

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 679**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/00** (2006.01)

**A61K 47/48** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.07.2007 E 07810318 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.11.2014 EP 2054073**

54 Título: **Composiciones para la administración de liberación controlada de péptidos**

30 Prioridad:

**11.07.2006 US 830011 P**

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

**18.03.2015**

73 Titular/es:

**FORESEE PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)  
215 Ridgeway Road  
Woodside, CA 94062, US**

72 Inventor/es:

**LI, YUHUA y  
CHIEN, BENJAMIN**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 531 679 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

Composiciones para la administración de liberación controlada de péptidos

## Antecedentes de la invención

## 1. Campo de la invención

- 5 Esta invención se refiere al campo de la administración de liberación controlada de péptidos terapéuticos y a composiciones y métodos útiles para la administración de liberación controlada de péptidos terapéuticos covalentemente modificados con una o más moléculas lipófilas o anfífilas.

## 2. Descripción de la técnica relacionada

10 Los péptidos, denominado alternativamente como oligopéptidos, polipéptidos y proteínas, han sido ampliamente utilizados como agentes terapéuticos. Los péptidos pueden ser convenientemente producidos por tecnología de ADN recombinante o pueden sintetizarse por tecnología de síntesis peptídica bien establecida. Sin embargo, muchos péptidos son susceptibles a la degradación enzimática y tienen una semivida de circulación muy corta *in vivo*. Por lo tanto, la mayoría de los medicamentos peptídicos se han administrado mediante inyección, por lo general varias veces al día. Sería muy beneficioso si dichos péptidos pudieran ser administrados de una manera controlada durante períodos prolongados de tiempo para mejorar la seguridad, eficacia y cumplimiento del paciente.

15 Los polímeros biodegradables se han utilizado para la liberación sostenida de péptidos terapéuticos. El péptido se incorpora generalmente en la composición polimérica y se conforma en las formas deseadas tales como varillas, obleas y micropartículas fuera del cuerpo. Estas composiciones sólidas pueden entonces ser insertadas en el cuerpo a través de una incisión o inyección. Alternativamente y preferiblemente, algunas de las composiciones poliméricas se pueden inyectar en el cuerpo como una composición polimérica líquida para formar un implante *in situ*. Composiciones poliméricas líquidas inyectables biodegradables para la formación de implantes para la administración de fármacos *in situ* de forma controlada se describen en la literatura de patentes. Las siguientes referencias se consideran que son representativas en este ámbito: Documentos de patente de Estados Unidos N° 6.565.874; 6.528.080; RE37.950; 6.461.631; 6.395.293; 6.355.657; 6.261.583; 6.143.314; 5.990.194; 5.945.115; 20 5.792.469; 5.780.044; 5.759.563; 5.744.153; 5.739.176; 5.736.152; 5.733.950; 5.702.716; 5.681.873; 5.599.552; 5.487.897; 5.340.849; 5.324.519; 5.278.202; 5.278.201; y 4.938.763. Como se describe en las mismas, un agente bioactivo se disuelve o dispersa en una solución de polímero biodegradable en un disolvente orgánico biocompatible para proporcionar una composición líquida. Cuando se inyecta la composición líquida en el cuerpo, el disolvente se disipa en el entorno acuoso circundante y el polímero precipita para formar un depósito sólido o de gel a partir del cual se libera el agente bioactivo durante un largo período de tiempo a medida que el polímero se degrada. El uso de tal sistema de administración se ejemplifica en la administración del acetato de leuprolida para tratar el cáncer de próstata avanzado (Eligard™). A pesar de cierto éxito, dichos métodos no han sido totalmente satisfactorios para un gran número de péptidos que se podrían administrar de manera eficaz por medio de un enfoque de este tipo.

35 Para muchos péptidos terapéuticos, se han observado acilación y/o degradación de los péptidos encapsulados en microesferas de poli (DL-lactida-co-glicolida) durante el proceso de administración [por ejemplo, *Na DH, Youn YS, Lee SD, Son MO, Kim WA, DeLuca PP, Lee K C. J Control Release. 2003; 92 (3): 291-9*]. Los grupos funcionales nucleófilos de los péptidos no sólo pueden reaccionar con el polímero biodegradable, sino que también pueden catalizar la degradación del polímero biodegradable. También se encontró que la acilación y/o degradación pueden ocurrir mucho más rápido en una solución del polímero que en el estado sólido. Por ejemplo, cuando el acetato de octreotida se mezcló con 50/50 poli (DL-lactida-co-glicolida) en solución de NMP que tiene un grupo terminal carboxi, más del 80% de la octreotida se aciló y/o degradó en 24 horas. La interacción/reacción entre el péptido y el polímero o sus productos de degradación puede producirse durante la formulación, almacenamiento y administración. Por lo tanto, con el fin de mantener la estabilidad de las formulaciones, el péptido se suministra típicamente en una jeringa separada mientras que el resto de los componentes se embalan en otra jeringa. Los contenidos de las jeringas se mezclan justo antes de su uso. Sin embargo, debido a la naturaleza viscosa de las formulaciones poliméricas, a menudo es difícil mezclar los contenidos de las dos jeringas separadas para los usuarios finales. La uniformidad de las formulaciones preparadas por el usuario final puede variar significativamente, también puede ocurrir contaminación y, por tanto, la calidad del tratamiento puede verse comprometida de manera significativa. Además, la formación *in situ* del implante sólido de la formulación polimérica líquida inyectable es un proceso lento. 45 Normalmente, el proceso de difusión/disipación del disolvente puede tardar unas horas hasta varios días o incluso más tiempo, dependiendo del disolvente utilizado. Durante este período, la presencia de disolvente orgánico podría promover la interacción/reacción entre el péptido y el polímero o sus productos de degradación.

55 Además, durante la formación del implante, la tasa de difusión del péptido desde la composición polimérica coagulante puede ser mucho más rápida que la tasa de liberación que se produce desde el implante sólido formado posteriormente. Esta "explosión" inicial de liberación de péptido durante la formación del implante puede originar la pérdida o liberación de una gran cantidad de los péptidos terapéuticos. Si el péptido es particularmente tóxico o tiene

un margen terapéutico estrecho, esta liberación inicial o explosión es probable que conduzca a efectos secundarios tóxicos y puede dañar los tejidos adyacentes. Por lo tanto, el proceso de formación lenta de implante sólido y la inestabilidad de los agentes bioactivos y/o excipientes representan un reto muy significativo en la utilización de este tipo de formulaciones para la administración de liberación sostenida de péptidos terapéuticos.

- 5 La modificación covalente de los péptidos con moléculas lipófilas, tales como los ácidos grasos, ha sido descrita como mejoradora de la eficacia terapéutica mediante el aumento de la semivida de circulación *in vivo* mediante la unión a la albúmina. [Documentos de patente europea EP0708179-A2, EP0699686-A2, documento de patente de Estados Unidos N° 6.268.343, Knudsen LB, Nielsen PF, Huusfeldt PO, Johansen NL, Madsen K, Pedersen FZ, Thogersen H, Wilken M, Agerso H. Potent derivatives of glucagón-like peptide-1 with pharmacokinetic properties suitable for once daily administration. *J Med Chem.* 2000, 43 (9): 1664-9; Kurtzhals P, Havelund S, Jonassen I, Kiehr B, Larsen UD, Ribel U, Markussen J. Albumin binding of insulins acilated with fatty acids: characterization of the ligand-protein interaction and correlation between binding affinity and timing of the insulin effect *in vivo*. *Biochem J.* 1995; 312 (3): 725-31, y referencias allí citadas]. Aunque los péptidos modificados lipofílicamente mostraron una acción prolongada *in vivo* en comparación con los péptidos nativos, el tiempo de residencia en plasma de los péptidos modificados está limitado por su afinidad de unión a la albúmina. Un ejemplo exitoso es una insulina acilada (Detemir) que tiene una semivida de circulación de  $10,2 \pm 1,2$  horas. [Havelund S, Plum A, Ribel U, Jonassen I, Vølund A, Markussen J y Kurtzhals P, *Pharmaceutical Research*, 2004; 21 (8), 1498-1504]. Este producto ha sido aprobado como inyectable para tratar a pacientes con diabetes de tipo I. Sin embargo, todavía se necesita administrarlo a los pacientes todos los días. Por lo tanto, hay una gran necesidad de una composición estable en la que la tasa de administración de ciertos péptidos pueda ser controlada más fácilmente, especialmente para un péptido que requiere la liberación sostenida durante un largo período de tiempo.

En el documento de patente internacional WO 02/098446, se describen conjugados de fármaco-oligómero, en donde el fármaco está unido covalentemente a restos de polialquilenglicol.

- 25 El documento de patente de Estados Unidos US 2002/012942 describe, entre otros, polipéptidos unidos covalentemente a moléculas vehículo que incluyen el polietilenglicol.

El documento de patente internacional WO 02/065985 describe péptidos de insulina que están "conjugados a uno o más restos" para modificar la lipofilidad de la insulina.

