

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 379 357**

51 Int. Cl.:  
**A61K 38/21** (2006.01)  
**A61K 9/10** (2006.01)

12

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04805850 .7**  
96 Fecha de presentación: **19.11.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1684792**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.08.2006**

54 Título: **Formulaciones farmacéuticas para la liberación prolongada de interleucinas y sus aplicaciones terapéuticas**

30 Prioridad:  
**21.11.2003 FR 0350888**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**25.04.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**25.04.2012**

73 Titular/es:  
**FLAMEL TECHNOLOGIES  
33, AVENUE DU DOCTEUR GEORGES LÉVY  
69200 VÉNISSIEUX, FR**

72 Inventor/es:  
**BIGNON, Sophie;  
MEYRUEIX, Rémi y  
SOULA, Olivier**

74 Agente/Representante:  
**Durán Moya, Carlos**

**ES 2 379 357 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Formulaciones farmacéuticas para la liberación prolongada de interleucinas y sus aplicaciones terapéuticas

5 La presente invención se refiere a nuevas formulaciones farmacéuticas a base de suspensiones coloidales acuosas estables y fluidas para la liberación prolongada de principios activos proteínicos, a saber, las interleucinas, así como a las aplicaciones terapéuticas, de estas formulaciones. Estas formulaciones farmacéuticas activas se refieren tanto a la terapéutica humana como veterinaria.

10 Las interleucinas son un grupo de proteínas que entran en la familia de las citocinas. Presentan numerosas actividades que regulan la respuesta inflamatoria y la respuesta inmunológica. No obstante, su papel principal es la activación e inducción de la proliferación de los linfocitos T. Entre los miembros importantes de esta familia, se pueden citar: IL-1, IL-2, IL-11 e IL-12. Por ejemplo, IL-2 es producido por los linfocitos T activados por un antígeno. Este IL-2 se destina a estimular los otros linfocitos T para permitir su activación y su diferenciación y modular de esta  
15 manera la respuesta inmunitaria con mediación celular.

Las interleucinas son utilizadas en terapéutica, pero su toxicidad bien conocida sigue siendo frecuentemente la causa principal de interrupción de los tratamientos. Por ejemplo, en el caso de IL-2, los eventos principales observados en el curso de la utilización clínica del IL-2 son fiebre, náuseas, diarreas, reacciones cutáneas, dolores articulares y apatía. En ciertos casos, ello requiere hospitalización y reanimación, y se debe observar que en algunos casos raros la inyección de IL-2 ha sido puesta en duda en cuanto a mortalidad de pacientes.  
20

Además de la toxicidad de las IL, otro factor a tener en cuenta para la liberación prolongada de estas proteínas terapéuticas que son las interleucinas, es la necesidad en muchos casos, de reproducir lo mejor posible en el paciente una concentración plasmática en proteína o en péptido próxima al valor observado en el sujeto sano.  
25

Este objetivo encuentra la dificultad de la reducida duración de vida de las IL en el plasma, lo que obliga de manera muy estricta a inyectarlas de manera repetida. La concentración plasmática en proteína terapéutica presenta entonces un perfil "en diente de sierra" caracterizado por picos de concentración elevada y mínimos de concentración muy baja. Los picos de concentración, muy superiores a la concentración basal en el sujeto sano, tienen efectos nocivos muy marcados debido a la toxicidad elevada de las proteínas terapéuticas tales como las interleucinas y más particularmente la interleucina IL2. Por otra parte, los mínimos de concentración son inferiores a la concentración necesaria para tener un efecto terapéutico, lo que conlleva una mala cobertura terapéutica del paciente y efectos secundarios graves a largo plazo.  
30

Asimismo, para reproducir en el paciente una concentración plasmática de interleucina próxima al valor ideal para el tratamiento, es importante que la formulación farmacéutica considerada permita liberar la proteína terapéutica con una duración prolongada, para limitar las variaciones de concentración plasmática a lo largo del tiempo.  
35

40 Por otro lado, esta formulación activa debe preferentemente satisfacer a las características deseadas siguientes, ya conocido por los expertos en la técnica:

- 1 – liberación prolongada de una o varias interleucinas activas y no desnaturalizadas (no modificadas), de manera que la concentración plasmática es mantenida a nivel terapéutico;
- 45 2 – forma líquida suficientemente fluida para ser fácilmente inyectable y esterilizable mediante filtración sobre filtros cuyo tamaño de poros es inferior o igual a 0,2 micrones;
- 3 – forma líquida estable;
- 4 – biocompatibilidad y biodegradabilidad;
- 5 – ninguna toxicidad;
- 50 6 – ninguna inmunogenicidad;
- 7 – excelente tolerancia local.

Para intentar alcanzar estos objetivos, ya se han propuesto varios enfoques en la técnica anterior.

55 En el primer enfoque, la proteína terapéutica nativa es modificada mediante injerto covalente de una o más cadenas de polímero o también mediante injerto covalente de una proteína tal como la albúmina sérica humana (HSA). La proteína así modificada tiene una menor afinidad para sus receptores y su término medio de vida en la circulación general aumenta considerablemente. La amplitud de la variación de concentración entre los picos y los huecos de concentración plasmática en proteína está así considerablemente reducida. Así, por ejemplo, la sociedad Cetus ha propuesto, en su Patente US-B-4 766 106, inyectar una cadena de polioxietileno en la interleucina 2, con la finalidad de aumentar su solubilidad y duración de vida plasmática. De manera similar, la sociedad Human Genome Science propone (US-B-5 876 969) inyectar de manera covalente interleucinas a la albúmina de suero humano con la finalidad de aumentar su duración de vida plasmática. Esta modificación química se traduce por un aumento del término medio de vida en el paciente de 6,8 a 33 horas. Esta conducta de modificación química de la proteína terapéutica presenta, de manera general, dos inconvenientes mayores. En primer lugar, la modificación irreversible de la proteína que, no siendo ya una proteína humana, puede conducir a largo plazo a problemas de toxicidad y de  
65

inmunogenicidad. El segundo inconveniente proviene de la pérdida parcial de bioactividad de la interleucina IL 2 modificada de este modo.

5 En un segundo enfoque, se ha propuesto aumentar la duración de acción gracias a formulaciones que comprenden al menos un polímero y un principio activo, líquidos a temperatura y atmósfera ambiente, inyectables y que se vuelven más viscosos después de la inyección, por ejemplo, bajo el efecto de un cambio de pH y/o de temperatura.

De esta manera, en este aspecto, la patente US-B-6 143 314 divulga una solución orgánica de polímero de liberación controlada de PA, que forma un implante sólido después de la inyección. Esta solución comprende:

- 10
- o (A) 10 a 80% en peso de un polímero termoplástico de base, biocompatible, biodegradable e insoluble en agua o en los fluidos fisiológicos (por ejemplo poliláctico y/o poliglicólico);
  - o (B) un disolvente orgánico, tal como la N-metilpirrolidona que se dispersa en los fluidos fisiológicos;
  - 15 o (C) un principio activo (PA);
  - o (D) y finalmente 1 a 50% en peso de un agente de liberación controlado constituido por un copolímero bloque de tipo poli-láctico-glicólico/poli-butilenglicol.

Después de la inyección, (B) se dispersa o se disipa en los fluidos fisiológicos. (A) forma un implante encapsulante (C) que no está relacionado de manera covalente con (A) ni con (D), y que se libera entonces lentamente *in vivo*.

20 El principal inconveniente de esta técnica es usar un disolvente orgánico (B), potencialmente desnaturalizante para el PA (C) (por ejemplo proteínas terapéuticas) y tóxico para el paciente. Además, la hidrólisis *in vivo* del polímero (A) genera un ácido que puede conducir a problemas de tolerancia local.

25 Las solicitudes PCT WO-A-99/18142 y WO-A-00/18821 se refieren a disoluciones acuosas de polímeros que contienen un PA en forma disuelta o coloidal, que son administrables a animales de sangre caliente, particularmente mediante inyección y que forman un depósito de PA (por ejemplo insulina) gelificado *in vivo*, debido a que la temperatura fisiológica es superior a su temperatura de gelificación. El gel así formado libera el PA de manera prolongada. Estos polímeros biodegradables particulares son unos tribloques ABA o BAB con

30 A = poliláctico-coglicólico (PLAGA) o poliláctico (PLA) y B = polietilenglicol. Las temperaturas de transformación líquida  $\Rightarrow$  gel de estos polímeros tribloques son, por ejemplo, de 36, 34, 30 y 26°C. Al igual que los polímeros (A) según el documento US-B-6 143 314, la hidrólisis de estos polímeros tribloques ABA o BAB *in vivo* conduce a ácidos que pueden no ser correctamente tolerados localmente.

35 La solicitud PCT WO-A-98/11874 describe formulaciones farmacéuticas que comprenden un principio activo lipófilo, un polímero gelificante (Gelrite® = goma gellan desacetilada o etilhidroxixelulosa) y un tensoactivo. La interacción polímero/tensoactivo y eventualmente, tratándose del polímero Gelrite®, la única presencia de electrolitos tales como iones  $Ca^{++}$  en concentración fisiológica conduce a la formación de un gel constituido por un agregado de polímero/tensoactivo, al que se enlaza de manera no covalente el principio activo lipófilo. Esta formulación está

40 destinada a una administración local en un órgano diana (el ojo, por ejemplo). La asociación de agregado/principio activo que se forma *in situ* permite la lenta liberación del principio activo en el órgano diana.

Un tercer enfoque realizado para intentar prolongar la duración de acción de una proteína conservando al mismo tiempo su bioactividad, fue usar una proteína terapéutica no desnaturalizada e incorporarla en microesferas o

45 implantes a base de polímeros biocompatibles. Este enfoque está en particular ilustrado por la patente US-B-6 500 448 y la solicitud US-A-2003/0133980 que describen una composición de liberación prolongada de una hormona humana de crecimiento (hGH) en la que la proteína hormonal, previamente estabilizada mediante complejación con un metal, está después dispersada en una matriz de polímero biocompatible. El polímero biocompatible es, por ejemplo, un poli(láctico), un poli(glicólico) o un copolímero poli(láctico-co-glicólico). La composición se presenta por

50 ejemplo en forma de una suspensión de microesferas en una solución de carboximetilcelulosa de sodio. Este enfoque presenta varios inconvenientes: en primer lugar, durante el procedimiento de fabricación de las microesferas, la proteína se pone en contacto con disolventes orgánicos potencialmente desnaturalizantes. Además, las microesferas son de un tamaño elevado (1 a 1000 micrones), lo que constituye una restricción en términos de inyección y de esterilización fácil sobre filtros. Finalmente, pueden aparecer problemas de tolerancia local durante la hidrólisis *in situ* del polímero.

55

Según un cuarto enfoque, se han desarrollado formas de liberación prolongada de proteína terapéutica (especialmente de interleucinas) constituidas por suspensiones, líquidas de nanopartículas cargadas de proteínas. Estas últimas han permitido la administración de la proteína natural en una formulación líquida de reducida

60 viscosidad.

Según una primera vía de liberación prolongada, la suspensión de nanopartículas de liberación prolongada está constituida por unas suspensiones de liposomas en las que está encapsulada la proteína terapéutica nativa no modificada. Después de la inyección, la proteína está liberada progresivamente de los liposomas, lo que prolonga el

65 tiempo de presencia de la proteína en la circulación general. De esta manera, por ejemplo, Frossen y otros, describen en el artículo Cancer Res 43 p. 546, 1983, la encapsulación de agentes anti-neoplásicos en liposomas a

fin de aumentar su eficacia terapéutica. La liberación de los agentes es, sin embargo, demasiado rápida para obtener una liberación real prolongada. La compañía Liposome Company Inc., en su patente US-B-5 399 331, propone mejorar el tiempo de liberación *in vitro* de la interleucina 2 injertándola de manera covalente en el liposoma. Se vuelve a caer entonces en los defectos del primer enfoque "proteína modificada" mencionados anteriormente.

