(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 400 687**

(51) Int. Cl.:
A61K 9/52 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2005** **E 05742315 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2013** **EP 1750683**

(54) Título: **Formulaciones de liberación sostenida**

(30) Prioridad:

23.04.2004 US 565247 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.04.2013

(73) Titular/es:

AMGEN INC. (100.0%)
M/S 27-4-A, AMGEN INC., ONE AMGEN CENTER DRIVE
THOUSAND OAKS, CA 91320-1799, US

(72) Inventor/es:

GOLDENBERG, MERRILL, S. y
GU, JIAN HUA

(74) Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 400 687 T3

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

DESCRIPCIÓN

Formulaciones de liberación sostenida

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional estadounidense con número de serie 60/565.247, presentada el 23 de abril de 2004.

Campo de la invención

La presente invención se refiere en líneas generales al campo de las formulaciones de liberación sostenida. Más específicamente, la invención describe composiciones y métodos relacionados con formular proteínas y/o péptidos con ésteres de ácido gálico purificados. En un ejemplo, el éster de ácido gálico es pentagaloilglucosa (PGG), conociéndose el ácido gálico también como ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico y en otro ejemplo el éster de ácido gálico es galato de epigalocatequina (EGCG).

Antecedentes

Para lograr el suministro continuo de la proteína o el péptido *in vivo*, es deseable una formulación de liberación sostenida o de suministro sostenido para evitar la necesidad de administraciones repetidas. Un enfoque de suministro de fármaco sostenido es mediante microencapsulación, en la que el principio activo está encerrado dentro de una membrana polimérica para producir micropartículas.

Se ha mostrado que puede encapsularse un agente biológicamente activo o farmacéuticamente activo dentro de un material formador de pared biocompatible, biodegradable tal como un polímero, para proporcionar liberación sostenida o retardada. En estos métodos el agente o fármaco normalmente se disuelve, dispersa o emulsiona, usando mezcladores, agitadores u otras técnicas de mezclado dinámicas, en uno o más disolventes que contienen el material formador de pared. Se elimina entonces el disolvente dando como resultado la formación de micropartículas que encapsulan el agente o fármaco. Estas micropartículas pueden entonces administrarse a un paciente.

Está bien establecida ahora la importancia de polímeros biocompatibles y/o biodegradables como vehículos para sistemas de suministro de fármaco parenteral. Sustancias biocompatibles, biodegradables y relativamente inertes tales como microesferas o películas de polilactida (PLA) o poli(lactida-co-glicolida) (PLGA) que contienen el agente activo que va a administrarse son dispositivos de liberación sostenida comúnmente utilizados (para revisión, véase M. Chasin, Biodegradable polymers for controlled drug delivery. En: J. O. Hollinger Editor, Biomedical Applications of Synthetic Biodegradable Polymers CRC, Boca Raton, FL (1995), págs. 1-15; T. Hayashi, Biodegradable polymers for biomedical uses. Prog. Polym. Sci. 19 4 (1994), págs. 663-700; y Harjit Tamber, Pål Johansen, Hans P. Merkle y Bruno Gander, Formulation aspects of biodegradable polymeric microspheres for antigen delivery Advanced Drug Delivery Reviews, volumen 57, número 3, 10 de enero de 2005, páginas 357-376).

Sin embargo, todavía existen muchos desafíos con respecto al diseño de sistemas de suministro para agentes activos. Un requisito básico para tales sistemas de suministro es que los materiales usados sean aceptables para aplicación parenteral. Tal como se mencionó anteriormente, es deseable que los materiales usados sean biodegradables para formulaciones destinadas a la administración repetida. Otra cualidad generalmente deseable es la biocompatibilidad: los materiales deberían tolerarse bien y la biodegradación debería producir compuestos inocuos que o bien se eliminan del cuerpo o bien se incorporan al metabolismo intermedio. La lista de materiales generalmente usados para la fabricación de preparaciones parenterales es limitada y es todavía más corta para formulaciones de proteína parenterales.

Otro atributo deseable es el control suficientemente bueno de la liberación del agente activo encapsulado. Generalmente es importante mantener la concentración del agente activo dentro de una ventana eficaz durante un periodo de tiempo suficiente para lograr el efecto deseado y para evitar concentraciones excesivas, que puedan conducir a efectos secundarios o resultados perjudiciales. A menudo es difícil lograr la cinética de liberación deseada con micropartículas monolíticas ya que la fracción del agente activo liberado dentro del primer día tras la administración depende a menudo del nivel de carga del fármaco.

Aún otra característica deseable de tecnologías de suministro sostenido, particularmente cuando se aplica al suministro de macromoléculas, es que la integridad del agente activo se mantenga durante la fabricación. Esto es a menudo un desafío difícil ya que la mayoría de los fármacos de proteína y péptido dependen de una conformación tridimensional para su bioactividad y esa conformación puede comprometerse fácilmente. Por ejemplo, la mayoría de los polímeros que se usan para fabricar preparaciones parenterales de liberación controlada no son solubles en agua y en consecuencia la proteína o el péptido se expone a un disolvente orgánico en la etapa de encapsulación. Ejemplos de otras tensiones no deseadas que están asociadas con la fabricación de preparaciones de liberación controlada que pueden comprometer la integridad de cualquier agente activo particular son fuerzas de cizallamiento altas usadas para formar gotas de la disolución de polímero en una fase continua, exposición a reacciones de polimerización, temperaturas altas y valores de pH indeseablemente bajos o altos.

