

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 555 310**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/16**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.2006 E 06803680 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.11.2015 EP 1937219**

54 Título: **Método de formulación de fármacos basado en el incremento de la afinidad de superficies de micropartículas cristalinas por principios activos**

30 Prioridad:

**14.09.2005 US 717524 P**  
**14.04.2006 US 744882 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**30.12.2015**

73 Titular/es:

**MANKIND CORPORATION (100.0%)**  
**25134 Rye Canyon Loop, Suite 300**  
**Valencia, CA 91355, US**

72 Inventor/es:

**OBERG, KEITH A.**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 555 310 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**

Método de formulación de fármacos basado en el incremento de la afinidad de superficies de micropartículas cristalinas por principios activos

5

**Campo de la invención**

La presente invención está generalmente en el área de las formulaciones de fármacos y se refiere particularmente a métodos de recubrimiento con principios activos de la superficie de micropartículas cristalinas.

10

**Antecedentes de la invención**

La liberación de agentes terapéuticos ha sido un problema importante. La administración oral es una de las vías de administración más frecuentes y preferidas debido a la facilidad de administración, el cumplimiento del paciente y los menores costes. Sin embargo, las desventajas de esta vía incluyen la potencia baja o variable y la adsorción ineficiente de la sustancia terapéutica. Esto es particularmente evidente cuando el compuesto a administrar es inestable en las condiciones que se encuentra en el tracto gastrointestinal. En la técnica se han desarrollado diversos métodos de recubrimiento y encapsulación, pero sólo unos pocos son eficaces en lo que respecta al abordaje de este problema. No obstante, hay compuestos terapéuticos que tienden a ser menos activos en las condiciones del tracto gastrointestinal y deben administrarse en dosis más altas para su adsorción hacia la circulación sanguínea en una cantidad eficaz.

15

20

Se ha desarrollado una amplia gama de sistemas de formulación de fármacos para abordar el problema de la administración óptima de fármacos y se basan en la incorporación del fármaco en una matriz que actúa como vehículo. Los factores considerados en la formulación de fármacos incluyen los requisitos de que el sistema sea no tóxico, no reactivo con el fármaco a administrar, de fabricación económica, formado por componentes fácilmente disponibles, y coherente con respecto a la composición final y a las características físicas, incluyendo la estabilidad y la velocidad de liberación. También es preferible que el sistema de liberación del fármaco esté formada por materiales que el cuerpo pueda eliminarlos fácilmente mediante los procesos fisiológicos normales.

25

30

Las formulaciones de fármacos en micropartículas se pueden utilizar en numerosas vías de administración, pero son particularmente adecuadas para la administración pulmonar. Las ventajas de los pulmones para la liberación de agentes con efectos sistémicos incluyen la gran cantidad de área de superficie y la facilidad de captación por la superficie de la mucosa. La patente de Estados Unidos n.º 6.071.497 describe un sistema de administración pulmonar de fármacos basado en la formación de micropartículas de dicetopiperazina, así como de micropartículas a base de polímeros. El documento WO 02/067995 divulga la obtención mediante derivatización química de una micropartícula con vitamina B12.

35

**Sumario de la invención**

40

La invención proporciona un método de recubrimiento con un principio activo de una micropartícula cristalina preformada en suspensión, comprendiendo dicho método las etapas de:

i) obtener una micropartícula cristalina preformada que comprende una dicetopiperazina;

45

ii) proporcionar una suspensión que comprende la micropartícula cristalina preformada, el principio activo y un disolvente; y

iii) alterar después las condiciones de la solución en la suspensión proporcionada para modificar una interacción energética entre el principio activo y la micropartícula cristalina para modificar una propiedad de superficie de la micropartícula cristalina, en el que la etapa de alterar las condiciones de la solución comprende al menos una de cambiar el pH de la solución, alterar la polaridad de la solución, añadir iones monovalentes o multivalentes a la solución, o la derivatización química de la micropartícula; y

50

en el que dicha etapa de alteración produce la adsorción del principio activo sobre una superficie de la micropartícula cristalina para proporcionar un recubrimiento del principio activo sobre la micropartícula cristalina y la etapa de alteración no incluye la etapa de eliminar el disolvente de la suspensión.

55

De acuerdo con el método de la presente invención, en general, las micropartículas se recubren con un principio activo mediante la modificación de las propiedades de superficie de las micropartículas de forma que el principio activo tenga una mayor afinidad por la superficie de la micropartícula que por lo que permanece en solución, sin la eliminación de disolvente de la solución.