### **Compendio de la invención**

- 30 Se ha encontrado inesperadamente que péptidos modificados covalentemente con una o más moléculas lipófilas y/o anfífilas podían ser formulados con polímeros biodegradables lo que causa una estabilidad y perfiles de liberación sostenida significativamente mejorados en relación con los péptidos no conjugados. Péptidos lipofílicamente y/o anfífilicamente modificados no sólo podrían prevenir la acilación aleatoria incontrolada y la degradación de los péptidos durante los procesos de formulación, almacenamiento y posterior liberación *in vivo*, sino que también podrían reducir la liberación en explosión inicial no deseada de los péptidos. Tales sistemas de administración permiten que se incorporen de manera segura concentraciones más altas de un péptido terapéutico en un sistema de suministro de polímero biodegradable. También se mejora la eficacia de tales productos, ya que un porcentaje mucho mayor de péptido activo intacto permanece en el sistema de administración de liberación sostenida y no se pierde por la degradación durante la formulación, almacenamiento, administración y posterior liberación *in vivo*.

- 40 Por consiguiente, la presente invención proporciona formulaciones farmacéuticas novedosas para liberación sostenida y controlada de péptidos terapéuticos. Las composiciones de la presente invención comprenden (a) un péptido que se conjuga covalentemente con una o más molécula (s) lipófila (s); (b) un polímero biodegradable; y (c) un disolvente orgánico farmacéuticamente aceptable. Los péptidos se conjugan de forma covalente con una o más molécula (s) lipófila (s) de tal manera que el péptido conjugado conserva la mayor parte o la totalidad de la actividad biológica del péptido no conjugado, mientras que tiene una resistencia química mejorada a la reacción con el polímero biodegradable, tanto *in vitro* como *in vivo*, en relación con el péptido no conjugado. El péptido lipofílicamente modificado se formula entonces por disolución o dispersión en una solución de polímero biodegradable utilizando un disolvente orgánico farmacéuticamente aceptable. Las formulaciones de la presente invención no sólo mejoran la estabilidad del péptido durante la formulación, almacenamiento, administración y posterior liberación, sino que también mejoran sus perfiles de liberación con niveles de explosión inicial más bajos y duración sostenida.

- 55 En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende (a) un péptido que se conjuga covalentemente con uno o más restos anfífilicos; (b) un polímero biodegradable; y (c) un disolvente orgánico farmacéuticamente aceptable. Los péptidos se conjugan de forma covalente con uno o más restos anfífilicos de una manera tal que el péptido conjugado conserva la mayor parte o la totalidad de la actividad biológica del péptido no conjugado, mientras que tiene una resistencia química mejorada a la reacción con el polímero biodegradable, tanto *in vitro* como *in vivo*, en relación con el péptido no conjugado. El péptido anfífilicamente modificado se formula entonces por disolución o dispersión en una solución de polímero biodegradable utilizando un disolvente orgánico

farmacéuticamente aceptable. Las formulaciones de la presente invención no sólo mejoran la estabilidad del péptido durante la formulación, almacenamiento, administración y posterior liberación, sino que también mejoran sus perfiles de liberación con niveles de explosión inicial más bajos y duración sostenida. El péptido conjugado también reduce la degradación del polímero catalizada por grupos nucleófilos del péptido.

- 5 Cada una de las composiciones de la presente invención puede ser un líquido viscoso o no viscoso, gel o semi-sólido que se mueve como un fluido de manera que se pueda inyectar con una jeringa. Cada composición puede estar formada como una matriz polimérica que se puede implantar *in vitro*, o, alternativamente, se puede formar *in situ* en las formas de un gel o un implante sólido. Las composiciones se pueden administrar por inyección y/o implantación por vía subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, o intradérmica. Cuando se administra a un sujeto, la liberación controlada del péptido puede ser sostenida durante un período de tiempo deseado dependiendo de la composición del implante. Con la selección del polímero biodegradable y otros excipientes, la duración de liberación sostenida del péptido puede ser controlada durante un período de tiempo de varias semanas a un año.

15 Las diversas características de novedad que caracterizan la invención se señalan con particularidad en las reivindicaciones anexas que forman parte de la divulgación. Para una mejor comprensión de la invención, sus ventajas operativas y logros específicos alcanzados por su uso, debe hacerse referencia a los dibujos y materia descriptiva en los que se ilustran y describen realizaciones preferidas de la invención.

### Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Liberación *in vitro* de lisozima y lisozima acilada de ácido palmítico a partir de formulaciones en solución de RG503H en mPEG350.

- 20 Figura. 2. Liberación *in vitro* de la grelina y grelina desacilada a partir de formulaciones en solución de RG503H en mPEG350.

Figura 3. Liberación *in vitro* de la octreotida a partir de la formulación en solución de DLPLG85/15 (IV 0,28) en NMP.

Figura 4. Liberación *in vitro* de la octreotida modificada (Pal-PEG-BA-OCT) de la formulación en solución DLPLG85/15 (IV 0,28) en NMP.

### 25 Descripción detallada de las realizaciones actualmente preferidas

La presente invención proporciona composiciones poliméricas biodegradables líquidas inyectables para la formación de un sistema de administración de liberación controlada para péptidos. La presente invención también proporciona un método de fabricación de las mismas según la reivindicación 17. Las realizaciones preferidas se presentan en las reivindicaciones dependientes.

- 30 Las composiciones de la presente invención comprenden (a) un péptido que se conjuga, preferentemente de forma covalente, con una o más moléculas lipófilas; (b) un polímero biodegradable, insoluble en agua, farmacéuticamente aceptable como se define en la reivindicación 1; y (c) un disolvente orgánico farmacéuticamente aceptable. Los péptidos se conjugan de forma covalente con una o más moléculas lipófilas de tal manera que el péptido conjugado conserva la mayor parte o la totalidad de la actividad biológica del péptido no conjugado, mientras que de esta manera tiene una resistencia química mejorada a la reacción con el polímero biodegradable, tanto *in vitro* como *in vivo*, en relación con el péptido no conjugado. El péptido lipofílicamente modificado se formula entonces por disolución o dispersión en una solución de polímero biodegradable utilizando un disolvente orgánico farmacéuticamente aceptable. Las formulaciones de la presente invención no sólo mejoran la estabilidad del péptido durante la formulación, almacenamiento, administración y posterior liberación, sino que también mejoran sus perfiles de liberación con niveles de explosión inicial más bajos y duración sostenida.

40 En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende (a) un péptido que se conjuga, preferentemente de forma covalente, con una o más moléculas anfífilas; (b) un polímero biodegradable, insoluble en agua, farmacéuticamente aceptable como se define en la reivindicación 1; y (c) un disolvente orgánico farmacéuticamente aceptable. Los péptidos se conjugan de forma covalente con una o más moléculas anfífilas de tal manera que el péptido conjugado conserva la mayor parte o la totalidad de la actividad biológica del péptido no conjugado, mientras que de esta manera tiene una resistencia química mejorada a la reacción con el polímero biodegradable, tanto *in vitro* como *in vivo*, en relación con el péptido no conjugado. El péptido anfífilicamente modificado se formula entonces por disolución o dispersión en una solución de polímero biodegradable utilizando un disolvente orgánico farmacéuticamente aceptable. Las formulaciones de la presente invención no sólo mejoran la estabilidad del péptido durante la formulación, almacenamiento, administración y posterior liberación, sino que también mejoran sus perfiles de liberación con niveles de explosión inicial más bajos y duración sostenida. El péptido conjugado también reduce la degradación del polímero catalizada por grupos nucleófilos del péptido.

50 Tal como se utilizan en este documento, los términos "un", "una" y "uno" están destinados a ser interpretados como "uno o más" y "al menos uno".

El término "péptido" se usa como sinónimo de "polipéptido" y "proteína". Los ejemplos no limitantes de las propiedades terapéuticas que un péptido pueda poseer incluyen propiedades antimetabólicas, antifúngicas, antiinflamatorias, antitumorales, antiinfecciosas, antibióticas, nutrientes, agonistas, y antagonistas.

Más específicamente, los péptidos de la invención pueden ser modificados covalentemente con molécula (s) lipófila (s) o anfifílica (s). Los péptidos contienen preferiblemente uno o más grupos funcionales modificables. Los péptidos útiles en la preparación de las formulaciones de la invención incluyen, pero no se limitan a, la oxitocina, vasopresina, hormona adrenocorticotrópica (ACTH), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), prolactina, hormonas tales como la hormona luteinizante, hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH), agonistas de LHRH, antagonistas de LHRH, hormonas de crecimiento, factor de liberación de la hormona de crecimiento, insulina, eritropoyetina, somatostatina, glucagón, interleuquina, interferón-alfa, interferón-beta, interferón-gamma, gastrina, tetragastrina, pentagastrina, urogastrona, secretina, calcitonina, encefalinas, endorfinas, angiotensinas, hormona liberadora de la tirotropina (TRH), factor de necrosis tumoral (TNF), hormona paratiroidea (PTH), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), heparinasa, factor de crecimiento endotelial vascular (VEG-F), proteína morfogénica ósea (BMP), hANP, péptido similar al glucagón (GLP-1), exenatida, péptido YY (PYY), grelina, renina, bradiquinina, bacitracinas, polimixinas, colistinas, tirocidina, gramicidinas, ciclosporinas, enzimas, citoquinas, anticuerpos, vacunas, antibióticos, anticuerpos, glicoproteínas, hormona estimuladora del folículo, kitorfina, tuftsina, timopoyetina, timosina, timoestimulina, factor tímico humoral, factor tímico del suero, factores estimulantes de colonias, motilina, bombesina, dinorfina, neurotensina, ceruleína, uroquinasa, calicreína, análogos y antagonistas de la sustancia P, angiotensina II, factores de coagulación de la sangre VII y IX, lisozima, gramicidinas, hormona estimulante de los melanocitos, hormona liberadora de la hormona tiroidea, hormona estimulante del tiroides, pancreozimina, colecistoquinina, lactógeno placentario humano, gonadotropina coriónica humana, péptido estimulante de la síntesis de proteínas, péptido inhibidor gástrico, péptido intestinal vasoactivo, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, hormonas de la pigmentación, somatomedina, gonadotropina coriónica, factores de liberación hipotalámica, hormonas anti diuréticas, hormona estimulante del tiroides, bifalina y prolactina.