Con el fin de paliar la falta de estabilidad de los liposomas, guardando al mismo tiempo las ventajas de una formulación de nanopartículas líquida y de baja viscosidad, la compañía Flarnel Technologies ha propuesto una segunda vía de liberación prolongada, en la que la proteína terapéutica está asociada a nanopartículas de un poliaminoácido hidrosoluble "modificado hidrófobo", es decir, modificado mediante injerto de grupos hidrófobos. Este polímero se elige, en particular, entre los poliaminoácidos (poliglutamatos o poliaspartatos) portadores de injertos hidrófobos.

Uno de los intereses notables de estos polímeros modificados hidrófobos es el de autoensamblarse espontáneamente en el agua para formar nanopartículas.

Otro interés de estos sistemas es que las proteínas o los péptidos terapéuticos se asocian espontáneamente con las nanopartículas de polímeros modificados hidrófobos, esta asociación es no covalente y se efectúa sin la necesidad de recurrir a un tensoactivo ni a un procedimiento de transformación potencialmente desnaturante. No se trata de una encapsulación de la proteína en una microesfera, tal como se divulga en la patente US-B-6 500 448 y en la solicitud US-A-2003/0133980. De manera totalmente diferente, estas nanopartículas de copoliaminoácidos modificados hidrófobos adsorben espontáneamente las proteínas en solución, sin modificarlas químicamente ni desnaturarlas y sin hacerles sufrir etapas de tratamiento agresivos de tipo "puesta en emulsión" y "evaporación de disolvente". Las formulaciones se pueden almacenar en forma líquida o liofilizada.

Después de la inyección, por ejemplo por vía subcutánea, estas suspensiones de nanopartículas cargadas en proteínas liberan progresivamente la proteína no desnaturada y bioactiva *in vivo*. Tales asociaciones no covalentes de principio activo (PA) proteínico/poli[Glu] o poli[Asp] están divulgadas en la solicitud de patente WO-A-00/30618.

Esta solicitud describe en particular suspensiones coloidales de pH 7,4, que comprenden asociaciones de insulina humana con nanopartículas de poliglutamato "modificado hidrófobo". La tabla a continuación muestra unos poliaminoácidos "modificados hidrófobos" usados y unos índices de asociación obtenidos en los ejemplos del documento WO-A-00/30618.

EJEMPLO	POLÍMERO	Índice de asociación (%)
1	poli[(Glu-O-Na) <sub>0,63</sub> bloque-(Glu-O-metilo) <sub>0,37</sub> ]	55
2	poli[(Glu-O-Na) <sub>0,66</sub> -bloque-(Glu-O-etilo) <sub>0,34</sub> ]	26
3	poli[(Glu-O-Na) <sub>0,65</sub> -bloque-(Glu-O-hexadecilo) <sub>0,35</sub> ]	36
4	poli[(Glu-O-Na) <sub>0,88</sub> -bloque-(Glu-O-dodecilo) <sub>0,12</sub> ]	> 90

Estas suspensiones coloidales titulan 1,4 mg/ml de insulina y 10 mg/ml de poliaminoácido "modificado hidrófobo".

Destaca de la figura 1 del documento WO-A-00/30618 que la duración de la liberación *in vivo* de la insulina vectorizada por las suspensiones en cuestión anteriores, es de 12 h. Esta duración de liberación ganaría al ser aumentada.

De esta manera, incluso si esta solicitud PCT representa ya un progreso considerable, su contenido técnico se puede todavía optimizar frente a las características deseadas enunciado anteriormente, y sobre todo frente a la prolongación de la duración de la liberación *in vivo* de las interleucinas.

Las solicitudes de patente francesas no publicadas n<sup>os</sup> 02 07008 del 07/06/2002, 02 09670 del 30/07/2002, 03 50190 del 28/05/2003 y 01 50641 del 03/10/2003, se refieren a nuevos poliaminoácidos anfifílicos, hidrosolubles, y que comprenden unidades ácido aspártico y/o unidades ácido glutámico, en las que al menos una parte de estas unidades son portadoras de injertos hidrófobos. Al igual que los poliaminoácidos modificados hidrófobos divulgados en la solicitud WO-A-00/30618, estas nuevas materias primas de polímeros forman espontáneamente, en un medio líquido acuoso, unas suspensiones coloidales de nanopartículas que se pueden usar para la liberación prolongada de PA (insulina). Estas son biocompatibles, biodegradables y las proteínas, en particular las proteínas terapéuticas, se adsorben espontáneamente sobre estas nanopartículas sin sufrir ninguna modificación química o de desnaturación.

Estas solicitudes tienen asimismo como objetivo nuevas composiciones farmacéuticas, cosméticas, dietéticas o fitosanitarias a base de estos poliaminoácidos.

Los poliaminoácidos "modificados hidrófobos" anfifílicos según la solicitud de patente francesa n<sup>o</sup> 02 07008

comprenden unidades de ácido aspártico y/o unidades de ácido glutámico, portadoras de injertos hidrófobos que comprenden al menos un motivo alfa-tocoferol, por ejemplo: (poli-glutamato o poliaspartato injertado por el alfa tocoferol de origen sintético o natural).

5 Esta solicitud, no publicada, divulga específicamente una suspensión coloidal que contiene nanopartículas formadas por asociaciones de polímero/proteína activa y que se obtiene mezclando 1 mg de un poli-glutamato injertado por el alfa-tocoferol y 7 mg de insulina en 1 ml de agua, a pH 7,0.

10 Los poliaminoácidos "modificados hidrófobos" anfífilos según la solicitud de patente francesa nº 02 09670 comprenden unidades de ácido aspártico y/o unidades de ácido glutámico, portadoras de injertos hidrófobos que comprenden al menos un motivo hidrófobo enlazados a las unidades de ácido aspártico y/o ácido glutámico por medio de una rótula que contiene dos funciones amida, y más precisamente por medio de un "separador" de tipo lisina u ornitina.

15 Esta solicitud no publicada divulga específicamente una suspensión coloidal que contiene nanopartículas formadas por asociaciones de polímero/proteína activa y que se obtiene mezclando 10 mg de un poli-glutamato injertado con ácido palmítico por medio de un "separador" de lisina y 200 UI de insulina (7,4 mg) en 1 ml de agua, a pH 7,4.

20 Los poliaminoácidos "modificados hidrófobos" anfífilos según la solicitud de patente francesa nº 03 50190 comprenden unidades de ácido aspártico y/o unidades de ácido glutámico, de las cuales algunas son portadoras de al menos un injerto enlazado a una unidad de ácido aspártico o glutámico, por medio de un "separador" "aminoácido" a base de Leu y/o ILeu y/o Val y/o Phe, siendo un grupo hidrófobo en C6-C30 enlazado mediante un enlace éster al "separador".

25 Esta solicitud no publicada divulga específicamente una suspensión coloidal que contiene nanopartículas formadas por asociaciones de polímero/proteína activa y que se obtiene mezclando una solución acuosa que contiene 10 mg de un poli-glutamato injertado con un injerto -Leu-OC8, -Val-OC12 o -Val-colesterilo y 200 UI de insulina (7,4 mg), por mililitro de agua, pH 7,4.

30 La solicitud de patente francesa nº 01 50641 divulga homopoliaminoácidos lineales, anfífilos, aniónicos, que comprenden unidades de ácido aspártico o unidades de ácido glutámico cuyos extremos son portadores de grupos hidrófobos que comprenden de 8 a 30 átomos de carbono.

35 En particular, los homopoliaminoácidos telequéricos "modificados hidrófobos" son, por ejemplo, un poli[GluONa] con extremos PheOC18/C18 o un poli[GluONa] con extremos PheOC18/alfa-tocoferol. Esta solicitud no publicada describe asimismo una suspensión coloidal que contiene unas nanopartículas formadas por unas asociaciones de polímero/proteína activa y que se obtiene mezclando 10 mg de uno de los polímeros antes mencionados y 200 UI de insulina (7,4 mg) por mililitro de agua, a pH 7,4.

40 La duración de la liberación *in vivo* de la insulina "vectorizada" por las suspensiones, según estas solicitudes no publicadas, ganaría al ser aumentada.

En todo caso, toda esta técnica anterior sobre las suspensiones coloidales de nanopartículas de poliaminoácidos modificados hidrófobos no revela ninguna formulación que permita:

45 (I) aumentar suficientemente la duración de la liberación de la proteína activa después de la inyección por vía parenteral, en particular subcutánea;  
 (II) y/o reducir el pico de concentración plasmático de la proteína activa después de la inyección de la formulación que la contiene.

50 En estas condiciones, uno de los objetivos esenciales de la presente invención es, por lo tanto, proponer una formulación farmacéutica líquida para la liberación prolongada de las IL, que soluciona las carencias de la técnica anterior, y en particular que permite después de la inyección por vía parenteral (por ejemplo subcutánea), obtener una duración de liberación *in vivo* prolongada para interleucinas no desnaturalizadas.

55 Otro objetivo esencial de la invención es proponer una formulación farmacéutica líquida de liberación prolongada de interleucinas *in vivo*, que sea suficientemente fluida para ser fácilmente inyectable y esterilizable por filtración sobre filtros cuyo tamaño de poros es inferior o igual a 0,2 micrones.

60 Otro objetivo esencial de la invención es proponer una formulación farmacéutica líquida de liberación prolongada de interleucinas *in vivo*, que sea estable a la conservación tanto en el plano fisicoquímico como biológico.

65 Otro objetivo esencial de la invención es proponer una formulación farmacéutica líquida de liberación prolongada de interleucinas *in vivo*, que presenta al menos una de las propiedades siguientes: biocompatibilidad, biodegradabilidad, atoxicidad, buena tolerancia local.

Otro objetivo esencial de la invención es proponer una formulación farmacéutica para la liberación prolongada lenta de interleucinas *in vivo*, siendo esta formulación una suspensión coloidal acuosa de baja viscosidad que comprende partículas submicrónicas de polímero PO autoasociadas a al menos una interleucina, siendo el polímero PO un polímero biodegradable, hidrosoluble y portador de grupos hidrófobos.

Otro objetivo esencial de la invención es proponer una formulación farmacéutica para la liberación prolongada lenta de interleucinas *in vivo*, siendo esta formulación una suspensión coloidal acuosa de baja viscosidad que comprende unas partículas submicrónicas de polímero PO autoasociadas a al menos una interleucina, siendo el polímero PO, por ejemplo, un poliaminoácido formado por unidades de ácido aspártico y/o unidades de ácido glutámico, siendo al menos una parte de estas unidades portadoras de injertos que comprenden al menos un grupo hidrófobo (GH), siendo PO además biodegradable, hidrosoluble y anfifílico.

Otro objetivo esencial de la invención es proponer productos derivados y/o precursores de la formulación mencionada en los objetivos antes enunciados.

Es en particular mérito de la Solicitante haber realizado unas formulaciones farmacéuticas líquidas acuosas de baja viscosidad a temperatura fisiológica que, de manera sorprendente, forman un depósito gelificado *in vivo* después de una fácil administración parenteral en el ser humano o en los mamíferos de sangre caliente, no siendo la formación de este depósito iniciada por un cambio de pH, ni de temperatura durante la inyección parenteral, ni tampoco por dispersión de disolvente orgánico en el medio fisiológico. El depósito gelificado así formado aumenta de manera significativa la duración de la liberación de IL *in vivo*.

De lo cual resulta que la invención se refiere a una formulación farmacéutica líquida para la liberación prolongada de interleucina(s), comprendiendo esta formulación, como mínimo, una interleucina, eventualmente por lo menos otro principio activo (PA), preferentemente en solución acuosa, y una suspensión coloidal, acuosa, de baja viscosidad, a base de partículas submicrónicas de polímero (PO) biodegradable, hidrosoluble, seleccionado del grupo que consiste en poliaminoácidos, polisacáridos, gelatinas o sus mezclas y portador de grupos hidrófobos (GH), estando asociadas dichas partículas de manera no covalente con dicha interleucina y eventualmente dicho otro principio activo (PA),

caracterizada:

- ◆ porque el medio de dispersión de la suspensión está esencialmente constituido por agua,
- ◆ porque su concentración en [PO] está fijada a un valor  $[PO] \geq 0,9.C1$  suficientemente elevada de manera que dicha formulación farmacéutica es apropiada para ser inyectada por vía parenteral y formar a continuación *in vivo* un depósito gelificado, representando C1 la concentración de "gelificación inducida" de las partículas de PO, tal como se ha medido en una prueba GI tal como se describe más adelante, cuya formación de depósito gelificado:

- es, por un lado, al menos en parte provocada por al menos una proteína fisiológica presente *in vivo*,
- y permitiendo, por otro lado, prolongar y controlar la duración de liberación de la interleucina y eventualmente del PA *in vivo*, más allá de 24h después de la administración,

- ◆ porque es líquida en las condiciones de inyección,
- ◆ y porque es asimismo líquida a la temperatura y/o al pH fisiológicos, y/o en presencia:

- \* de electrolito fisiológico en concentración fisiológica,
- \* y/o de al menos un tensoactivo.