Otro atributo deseable de las modalidades de liberación sostenida es que la integridad del agente activo,

particularmente proteínas o péptidos, se conserva dentro de las micropartículas durante la liberación. Dependiendo de la duración de liberación elegida, este periodo puede ser de desde algunos días hasta varios meses. Para sistemas de matriz de polímero convencionales formados de PLGA el microentorno ácido formado durante la biodegradación del polímero puede degradar agentes activos incorporados al mismo durante la incubación *in vitro* e *in vivo*.

La técnica anterior describe diversas composiciones de suministro sostenido y métodos para prepararlas, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 5.916.597; 5.019.400; 5.922.253; y 6.531.154. La liberación *in vivo* de agentes activos incorporados de polímeros biocompatibles y biodegradables es, en muchos casos, inicialmente alta o baja, y por tanto no uniforme a lo largo de la vida del dispositivo de suministro. Adicionalmente, la microencapsulación con polímeros tiende a proporcionar un suministro sostenido de péptidos a largo plazo que oscila entre dos semanas y nueve meses o más prolongada mientras que existe una necesidad de perfiles de suministro a más corto plazo para determinados medicamentos. Por tanto, existe la necesidad en la técnica de composiciones de liberación sostenida con perfiles de liberación inferiores a aproximadamente una semana o dos.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un complejo de liberación sostenida estable compuesto por una proteína y/o un péptido y un éster de ácido gálico que permite el suministro sostenido de la proteína o el péptido *in vivo* tras la administración del complejo. Por consiguiente, el complejo de la invención puede permitir el suministro continuo de un péptido farmacéuticamente activo a un sujeto durante periodos de tiempo inferiores a aproximadamente una o dos semanas.

El complejo de la invención se forma combinando una proteína o un péptido y un éster de ácido gálico en condiciones tales que se forma un complejo. En una realización preferida, el complejo es una sal del éster de ácido gálico y proteína o péptido. El complejo es normalmente poco soluble en agua y puede purificarse a partir de diversas disoluciones acuosas. Como el complejo está en forma de un sólido (por ejemplo, una pasta, gránulos, un polvo o un liofilizado), el complejo puede prepararse para la administración a un sujeto como suspensión líquida estable o dispersión semisólida.

En una realización de la invención, el grupo adecuado para su uso en la formación de un complejo con un péptido o una proteína es un éster de ácido gálico. Preferiblemente, el propio éster está formado por un enlace del grupo ácido de ácido gálico a un resto de alcohol en otro compuesto tal como un azúcar. En una realización particular, el éster de ácido gálico es pentagaloilglucosa (PGG), conociéndose el ácido gálico también como ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico. En otra realización, el éster de ácido gálico es galato de epigalocatequina (EGCG).

Descripción detallada

La presente invención se refiere a composiciones que comprenden un complejo de liberación sostenida compuesto por una proteína o un péptido y un éster de ácido gálico, a métodos de preparación de tales composiciones y a métodos de uso de tales composiciones. Aunque los ésteres de ácido gálico son un componente conocido del ácido tánico, no se ha descrito el uso de un componente altamente purificado de ácidos tánicos tal como ésteres de ácido gálico particulares para preparar una sal con péptidos y polipéptidos para crear una formulación de liberación sostenida tal como se describe en el presente documento. Las ventajas de las composiciones de la invención incluyen el suministro de la parte de péptido o proteína del complejo, de manera o bien sistémica o bien local, durante un periodo controlado (por ejemplo, normalmente inferior a aproximadamente una o dos semanas). También se contempla el suministro durante periodos de tiempo más largos.

Tal como se usan en el presente documento, se entiende que los términos “proteína” y “péptido” incluyen polímeros de aminoácidos unidos mediante enlaces amida. Normalmente, un péptido estará compuesto por menos de aproximadamente 50 aminoácidos, más normalmente menos de aproximadamente 30 residuos de aminoácido e incluso más normalmente, menos de aproximadamente 20 residuos de aminoácido. Mientras que una proteína estará compuesta normalmente por más de 50 aminoácidos y tendrá estructura y actividad biológica. La actividad biológica de la proteína puede ser enzimática o puede ser una actividad de unión que confiere cambios de conformación. Estos términos pretenden abarcar adicionalmente análogos y derivados que imiten la estructura química de los componentes de la proteína o los péptidos. Los ejemplos de análogos incluyen péptidos o proteínas que contienen uno o más aminoácidos no naturales. Los ejemplos de derivados incluyen péptidos o proteínas que contienen cadena(s) lateral(es) de aminoácidos, estructura principal peptídica y/o extremo amino o carboxiloterminal que se han derivatizado.