Tal como se utiliza en este documento, el término "resto lipófilo" se refiere a cualquier resto que tiene características lipófilas y que tiene una solubilidad en agua a 20° C menor de 5 mg/ml, preferiblemente menor de 0,5 mg/ml. Tal resto lipófilo típicamente se selecciona entre restos de alquilo C<sub>3-39</sub>, alqueno C<sub>3-39</sub> y alcadieno C<sub>3-39</sub>, tocoferol y residuos esteroídicos. Los términos "alquilo C<sub>3-39</sub>", "alqueno C<sub>3-39</sub>" y "alcadieno C<sub>3-39</sub>" están destinados a cubrir hidrocarburos saturados, monoinsaturados y diinsaturados de cadena lineal y ramificada, preferiblemente de cadena lineal de 3-39 átomos de carbono.

La conjugación covalente de un resto lipófilo a un péptido conduce a un péptido lipofílicamente modificado que puede tener un efecto terapéutico mejorado en comparación con el péptido nativo. Esto normalmente se puede hacer mediante la reacción de un grupo funcional tal como un grupo amino en un péptido con un ácido u otros grupos reactivos en una molécula lipófila. Alternativamente, la conjugación entre el péptido y la molécula lipófila se lleva a cabo a través de un resto adicional, tal como un puente, espaciador, o resto de unión, que puede ser degradable o no degradable. Algunos ejemplos se dan a conocer en la técnica anterior [por ejemplo, las insulinas aciladas de ácidos grasos se describen en la solicitud de patente japonesa 1.254.699. Véase también, Hashimoto, M., et al, *Pharmaceutical Research*, 6:171-176 (1989), y Lindsay, DG, et al, *Biochemical J.*, 121:737-745 (1971)]. Más divulgaciones de insulinas aciladas de ácidos grasos y análogos de insulina acilados de ácidos grasos, y de procedimientos para su síntesis, se encuentran en el documento de patente de Estados Unidos N° 5.693.609, el documento de patente internacional WO95/07931, el documento de patente de Estados Unidos N° 5.750.497, y el documento de patente internacional N° WO96/29342. Otros ejemplos de péptidos acilados se encuentran en los documentos de patente internacional N° WO98/08871, WO98/08872, y WO99/43708. Estas divulgaciones describen péptidos modificados lipofílicamente y permiten la preparación de los mismos.

Tal como se utiliza en este documento, el término "resto anfifílico" se refiere a cualquier resto que tiene tanto características lipófilas como hidrófilas y es soluble tanto en agua como en disolventes lipófilos. Las moléculas anfifílicas utilizadas en la presente invención se componen de restos lipófilos e hidrófilos. Los restos lipófilos son preferiblemente ácidos grasos naturales o cadenas de alquilo y los descritos anteriormente. Los restos hidrófilos se seleccionan de entre polietilenglicol, polivinilpirrolidona, azúcares, y similares. Los restos hidrófilos son preferiblemente polietilenglicol (PEG) que tiene menos de 1.000 unidades de etilenglicol. El tamaño y la composición de los restos lipófilos y los restos hidrófilos se pueden ajustar para obtener la anfifilicidad deseada.

Tal como se utiliza en este documento, los términos "conjugado", "unido", "enlazado", y similares, con referencia al péptido y otros componentes del péptido modificado de la presente invención, significan que los restos especificados están unidos el uno al otro, preferiblemente covalentemente, a través de un enlazador, puente, espaciador, o similares.

Tal como se utiliza en este documento, los términos "enlazador", "puente", "espaciador", o similares se refieren a un átomo o un grupo de átomos que enlazan, preferentemente de forma covalente, y por ejemplo, un resto lipófilo a un péptido terapéutico.

5 Con el fin de llevar a cabo la conjugación covalente, un péptido terapéutico puede tener uno o más grupos funcionales adecuados, o puede ser modificado para incluir uno o más grupos funcionales adecuados para el acoplamiento covalente a un resto lipófilo o anfifílico. Los grupos funcionales adecuados incluyen, por ejemplo, los siguientes grupos: grupo hidroxilo, grupo amino (amino primario o grupo amino secundario), grupo tiol, y grupo carboxilo. Los restos lipófilos o anfifílicos de la presente invención pueden tener uno o más grupos funcionales adecuados, o pueden ser modificados para incluir uno o más grupos funcionales adecuados para el acoplamiento covalente a un péptido. Grupos funcionales adecuados incluyen, por ejemplo, los siguientes grupos: un grupo hidroxilo, grupo amino (grupo amino primario o grupo amino secundario), grupo tiol, grupo carboxilo, grupo aldehído, grupo isocianato, grupo de ácido sulfónico, grupo de ácido sulfúrico, grupo de ácido fosfórico, grupo de ácido fosfónico, grupo de haluro alílico, grupo de haluro bencílico, grupo de haluro bencílico sustituido, y grupo oxiranilo.

15 Un péptido terapéutico puede ser acoplado directa o indirectamente con uno o más restos lipófilos a través de un grupo éster, grupo de amida, grupo de amina secundaria o terciaria, grupo de carbamato, grupo sulfonato, grupo sulfato, grupo fosfato, grupo fosfonato, o grupo éter.

20 En una realización de la presente invención, el ácido palmítico se activó con N-hidroxisuccinimida y después se hizo reaccionar con grupos de amina en la octreotida, un octapéptido, para formar un conjugado a través de un enlazador de amida entre el resto lipófilo palmitilo y el péptido. Hay dos grupos de amina primaria en la octreotida. Ambos grupos de amina pueden conjugarse simultáneamente o sólo un grupo de amina puede conjugarse de forma selectiva mediante el ajuste de las condiciones de reacción seguido de la separación.

25 En otra realización, el decanal, un compuesto lipófilo con un extremo de grupo aldehído, se hizo reaccionar con los grupos de amina en la octreotida para formar un conjugado a través de un enlace de amina secundaria. Ambos grupos de amina pueden conjugarse simultáneamente o sólo un grupo de amina podría conjugarse mediante el ajuste de las condiciones de reacción seguido de la separación.

En una realización adicional, el ácido palmítico se conjugó a la lisozima a través de sus seis grupos de amina en varias proporciones. Cuando la relación de ácido palmítico a la lisozima es menor que 6, los sitios de conjugación en la lisozima puede ser aleatorios dependiendo de la reactividad de cada grupo de amina.

30 En aún otra realización, la grelina es un péptido acilado a través de su grupo hidroxilo con un resto de n-octanoilo. La grelina es un péptido gástrico que estimula la secreción de la hormona del crecimiento y aumenta la adiposidad. Es el primer ligando natural identificado para un receptor secretagogo de la hormona de crecimiento previamente clonado que está presente en la glándula pituitaria y la región hipotalámica del cerebro.

35 Un resto lipófilo puede ser primero acoplado covalentemente a un resto hidrófilo para formar una molécula anfifílica. Las moléculas anfifílicas de la presente invención pueden tener uno o más grupos funcionales adecuados, o pueden modificarse para tener uno o más grupos funcionales adecuados para el acoplamiento covalente a un péptido. Los grupos funcionales adecuados se seleccionan del grupo hidroxilo, grupo de amina (grupo de amina primaria o grupo de amina secundaria), grupo tiol, grupo carboxilo, grupo aldehído, grupo isocianato, grupo de ácido sulfónico, grupo de ácido sulfúrico, grupo de ácido fosfórico, grupo de ácido fosfónico, grupo de haluro de alilo, grupo de haluro de bencilo, grupo de haluro de bencilo sustituido, y grupo oxiranilo.

40 Un péptido terapéutico puede ser acoplado directa o indirectamente con uno o más restos anfifílicos a través de un grupo éster, grupo de amida, grupo de amina secundaria o terciaria, grupo carbamato, grupo sulfonato, grupo sulfato, grupo fosfato, grupo fosfonato, o grupo éter.

45 Preferiblemente, un péptido terapéutico se conjuga covalentemente a una o más moléculas anfifílicas que comprenden (a) un resto hidrófilo y (b) un resto lipófilo, en donde las características hidrófilas y lipófilas equilibradas de la molécula anfifílica imparten al conjugado adecuada solubilidad en el fluido biológico o solución acuosa.