Ventajosamente, esta gelificación *in vivo* no resulta de un cambio de pH y/o de temperatura, ni de una dispersión *in vivo* de uno o más disolventes orgánicos eventualmente contenidos en la formulación inyectada.

Sin querer estar sujeto a la teoría, se puede pensar que las proteínas fisiológicas, presentes *in vivo* en unas concentraciones fisiológicas, permiten la agregación de las nanopartículas de PO asociadas a al menos una interleucina. Tal gelificación se lleva a cabo, por ejemplo, en una o más horas, 24h, 48h o 72h, entre otras.

Según un modo de definición, que ya no está basado en un comportamiento *in vivo* como el indicado anteriormente, sino en un comportamiento *in vitro*, la invención se refiere a una formulación farmacéutica líquida para la liberación prolongada de interleucina(s) y eventualmente de otros principios activo(s) -PA-, siendo esta formulación:

- líquida en atmósfera ambiente,
- asimismo líquida a la temperatura y/o al pH fisiológicos y/o en presencia:

- \* de electrolito fisiológico en concentración fisiológica,
- \* y/o de al menos un tensoactivo,

- y comprendiendo como mínimo una interleucina, eventualmente como mínimo, otro principio activo (PA),

preferentemente en solución acuosa, y una solución coloidal, acuosa, de baja viscosidad, a base de partículas submicrónicas de polímero biodegradable PO, hidrosoluble seleccionado del grupo que consiste en poliaminoácidos, polisacáridos, gelatinas o sus mezclas y portador de grupos hidrófobos GH, estando asociadas dichas partículas de manera no covalente con dicha interleucina, preferentemente en solución acuosa, (y eventualmente el otro principio activo mencionado) y siendo el medio dispersante de la suspensión esencialmente agua,

caracterizada porque su concentración en [PO] está fijada en un valor suficientemente elevado para permitir la formación de depósito gelificado *in vitro* en presencia, por lo menos de una proteína, siendo dicha concentración en [PO] tal que  $[PO] \geq 0,9.C1$ , representado C1 la concentración de "gelificación inducida" de las partículas de PO, tal como se ha medido en una prueba GI tal como se describe en la descripción.

Preferentemente, la formulación farmacéutica líquida según la invención se caracteriza porque su concentración en [PO] es tal que:

- $20.C1 \geq [PO] \geq C1$ ,
- y más preferentemente  $10.C1 \geq [PO] \geq C1$

El depósito gelificado obtenido después de la inyección parenteral de la formulación permite una prolongación interesante de la duración de la liberación de la proteína, así como una reducción del pico de concentración de interleucinas.

La duración de la liberación de las interleucinas está en particular significativamente aumentada con relación a la de las formulaciones de la técnica anterior, en particular las descritas en las solicitudes de patente PCT publicada WO-A-00/30618 y sus solicitudes de patente francesa no publicadas n<sup>os</sup> 02 07008, 02 09670, 03 50190 y 01 50641.

La prolongación de la duración de liberación *in vivo* inducida por las formulaciones, según la invención, es tanto más apreciable cuanto que las interleucinas liberadas son siempre plenamente bioactivas y no desnaturalizadas.

Las interleucinas, en el sentido de la presente descripción, son de manera indiferente interleucinas no modificadas o interleucinas modificadas, por ejemplo, por injerto de uno o varios grupos polioxietilénicos. Entre las proteínas de la familia de las interleucinas, se pueden citar: IL-1, IL-2, IL-11, IL-12 e IL 18.

En todo el presente texto, las combinaciones supramoleculares de polímero PO asociado o no como mínimo a una interleucina y eventualmente por lo menos a otro PA, se designarán indistintamente como "partículas submicrónicas" o "nanopartículas". Esto corresponde a partículas de diámetro hidrodinámico medio (medido según un modo de realización Md definido más adelante en los ejemplos) por ejemplo, comprendido entre 1 y 500 nm, preferentemente entre 5 y 250 nm.

Además, es muy importante tener en cuenta que estas formulaciones son líquidas, es decir, que presentan ventajosamente una viscosidad muy baja, que hace su inyección fácil. Éstas gelifican sólo *in vivo*.

Según la invención, los calificativos "líquida", "baja" o "muy baja viscosidad" corresponden, ventajosamente, a una viscosidad dinámica a 20°C inferior o igual a 5 Pa.s. La medición de referencia para la viscosidad se puede realizar, por ejemplo, a 20°C con la ayuda de un reómetro AR1000 (TA Instruments) equipado de una geometría cono-plano (4 cm, 2°). La viscosidad  $v$  se mide para un gradiente de cizallamiento de  $10 \text{ s}^{-1}$ .

De esta manera, la viscosidad de las formulaciones según la invención puede estar, por ejemplo, comprendida entre  $1.10^{-3}$  y 5 Pa.s, preferentemente entre  $1.10^{-3}$  y 0,8 Pa.s y, aún más preferentemente, entre  $1.10^{-3}$  y 0,5 Pa.s.

Esta baja viscosidad hace las formulaciones de la invención no sólo fácilmente inyectables por vía parenteral, en particular por vía intramuscular o subcutánea, entre otros, sino también esterilizables fácilmente y a menor coste por filtración sobre unos filtros de esterilización de 0,2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poros.

Este estado líquido o esta baja viscosidad de las formulaciones de la invención existen tanto a temperaturas de inyección que corresponden a temperaturas ambientes, por ejemplo, comprendidas entre 4 y 30°C, como a temperatura fisiológica.

La formulación, según la invención es, preferentemente, una suspensión coloidal acuosa de nanopartículas asociadas a una o varias interleucinas y eventualmente a uno o más PA. Esto significa que, según la invención, el medio de dispersión de esta suspensión está esencialmente formado por agua. En la práctica, este agua representa, por ejemplo, al menos 50% en peso con relación a la masa total de la formulación.

Según el sentido de la invención, el término "proteína" designa tanto una proteína como un péptido. Pudiendo ser esta proteína o este péptido modificado o no, por ejemplo, mediante injerto de uno o más grupos polioxietilénicos.

Mediante la expresión "proteínas fisiológicas" se entienden, según el sentido de la invención, las proteínas y/o los

peptidos endógenos de los mamíferos de sangre caliente presentes en el lugar de inyección.

Mediante la expresión "temperatura fisiológica" se entiende, según el sentido de la invención, la temperatura fisiológica de los mamíferos de sangre caliente, a saber por ejemplo, aproximadamente 37-42°C.

5 Mediante la expresión "pH fisiológico" se entiende, según el sentido de la invención, un pH por ejemplo comprendido entre 6 y 7,6.

10 Por el término "gel" se entiende, según el sentido de la invención, un estado semisólido en el que se transforma la formulación líquida, según la invención, de forma espontánea mediante la única presencia de proteína(s) fisiológica(s), sin ninguna intervención esencial del pH fisiológico y/o de la temperatura fisiológica y/o de la presencia de un electrolito fisiológico (Ca<sup>++</sup> por ejemplo) y/o de la dispersión (o disipación) *in vivo* de un disolvente orgánico eventualmente presente en la formulación inyectada.

15 Mediante la expresión "electrolito fisiológico" se entiende, según el sentido de la invención, cualquier elemento electrolito (por ejemplo iones Ca<sup>++</sup>) presente en los mamíferos de sangre caliente.

20 Mediante la expresión "concentración fisiológica" se entiende, según el sentido de la invención, cualquier concentración fisiológica encontrada en los mamíferos de sangre caliente, para el medio fisiológico considerado.

Además, las formulaciones, según la invención, son no tóxicas, bien toleradas localmente y estables.

25 Es asimismo mérito de los inventores haber realizado un ensayo *in vitro* GI que permite seleccionar una población de las formulaciones preferentes, según la invención, y determinar las concentraciones adecuadas en PO en las formulaciones.

30 Según la invención, el ensayo GI de medición de la concentración de gelificación C1, es un ensayo de referencia que permite definir la concentración crítica C1, denominada a continuación concentración de gelificación inducida C1, que caracteriza cada formulación coloidal según la invención.

El ensayo GI de determinación de la concentración C1 de gelificación inducida es el siguiente:

35 A fin de determinar la concentración C1, se preparan formulaciones coloidales de concentraciones variables en polímero anfifílico según la invención y de concentración constante en proteína terapéutica. Para eso, se ponen en solución en agua ionizada cantidades crecientes de polvo seco del polímero. Las soluciones se mantienen a 25°C bajo agitación magnética durante 16 horas antes de ser mezcladas con una solución concentrada en proteína terapéutica. El volumen y la concentración de esta solución de proteína terapéutica se ajustan a fin de obtener la concentración en proteína buscada para la formulación [por ejemplo 2,5 mg/ml de interleucina 2 (IL2)].

40 Las formulaciones coloidales así preparadas se mezclan en una solución acuosa de albúmina de suero bovino (BSA) concentrada a 30 mg/ml, y después centrifugada durante 15 minutos a 3000 rpm. Las mezclas se dejan bajo agitación suave durante 24 horas antes de ser recuperadas para ser caracterizadas.

45 Las mediciones de viscoelasticidad se efectúan sobre un reómetro TA Instrument AR 1000, equipado de una geometría cono-plano (diámetro 4 cm y ángulo 1,59°). Una deformación de 0,01 rad, situada en el dominio de viscoelasticidad lineal, se impone de manera sinusoidal sobre un rango de frecuencia comprendido entre 0,1 y 300 rad/s. La temperatura de la muestra está mantenida constante a 20°C por medio de una célula Peltier.

50 Los espectros de frecuencia del módulo elástico G' y del módulo viscoso o de pérdida, G'', permiten definir el tiempo de relajación característico Tr definido aquí como la inversa de la frecuencia a la que el módulo elástico G' cruza el módulo viscoso G''. Se encontrará una exposición detallada de estas cuestiones en el documento Ferry, Viscoelastic Properties of Polymers, J.D. Ferry, J. Wiley, NY, 1980 y en el artículo de J. REGALADO y otros Macromolecules 1999, 32, 8580.

55 La medición del tiempo de relajación Tr en función de la concentración en polímero de la formulación permite definir la concentración C1 a la que este tiempo Tr pasa por 1 segundo. Ejemplos de valores de la concentración de gelificación C1 se darán en el ejemplo 6, más adelante.

60 De la misma manera, se pueden definir las concentraciones C0,1 y C10 para las cuales el tiempo de relajación supera respectivamente 0,1 s y 10 s. Estas concentraciones se clasifican en el orden creciente siguiente: C0,1 < C1 < C10.

Según una variante de la formulación según la invención:

- 65
- [PO] ≥ C0,1,
  - Preferentemente [PO] ≥ C1,



➤ Y más preferentemente todavía [PO] ≥ C10.

Según una característica adicional ventajosa: [PO] ≤ 20.C1.

5 Según el sentido de la invención y en todo el presente texto los términos “asociación” o “asociar” usados para calificar las relaciones entre uno o más principios activos y los polímeros PO (por ejemplo los poliaminoácidos) significan, en particular, que el principio o principios activos están unidos al polímero o polímeros PO [por ejemplo el (o los) poliaminoácido(s)] mediante una unión no covalente, por ejemplo mediante interacción electrostática y/o hidrófoba y/o una unión de hidrógeno y/o un gen estérico.