60

Se proporcionan métodos mejorados para el recubrimiento de partículas cristalinas, tales como (FDKP) micropartículas de fumaril dicetopiperazina con principios activos, tales como proteínas, utilizando asociaciones electrostáticas, hidrófobas o de enlaces de hidrógeno. El líquido se puede retirar (para la recuperación de

65

micropartículas recubiertas de principio activo) opcionalmente mediante filtración o secado, o reemplazar mediante el intercambio para un medio de solución diferente, después de que se ha realizado la etapa de alteración y se ha formado el recubrimiento. En cualquier caso, la eliminación del medio líquido no es una etapa obligatoria en la formación del complejo de principio activo - micropartículas. Se divulga un método para el recubrimiento de micropartículas basado en el cambio de las propiedades de la superficie de las micropartículas cristalinas para lograr la adsorción del principio activo a la micropartícula.

Se proporciona un método de recubrimiento de una micropartícula cristalina preformada en suspensión con un principio activo que comprende: i) ajustar la interacción energética entre el principio activo y la micropartícula cristalina independiente de la eliminación del disolvente; y ii) dar tiempo para que el principio activo se adsorba sobre la superficie de la micropartícula. En algunas formas de realización, el método de recubrimiento de una micropartícula cristalina preformada en suspensión con un principio activo puede comprender además una etapa de eliminar o intercambiar el disolvente sin que se produzca un efecto sustancial sobre la Interacción entre el principio activo y la micropartículas.

De acuerdo con la presente invención, el método de recubrimiento de la micropartícula con el principio activo se lleva a cabo mediante la modificación de las propiedades de la superficie de la micropartícula. La modificación de las propiedades de la superficie de la micropartícula se logra mediante la alteración de las condiciones de la solución. Estas condiciones, comprenden al menos una de cambiar el pH, alterar la polaridad de la solución; la adición de iones monovalentes o multivalentes; o la derivatización química de la micropartícula.

La presente invención puede comprender además una etapa de disolver el principio activo en la fase fluida de la suspensión de micropartículas y, posteriormente, cambiar el pH. Tal etapa de disolver el principio activo en una fase fluida se refiere a la adición de una solución más concentrada del principio activo además de añadir sólidos.

En aún otra forma de realización más, las condiciones de pH de la suspensión de micropartículas se alteran para favorecer las interacciones entre principio activo y micropartículas antes de, o después de, la adición del principio activo.

En otras formas de realización, el principio activo tiene más de un tipo de interacción energéticamente favorable con la superficie de las micropartículas.

En otra forma de realización particular de la presente invención, el principio activo es insulina o un análogo de la misma.

En otras formas de realización particulares de la presente invención, las propiedades de la superficie que crean una interacción favorable entre el principio activo y las micropartículas se seleccionan del grupo que consiste en propiedades electrostáticas, hidrófobas y de enlaces de hidrógeno.

En otra realización de la presente invención, la micropartícula es porosa y tiene superficies interiores accesibles al fluido general de la solución. De acuerdo con la presente invención, la micropartícula comprende una dicetopiperazina. En una forma de realización, esta puede ser fumaril dicetopiperazina, pero no se limita a la misma.

En formas de realización de la presente invención, el método de recubrimiento produce una monocapa de principio activo en la superficie de las micropartículas. En otras formas de realización de la invención, la monocapa es continua. En otras formas de realización de la invención, el principio activo en la monocapa puede tener una orientación preferida.

En aún otra forma realización, se proporciona un método como se define en la presente reivindicación 19 para el recubrimiento de una micropartícula cristalina reformada en suspensión con insulina, que comprende ajustar la interacción energética entre el principio activo y la micropartícula cristalina independiente de la eliminación del disolvente; y adsorber el insulina sobre la superficie de las micropartículas.

El disolvente, como se usa en el presente documento, se refiere al medio fluido en el que el principio activo y la micropartícula están "bañados". No debe interpretarse que requiere que todos los componentes estén en solución. De hecho, en muchos casos, puede usarse para hacer referencia al medio líquido en el que las micropartículas están suspendidas.

### Breve descripción de las figuras

Las siguientes figuras forman parte de la presente especificación y están incluidas para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de los ejemplos divulgados en el presente documento. La invención puede entenderse mejor por referencia a una o más de estas figuras en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas presentadas en el presente documento.