50 Más preferiblemente, un péptido terapéutico se conjuga covalentemente a una o más moléculas anfifílicas que comprenden (a) un resto de polietilenglicol lineal y (b) un resto lipófilo, en el que el péptido terapéutico, el polietilenglicol y el resto lipófilo están dispuestos conformacionalmente para tener el resto lipófilo disponible al exterior para la interacción con el entorno lipófilo o las membranas celulares. Tal péptido anfifílicamente modificado tiene una resistencia química mejorada a la reacción con el polímero biodegradable tanto *in vitro* como *in vivo*, en relación con el péptido no conjugado.

Preferiblemente, la molécula anfifílica tiene la siguiente estructura general: LS-(OC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)<sub>m</sub>OH (Fórmula 1), en donde L es el resto lipófilo preferiblemente seleccionado entre alquilo C<sub>3-39</sub>, alquenilo C<sub>3-39</sub>, alcadienilo C<sub>3-39</sub>, tocoferol y residuos esteroídicos, y en donde S es un enlazador seleccionado de un grupo de un grupo éster, grupo de amida,

grupo de amina secundaria o terciaria, grupo carbamato, grupo sulfonato, grupo sulfato, grupo fosfato, grupo fosfonato, o grupo éter.

5 En una realización, un grupo alquilo de 16 átomos de carbono se acopló covalentemente a una molécula de polietilenglicol a través de un enlace éter. La molécula anfifílica resultante tiene un grupo hidroxilo que se puede  
 10 activar o derivatizar para reaccionar con grupos funcionales adecuados en los péptidos. En una realización de la presente invención, la molécula anfifílica se derivatizó a fin de tener un grupo terminal aldehído. Entonces la molécula anfifílica se conjugó covalentemente a la octreotida por medio de la reacción con grupos de amina en la octreotida seguido por una reacción de reducción con NaCNBH<sub>3</sub>. Ambos grupos de amina en la octreotida podrían conjugarse simultáneamente o sólo un grupo de amina puede conjugarse de forma selectiva mediante el ajuste de  
 15 las condiciones de reacción seguido de la separación. El conjugado se formó por medio de una amina secundaria lo que no cambia las características de carga de la octreotida no conjugada. Esta propiedad puede ser útil para retener la actividad del péptido.

En otra realización, la molécula anfifílica monopalmitil poli(etilenglicol) (Nm~1124) se activó con cloroformiato de 4-nitrofenilo. A continuación la molécula anfifílica se conjugó covalentemente a la octreotida a través de la reacción  
 20 con grupos de amina en la octreotida. Ambos grupos de amina en la octreotida podrían conjugarse simultáneamente o sólo un grupo de amina puede conjugarse de forma selectiva mediante el ajuste de las condiciones de reacción seguido de la separación.

Los péptidos modificados covalentemente con uno o más restos lipófilos o anfifílicos incluyen, por ejemplo, sales farmacéuticamente aceptables y complejos del péptido modificado. La modificación puede ser en uno o más lugares  
 25 en el péptido. Tales péptidos también incluyen, por ejemplo, péptidos modificados específicamente en un lugar y mezclas de péptidos modificados en un lugar y en múltiples lugares.

Una "sal farmacéuticamente aceptable" significa una sal formada entre uno cualquiera o más de los grupos cargados en un péptido y uno cualquiera o más de cationes o aniones farmacéuticamente aceptables, no tóxicos. Las sales orgánicas e inorgánicas incluyen, por ejemplo, las preparadas a partir de ácidos tales como el ácido clorhídrico,  
 30 sulfúrico, sulfónico, tartárico, fumárico, bromhídrico, glicólico, cítrico, maleico, fosfórico, succínico, acético, nítrico, benzoico, ascórbico, p-toluenosulfónico, bencenosulfónico, naftalenosulfónico, propiónico, carbónico, y similares, o, por ejemplo, de amonio, sodio, potasio, calcio o magnesio.

El término "polímero insoluble en agua biodegradable" incluye cualquier polímero sintético o natural biocompatible (es decir, farmacéuticamente aceptable) y biodegradable que se pueda utilizar *in vivo*. Este término también incluye  
 35 polímeros que son insolubles o se convierten en insolubles en agua o fluidos biológicos a 37° C. Los polímeros pueden purificarse, opcionalmente, para eliminar monómeros y oligómeros usando técnicas conocidas en la técnica (por ejemplo, el documento de patente de Estados Unidos N° 4.728.721; el documento de patente de Estados Unidos N° 2004/0228833). Los polímeros se seleccionan del grupo que consiste en poliláctidos, poliglicólidos, policaprolactonas, polidioxanonas, policarbonatos, polihidroxibutiratos, oxalatos de polialquileno, polianhídridos,  
 40 poliamidas, poliesteramidas, poliuretanos, poliacetales, poliortocarbonatos, polifosfacenos, polihidrovaleratos, succinatos de polialquileno y poliortoésteres y copolímeros, copolímeros de bloque, copolímeros ramificados, terpolímeros y combinaciones y mezclas de los mismos.

Los pesos moleculares adecuados para los polímeros pueden determinarse por una persona de experiencia ordinaria en la técnica. Los factores que pueden tenerse en cuenta al determinar los pesos moleculares incluyen la  
 45 tasa deseada de degradación del polímero, la resistencia mecánica y la tasa de disolución del polímero en el disolvente. Típicamente, un intervalo adecuado de pesos moleculares de polímeros es de aproximadamente 2.000 Daltons a aproximadamente 150.000 Daltons con una polidispersidad de 1,1 a 2,8, dependiendo de qué polímero se selecciona para uso, entre otros factores.

Según la invención, las formulaciones farmacéuticas de péptidos terapéuticos se preparan en forma de soluciones o  
 50 suspensiones inyectables de un polímero en un disolvente farmacéuticamente aceptable que contiene dispersados o solubilizados péptidos lipofílicamente o anfifílicamente modificados. Mediante el acoplamiento covalente de un péptido con una molécula lipofílica o anfifílica, algunos grupos reactivos en el péptido están protegidos y no están disponibles para interactuar con el polímero en solución. Por lo tanto, la estabilidad del péptido y el polímero en las composiciones de la presente invención se mejora mediante la modificación covalente del péptido.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un método para formar un implante *in situ* sólido, biodegradable, en un sujeto, que comprende: (a) disolver o dispersar un polímero insoluble en agua, biodegradable, biocompatible y un péptido terapéutico modificado covalentemente con uno o más restos lipófilos o anfifílicos en un disolvente orgánico biocompatible, soluble en agua para formar una composición; el disolvente orgánico es capaz de disiparse o difundirse en un fluido corporal tras la colocación dentro de un tejido corporal; y (b) administrar la composición en un  
 55 lugar del implante dentro del cuerpo, de manera que permita que el disolvente orgánico se disipe o difunda en los fluidos corporales, y el polímero se coagule o solidifique para producir el implante sólido biodegradable.