10 Los polímeros PO, según la invención, son polímeros biodegradables, hidrosolubles y portadores de grupos hidrófobos GH. Los grupos hidrófobos pueden encontrarse en número reducido frente al resto de la cadena y pueden situarse lateralmente a la cadena o ser intercalados en la cadena, y ser repartidos de manera aleatoria (copolímero estático) o repartidos en forma de secuencias o de injertos (copolímeros bloque o copolímeros secuenciados).

15 Sin que sea limitativo, los polímeros PO modificados hidrófobos se pueden elegir del grupo que comprende los copoliaminoácidos anfifílicos, los polisacáridos (preferentemente en el subgrupo que comprende los pululanos y/o los quitosanos y/o los mucopolisacáridos), las gelatinas, o sus mezclas.

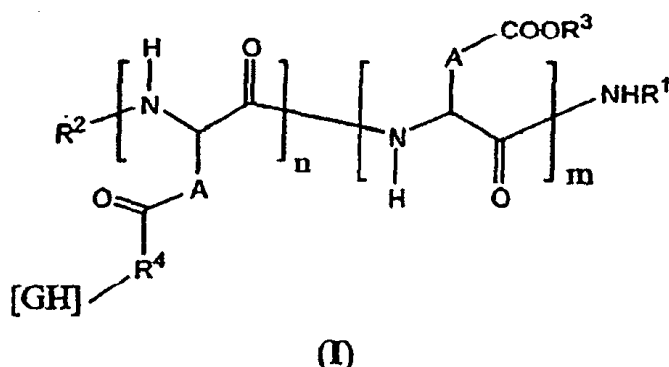
20 Según un modo preferente de realización de la invención, PO se elige entre los copoliaminoácidos anfifílicos. Según el sentido de la invención y en todo el presente texto, el término “*poliaminoácido*” cubre tanto los oligoaminoácidos que comprenden de 2 a 20 unidades de “aminoácido” como los poliaminoácidos que comprenden más de 20 unidades de “aminoácido”.

25 Preferentemente, los poliaminoácidos según la presente invención son oligómeros u homopolímeros que comprenden unidades recurrentes de ácido glutámico o aspártico, o copolímeros que comprenden una mezcla de estos dos tipos de unidades de “aminoácido”. Las unidades consideradas en estos polímeros son unos aminoácidos que tienen la configuración D o L o D/L y que están unidos por sus posiciones alfa o gamma para la unidad glutamato o ácido glutámico y alfa o beta para la unidad ácido aspártico o aspartato.

30 Las unidades de “aminoácido” preferentes de la cadena de poliaminoácido principal son aquellas que tienen la configuración L y una unión de tipo alfa.

35 Según un modo todavía más preferente de realización de la invención, el polímero PO es un poliaminoácido formado por unidades de ácido aspártico y/o unidades de ácido glutámico, siendo al menos una parte de estas unidades portadora de injertos que comprenden al menos un grupo hidrófobo GH. Estos poliaminoácidos son en particular del tipo de aquellos descritos en la solicitud de patente PCT WO-A-00/30618.

40 Según una primera posibilidad, el (o los) PO de la formulación son definidos por la fórmula general (I) siguiente:



en la que:

- 45
- R<sup>1</sup> representa un H, un alquilo lineal en C2 a C10 o ramificado en C3 a C10, bencilo, una unidad de aminoácido terminal o -R<sup>4</sup>-[GH];
  - R<sup>2</sup> representa un H, un grupo acilo lineal en C2 a C10 o ramificado en C3 a C10, un piroglutamato o -R<sup>4</sup>-[GH];
  - R<sup>3</sup> es un H o una entidad catiónica preferentemente seleccionada del grupo que comprende:

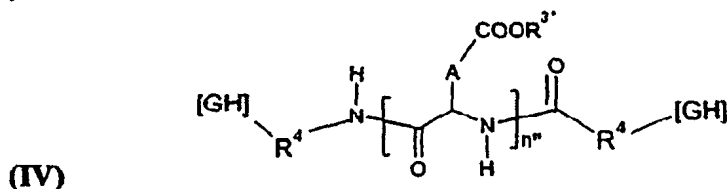
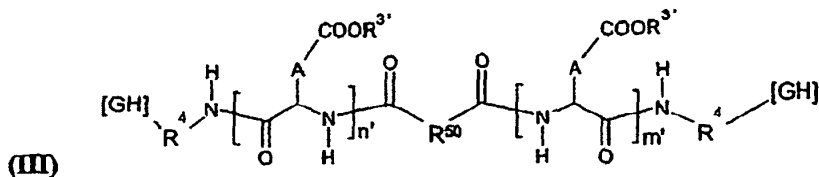
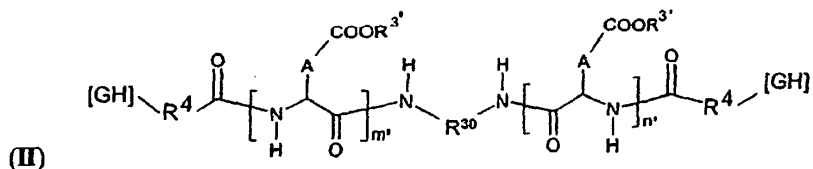
- 50
- los cationes metálicos ventajosamente elegidos del subgrupo que comprende: el sodio, el potasio, el calcio, el magnesio,
  - los cationes orgánicos ventajosamente elegidos del subgrupo que comprende:

- los cationes a base de amina,
  - los cationes a base de oligoamina,
  - los cationes a base de poliaminas (siendo la polietilenimina particularmente preferida),
- 5
- los cationes a base de aminoácido(s) ventajosamente elegidos en la clase que comprende los cationes a base de lisina o de arginina,

- o los poliaminoácidos catiónicos ventajosamente elegidos del subgrupo que comprende la polilisina o la oligolisina;

- 10
- R<sup>4</sup> representa una unión directa o un “separador” a base de 1 a 4 unidades de aminoácido;
  - A representa independientemente un radical -CH<sub>2</sub>- (unidad de ácido aspártico) o -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- (unidad de ácido glutámico);
  - n/(n+m) se ha definido como el índice de injerto molar y su valor es suficientemente bajo para que PO puesto en solución en agua de pH 7 y 25°C forme una suspensión coloidal de partículas submicrónicas de PO, preferentemente n/(n+m) está comprendido entre 1 a 25% molar y mejor todavía entre 1 y 15% molar;
  - n + m se ha definido como el grado de polimerización y varía de 10 a 1000, preferentemente entre 50 y 300;
  - GH representa un grupo hidrófobo.
- 15

20 Según una segunda posibilidad, el (o los) PO de la formulación responden a una de las fórmulas generales (II), (III) y (IV) siguientes:



25 en las que:

- 30
- GH representa un grupo hidrófobo;
  - R<sup>30</sup> es un grupo alquilo lineal en C2 a C6;
  - R<sup>3'</sup> es un H o una entidad catiónica, preferentemente seleccionada del grupo que comprende:
- 35
- los cationes metálicos ventajosamente elegidos del subgrupo que comprende: el sodio, el potasio, el calcio, el magnesio,
  - los cationes orgánicos ventajosamente elegidos del subgrupo que comprende:

- 40
- los cationes a base de amina,
  - los cationes a base de oligoamina,
  - los cationes a base de poliaminas (siendo la polietilenimina particularmente preferida),
  - los cationes a base de aminoácido(s) ventajosamente elegidos en la clase que comprende los cationes a base de lisina o de arginina,

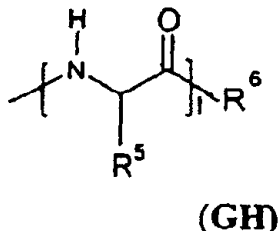
- o los poliaminoácidos catiónicos ventajosamente elegidos del subgrupo que comprende la polilisina o la oligolisina;

- 45
- R<sup>50</sup> es un grupo alquilo, dialcoxi o diamina en C2 a C6;
  - R<sup>4</sup> representa una unión directa o un “separador” a base de 1 a 4 unidades de aminoácido;
  - A representa independientemente un radical -CH<sub>2</sub>- (unidad de ácido aspártico) o -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- (unidad de ácido

glutámico);

■  $n' + m' + n''$  se ha definido como el grado de polimerización y varía de 10 a 1000, preferentemente entre 50 y 300.

5 Ventajosamente, los  $n$  grupos GH del PO representan cada uno independientemente entre sí un radical monovalente de fórmula siguiente:



en la que:

- 10 -  $R^5$  representa metilo (alanina), isopropilo (valina), isobutilo (leucina), secbutilo (isoleucina), bencilo (fenilalanina);  
 -  $R^6$  representa un radical hidrófobo que comprende de 6 a 30 átomos de carbono;  
 -  $n$  varía de 0 a 6.

15 Según una característica destacable de la invención, todo o parte de los grupos hidrófobos  $R^6$  de los PO se eligen de manera independiente, en el grupo de radicales que comprende:

- 20 ■ un alcoxi lineal o ramificado que comprende de 6 a 30 átomos de carbono y que puede comprender al menos un heteroátomo (preferentemente O y/o N y/o S) y/o al menos una insaturación,  
 ■ un alcoxi que comprende de 6 a 30 átomos de carbono y que tiene uno o más carbociclos anulares y que contiene eventualmente al menos una insaturación y/o al menos un heteroátomo (preferentemente O y/o N y/o S),  
 ■ un alcoxiarilo o un ariloxialquilo de 7 a 30 átomos de carbono y que puede comprender al menos una insaturación y/o al menos un heteroátomo (preferentemente O y/o N y/o S).

25 En la práctica y sin que eso sea limitativo, el radical hidrófobo  $R^6$  del injerto del PO procede de un precursor alcohólico elegido del grupo que comprende: el octanol, el dodecanol, el tetradecanol, el hexadecanol, el octadecanol, el oleilalcohol, el tocoferol o el colesterol.

30 Según una primera forma de realización de la invención, las cadenas principales de poliaminoácidos son homopolímeros de alfa-L-glutamato o de ácido alfa-L-glutámico.

Según una segunda forma de realización de la invención, las cadenas principales de poliaminoácidos son homopolímeros de alfa-L-aspartato o de ácido alfa-L-aspártico.

35 Según una tercera forma de realización de la invención, las cadenas principales de poliaminoácidos son copolímeros de alfa-L-aspartato/alfa-L-glutamato de ácido alfa-L-aspártico/alfa-L-glutámico.

40 Ventajosamente, la distribución de las unidades de ácido aspártico y/o de ácido glutámico de la cadena poliaminoácido principal del PO es tal que el polímero así constituido es aleatorio, o bien de tipo bloque, o bien de tipo multibloque.

Preferentemente, el PO usado en la formulación, según la invención, tiene una masa molar que se sitúa entre 2000 y 100.000 g/mol, y preferentemente entre 5000 y 40.000 g/mol.

45 Según un primer modo preferente de realización de la formulación, el radical hidrófobo  $R^6$  del injerto de PO procede de un precursor alcohólico formado por tocoferol:

- 50 ♦  $1\% \leq [n/(n+m)] \times 100 \leq 10\%$   
 ♦ preferentemente  $3,5\% \leq [n/(n+m)] \times 100 \leq 7,5\%$   
 ♦  $n + m$  varía de 100 a 400, preferentemente de 120 a 300.

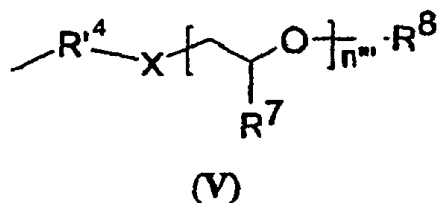
Según una segunda forma preferente de realización de la formulación, el radical hidrófobo  $R^6$  del injerto de PO procede de un precursor alcohólico formado por colesterol:

- 55 ♦  $1\% \leq [n/(n+m)] \times 100 \leq 10\%$   
 ♦ preferentemente  $3,5\% \leq [n/(n+m)] \times 100 \leq 6,5\%$   
 ♦  $n + m$  varía de 100 a 400, preferentemente de 120 a 300.

En estos dos modos preferentes de realización de la formulación de la invención, es ventajoso que la concentración de polímero PO esté comprendida entre 15 y 50 mg/ml.