Los péptidos adecuados para la formulación según la invención incluyen pero no se limitan a enfuvirtida (vendido por Trimeris y Roche como Fuzeon®), angiotensina, amilina, ACTH, sustrato de renina, amida de cecropina A-melitina, cecropina B, magainina 1, péptido inhibidor de renina, bombesina, osteocalcina, bradicinina, péptido inhibidor de B1, antagonistas de péptido de bradicinina, incluyendo los antagonistas de péptido de bradicinina dados a conocer en la solicitud de patente estadounidense n.º 10/972.236, presentada el 21 de octubre de 2004, calidina, calcitonina, colecistocinina, factor de liberación de corticotropina, dinorfina A, endomorfina, sarafotoxina, encefalina, exendina, fibrinopéptido, galanina, gastrina, péptido de liberación de gastrina, péptido similar a glucagón, factor de liberación

de hormona del crecimiento, péptido OVA, hormona de liberación de hormona luteinizante, péptido natriurético auricular, hormona de concentración de melanina, péptido natriurético cerebral, vasonatrina, neurocinina, neuromedina, neuropéptido Y, neurotensina, orexina, oxitocina, vasopresina, péptido de hormona paratiroidea, péptido de liberación de prolactina, somatostatina, análogo de inhibición de tumor de somatostatina, hormona de liberación de tirotropina, y variantes y derivados de los mismos (véase también, Latham, (1999) Nat. Biotech., 17: 755).

Las proteínas que pueden formularse según la invención incluyen, pero no se limitan a, ligando Flt3, ligando CD40, eritropoyetina, trombopoyetina, calcitonina, ligando Fas, ligando para activador de receptor de NF-kappa B (RANKL), ligando que induce apoptosis relacionada con TNF (TRAIL), ORK/Tek, linfopoyetina derivada de estroma tímico, factor de estimulación de colonias de granulocitos, factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos, factor de crecimiento de mastocitos, factor de crecimiento de células madre, factor de crecimiento epidérmico, RANTES, hormona del crecimiento, insulina, insulinotropina, factores de crecimiento similares a insulina, hormona paratiroidea, factores de crecimiento nerviosos, glucagón, interleucinas 1 a 18, factores de estimulación de colonias, linfotoxina-β, factor de necrosis tumoral, factor de inhibición de leucemia, oncostatina-M y diversos ligandos para moléculas de superficie celular Elk y Hek (tales como los ligandos para cinasas relacionadas con eph o LERKS). Descripciones de preparación de tales proteínas pueden encontrarse en, por ejemplo, Human Cytokines: Handbook for Basic and Clinical Research, vol. II (Aggarwal y Gutterman, Eds. Blackwell Sciences, Cambridge MA, 1998); Growth Factors: A Practical Approach (McKay y Leigh, Eds. Oxford University Press Inc., Nueva York, 1993) y The Cytokine Handbook (AW Thompson, ed.; Academic Press, San Diego CA; 1991).

También pueden formularse según la invención receptores para cualquiera de las proteínas mencionadas anteriormente, siempre que sean partes solubles de la molécula adecuadas para su administración a un sujeto. Los ejemplos incluyen los receptores para ambas formas de receptor de factor de necrosis tumoral (denominadas p55 y p75), receptores de interleucina-1 (tipo 1 y 2), receptor de interleucina-4, receptor de interleucina-15, receptor de interleucina-17, receptor de interleucina-18, receptor de factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos, receptor de factor de estimulación de colonias de granulocitos, receptores para oncostatina-M y factor de inhibición de leucemia, activador de receptor de NF-kappa B (RANK), receptores para TRAIL y receptores que comprenden dominios de muerte, tales como Fas o receptor de inducción de la apoptosis (AIR). Un receptor particularmente preferido es una forma soluble del receptor de IL-1 tipo II; tales proteínas se describen en la patente estadounidense n.º 5.767.064, incorporada en el presente documento como referencia en su totalidad.

Otras proteínas que pueden formularse según la invención incluyen variantes solubles de grupos de antígenos de diferenciación (denominados proteínas CD), por ejemplo, los dados a conocer en Leukocyte Typing VI (Proceedings of the VIth International Workshop and Conference; Kishimoto, Kikutani *et al.*, Eds. Kobe, Japón, 1996), o moléculas CD dadas a conocer en talleres posteriores. Los ejemplos de tales moléculas incluyen CD27, CD30, CD39, CD40; y ligandos de las mismas (ligando CD27, ligando CD30 y ligando CD40). Varias de éstas son miembros de la familia de receptores de TNF, que también incluye 41BB y OX40; los ligandos son a menudo miembros de la familia de TNF (como lo son el ligando 41BB y el ligando OX40); por consiguiente, los miembros de las familias de TNF y TNFR también pueden producirse usando la presente invención.