La Figura 1 representa los perfiles de ultrasonidos de titulación con HCl para separar los componentes de la

suspensión de fumaril dicetopiperazina (FDKP), partículas de FDKP y tampón, de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención. La magnitud de los cambios en el perfil de titulación de la velocidad ultrasónica (Figura 1, panel A) refleja los cambios de hidratación causados por la protonación de los grupos carboxilato ionizables de los componentes de la muestra. Los picos de atenuación de ultrasonidos máximos (Figura 1, panel B) son el resultado de la relajación rápida en la reacción del intercambio de protones en el punto de saturación. La frecuencia (F) es 15 MHz, la temperatura es 25 °C.

La Figura 2 representa los perfiles de titulación ultrasónicos del ácido acético glacial para partículas de FDKP + insulina y partículas de FDKP de forma individual de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención. El perfil de la velocidad ultrasónica se calculó restando la contribución de la insulina; la frecuencia es de 8 MHz, la temperatura es 25 °C. También se representa el exceso de atenuación ultrasónica como una función de la concentración de ácido acético glacial añadido. Dos etapas de acidificación inducida por ácido acético glacial son similares a las observadas mediante titulación con HCl. El panel insertado en la izquierda (Panel A) representa la asociación del principio activo con la micropartícula de FDKP a pH mayor que aproximadamente 2,9. El panel insertado en la derecha (Panel B) muestra la reducción de la interacción entre el principio activo y la micropartícula a pH por debajo de aproximadamente 2,9.

La Figura 3 representa la adsorción de proteínas sobre micropartículas ionizables de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención. La proteína se añadió a la suspensión de micropartículas después de ajustar el pH, la proteína no unida se separó por filtración y las micropartículas se disolvieron para liberar la proteína unida.

La Figura 4 representa la dependencia del pH para la adsorción de principios activos sobre micropartículas de FDKP de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención. Las Figuras 4A representan la adsorción de la insulina; La Figura 4B representa la adsorción del anticuerpo monoclonal anti-SSX-241-49, la figura 4C representa la adsorción de la hormona paratiroidea (PTH) y la Figura 4D representa la adsorción de grelina.

La Figura 5 representa la dependencia del pH de la adsorción de la insulina sobre micropartículas de FDKP con la limitación de la concentración de insulina de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención.

La Figura 6 representa el cambio en la velocidad de los ultrasonidos en la suspensión de micropartículas de FDKP (11 mg/ml) tras la valoración por etapas de las micropartículas de FDKP con la proteína (10 mg/ml) de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención. Se restó la contribución de la proteína libre y el efecto de la dilución de las micropartículas de FDKP. La temperatura es de 25 °C.

La Figura 7 representa las curvas de saturación para la adsorción del principio activo sobre las micropartículas de FDKP de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención. Se muestran las curvas de carga para micropartículas de principio activo / FDKP como función de la concentración de principio activo a un pH de 5,0. La figura 7A representa la adsorción del péptido 1 similar al glucagón (GLP-1); la Figura 7B representa la adsorción de PTH; la Figura 7C representa la adsorción del anticuerpo monoclonal anti-SSX241-49 y la Figura 7D representa la adsorción del anticuerpo monoclonal anti-MOPC-21.

La Figura 8 representa la adsorción de principios activos sobre micropartículas a pH en 5,0, según está influida por concentraciones crecientes de sal de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención. El principio activo se añadió a la suspensión de micropartículas después de ajustar el pH, el agente no unido se separó por filtración y las micropartículas se disolvieron para liberar el agente unido. La Figura 8A representa la adsorción de insulina, la Figura 8B representa la adsorción del anticuerpo monoclonal anti-SSX-241-49, la Figura 8C representa la adsorción de PTH y la Figura 8D representa la adsorción de grelina.

## Descripción detallada de la invención

### Agentes a administrar

La sustancia con la que se va a recubrir la micropartícula cristalino se denomina en la presente invención el principio activo. Ejemplos de clases de principio activo incluyen composiciones farmacéuticas, compuestos sintéticos y macromoléculas orgánicas que tienen utilidad terapéutica, profiláctica y / o diagnóstica.