5 Según una variante, el PO de la formulación, según la invención, es portador, como mínimo, de un injerto del tipo polialquilenglicol unido a una unidad de glutamato y/o aspartato.

Ventajosamente, este injerto de tipo polialquilenglicol es de fórmula (V) siguiente.



10 en la que:

- R<sup>4</sup> representa una unión directa o un "separador" a base de 1 a 4 unidades de aminoácidos;
- X es un heteroátomo elegido del grupo que comprende el oxígeno, el nitrógeno o un azufre;
- R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> representan independientemente un H, un alquilo lineal en C1 a C4;
- 15 - n''' varía de 10 a 1000, preferentemente de 50 a 300.

En la práctica, el polialquilenglicol es, por ejemplo, un polietilenglicol.

20 Es deseable, según la invención, que el porcentaje molar de injerto del polialquilenglicol varíe de 1 a 30%.

Los poliaminoácidos PO son además extremadamente interesantes debido a un índice de injerto ajustable, se dispersan en agua de pH 7,4 (por ejemplo con un tampón fosfato) para dar suspensiones coloidales.

25 Además, principios activos PA tales como proteínas, péptidos o pequeñas moléculas, pueden asociarse espontáneamente a nanopartículas que comprenden estos poliaminoácidos PO.

Se debe comprender que los PO a base de poliaminoácidos contienen funciones carboxílicas que son, o bien neutras (forma COOH), o bien ionizadas (anión COO<sup>-</sup>), según el pH y la composición. Por esta razón, la solubilidad en fase acuosa es directamente función del índice de COOH libres de los PO (no injertado por el motivo hidrófobo) y del pH. En solución acuosa, el contracción puede ser un catión metálico tal como sodio, calcio o magnesio, o un catión orgánico tal como trietanolamina, tris(hidroximetil)-aminometano o poliamina tal como la polietilenimina.

30 Los PO de tipo poliaminoácidos susceptibles de ser usados en la formulación de la invención son obtenidos, por ejemplo, mediante métodos conocidos por un experto en la técnica. Los poliaminoácidos estadísticos se pueden obtener mediante injerto del injerto hidrófobo, previamente funcionalizado por el "separador", directamente en el polímero mediante reacción habitual de acoplamiento. Los PO poliaminoácidos bloque o multibloques se pueden obtener mediante polimerización secuencial de los anhídridos de N-carboxi-aminoácidos (NCA) correspondientes.

35 Se prepara por ejemplo un poliaminoácido, un homopoliglutamato, un homopoliaspartato o un copolímero glutamato/aspartato, bloque, multibloque o aleatorio según métodos habituales.

Para la obtención de un poliaminoácido de tipo alfa, la técnica más habitual se basa en la polimerización de anhídridos de N-carboxi-aminoácidos (NCA), descrita por ejemplo en el artículo Biopolymers, 1976, 15, 1869 y en el documento de H.R. Kricheldorf "alpha-Aminoacid-N-carboxy Anhydrides and related Heterocycles" Springer Verlag (1987). Los derivados de NCA son preferentemente unos derivados NCA-O-Me, NCA-O-Et o NCA-O-Bz (Me = Metilo, Et = Etilo y Bz = Bencilo). Los polímeros se hidrolizan después en condiciones apropiadas para obtener el polímero en su forma ácida. Estos métodos se basan en la descripción dada en la patente FR-A-2 801 226 de la solicitante. Un cierto número de polímeros utilizables según la invención, por ejemplo de tipo ácido poli(alfa-L-aspartico), ácido poli(alfa-L-glutámico), ácido poli(alfa-D-glutámico) y ácido poli(gamma-L-glutámico) de masas variables están disponibles comercialmente. El ácido poliaspartico de tipo alfa-beta se obtiene mediante condensación del ácido aspártico (para obtener una polisuccinimida) seguida de una hidrólisis básica (véase Tomida y otros, Polymer 1997, 38, 4733-36).

55 El acoplamiento del injerto con una función ácida del polímero se realiza fácilmente mediante reacción del poliaminoácido en presencia de una carbodiimida como agente de acoplamiento y, de forma opcional, un catalizador tal como la 4-dimetilaminopiridina y en un disolvente apropiado tal como la dimetilformamida (DMF), la N-metilpirrolidona (NMP) o el dimetilsulfóxido (DMSO). La carbodiimida es, por ejemplo, la dicitlohexilcarbodiimida o la diisopropilcarbodiimida. El índice de injerto se controla químicamente mediante la estequiometría de los

constituyentes y reactivos o el tiempo de reacción. Los injertos hidrófobos funcionalizados por un “separador” se obtienen mediante acoplamiento peptídico clásico o mediante condensación directa por catalización ácida. Estas técnicas son bien conocidas por los expertos en la técnica.

- 5 Para la síntesis de copolímero bloque o multibloque, se usan derivados NCA previamente sintetizados con el injerto hidrófobo. Por ejemplo, el derivado NCA-hidrófobo se copolimeriza con el NCA-O-bencilo y después se eliminan mediante hidrólisis selectivamente los grupos bencílicos.

10 La síntesis de poliaminoácidos PO conduce preferentemente a unas suspensiones acuosas de nanopartículas de PO.

15 Tales suspensiones se pueden transformar en polvos de nanopartículas de PO mediante secado, de manera apropiada y conocida por los expertos en la técnica, como por ejemplo: calentamiento (autoclave, etc.), puesta al vacío, uso de desecantes, liofilización, atomización.

Estas nanopartículas de PO, en suspensión o en estado pulverulento, forman una materia prima para la preparación de las formulaciones, según la invención.

20 A este respecto, se puede precisar que las formulaciones, según la invención, resultan de la asociación no covalente de nanopartículas a base de al menos un PO y de al menos un PA, en un medio líquido acuoso.

Para la preparación, el PO y/o la(s) interleucina(s) (y/o el eventual PA suplementario) pueden estar en forma sólida (preferentemente polvo) y/o en forma líquida (preferentemente suspensión acuosa coloidal).

25 La asociación interleucinas(s)/PO significa, según el sentido del presente documento, que la (o las) interleucinas está(n) asociada(s) al (a los) polímero(s) PO [por ejemplo uno o más poliaminoácidos(s)] mediante una o más uniones distinta(s) que una (o más) unión(es) química(s) covalente(s).

30 Las técnicas de asociación de una o más interleucinas a los PO, según la invención, se describen especialmente en la solicitud de patente WO-A-00/30618. Consisten en incorporar al menos una interleucina (y uno o varios otros principios activos eventuales) en el medio líquido que contiene unas nanopartículas de PO, para obtener una suspensión coloidal de nanopartículas cargadas en o asociadas con una o varias interleucinas (y uno o varios otros principios activos eventuales).

35 La invención tiene, por lo tanto, asimismo, por objeto un procedimiento de preparación de la formulación mencionada anteriormente.

Según un primer modo preferente de realización, este procedimiento se caracteriza porque consiste esencialmente en:

- 40
- ◆ llevar a cabo una suspensión coloidal de nanopartículas de al menos un PO,
  - ◆ mezclar esta suspensión coloidal de nanopartículas de PO con al menos una interleucina (y uno o varios otros principios activos eventuales), preferentemente en solución acuosa,
  - ◆ añadir eventualmente al menos un excipiente
  - 45 ◆ si es necesario, ajustar el pH y/o la osmolaridad, y
  - ◆ eventualmente filtrar la suspensión así obtenida.

50 Ventajosamente, la(s) interleucina(s) (y uno o varios otros principios activos eventuales) se obtienen en forma de suspensión o de solución acuosa para la mezcla con la suspensión coloidal de nanopartículas de PO.

Según un segundo modo de realización, este procedimiento se caracteriza porque consiste esencialmente en:

- 55
- ◆ realizar un polvo de al menos un polímero PO,
  - ◆ mezclar este polvo con una suspensión o solución acuosa de al menos una interleucina (y uno o varios otros principios activos eventuales), preferentemente en solución acuosa,
  - ◆ añadir eventualmente al menos un excipiente,
  - ◆ si es necesario, ajustar el pH y/o la osmolaridad, y
  - ◆ eventualmente filtrar la suspensión así obtenida.

60 Las formulaciones así obtenidas pueden asimismo ser elaboradas en forma de geles, de polvo o de película mediante los métodos clásicos conocidos por los expertos en la técnica, tales como la concentración por diafiltración o evaporación, el revestimiento, la atomización o la liofilización, entre otros. Estos métodos pueden ser eventualmente combinados.

65 De lo anterior resulta un tercer modo de realización del procedimiento de preparación de las formulaciones líquidas,

según la invención, consistiendo este tercer modo esencialmente en:

- ◆ realizar un polvo procedente del secado de la formulación líquida, según la invención, tal como se ha definido anteriormente,
  - 5 ◆ mezclar este polvo con un medio líquido acuoso, preferentemente bajo agitación,
  - ◆ añadir eventualmente al menos un excipiente,
  - ◆ si es necesario ajustar el pH y/o la osmolaridad, y
  - ◆ eventualmente filtrar la suspensión así obtenida
- 10 Los excipientes susceptibles de ser añadidos son, por ejemplo, antimicrobianos, tampones, antioxidantes, agentes que permiten ajustar la isotonicidad, que son conocidos por los expertos en la técnica. Se podrá, por ejemplo, referirse al documento: *Injectable Drug Development*, P.K. Gupta y otros, Interpharm Press, Denver, Colorado 1999.
- 15 La filtración eventual de la formulación líquida sobre filtros de porosidad igual, por ejemplo, de 0,2  $\mu\text{m}$ , permite esterilizarla. Se puede así inyectar directamente a un paciente.
- Todos estos ejemplos de preparación de formulaciones líquidas, según la invención, son ventajosamente realizados en atmósfera y a temperatura ambiente (25°C por ejemplo).
- 20 Según una disposición interesante de la formulación según la invención, su fracción másica en interleucina(s) no asociada(s) a las partículas submicrónicas [interleucina(s) no asociada(s)] en % en peso es tal que:
- [interleucina(s) no asociada(s)]  $\leq 1$
  - preferentemente [interleucina(s) no asociada(s)]  $\leq 0,5$ .
  - 25 ○ y más preferentemente [interleucina(s) no asociada(s)]  $\leq 0,1$ . De acuerdo con la invención, la interleucina preferente es interleucina 2.
- Según otro de sus aspectos, la invención comprende cualquier producto derivado obtenido a partir de la formulación líquida según la invención, tal como se ha definido anteriormente y que comprende partículas submicrónicas, formadas por asociaciones no covalentes PO / interleucina tales como se han definido anteriormente.
- 30 En la práctica, estos productos derivados pueden estar constituidos especialmente por polvos, geles, implantes o películas, entre otros.
- 35 Además, la invención se refiere a cualquier precursor de la formulación líquida inyectables tal como se ha definido anteriormente.
- Al tratarse siempre de estos productos derivados, se debe subrayar que la invención se refiere igualmente a un procedimiento de preparación de un material en polvo derivado de la formulación que se ha definido anteriormente, caracterizándose este procedimiento porque dicho material en polvo es obtenido por secado de la formulación que se ha definido anteriormente.
- 40 La formulación, según la invención, es preferentemente farmacéutica, sin excluir las formulaciones cosméticas, dietéticas o fitosanitarias que comprenden como mínimo un PO, tal como se ha definido anteriormente y como mínimo una interleucina y eventualmente, como mínimo, otro principio activo.
- 45 Según la invención, el eventual principio activo suplementario distinto de una interleucina, puede ser una proteína, una glicoproteína, una proteína unida a una o varias cadenas polialquilenglicol [preferentemente PoliEtilenGlicol (PEGi): "proteína-PEGilada"], un polisacárido, un liposacárido, un oligonucleótido, un polinucleótido o un péptido.
- 50 Este principio activo suplementario puede ser seleccionado entre las hemoglobinas, citocromas, albúminas, interferones, citocinas, antígenos, anticuerpos, eritropoyetina, insulina, hormonas de crecimiento, factores VIII y IX, factores estimulantes de la hematopoyesis o sus mezclas.
- Según una variante, este principio activo suplementario es una "pequeña" molécula orgánica hidrófoba, hidrófila o anfifílica, por ejemplo, péptidos tales como leuprólido o ciclosporina o pequeñas moléculas tales como las que pertenecen a la familia de las antraciclina, taxoides o camptotecinas y sus mezclas.
- 55 Entre las características primordiales de la formulación, según la invención, figuran su carácter inyectable y su capacidad de formar un depósito sobre el sitio de inyección, *in vivo*, mediante gelificación o también mediante agregación de las nanopartículas, en presencia de proteínas fisiológicas o análogos.
- 60 La formulación, según la invención, puede en particular ser inyectada por vía parenteral, subcutánea, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, intracerebral o en un tumor.
- 65 La formulación, según la invención, puede asimismo ser administrada por vía oral, nasal, vaginal, ocular o bucal.