- Adicionalmente, la presente invención proporciona una composición farmacéutica líquida para formar un implante biodegradable *in situ* dentro de un cuerpo, que comprende una cantidad eficaz de un polímero biodegradable, insoluble en agua, biocompatible, y una cantidad eficaz de un péptido terapéutico modificado covalentemente con uno o más restos lipófilos o anfifílicos, que se disuelven o dispersan en una cantidad eficaz de un disolvente orgánico soluble en agua, biocompatible; en donde el disolvente es capaz de disiparse o difundirse en un fluido corporal y el polímero es capaz de coagularse o solidificarse al entrar en contacto con un fluido corporal.
- Péptidos adecuados y las moléculas lipófilas o anfifílicas son los definidos anteriormente. La relación molar de péptido a la molécula lipófila o anfifílica en el conjugado variará, por ejemplo, de 1:1 a 1:10, según la naturaleza del péptido.
- Los polímeros biodegradables según la presente invención son insolubles o se vuelven insolubles en un medio acuoso o fluido corporal a 37° C. Polímeros biodegradables adecuados son aquellos definidos anteriormente.
- El tipo, peso molecular y cantidad de polímero biodegradable presente en las composiciones pueden influir en la longitud de tiempo durante la que el péptido se libera desde el implante de liberación controlada. La selección del tipo, peso molecular y cantidad de polímero biodegradable presente en las composiciones para conseguir las propiedades deseadas del implante de liberación controlada puede ser realizada por una persona de experiencia ordinaria en la técnica a través de experimentación de rutina.
- Disolventes orgánicos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, N-metil-2-pirrolidona, N,N-dimetilformamida, sulfóxido de dimetilo, carbonato de propileno, caprolactama, triacetina, benzoato de bencilo, alcohol bencílico, lactato de etilo, triacetato de glicerilo, ésteres de ácido cítrico, glicoles de polietileno, glicoles de alcoxipolietileno y acetatos de polietilenglicol, o cualquier combinación de los mismos.
- Los criterios para los disolventes orgánicos de polímeros biodegradables son que sean farmacéuticamente aceptables y de miscibles a dispersables en medio acuoso o fluido corporal. El disolvente orgánico adecuado debe ser capaz de difundirse en un fluido corporal de manera que la composición líquida se coagule o solidifique para formar un implante *in situ*. Disolventes individuales y/o mezclados pueden ser empleados, y la idoneidad de tales disolventes se puede determinar fácilmente por experimentación de rutina.
- Las composiciones farmacéuticas de la invención típicamente contienen péptidos en un rango de 0,1 a 40% p/v. En general, la carga óptima del fármaco depende del período de liberación deseado y de la potencia del péptido. Obviamente, para un péptido de baja potencia y un período de liberación más largo, se pueden requerir niveles más altos de incorporación.
- La viscosidad de las composiciones líquidas inyectables de la invención se determina por el peso molecular del polímero y el disolvente orgánico utilizado. Por ejemplo, cuando se usa poli (lactida-co-glicólida), la solución de poliéster en NMP tiene una menor viscosidad que en mPEG350. Típicamente, cuando se utiliza el mismo disolvente, cuanto mayor sea el peso molecular y la concentración del polímero, mayor será la viscosidad. Preferiblemente, la concentración del polímero en solución está por debajo de 70% en peso. Más preferiblemente, la concentración del polímero en la solución está entre el 20 y el 60% en peso.
- La liberación de péptidos lipofílicamente o anfifílicamente modificados de estos implantes formados *in situ* seguirá las reglas generales similares para la liberación de un fármaco desde un dispositivo polimérico monolítico. La liberación de péptidos lipofílicamente o anfifílicamente modificados puede verse afectada por el tamaño y la forma del implante, la carga de péptidos lipofílicamente o anfifílicamente modificados dentro del implante, los factores de permeabilidad que implican los péptidos lipofílicamente o anfifílicamente modificados y el polímero particular, y la degradación del polímero. Dependiendo de la cantidad de péptidos modificados seleccionados para la liberación, los parámetros anteriores se pueden ajustar por un experto en la técnica de administración de fármacos para dar la tasa y duración de liberación deseada.
- La cantidad de composición inyectable administrada típicamente dependerá de las propiedades deseadas del implante de liberación controlada. Por ejemplo, la cantidad de composición de la solución inyectable puede influir sobre la duración de tiempo durante la que el péptido se libera desde el implante de liberación controlada.
- Según la presente invención, las composiciones que contienen péptidos lipofílicamente o anfifílicamente modificados se pueden administrar a un sujeto donde se desea la liberación sostenida controlada de suministro de un péptido. Tal como se utiliza en este documento, el término "sujeto" pretende incluir animales de sangre caliente, preferiblemente mamíferos, más preferiblemente seres humanos.
- Como se usa en este documento, el término "administrado" pretende referirse a dispensar, liberar o aplicar una composición (por ejemplo, formulación farmacéutica) a un sujeto por cualquier vía adecuada para la liberación de la composición a la ubicación deseada en el sujeto, incluyendo la liberación por inyección y/o implantación subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, o por vía intradérmica, y mediante la administración a las membranas mucosas para

proporcionar la dosis deseada de un péptido basado en los parámetros conocidos para el tratamiento de las diversas afecciones médicas con los péptidos terapéuticos.

El término "administración de liberación sostenida controlada", como se usa en este documento, incluye, por ejemplo, la liberación continua de un péptido terapéutico *in vivo* durante un período de tiempo después de la administración, preferiblemente al menos de varios días a semanas o meses. La administración de liberación sostenida controlada del péptido se puede demostrar, por ejemplo, por el efecto terapéutico continuo del agente con el tiempo (por ejemplo, para la octreotida, la liberación sostenida del péptido puede demostrarse por la reducción continuada de GH en el tiempo). Alternativamente, la administración sostenida del agente puede demostrarse detectando la presencia del agente *in vivo* en el tiempo.

En esta solicitud, las diversas realizaciones expuestas en las reivindicaciones para las composiciones farmacéuticas líquidas presentes también se prevén, *mutatis mutandis*, para los presentes métodos para la formación de tales composiciones y los métodos presentes para formar implantes sólidos.

### Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran las composiciones y métodos de la presente invención. Los siguientes ejemplos sólo deben enseñar cómo hacer los sistemas de administración de fármacos útiles.

Ejemplo 1. Preparación de palmitoil-octreotida (PAL-OCT)

Se disolvieron 50 mg de acetato de octreotida en 1 ml de DMSO anhidro que contenía 100 µl de trietilamina (TEA). Se disolvieron 40,2 mg del éster de N-hidroxisuccinimida del ácido palmítico (Pm 353,50) en 3 ml de DMSO anhidro y se añadieron a la solución del péptido. La reacción se dejó proceder durante 3 horas a temperatura ambiente. La mezcla se vertió en éter dietílico para precipitar la octreotida palmitoilada. El precipitado se lavó con éter dietílico dos veces y luego se secó bajo vacío. El péptido acilado resultante estaba en forma de un polvo blanco.

Ejemplo 2. Preparación de palmitoil-octreotida (PAL-OCT)

Se disolvieron 50 mg de acetato de octreotida en 1000 µl de DMSO anhidro que contenía 100 µl de TEA. Se disolvieron 17,1 mg del éster de N-hidroxisuccinimida del ácido palmítico (Pm 353,50) en 3 ml de DMSO anhidro y se añadieron mediante inyección directa a la solución de péptido. La reacción se dejó proceder durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla se vertió en éter dietílico para precipitar la octreotida palmitoilada. El precipitado se lavó con éter dietílico dos veces y luego se secó bajo vacío. El péptido acilado resultante estaba en forma de polvo blanco.

Ejemplo 3. Preparación de decanal-octreotida (DSL-OCT)

Se disolvieron 50 mg de octreotida en 2 ml de cianoborohidruro de sodio (Pm 62,84, NaCNBH<sub>3</sub>) 20 mM solución de (2,51 mg) en tampón de acetato 0,1 M a pH 5. A la solución del péptido se añadieron 13,7 mg de decanal (Pm 156,27) (OCT:DCL = 1:2) directamente mediante inyección. La reacción se dejó proceder durante la noche a 4° C. La mezcla se separó por centrifugación. El precipitado PAL-OCT se liofilizó.

Ejemplo 4. Preparación de palmitoil-lisozima (PAL-Lyz, 3:1)

Se disolvieron 302 mg de lisozima (Pm 14.500) en 1000 µl de DMSO anhidro que contenía 200 µl de TEA. Se disolvieron 18,25 mg del éster de N-hidroxisuccinimida del ácido palmítico (Pm 353,50) en 3 ml de DMSO anhidro y se añadieron por inyección directa a la solución de proteína. La reacción se dejó proceder durante la noche a temperatura ambiente. El PAL-Lyz se precipitó en éter dietílico y el producto final se liofilizó después de eliminar el disolvente orgánico.

Ejemplo 5. Liberación de palmitoil-lisozima a partir de formulaciones inyectables de polímero

Se preparó PLGA RG503H al 40% disolviendo apropiadamente el polímero en mPEG350. Después se mezclaron palmitoil-lisozima y lisozima con la solución de polímero a aproximadamente 7% respectivamente. Las formulaciones se mezclaron a fondo para obtener formulaciones uniformes.

Liberación *in vitro* de lisozima y lisozima palmitoilada de solución de polímero inyectable: Las suspensiones de la formulación (aproximadamente 100 mg) se inyectaron en 3 ml de solución salina de tampón de fosfato a pH 7,4 con 0,1% de azida de sodio a 37° C. El fluido receptor se sustituyó en los puntos de tiempo seleccionados con solución de tampón fresco, y la solución tampón eliminada se diluyó apropiadamente con PB a pH 7,4 y se analizó para la concentración de fármaco mediante un espectrofotómetro UV a 280 nm frente a las curvas de calibración.

La figura 1 muestra los perfiles de liberación acumulativos tanto de la lisozima acilada como de la lisozima nativa. La lisozima nativa mostró inicialmente una liberación significativa comparada con la lisozima acilada.

## Ejemplo 6. Preparación de palmitoil-lisozima (PAL-Lyz, 5:1)

Se disolvieron 50 mg de lisozima (Pm 14.500) en agua y el pH se ajustó a 9,58. La solución se secó por liofilización. A continuación, el polvo seco se disolvió en 3 ml de DMSO. Después se añadieron 322  $\mu$ l de solución de 20 mg/ml del éster de N-hidroxisuccinimida del ácido palmítico (Pm 353,50) en DMSO anhidro mediante inyección directa a la solución de proteína. La reacción se dejó proceder durante la noche a 4° C. El PAL-Lyz se precipitó en éter dietílico y el producto final se liofilizó después de eliminar el disolvente orgánico.

## Ejemplo 7. Preparación de palmitoil-lisozima (PAL-Lyz, 13:1)

Se disolvieron 50 mg de lisozima (Pm 14.500) en agua y el pH se ajustó a 9,58. La solución se secó por liofilización. A continuación, el polvo seco se disolvió en 3 ml de DMSO. A continuación se añadieron 799  $\mu$ l de solución de 20 mg/ml del éster de N-hidroxisuccinimida del ácido palmítico (Pm 353,50) en DMSO anhidro mediante inyección directa a la solución de proteína. La reacción se dejó proceder durante la noche a 4° C. El PAL-Lyz se precipitó en éter dietílico y el producto final se liofilizó después de eliminar el disolvente orgánico.