También pueden formularse proteínas enzimáticamente activas según la invención. Los ejemplos incluyen miembros de la familia metaloproteinasa-desintegrina, diversas cinasas, glucocerebrosidasa, alfa-galactosidasa A, superóxido dismutasa, activador de plasminógeno tisular, factor VIII, factor IX, apolipoproteína E, apolipoproteína A-I, globinas, un antagonista de IL-2, alfa-1 antitripsina, enzima de conversión de TNF-alfa y numerosas otras enzimas. También pueden formularse ligandos para proteínas enzimáticamente activas aplicando la presente invención.

Las composiciones y métodos inventivos son también útiles para la formulación de otros tipos de proteínas, incluyendo moléculas de inmunoglobulina o partes de las mismas, y anticuerpos quiméricos (es decir, un anticuerpo que tiene una región constante humana se acopla a una región de unión de antígeno murina) o fragmentos de los mismos. Se conocen numerosas técnicas mediante las que pueden manipularse moléculas de inmunoglobulina que codifican para ADN para producir ADN que pueden codificar para proteínas recombinantes tales como anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos con afinidad potenciada u otras proteínas basadas en anticuerpo (véase, por ejemplo, Larrick *et al.*, 1989, Biotechnology 7: 934-938; Reichmann *et al.*, 1988, Nature 332: 323-327; Roberts *et al.*, 1987, Nature 328: 731-734; Verhoeyen *et al.*, 1988, Science 239: 1534-1536; Chaudhary *et al.*, 1989, Nature 339: 394-397). El término anticuerpo humanizado también abarca anticuerpos de cadena sencilla. Véanse, por ejemplo, Cabilly *et al.*, patente estadounidense n.º 4.816.567; Cabilly *et al.*, patente europea n.º 0.125.023 B1; Boss *et al.*, patente estadounidense n.º 4.816.397; Boss *et al.*, patente europea n.º 0.120.694 B1; Neuberger, M. S. *et al.*, documento WO 86/01533; Neuberger, M. S. *et al.*, patente europea n.º 0.194.276 B1; Winter, patente estadounidense n.º 5.225.539; Winter, patente europea n.º 0.239.400 B1; Queen *et al.*, patente europea n.º 0 451 216 B1; y Padlan, E. A. *et al.*, documento EP 0 519 596 A1. Por ejemplo, la invención puede usarse para formular anticuerpos humanos y/o humanizados que reconozcan de manera inmunoespecífica dianas celulares específicas, por ejemplo, cualquiera de las proteínas mencionadas anteriormente, el receptor EGF humano, el antígeno her-2/neu, el antígeno CEA, antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), CD5, CD11a, CD18, NGF, CD20, CD45, Ep-cam, otras moléculas de superficie celular de cáncer, TNF-alfa, TGF-beta1, VEGF, otras citocinas, integrina alfa-4-beta-7, IgE, proteínas virales (por ejemplo, citomegalovirus), etc., por nombrar algunas.

También pueden formularse diversas proteínas de fusión según la invención. Una proteína de fusión es una proteína, o dominio de una proteína (por ejemplo un dominio extracelular soluble) fusionado a una proteína o péptido heterólogo. Los ejemplos de tales proteínas de fusión incluyen proteínas expresadas como fusión con una parte de una molécula de inmunoglobulina, proteínas expresadas como proteínas de fusión con un resto de cremallera y proteínas polifuncionales novedosas tales como proteínas de fusión de una citocina y un factor de crecimiento (es decir, GM-CSF e IL-3, MGF e IL-3). El documento WO 93/08207 y el documento WO 96/40918 describen la preparación de diversas formas oligoméricas solubles de una molécula denominada CD40L, incluyendo una proteína de fusión de inmunoglobulina y una proteína de fusión de cremallera, respectivamente; las técnicas comentadas en esos documentos son aplicables a otras proteínas. Otra proteína de fusión es un TNFR:Fc recombinante, también conocido como “etanercept”. El etanercept es un dímero de dos moléculas de la parte extracelular del receptor de TNF-alfa p75, consistiendo cada molécula en una proteína derivada de TNFR de 235 aminoácidos que se fusiona con una parte Fc de 232 aminoácidos de IgG1 humana. De hecho, cualquiera de las moléculas descritas previamente puede expresarse como proteína de fusión incluyendo, pero sin limitarse a, el dominio extracelular de una molécula receptora celular, una enzima, una hormona, una citocina, una parte de una molécula de inmunoglobulina, un dominio de cremallera y un epítopo.

Tal como se usa en el presente documento, el término “éster de ácido gálico” pretende referirse a una molécula que puede formar un complejo con una proteína o un péptido para formar un complejo de liberación sostenida. En un ejemplo, la molécula de éster de ácido gálico es una pentagaloilglucosa (PGG, también denominada en la técnica 5GG). Se entiende que la molécula de PGG puede tener un grupo galoílo, dos grupos galoílo, tres grupos galoílo o cuatro grupos galoílo. Además, se entiende que la glucosa puede reemplazarse por otra estructura principal de carbono, tal como un alcohol o poliol, por ejemplo, glicerol, etilenglicol o cualquier grupo de azúcar adecuado para su uso. En otro ejemplo, galato de epigalocatequina (EGCG) es la molécula de éster de ácido gálico útil en la invención para preparar una sal con un péptido o una proteína. EGCG es un flavonoide de polifenol antioxidante aislado del té verde. El éster de EGCG se une a una estructura de anillo que no es un azúcar, a diferencia de PGG. Además, se entiende que el éster de ácido gálico puede asumir diferentes formas estereoquímicas. Por ejemplo, PGG puede estar en formas o bien alfa o bien beta. Un experto en la técnica podrá identificar, por las enseñanzas en el presente documento, moléculas de éster de ácido gálico apropiadas para su uso en las composiciones y métodos de la invención.