Ventajosamente, la formulación se destina a la preparación de medicamentos, en particular para administración parenteral, subcutánea, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, intracerebral o en un tumor, incluso por vía oral, nasal, vaginal u ocular.

5 Aunque la formulación, según la invención, sea preferentemente farmacéutica, esto no excluye sin embargo las formulaciones cosméticas, dietéticas o fitosanitarias que comprenden al menos un PO tal como se definió anteriormente y al menos un principio activo correspondiente.

10 Según todavía otro de sus aspectos, la invención se refiere a un procedimiento de preparación de medicamentos, en particular para administración parenteral, subcutánea, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, intracerebral o en un tumor, incluso por vía oral, nasal, vaginal u ocular, caracterizado porque consiste esencialmente en realizar al menos una formulación definida anteriormente y/o cualquier producto derivado y/o cualquier precursor de dicha formulación.

15 La invención se refiere asimismo al uso terapéutico de la formulación tal como se describe en el presente texto, que consiste esencialmente en administrar dicha formulación por vía parenteral, subcutánea, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, intracerebral o en un tumor, incluso por vía oral, nasal, vaginal u ocular, de manera que ésta forme un depósito gelificado/reticulado en el sitio de inyección.

20 La invención se entenderá mejor y sus ventajas y variantes de realización se comprenderán mejor a partir de los ejemplos siguientes, que describen la síntesis de los PO formados por poliaminoácidos injertados por un grupo hidrófobo, su transformación en sistema de liberación prolongada de una interleucina, a saber, en formulación según la invención (suspensión coloidal acuosa estable) y la demostración de la capacidad de tal sistema, no sólo en asociarse a una interleucina, sino sobre todo en gelificarse/reticularse para liberar de manera muy prolongada *in vivo* las interleucinas.

## DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

30 **Figura 1:** Curvas de las concentraciones plasmáticas de IL2 (picogram/ml) conseguidas en un mono después de la inyección subcutánea

- de la formulación de IL2 según la invención (ejemplo 11):  
→ curva -□-□-,
- 35 • de la formulación de IL2 (F) control no incluida en la invención (ejemplo 11):  
→ curva -●-●-,
- y de la formulación de IL2 (G) control no incluida en la invención (ejemplo 11):  
→ curva -■-■-,

40 en función del tiempo T en horas y a una dosis de IL2 de 0,5 mg/kg.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1: Polímero anfifílico P1

#### 45 Síntesis de un poliglutamato injertado por el alfa-tocoferol de origen sintético

Se solubilizan 5,5 g de un alfa-L-poliglutamato (de masa equivalente a aproximadamente 10.000 Da) con respecto a un estándar de polioxietileno y obtenido mediante polimerización de NCAGluOMe seguida de una hidrólisis tal como se describe en la solicitud de patente FR-A-2 801 226) en 92 ml de dimetilformamida (DMF) calentando a 40°C durante 2 horas. Una vez solubilizado el polímero, se deja volver la temperatura hasta 25°C y se añaden sucesivamente 1,49 g de D,L-alfa-tocoferol (> 98% obtenido de Fluka®) previamente solubilizado en 6 ml de DMF, 0,09 g de 4-dimetilaminopiridina previamente solubilizada en 6 ml de DMF y 0,57 g de diisopropilcarbodiimida previamente solubilizada en 6 ml de DMF. Después de 8 horas a 25°C bajo agitación, el medio de reacción se vierte en 800 ml de agua que contiene 15% de cloruro de sodio y de ácido clorhídrico (pH 2). El polímero precipitado se recupera después mediante filtración, se lava con ácido clorhídrico 0,1N y después con agua. El polímero se resolubiliza después en 75 ml de DMF, y después se reprecipita en agua que contiene como antes sal y ácido a pH 2. Después de dos lavados con agua, se lava varias veces con éter diisopropílico. El polímero se seca después en estufa, en vacío a 40°C. Se obtiene un rendimiento del orden de 85%.

### 60 Ejemplo 2: Polímeros anfifílicos P1, P2, P3, P4, P5 y P6

Estos polímeros se obtienen de la misma manera que para la obtención del polímero P1. La siguiente tabla 1 resume las características de estos polímeros. Las del polímero P1 se dan a título de comparación.

65

TABLA 1

Polímero	Mn <sup>1</sup> g/mol del poliglutamato	Grupo hidrófobo	% de injerto (RMN) <sup>2</sup>	Mn <sup>1</sup> g/mol del polímero
P1	10.000	alfa-tocoferol <sup>3</sup>	7	13.900
P2	10.000	alfa-tocoferol <sup>3</sup>	4	14.400
P3	16.900	alfa-tocoferol <sup>3</sup>	4	15.200
P4	10.000	Colesterol	5	11.500
P5	16.900	colesterol	5	12.900
P6	10.000	n-dodecanol	15	11.500

<sup>1</sup> En equivalente polioxietileno.  
<sup>2</sup> Índice de injerto molar estimado por la RMN del protón  
<sup>3</sup> de origen sintético

**Ejemplo 3: Preparación de una formulación de interleucina-2 (IL2) de larga acción, según la presente invención, a base del polímero P3.**

5 Se introduce en un frasco la cantidad de polvo liofilizado del polímero anfílico y de agua estéril necesaria para obtener una concentración en polímero igual a  $X = 1,3$  veces la concentración final buscada en la formulación. La solución del polímero se prolonga durante 16 horas bajo agitación magnética.

10 La cantidad necesaria de IL2 liofilizada (Prospec) se concentra a  $X/(X-1)$  veces la concentración final buscada.

La concentración precisa de la solución de IL2 concentrada se determina mediante determinación UV a 280 nm, con la ayuda de un espectrofotómetro UV Perkin Elmer Lambda 35. Esta solución de IL2 se filtra sobre 0,8-0,2  $\mu\text{m}$  y se almacena a 4°C. Su pH se ajusta a pH 11 mediante adición de NaOH 1M. Se denomina Y la relación de la concentración en proteína de esta solución con la concentración deseada en la formulación.

15 Se procede después a la mezcla a temperatura ambiente de la solución de proteína y de la solución de polímero. Para un volumen de polímero, se añaden  $X - 1$  volúmenes de solución de proteína. El pH y la osmolaridad se ajustan a  $\text{pH } 7,4 \pm 0,2$  y a  $300 \pm 20$  mOsm.

20 De esta manera, para preparar una formulación de IL2 de larga acción, según la invención, a base del polímero P3 que contiene 20 mg/ml de polímero P3 y 2,5 mg/ml de IL2, la solución inicial de polímero se concentra a 26 mg/ml. La solución inicial de IL2 se concentra a 11 mg/ml. Para un volumen de polímero, se añaden 0,3 volúmenes de solución de proteína.

**Ejemplo 4: Medición del diámetro hidrodinámico medio de las nanopartículas de diferentes polímeros PO, según la invención.**

30 El diámetro hidrodinámico medio de las partículas de polímero PO según la invención se mide según el modo de realización Md definido a continuación.

Las disoluciones de PO se preparan en unas concentraciones de 1 ó 2 mg/ml en medio NaCl 0,15M y se dejan bajo agitación durante 24h. Estas disoluciones se filtran después sobre 0,8-0,2  $\mu\text{m}$ , antes de analizarlas en difusión dinámica de la luz gracias a un aparato de tipo Brookhaven, que funciona con un haz láser de longitud de onda 488 nm y polarizado verticalmente. El diámetro hidrodinámico de las nanopartículas de polímero PO se calcula a partir de la función de autocorrelación del campo eléctrico por medio del método de los cumulantes, tal como se describe en el texto "Surfactant Science Series" volumen 22, Surfactant Solutions, Ed. R Zana, cap. 3, M. Dekker, 1984.

40 Se obtienen los resultados siguientes para los polímeros PO, P2, P3, P4 y P6 del ejemplo 2:

TABLA 2

Polímero	Diámetro hidrodinámico medio (nm)
P2	60
P3	90
P4	30
P6	15

**Ejemplo 5: Asociación espontánea de una proteína a las nanopartículas de polímero PO**

45 Una solución de tampón fosfato a 25 mM se prepara a partir de polvo de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Sigma ref. S-0751) y se ajusta con sosa 1N (SDS ref. 3470015) a  $\text{pH} = 7,2$ . Una suspensión coloidal de nanopartículas de polímero P1 se prepara mediante disolución del polímero liofilizado durante una noche a 5 mg/ml en la solución de tampón fosfato anterior.

Una solución madre de BSA (Sigma A-2934) se prepara mediante disolución durante dos horas de una proteína a 10



mg/ml en el mismo tampón.

Las disoluciones madres así como el tampón se filtran sobre 0,22 µm. Se realizan unas mezclas mediante adición de volúmenes predeterminados de dos soluciones madres y de la dilución en el tampón fosfato para obtener al final una gama de muestras que tienen una concentración constante en polímero (0,1 mg/ml) y unas concentraciones crecientes de proteínas (0 a 1,8 mg/ml).

Las muestras se dejan asociarse durante 5 horas a 25°C y después se analizan mediante electroforesis capilar en un método denominado de frontal en el que es posible visualizar separadamente la proteína y el complejo de proteína-polímero. Para más detalles de esta técnica, se consultará el siguiente artículo: Gao JY, Dublin PL, Muhoberac BB, Anal. Chem. 1997, 69, 2945. Los análisis se realizan en un aparato Agilent G16000A provisto de una burbuja capilar de sílice fundida (tipo G1600-62-232). La altura del primer nivel que corresponde a la proteína libre permite determinar la concentración en BSA no asociada. El experimento muestra que para unas cantidades de proteínas inferiores a 0,1 g de proteína por g de polímero, la proteína se asocia a las nanopartículas de polímero.

**Ejemplo 6: Determinación de la concentración de gelificación C1 para los polímeros P0, P1, P3 y P6.**

Se aplica el ensayo GI a formulaciones de IL2 asociadas a los polímeros P1, P3 y P6 de los ejemplos 1 y 2. Las concentraciones en proteínas de estas formulaciones se trasladan a la tabla siguiente. La medición del tiempo de relajación de las formulaciones en presencia de BSA (concentración 30 mg/ml) se efectúa según el modo de realización del ensayo GI. La concentración crítica C1, para la cual el tiempo de relajación excede 1 s se traslada a la tabla 3 para IL-2:

**TABLA 3:**

Concentración de gelificación inducida por formulaciones de IL2			
Polímero	P1	P3	P6
Concentración en IL2 (mg/ml)	2,5	2,5	2,5
Concentración C1 (mg/ml)	17	17	> 50

**Ejemplo 7: Farmacocinética de la interleucina 2 (IL2) en el mono después de la inyección subcutánea de diversas formulaciones a base de poliaminoácidos anfifílicos.**

Las formulaciones siguientes se preparan según el modo de realización descrito en el ejemplo 3.

**TABLA 4**

Referencia	Polímero	Concentración en polímero (mg/ml)	Concentración en IL2 (mg/ml)
E	P1	30	2,5
F	P3	20	2,5
G	P6	40	2,5

Las formulaciones E y F, que tienen una concentración en polímero superior a la concentración de gelificación C1 medida en el ejemplo 6, pertenecen por lo tanto a la selección según la invención. En cambio, la formulación G tiene una concentración inferior a la concentración de gelificación C1 y no pertenece a la selección según la invención.