## Ejemplo 8. Preparación de palmitoil-lisozima (PAL-Lyz)

Se añade lisozima a PAL-NHS en PBS (pH 8,0) que contiene 2% de desoxicolato (DOC). La mezcla se incuba a 37° C durante 6 horas. La mezcla se centrifuga para eliminar el PAL-NHS sin reaccionar. El producto se dializa contra PBS que contiene 0,15% de DOC durante 48 horas. (PAL-NHS: Liso = 15:1).

## Ejemplo 9. Liberación de grelina de formulaciones de polímero inyectables

Se preparó PLGA RG503H al 40% disolviendo apropiadamente el polímero en mPEG350. A continuación se mezclaron la grelina (humana, de rata 1-5) y la grelina desacilada (Des-n-Octanoil-[Ser]<sup>3</sup>-grelina (humana, de rata 1-5)) con la solución de polímero a aproximadamente al 6% respectivamente. Las formulaciones se mezclaron a fondo para obtener formulaciones uniformes.

Las suspensiones de la formulación (aproximadamente 100 mg) se inyectaron en 3 ml de solución salina de tampón de fosfato a pH 7,4 con 0,1% de azida de sodio a 37° C. El fluido receptor se sustituyó en los puntos de tiempo seleccionados con solución de tampón fresco, y la solución tampón eliminada se diluyó apropiadamente con PB a pH 7,4 y se analizó para la concentración de fármaco por HPLC usando las curvas de calibración correspondientes. La figura 2 muestra la liberación acumulada de la grelina y la grelina desacilada en PBS. La grelina desacilada mostró una liberación mucho más rápida durante el período de dos semanas probado. La grelina con un resto lipófilo mostró una tasa de liberación mucho más lenta.

## Ejemplo 10. Preparación del dietil acetal de monopalmitil poli(etilenglicol)-butiraldehído.

Una mezcla de monopalmitil poli(etilenglicol) (promedio Nm~1124) (5,0 g, 4,45 mmoles) y tolueno (75 ml) se secó azeotrópicamente por destilación del tolueno bajo presión reducida. El monopalmitil poli(etilenglicol) seco, se disolvió en tolueno anhidro (50 ml) al que se añadió un 20% (p/p) de solución de terc-butóxido de potasio en THF (4,0 ml, 6,6 mmoles) y dietilacetal de 4-clorobutiraldehído (0,96 g, 5,3 mmoles, Pm 180,67). La mezcla se agitó a 100-105° C durante la noche bajo una atmósfera de argón. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla se filtró y se añadió a 150 ml de éter etílico a 0-5° C. El producto precipitado se separó por filtración y se secó bajo presión reducida.

## Ejemplo 11. Conjugación de octreotida al grupo de amina N-terminal con monopalmitil poli(etilenglicol) (PAL-PEG-BA-OCT)

En una preparación típica, 201,6 mg del dietilacetal de monopalmitil poli(etilenglicol)-butiraldehído, (PAL-PEG-BADA) se disolvió en 10 ml de ácido fosfórico 0,1 M (pH 2,1) y la solución resultante se calentó a 50° C durante 1 hora y después se enfrió a temperatura ambiente. El pH de la solución se ajustó a 5,5 con NaOH 1 N y la solución resultante se añadió a una solución de 195,3 mg de octreotida en 3,5 ml de tampón de fosfato de sodio 0,1 M (pH 5,5). Después de 1 hora, se añadió 18,9 mg de NaCNBH<sub>3</sub> para tener una concentración de 20 mM. La reacción se continuó durante la noche a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla de reacción se dializó ya sea con una membrana con un corte de 2.000 daltones o cargado en un HPLC preparativo con una columna C-18. La octreotida conjugada purificada fue principalmente un solo compuesto con una amina primaria (lisina), y una amina secundaria (N-terminal).

Ejemplo 12. Liberación *in vitro* y estabilidad de péptidos y polímero biodegradables en composiciones de líquidos poliméricos

Poli (DL-lactida-co-glicolida) (PLGA) de una relación 85/15 de lactida a glicólido que tenía una polidispersidad de 1,5 (DLPLG85/15, IV:0,28) se disolvió en N-metil-2-pirrolidona (NMP) para obtener una solución al 50% en peso. Los

péptidos se mezclaron con la solución de PLGA en NMP para dar una composición inyectable uniforme a las relaciones que se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Formulaciones poliméricas inyectables probadas

Muestras	Péptido (mg)	DLPLG (mg)	8515/NMP	Carga de fármaco (% p/p)
Blanco	0	1000		0
OCT	60	940		6
Pal-PEG-BA-OCT	120	880		6

Una alícuota de cada formulación fue tomada para la liberación *in vitro* en tampón de fosfato a pH 7,4 que contenía 0,1% de azida de sodio a 37° C y la formulación restante se utilizó para supervisar la estabilidad de los péptidos y el polímero a temperatura ambiente con el tiempo. Los puntos de tiempo son 0,125, 1, 2, 5, 7, 14, 21, y 28 días. La pureza de los péptidos en la muestra se determinó por HPLC. El peso molecular del polímero se determinó mediante cromatografía de permeabilidad en gel (GPC) usando patrones de poliestireno con pesos moleculares conocidos.

Según la técnica anterior, la presencia de un grupo nucleófilo en un péptido puede conducir a una interacción entre el péptido y el polímero biodegradable de una composición. Los grupos nucleófilos en el péptido pueden reaccionar con el polímero biodegradable para formar productos acilados y pueden catalizar la degradación del polímero biodegradable. Es bien sabido que cuando la octreotida y la poli (DL-lactida-co-glicolida) se combinan, especialmente en una solución orgánica, tal como NMP, la octreotida se acilará y el polímero se degradará rápidamente. La conjugación N-terminal de la octreotida en la presente invención contiene una amina primaria, una amina secundaria y un grupo ácido carboxílico C-terminal y se espera que interactúen y/o reaccionen con el polímero de manera similar a la propia octreotida. Sin embargo, se ha encontrado inesperadamente que la octreotida conjugada covalentemente de la presente invención impidió la reacción de acilación y redujo significativamente la tasa de degradación del polímero con respecto a la octreotida no modificada. Como se describió en la técnica anterior y se muestra en la Tabla 2, cuando la octreotida se mezcló con solución de poli (DL-lactida-co-glicolida) en NMP, la octreotida se aciló más del 80% en el intervalo de 24 horas a temperatura ambiente y había casi completamente reaccionado después de 7 días. Sin embargo, la octreotida covalentemente conjugada fue estable incluso después de 56 días bajo las mismas condiciones. Como se muestra en la Tabla 3, el peso molecular del polímero en la formulación que contiene octreotida disminuyó rápidamente a temperatura ambiente. Después de 21 días, el peso molecular del polímero se redujo en un 50%. Sin embargo, en el caso del polímero en la formulación que contenía octreotida conjugada covalentemente, se retuvo más de 90% del peso molecular inicial.

Tabla 2: Estabilidad de los péptidos en las formulaciones poliméricas líquidas

Tiempo (Días)	Octreotida	PAL-PEG-BA-OCT
7	2,3	99,6
14	0,6	100,0
21	0,3	100,0
56	0,0	100,0

35

Tabla 3: Estabilidad del polímero en las formulaciones poliméricas líquidas

Tiempo (días)	8515 PLG en NMP	Octeotrida	PAL-PEG-BA-OCT
0	100	100	100

Tiempo (días)	8515 PLG en NMP	Octeotrida	PAL-PEG-BA-OCT
0,1	100,0	95,8	100,6
1	99,2	75,3	99,8
2	99,0	66,1	98,8
3	102,0	65,3	100,4
7	98,9	59,0	98,6
14	100,8	57,1	98,1
21	98,2	51,3	92,2

Como se describe en la técnica anterior, con el fin de mantener la estabilidad de los agentes bioactivos y excipientes en una formulación, por lo general, el agente bioactivo se empaqueta por separado de otros componentes de la formulación, como en la formulación de leuprolida comercial Eligard. Después todos los ingredientes se mezclan inmediatamente antes de su uso. Aunque, dicha preparación puede prevenir la interacción entre péptidos y polímeros biodegradables durante el almacenamiento, no impide cualquier interacción después de que se mezclan. La interacción entre los péptidos y el polímero puede ocurrir durante la administración y la liberación subsiguiente *in vitro* o *in vivo*.

Cuando se tomó una alícuota de cada formulación después de la preparación para llevar a cabo la liberación *in vitro* en tampón de fosfato a pH 7,4 que contenía 0,1% de azida de sodio a 37° C, se encontró sorprendentemente que la interacción entre la octeotrida y el polímero se produjo durante la mezcla y la posterior liberación *in vitro*. Como se muestra en la figura 3, alrededor del 30% de la octeotrida detectada en el medio de liberación se degradó o reaccionó con el polímero dentro de las 3 horas. Y más del 50% de la octeotrida detectada en el medio de liberación fue degradada o acilada después de 28 días. Después de 28 días, la matriz de polímero se disolvió en acetonitrilo, y el polímero se precipitó usando agua. La octeotrida se analizó por HPLC. Se encontró que más del 50% de la octeotrida restante en la matriz de polímero también estaba acilada. Tal degradación y/o acilación de la octeotrida reduciría significativamente la disponibilidad de la octeotrida nativa y puede producir subproductos no deseados tóxicos. Sería muy ventajoso prevenir tal interacción entre el péptido y el polímero.