Tal como se usa en el presente documento, el término “complejo de liberación sostenida” pretende referirse a un complejo física y químicamente estable que se forma tras la combinación apropiada de una proteína o un péptido y éster de ácido gálico descrita en el presente documento. Este complejo normalmente toma la forma de un precipitado que se produce tras la combinación de preparaciones acuosas o no acuosas de la proteína o el péptido y éster de ácido gálico.

Tal como se usa en el presente documento, el término “suministro sostenido” pretende referirse al suministro continuo de un agente farmacéutico *in vivo* a lo largo de un periodo de tiempo tras la administración. El suministro sostenido del agente puede demostrarse mediante, por ejemplo, el efecto terapéutico continuado del agente a lo largo del tiempo. Alternativamente, el suministro sostenido del agente puede demostrarse detectando la presencia del agente *in vivo* a lo largo del tiempo. En una realización, el suministro sostenido es inferior a una semana y puede ser inferior a cuatro días. Sin embargo, también se contempla que el suministro sostenido pueda ser durante periodos más largos que una semana usando las composiciones de la invención, incluyendo más de dos semanas.

La formación de un complejo de PGG o EGCG con un péptido o una proteína a diferentes pH puede afectar al periodo de suministro de fármaco. Tal como se muestra a continuación en los ejemplos 4 y 5, la formación de un complejo de PGG con un péptido a pH 7,0 da como resultado una duración más larga en el suero del complejo, es decir, aproximadamente una semana, que los complejos formados a pH 7,6 y pH 8,6, es decir, inferior a una semana. Por tanto, es una realización de la invención que la duración de suministro de fármaco esté controlada en parte por el pH al que se forma el complejo. Un intervalo de pH representativo es de 6,0 a 9,0, y los intervalos de pH de 6,5 a 8,6, pH de 7,0 a 8,6 también son adecuados. Un experto en la técnica entendería fácilmente que otros pH pueden ser adecuados y, dadas las enseñanzas de la invención, no es más que experimentación de rutina determinar qué pH se adecúa mejor al perfil de suministro de fármaco deseado de un complejo de fármaco particular con los ésteres de ácido tánico de la invención.

Un aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un complejo de liberación sostenida de un agente farmacéuticamente activo tal como una proteína o un péptido y un éster de ácido gálico. Las composiciones farmacéuticas de la invención permiten el suministro sostenido de una proteína o un péptido a un sujeto *in vivo* tras administrar la composición al sujeto, en la que la duración del suministro sostenido puede variarse dependiendo de la solubilidad del complejo de péptido y éster de ácido gálico. Por ejemplo, en una realización, el complejo de liberación sostenida proporciona el suministro sostenido de un agente farmacéuticamente activo a un sujeto durante menos de una semana después de administrar al sujeto una composición farmacéutica de la invención. En otra realización, el complejo de liberación sostenida proporciona el suministro sostenido de una proteína o un péptido a un sujeto durante menos de cuatro días. Las formulaciones que proporcionan un suministro sostenido durante duraciones más largas o más cortas también están abarcadas por la invención, tales como formulaciones que proporcionan un suministro continuo durante 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días o una semana y similares. Del mismo modo, se contempla que estas composiciones puedan formularse de modo que

proporcionen un suministro de fármaco continuo durante más de una semana, y hasta dos semanas, o más.

Cualquier tamaño de cadena de aminoácido puede ser adecuado para su uso en el complejo siempre que la proteína o el péptido tenga la capacidad para formar un complejo no covalente de liberación sostenida con el éster de ácido gálico tras la combinación de los dos.

Además del complejo de liberación sostenida, las formulaciones farmacéuticas de la invención pueden comprender vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables adicionales. Tal como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retardo de la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. Preferiblemente, el vehículo es adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea o parenteral (por ejemplo, mediante inyección). Los excipientes incluyen estabilizantes y disgregantes farmacéuticamente aceptables.

Además de formulaciones farmacéuticas de péptidos complejados con un éster de ácido gálico, la invención abarca además formulaciones envasadas que contienen tales complejos y jeringas que contienen tales complejos. En otra realización, la invención proporciona una jeringa que tiene una luz, en la que un complejo de liberación sostenida de una proteína o un péptido y un éster de ácido gálico está incluido en la luz.