Estas formulaciones se inyectan a la dosis de 0,5 mg/kg a unos monos *Cynomolgus*. Se efectúan unas extracciones plasmáticas en los tiempos 1, 5, 11, 24, 36, 48, 72, 96, 120, 144, 168 y 240 horas. La concentración plasmática en IL2 se mide sobre estas extracciones mediante el ensayo de determinación ELISA (Kit Immunotech IM 3583).

Los tiempos Tmax y T50 para las formulaciones E, F y G se trasladan en la tabla 5 siguiente.

**TABLA 5**

Referencia de la formulación	Tmax (h)	T50 (h)
E	32	34,5
F	32	37,5
G	4	10,5

De esta manera, las formulaciones E y F, que pertenecen a la selección según la invención, presentan una duración de liberación considerablemente aumentada con respecto a la formulación G que no pertenece a la selección según la invención.

**Ejemplo 8: Observación de la gelificación *in vivo* de las formulaciones, según la invención, después de la inyección subcutánea.**

El comportamiento subcutáneo de las formulaciones, según la invención, se ha estudiado en el cerdo doméstico. Se

ha procedido a inyectar debajo de la piel de la barriga, a 4 mm de profundidad, seis cerdos domésticos, con 0,3 ml de las siguientes formulaciones: Formulación A: solución acuosa isotónica de pH 7,3 del polímero P6 del ejemplo 2 concentrado a 45 mg/ml.

5 Formulación B: solución acuosa isotónica de pH 7,3 del polímero P1 del ejemplo 1 concentrado a 20 mg/ml.

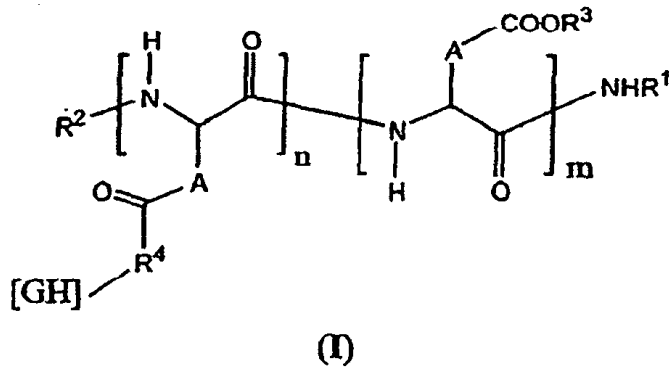
10 Los sitios inyectados han sido extraídos 72 horas después de la administración. El examen histológico muestra la presencia de un depósito gelificado de polímero para la formulación B. Este se presenta en forma de zonas uniformemente coloreadas. Sin embargo, este fenómeno no se observa para la formulación A para la cual el polímero se infiltra entre las fibras de colágeno.

Se puede subrayar que la matriz de polímero B es perfectamente biodegradable debido a que el tejido ha vuelto completamente a su estado normal después de 21 días.

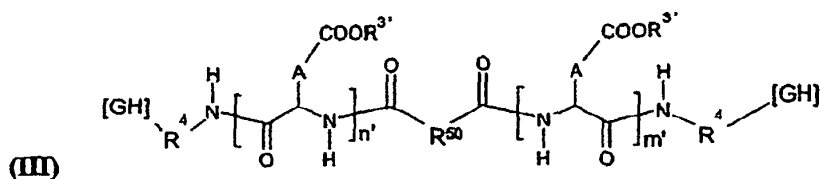
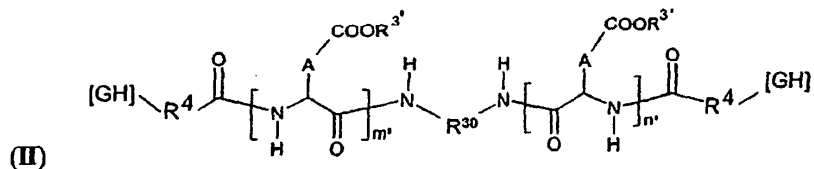
## REIVINDICACIONES

1. Formulación farmacéutica líquida para la liberación prolongada de interleucina(s), comprendiendo dicha formulación, como mínimo, una interleucina, eventualmente, como mínimo, otro principio activo (PA), preferentemente en solución acuosa, y una suspensión coloidal, acuosa, de baja viscosidad, a base de partículas submicrónicas de polímero (PO) biodegradable, hidrosoluble seleccionado del grupo que consiste en poliaminoácidos, polisacáridos, gelatinas o sus mezclas y portador de grupos hidrófobos (GH), estando asociadas dichas partículas de manera no covalente con dicha interleucina y eventualmente dicho otro principio activo (PA),
- 5
- 10 caracterizada:
- ◆ porque el medio dispersante de la suspensión está esencialmente constituido por agua,
  - ◆ porque su concentración en [PO] está fijada a un valor  $[PO] \geq 0,9.C1$  de manera que dicha formulación farmacéutica es apropiada para ser inyectada por vía parenteral y formar a continuación in vivo un depósito gelificado, representando C1 la concentración de "gelificación inducida" de las partículas de PO tal como se ha medido en una prueba GI tal como se describe en la descripción, cuya formación de depósito gelificado:
  - es, por un lado, al menos en parte provocada por al menos una proteína fisiológica presente *in vivo*,
  - y permitiendo, por otro lado, prolongar y controlar la duración de liberación de la leucina y eventualmente del PA *in vivo*, más allá de 24h después de la administración,
  - ◆ es líquida en las condiciones de inyección,
  - ◆ y es asimismo líquida a la temperatura y/o al pH fisiológicos, y/o en presencia:
  - \* de electrolito fisiológico en concentración fisiológica,
  - \* y/o de al menos un tensoactivo.
- 15
- 20
- 25
2. Formulación farmacéutica líquida para la liberación prolongada de interleucina(s) y eventualmente de otros principio(s) activo(s) -PA-, siendo esta formulación:
- 30
- líquida en atmósfera ambiente,
  - asimismo líquida a la temperatura y/o al pH fisiológicos y/o en presencia:
  - \* de electrolito fisiológico en concentración fisiológica,
  - \* y/o de al menos un tensoactivo,
  - y comprendiendo por lo menos una interleucina(s), eventualmente por lo menos otro principio activo (PA), preferentemente en solución acuosa, y una suspensión coloidal, acuosa, de baja viscosidad, a base de partículas submicrónicas de polímero PO biodegradable, hidrosoluble seleccionado del grupo que consiste en poliaminoácidos, polisacáridos, gelatinas o sus mezclas y portador de grupos hidrófobos (GH), estando asociadas dichas partículas de manera no covalente con dicha interleucina y eventualmente dicho principio activo PA y estando el medio dispersante de la suspensión esencialmente constituido por agua,
- 35
- 40
- caracterizada porque** su concentración en [PO] está fijada en un valor suficientemente elevado para permitir la formación de depósito gelificado in vitro, en presencia por lo menos de una proteína, siendo dicha concentración de [PO] tal que  $[PO] \geq 0,9.C1$ , representando C1 la concentración de "gelificación inducida" de las partículas de PO tal como se mide en una prueba GI tal como se describe en la descripción.
- 45
3. Formulación, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada porque** su concentración en [PO] es tal que:
- 50
- $20.C1 \geq [PO] \geq C1$ ,
  - y más preferentemente  $10.C1 \geq [PO] \geq C1$
- 55
4. Formulación, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada porque** los polímeros modificados hidrófobos PO se seleccionan del grupo que comprende los polisacáridos escogidos del grupo de los pululanos, quitosanos y mucopolisacáridos.
- 60
5. Formulación, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada porque** los grupos hidrófobos (GH) se sitúan lateralmente en la cadena.
6. Formulación, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada porque** el polímero (PO) es un poliaminoácido formado por unidades de ácido aspártico y/o unidades de ácido glutámico, siendo al menos una parte de estas unidades portadora de injertos que comprenden al menos un grupo hidrófobo (GH).
- 65

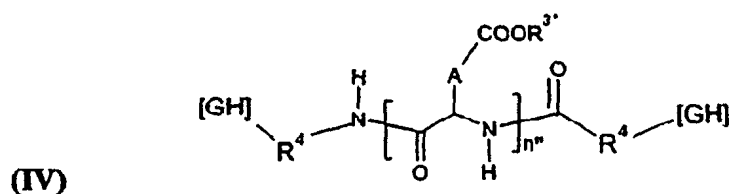
7. Formulación, según la reivindicación 6, **caracterizada porque** el (los) PO ha(n) sido definido(s) mediante la fórmula general (I) siguiente:



- 5 en la que:
- R<sup>1</sup> representa un H, un alquilo lineal en C2 a C10 o ramificado en C3 a C10, bencilo, una unidad de aminoácido terminal o -R<sup>4</sup>-[GH];
  - 10 ■ R<sup>2</sup> representa un H, un grupo acilo lineal en C2 a C10 o ramificado en C3 a C10, un piroglutamato o -R<sup>4</sup>-[GH];
  - R<sup>3</sup> es un H o una entidad catiónica preferentemente seleccionada del grupo que comprende:
    - los cationes metálicos ventajosamente elegidos del subgrupo que comprende: el sodio, el potasio, el calcio, el magnesio,
    - 15 - los cationes orgánicos ventajosamente elegidos del subgrupo que comprende:
      - los cationes a base de amina,
      - los cationes a base de oligoamina,
      - los cationes a base de poliaminas (siendo la polietilenimina particularmente preferida),
      - 20 • los cationes a base de aminoácido(s) ventajosamente elegidos en la clase que comprende los cationes a base de lisina o de arginina,
    - o los poliaminoácidos catiónicos ventajosamente elegidos del subgrupo que comprende la polilisina o la oligolisina;
  - 25 ■ R<sup>4</sup> representa una unión directa o un "separador" a base de 1 a 4 unidades de aminoácido;
  - A representa independientemente un radical -CH<sub>2</sub>- (unidad de ácido aspártico) o -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- (unidad de ácido glutámico);
  - 30 ■ n/(n+m) se define como la tasa de injerto molar y varía de 0,5 a 100% molar;
  - n/(n+m) se ha definido como el índice de injerto molar y su valor es suficientemente bajo para que PO puesto en suspensión en agua de pH 7 y 25°C forme una suspensión coloidal de partículas submicrónicas de PO, preferentemente n/(n+m) está comprendido entre 1 a 25% molar y mejor todavía entre 1 y 15% molar;
  - n + m varían de 10 a 1000, preferentemente entre 50 y 300;
  - 35 ■ GH representa un grupo hidrófobo.
8. Formulación, según la reivindicación 6, **caracterizada porque** el (o los) PO responde(n) a una de las fórmulas generales (II), (III) y (IV) siguientes:

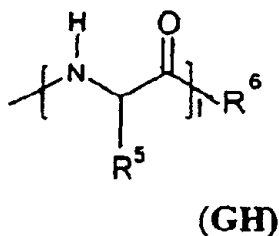


40



en las que:

- 5 ■ GH representa un grupo hidrófobo;  
 ■ R<sup>30</sup> es un grupo alquilo lineal en C2 a C6;  
 ■ R<sup>3</sup> es un H o una entidad catiónica, preferentemente seleccionada del grupo que comprende:
- 10 - cationes metálicos ventajosamente elegidos del subgrupo que comprende: sodio, potasio, calcio, magnesio,  
 - cationes orgánicos ventajosamente elegidos del subgrupo que comprende:
- 15 • cationes a base de amina,  
 • cationes a base de oligoamina,  
 • cationes a base de poliamina (siendo la polietilenimina particularmente preferida),  
 • cationes a base de aminoácido(s) ventajosamente elegidos en la clase que comprende los cationes a base de lisina o de arginina,
- o los poliaminoácidos catiónicos ventajosamente elegidos del subgrupo que comprende la polilisina o la oligolisina;
- 20 ■ R<sup>50</sup> es un grupo alquilo, dialcoxi o diamina en C2 a C6;  
 ■ R<sup>4</sup> representa una unión directa o un “separador” a base de 1 a 4 unidades de aminoácido;  
 ■ A representa independientemente un radical –CH<sub>2</sub>– (unidad de ácido aspártico) o –CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>– (unidad de ácido glutámico);
- 25 ■ n' + m' o n” se ha definido como el grado de polimerización y varía de 10 a 1000, preferentemente entre 50 y 300.
9. Formulación, según la reivindicación 7 u 8, **caracterizada porque** los n grupos GH del PO representan cada uno independientemente entre sí un radical monovalente de fórmula siguiente:



- 30 en la que:
- 35 - R<sup>5</sup> representa metilo (alanina), isopropilo (valina), isobutilo (leucina), secbutilo (isoleucina), bencilo (fenilalanina);  
 - R<sup>6</sup> representa un radical hidrófobo que comprende de 6 a 30 átomos de carbono;  
 - 1 varía de 0 a 6.
- 40 10. Formulación, según la reivindicación 9, **caracterizada porque** todo o parte de los radicales hidrófobos R<sup>6</sup> de los PO se eligen de manera independiente del grupo de radicales que comprende:
- 45 ■ un alcoxi lineal o ramificado que comprende de 6 a 30 átomos de carbono y que puede comprender al menos un heteroátomo (preferentemente O y/o N y/o S) y/o al menos una insaturación,  
 ■ un alcoxi que comprende de 6 a 30 átomos de carbono y que tiene uno o más carbociclos anulares y que contiene eventualmente al menos una insaturación y/o al menos un heteroátomo (preferentemente O y/o N y/o S),  
 ■ un alcoxiarilo o un ariloxialquilo de 7 a 30 átomos de carbono y que puede comprender al menos una insaturación y/o al menos un heteroátomo (preferentemente O y/o N y/o S).
- 50 11. Formulación, según la reivindicación 9 ó 10, **caracterizada porque** el radical hidrófobo R<sup>6</sup> del injerto del PO procede de un precursor alcohólico elegido del grupo que comprende: el octanol, el dodecanol, el tetradecanol, el hexadecanol, el octadecanol, el oleilalcohol, el tocoferol o el colesterol.