La figura 4 muestra la liberación *in vitro* de la octeotrida conjugada covalentemente Pal-PEG-BA-OCT. Aunque la octeotrida modificada contiene nucleófilos similares a los de la octeotrida no modificada, se encontró sorprendentemente que no se detectó ninguna degradación de la octeotrida modificada en el medio de liberación y en la matriz polimérica durante 28 días. Los resultados indican que la conjugación covalente del péptido con un resto anfífilico tal como monopalmitil poli(etilenglicol) puede prevenir o reducir la interacción y/o reacción entre péptidos y polímeros biodegradables de manera significativa.

Ejemplo 13. Preparación de monopalmitil poli(etilenglicol) activado con cloroformiato de 4-nitrofenilo (NPC)

Una mezcla de monopalmitil poli (etilenglicol) (promedio Nm~1124) (10,0 g, 8,9 mmoles) y benceno (100 ml) se secó azeotrópicamente por destilación de 50 ml de benceno a presión reducida. La mezcla de reacción se enfrió a 30° C, seguido por la adición de piridina anhidra (0,809 ml, 10 mmoles) bajo argón y cloroformiato de 4-nitrofenilo (2,015 g, 10,0 mmoles). Una vez completada la adición, la reacción se agitó a 45° C durante 2 horas seguido por agitación durante la noche a temperatura ambiente.

La mezcla de reacción se filtró, seguido de la eliminación del disolvente del filtrado por destilación a vacío. El residuo se recrystalizó a partir de 2-propanol para producir 8,2 g del producto (PAL-PEG-NPC).

Ejemplo 14. Conjugación de octeotrida con monopalmitil poli(etilenglicol) (PAL-PEG-OCT)

Se añadieron 236,5 mg de PAL-PEG-NPC a una solución de 239 mg de octeotrida en 10 ml de tampón de borato de sodio 50 mM (pH 9). La solución se agitó magnéticamente de forma continua durante la noche. La solución final se dializó usando una membrana de corte de Pm de 2000. La solución dializada se liofilizó y se analizó por HPLC. Los resultados indican que el péptido modificado era una mezcla de octeotrida conjugada de monositio y de sitio múltiple

La invención puede ser modificada en varias formas dentro del alcance de protección definido por las reivindicaciones de la patente adjuntas.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica polimérica líquida para la liberación controlada de un polipéptido terapéutico, que comprende:

5 (a) un polímero biodegradable, insoluble en agua, farmacéuticamente aceptable seleccionado del grupo que consiste en un poliláctido, poliglicólido, policaprolactona, polidioxanona, policarbonato, polihidroxitirato, oxalato de polialquileno, polianhídrido, poliamida, poliésteramida, poliuretano, poliactal, poliortocarbonato, polifosfaceno, polihidroxivalerato, succinato de polialquileno y poliortoéster y copolímeros, copolímeros de bloque, copolímeros ramificados, terpolímeros y combinaciones y mezclas de los mismos.

(b) un disolvente orgánico farmacéuticamente aceptable que solubiliza el polímero biodegradable; y

10 (c) un polipéptido terapéutico conjugado con uno o más restos lipófilos, y/o conjugado con uno o más restos anfífilos,

en donde la composición está en la forma de un líquido viscoso inyectable y es capaz de formar un implante de liberación controlada por disipación o dispersión del disolvente orgánico dentro del cuerpo de un sujeto; y en donde la composición tiene una mayor estabilidad in vitro y una liberación de explosión inicial más baja que la composición tendría si el polipéptido terapéutico no estuviera conjugado con los restos lipofílicos y/o restos anfífilos.

15 2. La composición de la reivindicación 1, en donde el polipéptido y el resto o restos lipófilos y/o el polipéptido y el resto o restos anfífilos están conjugados de forma covalente.

3. La composición de la reivindicación 2, en donde el polipéptido y el resto o restos lipofílicos y/o el polipéptido y el resto o restos anfífilos están conjugados de forma covalente por medio de un espaciador, un puente o un grupo de enlace.

20 4. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el polipéptido se selecciona del grupo que consiste en oxitocina, vasopresina, hormona adrenocorticotrópica (ACTH), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), prolactina, hormonas tales como la hormona luteinizante, hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH), agonistas de LHRH, antagonistas de LHRH, hormonas de crecimiento, factor de liberación de la hormona de crecimiento, insulina, eritropoyetina, somatostatina, glucagón, interleuquina, interferón-alfa, interferón-beta, interferón-gamma, gastrina, tetragastrina, pentagastrina, urogastrona, secretina, calcitonina, encefalinas, endorfinas, angiotensinas, hormona liberadora de la tiotropina (TRH), factor de necrosis tumoral (TNF), hormona paratiroidea (PTH), factor de crecimiento del nervio (NGF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), heparinasa, factor de crecimiento endotelial vascular (VEG-F), proteína morfogénica ósea (BMP), hANP, péptido similar al glucagón (GLP-1), exenatida, péptido YY (PYY), grelina, renina, bradiquinina, bacitracinas, polimixinas, colistinas, tirocidina, gramicidinas, ciclosporinas, enzimas, citoquinas, anticuerpos, vacunas, antibióticos, glicoproteínas, hormona estimuladora del folículo, kiotorfina, tuftsin, timopoyetina, timosina, timoestimulina, factor tímico humoral, factor tímico del suero, factores estimulantes de colonias, motilina, bombesina, dinorfina, neurotensina, ceruleína, uroquinasa, calicreína, análogos y antagonistas de la sustancia P, angiotensina II, factores de coagulación de la sangre VII y IX, lisozima, gramicidinas, hormona estimulante de los melanocitos, hormona liberadora de la hormona tiroidea, hormona estimulante del tiroides, pancreozimina, colecistoquinina, lactógeno placentario humano, gonadotropina coriónica humana, péptido estimulante de la síntesis de proteínas, péptido inhibidor gástrico, péptido intestinal vasoactivo, y factor de crecimiento derivado de las plaquetas.

35 5. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el polipéptido se selecciona del grupo que consiste en ACTH, glucagón, somatotropina, timosina, hormona de la pigmentación, somatomedina, gonadotropina coriónica, factor de liberación hipotalámico, hormonas antidiuréticas, hormona estimulante del tiroides, bifalina y prolactina.

45 6. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el polipéptido se selecciona del grupo que consiste en doxorubicina, rapamicina, naltrexona, factor de crecimiento epidérmico (EGF), agonista de LHRH, antagonista de LHRH, hormona de crecimiento, factor de liberación de la hormona de crecimiento, octreotida, interferón alfa, interferón beta, interferón gamma, calcitonina, hormona paratiroidea (PTH), péptido similar al glucagón (GLP-1), y péptido YY (PYY).

50 7. La composición de la reivindicación 4, en donde el polipéptido es el péptido similar al glucagón (GLP-1).

8. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el polipéptido es la exendina.

9. La composición de la reivindicación 6, en donde el polipéptido es la octreotida.

10. La composición de la reivindicación 4, en donde el polipéptido es la insulina.
11. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el resto lipófilo y/o la parte lipófila del resto anfifílico se selecciona del grupo que consiste en alquilo C<sub>3-39</sub>, alquenilo C<sub>3-39</sub>, alcadienilo C<sub>3-39</sub>, tocoferol y compuestos esteroidicos.
- 5 12. La composición de la reivindicación 11, en donde cada uno del alquilo C<sub>3-39</sub>, alquenilo C<sub>3-39</sub>, y alcadienilo C<sub>3-39</sub> es (i) de cadena lineal o ramificada, e (ii) saturado, monoinsaturado o diinsaturado.
13. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el resto lipófilo es un lípido.
14. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde la parte hidrófila del resto anfifílico se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol, polivinilpirrolidona, y azúcares.
- 10 15. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde el polímero biodegradable se selecciona del grupo que consiste en un ácido poliláctico y un ácido poliglicólico, y copolímeros de los mismos.
16. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde el disolvente orgánico se selecciona del grupo que consiste en N-metil-2-pirrolidona, N,N-dimetilformamida, dimetilsulfóxido, carbonato de propileno, caprolactama, triacetina, benzoato de bencilo, alcohol bencílico, lactato de etilo, triacetato de glicerilo, un éster del ácido cítrico, polietilenglicol, alcóxipolietileno, acetato de polietilenglicol, o cualquier combinación de los mismos.
- 15 17. Un método para formar la composición farmacéutica polimérica líquida de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, que comprende las etapas de:
- (a) disolver un polímero biodegradable, farmacéuticamente aceptable, insoluble en agua, según la reivindicación 1 en un disolvente orgánico farmacéuticamente aceptable para formar una solución de polímero; y
- 20 (b) mezclar la solución de polímero con una cantidad eficaz de un polipéptido terapéutico conjugado con uno o más restos lipófilos y/o con una cantidad eficaz de un polipéptido terapéutico conjugado con uno o más restos anfifílicos para formar una composición farmacéutica.