El complejo de la invención se prepara combinando la proteína o el péptido y el éster de ácido gálico en condiciones tales que se forma un complejo de liberación sostenida de la proteína o el péptido y el éster de ácido gálico. Por consiguiente, otro aspecto de la invención se refiere a métodos para preparar formulaciones farmacéuticas. En una realización, el método comprende proporcionar una proteína o un péptido y un éster de ácido gálico, combinar la proteína o el péptido y el éster de ácido gálico en condiciones tales que se forma un complejo de la proteína o el péptido y el éster de ácido gálico, y preparar una formulación farmacéutica que comprende el complejo.

Por ejemplo, se combinan una disolución de la proteína o el péptido y una disolución del éster de ácido gálico hasta que un complejo de liberación sostenida de la proteína o el péptido y el éster de ácido gálico precipite de la disolución. En determinadas realizaciones, las disoluciones de la proteína o el péptido y el éster de ácido gálico son disoluciones acuosas. Las cantidades de proteína o péptido y éster de ácido gálico necesarias para lograr el complejo de liberación sostenida pueden variar dependiendo de la proteína o péptido particular y éster de ácido gálico usados, el/los disolvente(s) particular(es) usado(s) y/o el procedimiento usado para lograr el complejo. A menudo, la proteína o el péptido también estará en exceso en peso/peso, tal como se demuestra en los ejemplos.

Una vez que el complejo de proteína o péptido/éster de ácido gálico precipita de la disolución, el precipitado puede retirarse de la disolución mediante medios conocidos en la técnica, tales como filtración, centrifugación y similares. Entonces puede secarse el material recuperado y puede molerse o pulverizarse el sólido para dar un polvo mediante medios conocidos en la técnica. Alternativamente, la pasta puede congelarse y liofilizarse hasta sequedad. La forma de polvo del complejo puede dispersarse en una disolución de vehículo para formar una suspensión líquida o dispersión semisólida adecuada para inyección. Por consiguiente, en diversas realizaciones, una formulación farmacéutica de la invención es un sólido liofilizado, una suspensión líquida o una dispersión semisólida.

En otra realización, la formulación farmacéutica de la invención es una formulación estéril. Por ejemplo, tras la formación del complejo de liberación sostenida, el complejo puede esterilizarse mediante irradiación gamma o esterilización por haz de electrones. Las formulaciones farmacéuticas, incluyendo polvos, suspensiones líquidas, dispersiones semisólidas, sólidos liofilizados y formas esterilizadas de los mismos (por ejemplo, mediante irradiación gamma o filtración estéril), preparadas según los métodos de la invención, también están abarcadas por la invención.

Tal como se usa en el presente documento, el término "sujeto" pretende incluir animales de sangre caliente, preferiblemente mamíferos, lo más preferiblemente seres humanos.

Tal como se usa en el presente documento, el término "administrar a un sujeto" pretende referirse a dispensar, suministrar o aplicar una composición (por ejemplo, formulación farmacéutica) a un sujeto mediante cualquier vía adecuada para el suministro de la composición a la ubicación deseada en el sujeto, incluyendo suministro por vía o bien parenteral o bien oral, inyección intramuscular, inyección subcutánea/intradérmica, inyección intravenosa, administración bucal, suministro transdérmico y administración por vía rectal, colónica, vaginal, intranasal o del tracto respiratorio.

Los siguientes ejemplos son realizaciones meramente representativas y no pretenden limitar el alcance completo de la invención.

Ejemplo 1

El ejemplo 1 proporciona una descripción de una preparación de sal de péptido B-PGG (razón molar 1:1 de péptido B (DOrn Lys Arg Pro Hyp Gly Cpg Ser Dtic Cpg) con respecto a PGG). Se preparó una disolución madre de PGG disolviendo 94 mg de PGG en 2 ml de disolución de NaOH (concentración de NaOH desde 0,10 hasta 0,20 N) filtrándola posteriormente a través de un filtro de 0,2 μm. A una disolución madre de PGG (1,56 ml) se le añadió

secuencialmente una disolución de 109,4 mg de sal de acetato de péptido B en 0,8 ml de agua con agitación y se formó un precipitado. Se recuperó el precipitado mediante centrifugación.

Se decantó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 0,5 ml de agua 3 veces. Se secó el precipitado a vacío a aproximadamente 30-35ºC durante aproximadamente 20 horas para producir 125 mg (76%). La sal de péptido B-PGG era un polvo blanquecino.

Ejemplo 2

Se prepararon sales de péptido A-PGG y tanato de manera similar al péptido B-PGG en el ejemplo 1. El péptido A era Acetil Lys Lys Arg Pro Hyp Gly Cpg Ser Dtic Cpg.

Ejemplo 3

Las tablas 1 y 2 a continuación enumeran el contenido en péptidos y la solubilidad de las sales de péptido A (Acetil Lys Lys Arg Pro Hyp Gly Cpg Ser Dtic Cpg) y péptido B (DOrn Lys Arg Pro Hyp Gly Cpg Ser Dtic Cpg) con tanato y PGG en agua y PBS. Los datos mostraron que la sal de péptido y PGG tiene un mayor contenido en péptidos que el tanato. Los precipitados de PGG tienen una mayor solubilidad de PBS que el tanato.