12. Formulación, según la reivindicación 6, **caracterizada porque** el PO está constituido por un homopolímero de alfa-L-glutamato o de ácido alfa-L-glutámico.
- 5 13. Formulación, según la reivindicación 6, **caracterizada porque** el PO está constituido por un homopolímero de alfa-L-aspartato o de ácido alfa-L-aspartico.
14. Formulación, según la reivindicación 6, **caracterizada porque** el PO está constituido por un copolímero de alfa-L-aspartato/alfa-L-glutamato o de ácido alfa-L-aspartico/alfa-L-glutámico.
- 10 15. Formulación, según la reivindicación 14, **caracterizada porque** en el PO la distribución de las unidades de ácido aspártico y/o de ácido glutámico portadoras de injertos que comprenden al menos un motivo GH es tal que el polímero así constituido es aleatorio, o bien de tipo bloque o bien de tipo multibloque.
- 15 16. Formulación, según la reivindicación 1, **caracterizada porque** la masa molar del PO se sitúa entre 2000 y 100.000 g/mol, y preferentemente entre 5000 y 40.000 g/mol.
17. Formulación, según las reivindicaciones 7 y 9, **caracterizada porque** el radical hidrófobo R<sup>6</sup> del injerto de PO procede de un precursor alcohólico formado por el tocoferol y **porque**:
- 20  $\diamond 1\% \leq [n/(n+m)] \times 100 \leq 10\%$   
 $\diamond$  preferentemente  $3,5\% \leq [n/(n+m)] \times 100 \leq 7,5\%$   
 $\diamond$  n + m varía de 100 a 400, preferentemente de 120 a 300.
- 25 18. Formulación, según las reivindicaciones 7 y 9, **caracterizada porque** el radical hidrófobo R<sup>6</sup> del injerto de PO precede de un precursor alcohólico formado por colesterol:
- $\diamond 1\% \leq [n/(n+m)] \times 100 \leq 10\%$   
 $\diamond$  preferentemente  $3,5\% \leq [n/(n+m)] \times 100 \leq 6,5\%$   
 $\diamond$  n + m varía de 100 a 400, preferentemente de 120 a 300.
- 30 19. Formulación, según la reivindicación 17 ó 18, **caracterizada porque** la concentración de polímero [PO] está comprendida entre 15 y 50 mg/ml.
- 35 20. Formulación, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, **caracterizada porque** su viscosidad a 20 °C es inferior o igual a 5 Pa.s.
- 40 21. Formulación, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, **caracterizada porque** su fracción másica en interleucina(s) no asociada(s) a las partículas submicrónicas [interleucina(s) no asociada(s)] en % en peso es tal que:
- $\circ$  [interleucina(s) no asociada(s)]  $\leq 1$   
 $\circ$  preferentemente [interleucina(s) no asociada(s)]  $\leq 0,5$ .  
 $\circ$  y más preferentemente [interleucina(s) no asociada(s)]  $\leq 0,1$ .
- 45 22. Formulación, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, **caracterizada porque** la interleucina es interleucina 2.
- 50 23. Formulación, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, **caracterizada porque** el (o los) principio(s) activo(s) suplementario(s) distinto de la (o las) interleucina(s) es una proteína, una glicoproteína, una proteína unida a una o varias cadenas de polialquilenglicol [preferentemente polietilenglicol (PEG): "proteína-PEGilada"], un polisacárido, un liposacárido, un oligonucleótido, un polinucleótido o un péptido, siendo seleccionado(s) este (o estos) principio(s) activo(s) suplementario(s) preferentemente entre las hemoglobinas, citocromas, albúminas, interferones, citocinas, antígenos, anticuerpos, eritropoyetina, insulina, hormonas de crecimiento, factores VIII y IX, factores estimulantes de la hematopoyesis o sus mezclas.
- 55 24. Formulación, según cualquiera de las reivindicaciones 1-23, **caracterizada porque** es inyectable por vía parenteral, subcutánea, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, intracerebral o en un tumor.
- 60 25. Formulación, según cualquiera de las reivindicaciones 1-24, **caracterizada porque** se destina a la preparación de medicamentos, en particular para la administración parenteral, subcutánea, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, intracerebral o en un tumor, incluso por vía oral, nasal, vaginal u ocular.
- 65 26. Procedimiento de preparación de medicamentos, en particular para la administración parenteral, subcutánea, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, intracerebral o en un tumor, incluso por vía oral, nasal, vaginal u ocular, **caracterizado porque** consiste esencialmente en realizar al menos una formulación, según cualquiera de las

reivindicaciones 1 a 25.

5 27. Producto derivado, **caracterizado porque** comprende unas partículas submicrónicas, formadas por asociaciones no covalentes PO/PA tales como se han definido en la reivindicación 1, y **porque** se obtiene a partir de la formulación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25.

28. Producto derivado, según la reivindicación 27, **caracterizado porque** está constituido por un polvo o por un gel.

10 29. Procedimiento de preparación de la formulación, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, **caracterizado porque** consiste esencialmente:

- ◆ en realizar una suspensión coloidal de nanopartículas de al menos un PO,
- ◆ en mezclar esta suspensión coloidal de nanopartículas de PO con al menos una interleucina (y uno o varios otros principios activos eventuales), preferentemente en solución acuosa,
- 15 ◆ en añadir eventualmente al menos un excipiente,
- ◆ si es necesario, en ajustar el pH y/o la osmolaridad, y
- ◆ eventualmente, en filtrar la suspensión así obtenida.

20 30. Procedimiento, según la reivindicación 29, **caracterizado porque** el (o los) PA está(n) en forma de suspensión o de solución acuosa para la mezcla con la suspensión coloidal de nanopartículas de PO.

31. Procedimiento de preparación de la formulación, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, **caracterizado porque** consiste esencialmente:

- 25 ◆ en realizar un polvo de nanopartículas de al menos un polímero PO,
- ◆ en mezclar este polvo con una suspensión o solución acuosa de al menos una interleucina (y uno o varios otros principios activos eventuales), preferentemente en solución acuosa,
- ◆ en añadir eventualmente al menos un excipiente,
- ◆ si es necesario, en ajustar el pH y/o la osmolaridad, y
- 30 ◆ eventualmente, en filtrar la suspensión así obtenida.

32. Procedimiento de preparación de la formulación, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, **caracterizado porque** consiste esencialmente:

- 35 ◆ en realizar un polvo procedente del secado de la formulación líquida, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25,
- ◆ en mezclar este polvo con un medio líquido acuoso, preferentemente bajo agitación,
- ◆ en añadir eventualmente al menos un excipiente,
- ◆ si es necesario, en ajustar el pH y/o la osmolaridad, y
- 40 ◆ eventualmente, en filtrar la suspensión así obtenida

45 33. Procedimiento de preparación de un polvo derivado de la formulación, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, **caracterizado porque** dicho polvo se obtiene mediante secado de la formulación, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25.

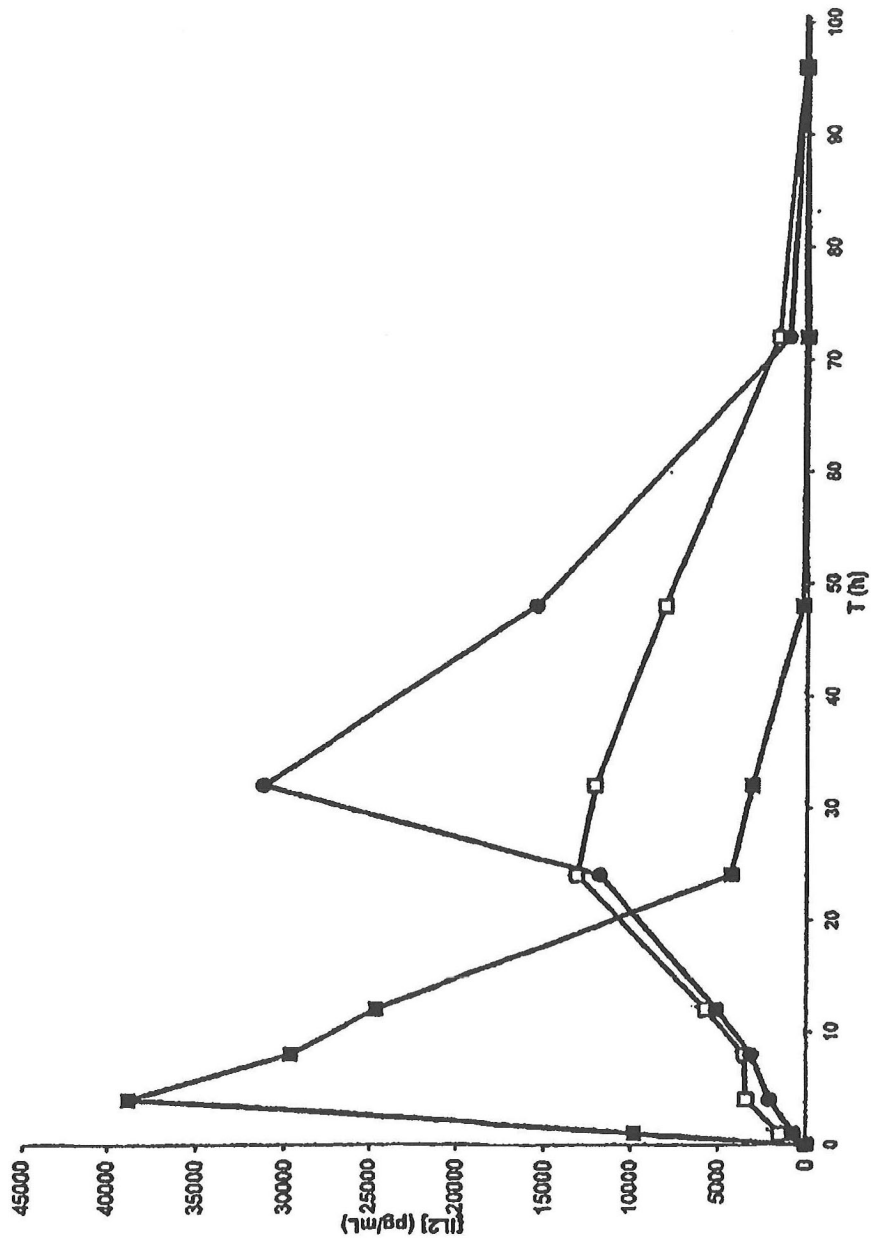


FIG.1