25

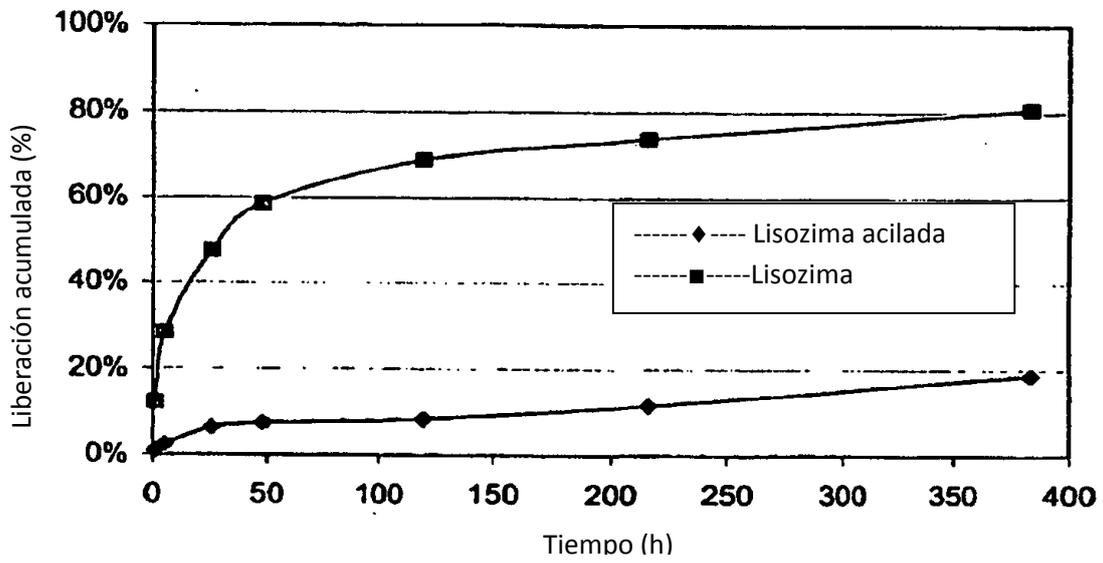


Figura 1

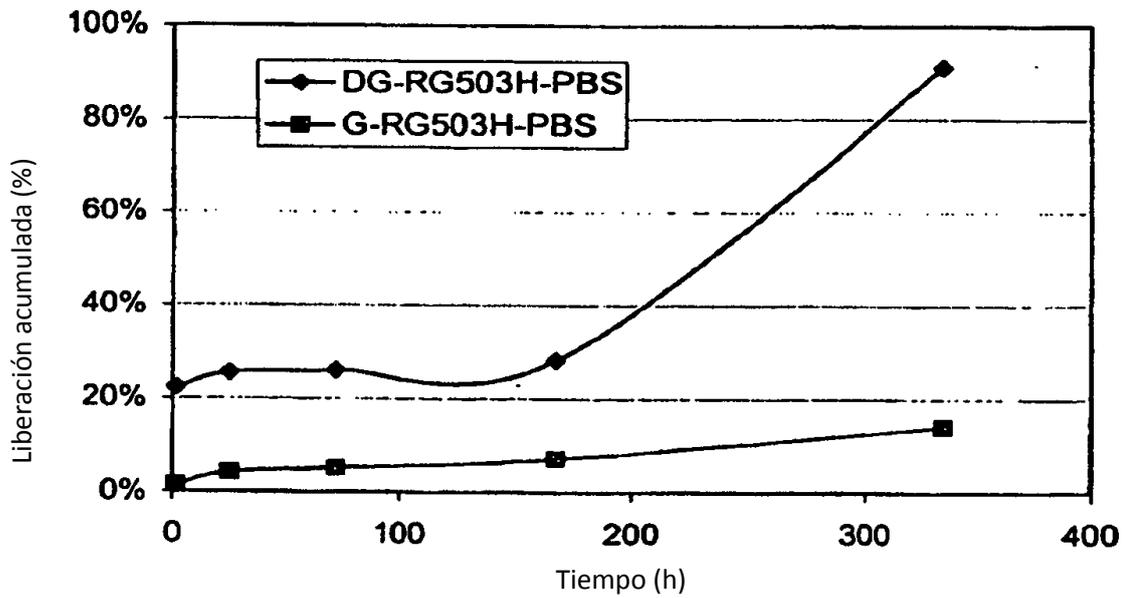


Figura 2

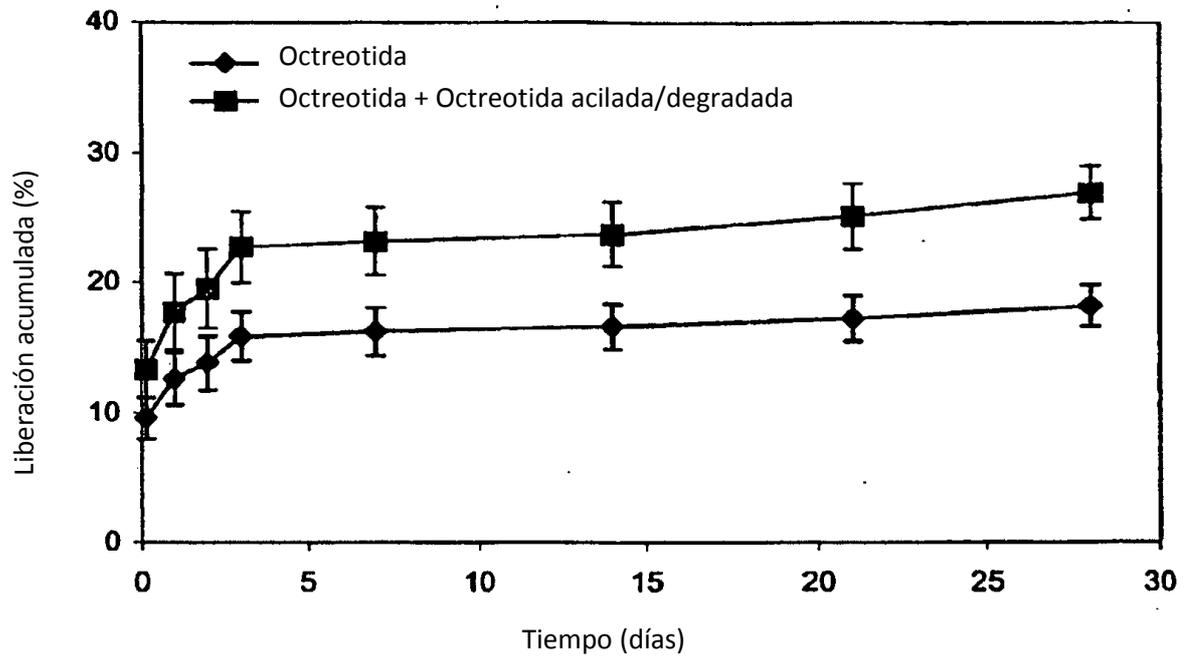


Figura 3

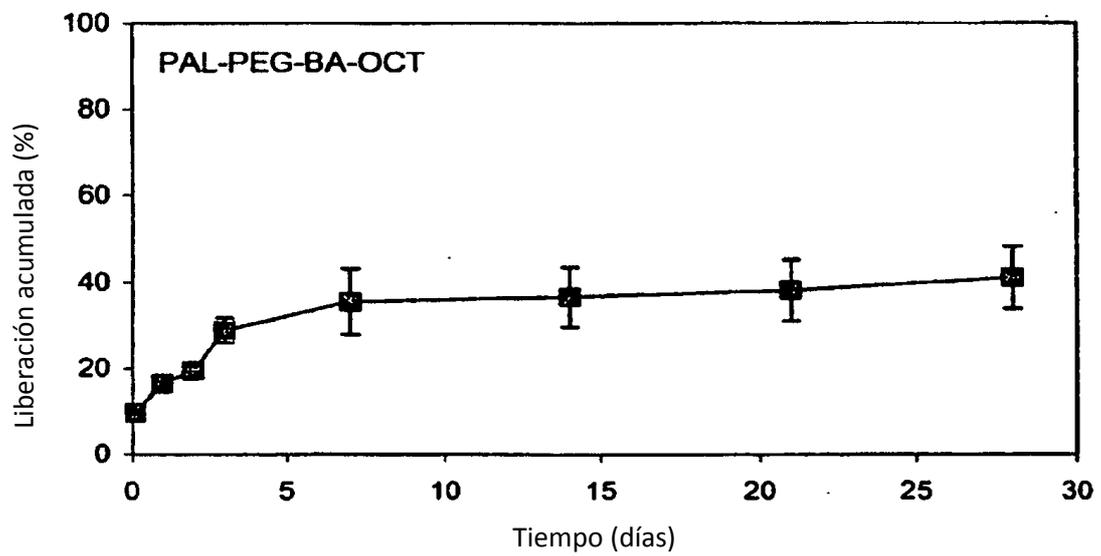


Figura 4