Ejemplo 4

Se investigó el estudio del efecto del pH de formación de sal (es decir nivel de concentración de NaOH) sobre el rendimiento, contenido en péptidos y solubilidad de la sal de péptido B-PGG. Se prepararon y aislaron cuatro sales de péptido B-PGG a pH 7,0, 7,2, 7,6 y 8,6. Se determinó entonces su solubilidad en agua y PBS, y además su contenido en péptidos. Estos resultados demuestran (tabla 3) que la solubilidad acuosa, rendimiento de formación de sal y contenido en péptidos aumentan con el aumento del pH durante la formación de sal.

Ejemplo 5

Este ejemplo describe la liberación sostenida de sales de péptido B/PGG y péptido B/tanato en ratas. Se realizaron los estudios farmacocinéticos (PK) de rata mediante una inyección subcutánea individual (10 mg/kg de dosis) de sales de péptido B/PGG y sal de péptido B/tanato suspendidas en tampón TRIS; y una disolución de PBS de acetato de péptido B como grupo control. Los resultados de PK mostraron liberación sostenida de una semana para la sal de péptido B/tanato y la sal de péptido B-PGG que se preparó a pH 7,0. Sin embargo, las sales de péptido B-PGG preparadas a pH 7,6 y 8,6 mostraron una duración de liberación más corta (alrededor de 2-3 días) en comparación con la sal preparada a pH 7,0 (hasta dos semanas).

Ejemplo 6

Se prepararon un anómero puro (beta-PGG) y una mezcla de anómeros (alfa + beta-PGG) de sales de PGG de péptido B (DOrn Lys Arg Pro Hyp Gly Cpg Ser Dtic Cpg) mediante un método similar al descrito en el ejemplo 1. No hubo diferencia significativa en la solubilidad acuosa de estas sales. Basándose en la solubilidad acuosa, se espera que la duración de liberación sostenida *in vivo* para estas sales sea similar.

Ejemplo 7

El siguiente ejemplo describe el uso de EGCG para preparar una sal con un péptido, que se sometió a prueba en un estudio farmacocinético (PK) animal para determinar la liberación sostenida. Se preparó una disolución madre de EGCG (Sigma-Aldrich) disolviendo 184 mg de EGCG en 2 ml de NaOH 0,2 N filtrándola posteriormente a través de un filtro de 0,2 μm. A una disolución madre de EGCG (1,4 ml) se le añadió lentamente una disolución de 138 mg de sal de acetato de péptido B (DOrn Lys Arg Pro Hyp Gly Cpg Ser Dtic Cpg) en 1,2 ml de agua con agitación. Se agitó la suspensión resultante durante aproximadamente 10-15 minutos a temperatura ambiente. Tras la centrifugación, se decantó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 1 ml de agua (3 veces mediante centrifugación y decantación del sobrenadante). Se secó el precipitado a vacío a aproximadamente 30-35ºC durante aproximadamente 20 horas para producir 218 mg (88%) de sal de péptido B-EGCG como un polvo blanquecino.

El contenido en péptidos de las sales de péptido B/EGCG fue del 47-50%. La solubilidad acuosa para la sal con razón molar 1:3 de péptido con respecto a EGCG es $<$ 0,5 mg/ml en agua y $<$ 0,05 mg/ml en PBS, y para la razón molar 1:2 de péptido con respecto a EGCG, la solubilidad es de aproximadamente 1 mg/ml en agua y aproximadamente 0,3 mg/ml en PBS. Se realizó un estudio PK en ratas usando una inyección s.c. individual (10 mg/kg de dosis) de sal de ‘593/EGCG suspendida en tampón TRIS, pH 7,0. El resultado de PK mostró liberación sostenida de péptido B durante múltiples días con el nivel de sangre $>$ 26 ng/ml a las 24 horas, luego una disminución hasta aproximadamente 5 ng/ml a las 96 horas.

Tabla 1. Precipitados de péptido A

Nombre de la sal	Rendimiento (%)	Pureza de péptido (%)	Contenido en péptidos (%)	Pureza de sal conjugada (%)	Solubilidad de péptido (mg/ml) a TA	
					H_2O	PBS
PGG	~ 78	> 98	50	> 97% ($\alpha + \beta$)	~ 0,03	~ 0,2
Tanato	~ 75	> 98	32	N/A	~ 0,01	~ 0,05

Tabla 2. Precipitados de péptido B

Nombre de la sal	Rendimiento (%)	Pureza de péptido (%)	Contenido en péptidos (%)	Pureza de sal conjugada (%)	Solubilidad de péptido (mg/ml) a TA	
					H_2O	PBS
PGG	~ 75	> 98	44	> 97% ($\alpha + \beta$)	~ 0,2	~ 0,08
Tanato	~ 75	> 98	28	N/A	~ 0,2	~ 0,01

