5). El % de proteína liberada se calcula en base a la carga de hGH de las micropartículas determinada de manera experimental.

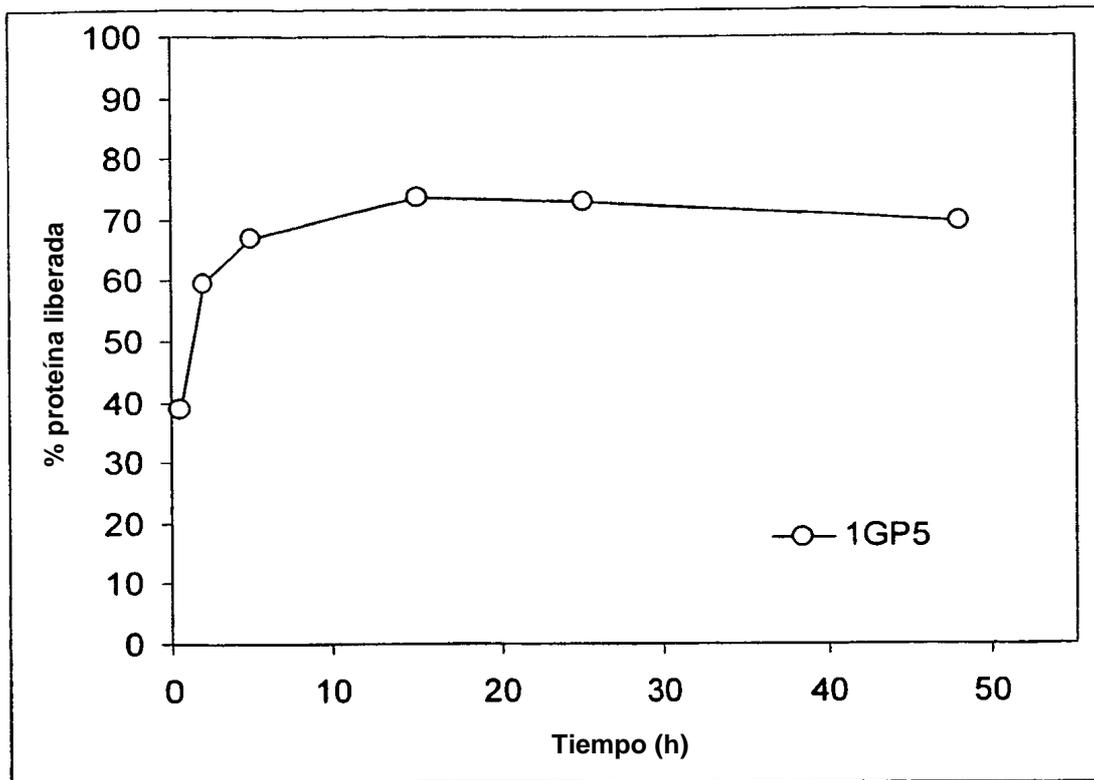


Figura 4: Perfiles de liberación in vitro para una formulación a base de Precirol®/Gelucire® (1GP5). El % de proteína liberada se calcula en base a la carga de hGH de las micropartículas determinada de manera experimental.

FPTIPLSRLF DNAMLRHRL HQLAFDITYQE FEEAYIPKEQ KYSFLQNPQT SLCFSESIPT
60
PSNREETQQK SNLELLRISL LLIQSWLEPV QFLRSVFANS LVYGASDSNV YDLLKDLEEG
120
IQTLMGRLED GSPRTGQIFK QTYSKFDTNS HNDDALLKNY GLLYCFRKDM DKVETFLRIV
180
QCRSVEGSCG F

Figura 5: Secuencia de aminoácidos de la hormona del crecimiento humana

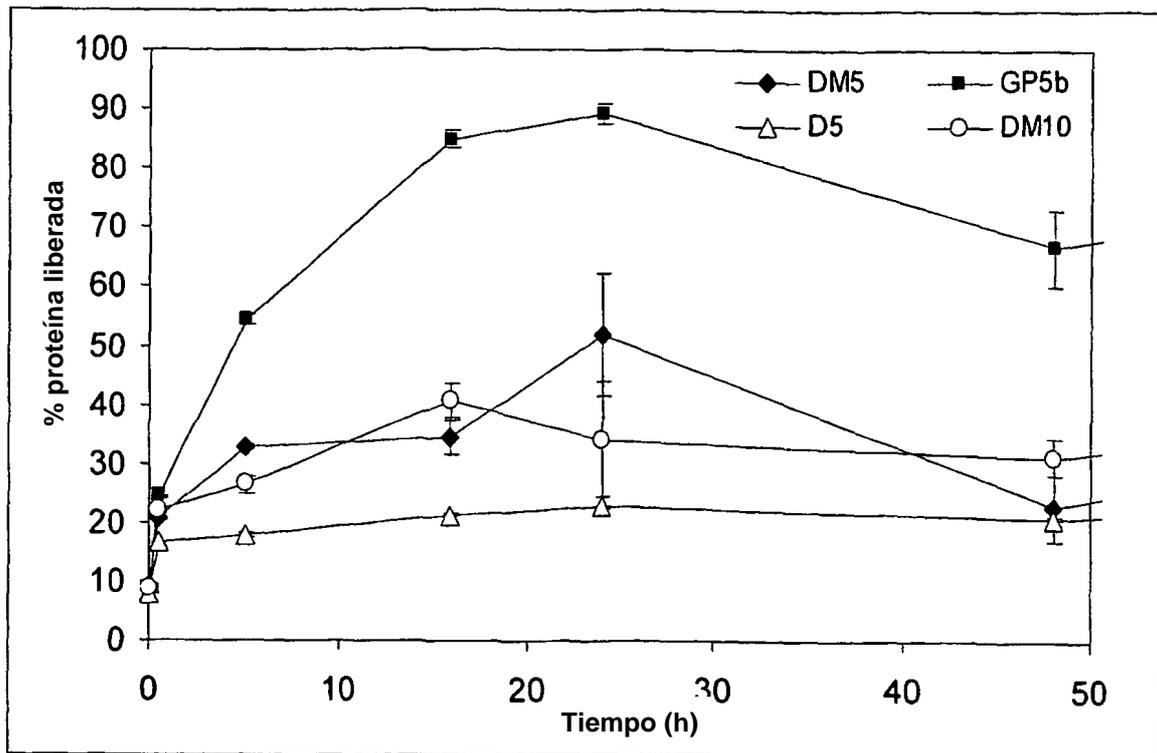


Figura 6: Perfiles de liberación in vitro para formulaciones de microcápsulas (DM5, GP5b, D5, DM10). El % de proteína liberada se calcula en base a la carga de hGH de las micropartículas determinada de manera experimental.