Tabla 3. Precipitados de péptido B formados a diferentes pH

Sales	Condición de formación de sal			Rendimiento (%)	Contenido en péptidos (%)	Péptido B (mg/ml)	
	Conc. de PGG	Conc. de NaOH	pH			En H_2O	En PBS
Péptido B-PGG	0,05 M	0,10 N	7,0	Aprox. 70	46,5	Aprox. 0,2	Aprox. 0,08
Péptido B-PGG	0,05 M	0,12 N	7,2	Aprox. 75	50,0	Aprox. 0,1	Aprox. 0,15
Péptido B-PGG	0,05 M	0,15 N	7,6	Aprox. 92	53,0	< 0,1	Aprox. 0,2
Péptido B-PGG	0,05 M	0,20 N	8,6	Aprox. 96	56,5		Aprox. 0,4

REIVINDICACIONES

1. Formulación farmacéutica que comprende un complejo de liberación sostenida de un péptido de menos de 20 aminoácidos y un éster de ácido gálico purificado.

2. Formulación según la reivindicación 1, en la que el complejo es una sal del péptido y el éster de ácido gálico.

3. Formulación según la reivindicación 1, que comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable, un excipiente farmacéuticamente aceptable o ambos.

4. Formulación según la reivindicación 1, en la que el éster de ácido gálico se selecciona del grupo que consiste en pentagaloilglucosa (PGG) y galato de epigalocatequina (EGCG).

5. Formulación según la reivindicación 4, en la que el complejo es una sal del péptido y PGG, y la sal tiene una duración de liberación en un animal inferior a una semana o de una semana.

6. Formulación según la reivindicación 5, en la que el complejo es una sal del péptido y PGG, y la sal tiene una duración de liberación en un animal inferior a 4 días.

7. Formulación según la reivindicación 4, en la que el complejo es una sal del péptido y PGG, y la sal tiene una duración de liberación en un animal de hasta dos semanas.

8. Formulación según la reivindicación 4, en la que el éster de ácido gálico purificado es galato de epigalocatequina (EGCG).

9. Formulación según la reivindicación 1, en la que el péptido en el complejo está en exceso con respecto al éster de ácido gálico purificado en peso/peso.

10. Formulación según la reivindicación 1, en la que dicho péptido es un antagonista de péptido B1.

11. Formulación según la reivindicación 10, en la que dicho péptido se selecciona de i) DOrn Lys Arg Pro Hyp Gly Cpg Ser Dtic Cpg; y ii) Acetil Lys Lys Arg Pro Hyp Gly Cpg Ser Dtic Cpg en la que DOrn es el isómero D de ornitina, Hyp es trans-4-hidroxi-prolina, Dtic es el isómero D de ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico y Cpg es ciclopentilglicina.

12. Método de preparación de una formulación farmacéutica según la reivindicación 1, que comprende combinar un péptido de menos de 20 aminoácidos con un éster de ácido gálico purificado seleccionado de PGG y EGCG, en condiciones tales que se forma un complejo del péptido y el éster de ácido gálico purificado a un pH de desde 6,0 hasta 9,0, y preparar una formulación farmacéutica que comprende el complejo.

13. Método según la reivindicación 12, en el que se combinan una disolución del péptido y una disolución del éster de ácido gálico y el complejo precipita de la disolución combinada.

14. Composición de liberación sostenida que comprende un complejo purificado de un péptido de menos de 20 aminoácidos y un éster de ácido gálico purificado, en la que dicho péptido es un antagonista de péptido B1.

15. Composición según la reivindicación 14, en la que el complejo es una sal del péptido y el éster de ácido gálico.

16. Composición según la reivindicación 14, en la que el éster de ácido gálico se selecciona del grupo que consiste en pentagaloilglucosa (PGG) y galato de epigalocatequina (EGCG).

17. Composición según la reivindicación 14, en la que dicho péptido se selecciona de i) DOrn Lys Arg Pro Hyp Gly Cpg Ser Dtic Cpg; y ii) Acetil Lys Lys Arg Pro Hyp Gly Cpg Ser Dtic Cpg en la que DOrn es el isómero D de ornitina, Hyp es trans-4-hidroxi-prolina, Dtic es el isómero D de ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico y Cpg es ciclopentilglicina.

18. Método de preparación de una composición de liberación sostenida que comprende las etapas de mezclar un péptido antagonista de péptido B1 de menos de 20 aminoácidos con un éster de ácido gálico purificado seleccionado y aislar el precipitado.

19. Método según la reivindicación 18, en el que el precipitado se forma a un pH de desde 6,5 hasta 8,6.

20. Método según la reivindicación 18, en el que el éster de ácido gálico es PGG o EGCG.

21. Composición según la reivindicación 14, en la que el péptido en el complejo está en exceso con respecto al éster de ácido gálico purificado en peso/peso.

22. Composición que comprende un complejo purificado de una proteína y un éster de ácido gálico purificado, en la que la proteína es una inmunoglobulina o parte de la misma o es un anticuerpo quimérico o fragmento del mismo.

23. Método de preparación de un complejo purificado que comprende las etapas de mezclar una proteína con un éster de ácido gálico purificado y aislar el precipitado, en el que la proteína es una inmunoglobulina o parte de la misma o es un anticuerpo quimérico o fragmento del mismo.