En general, cualquier forma de principio activo puede recubrir la superficie de una micropartícula cristalina. Estos materiales pueden ser macromoléculas orgánicas, entre las que se incluyen ácidos nucleicos, compuestos orgánicos sintéticos, polipéptidos, péptidos, proteínas, polisacáridos y otros azúcares y lípidos. Los péptidos, proteínas y polipéptidos son todas las cadenas de aminoácidos unidas por enlaces peptídicos. Generalmente se considera que los péptidos tienen menos de 30 restos de aminoácidos, pero puede incluir más. Las proteínas son polímeros que pueden contener más de 30 restos de aminoácidos. El término polipéptido, como se conoce en la técnica y como se utiliza en el presente documento, se puede referir a un péptido, una proteína, o cualquier otra cadena de aminoácidos de cualquier longitud que contenga múltiples enlaces peptídicos, aunque por lo general contienen al menos 10 aminoácidos. Los principios activos utilizados en la formulación de recubrimiento pueden entrar dentro de

varias clases de actividad biológica, tales como agentes vasoactivos, agentes neuroactivos, hormonas, anticoagulantes, agentes inmunomoduladores, agentes citotóxicos, antibióticos, agentes antivirales, antígenos y anticuerpos. Más particularmente, los principios activos pueden incluir, de una manera no limitante, insulina y análogos de la misma, hormona del crecimiento, hormona paratiroidea (PTH), grelina, factor estimulante de las colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), péptido 1 similar al glucagón (GLP-1), rojo Texas, alquinos, ciclosporinas, clopidogrel y PPACK (D-fenilalanil-L-prolil-L-arginina clorometil cetona), anticuerpos y fragmentos de los mismos, incluyendo, entre otros, anticuerpos humanizados o quiméricos; F(ab), F(ab)<sub>2</sub>, o anticuerpo monocatenario solo o condensado con otros polipéptidos; anticuerpos monoclonales terapéuticos o de diagnóstico frente a antígenos de cáncer, citocinas, agentes infecciosos, mediadores inflamatorios, hormonas y antígenos de superficie celular. Ejemplos no limitantes de anticuerpos frente a antígenos tumorales incluyen anti-SSX-2<sub>41-49</sub> (sarcoma sinovial, punto de rotura X 2), anti-NY-ESO-1 (antígeno asociado a tumores de esófago), anti-PRAME (antígeno de melanoma de expresión preferente), anti-PSMA (antígeno de membrana específico de la próstata), anti-Melan-A (antígeno asociado a tumores melanoma), anti-tirosinasa (antígeno asociado a tumores melanoma) y anti-MOPC-21 (proteína de células plasmáticas de mieloma).

### 15 Sistema de liberación - Micropartículas cristalinas

Esencialmente, el término "micropartículas" se refiere a una partícula con un diámetro de aproximadamente 0,5-1000 µm, independientemente de la estructura exterior o interior precisa. Dentro de la amplia categoría de micropartículas, "microesferas" se refiere a micropartículas con forma esférica uniforme. Las micropartículas cristalinas, como se usa en el presente documento, se refiere a micropartículas que tienen la estructura interna aunque no necesariamente la forma externa de un cristal y tienen una disposición regular de los átomos en una red espacial. Superficies cristalinas ionizables se refieren a micropartículas cristalinas que tienen la capacidad adicional de llevar una carga eléctrica.

25 Preferentemente, la sustancia química que compone la micropartícula cristalina es reactiva de forma reversible con el principio activo a administrar, así como no tóxica y no puede ser metabolizada, por lo menos por los roedores y los seres humanos. Además, la estructura cristalina de micropartículas preferidas no se altera sustancialmente en el proceso de recubrimiento con principio activo. La composición de las micropartículas cristalinas determina qué tipo de interacciones químicas se pueden manipular para dirigir la adsorción de un principio activo a la superficie de las micropartículas.

Se pueden usar numerosas sustancias para formar micropartículas cristalinas, aunque la presente invención se refiere a micropartículas cristalinas que comprenden una dicetopiperazina. Las micropartículas como tal tienen una superficie exterior, cuyas propiedades se pueden manipular en el proceso de recubrimiento. En consecuencia, las micropartículas cristalinas pueden formarse a partir dicetopiperazinas, que son un ejemplo de aminoácidos aromáticos, y sales de los mismos, con solubilidad limitada en un intervalo de pH definido.

Las patentes de Estados Unidos n.º 5.352.461 y 5.503.852 describen un sistema de administración de fármacos basado en la formación de micropartículas dicetopiperazina (DKP) de derivados de dicetopiperazina tales como 3,6-bis[*N*-fumaryl-*N*-(*n*-butil)amino] (también conocido como fumaril dicetopiperazina o FDKP; también denominado (E)-3,6-bis[4-(*N*-carboxi-2-propenil)amidobutil]-2,5-dicetopiperazina) que son estables a pH bajo y se disuelven al pH de la sangre o el intestino delgado. Como se divulga en las patentes anteriores, el fármaco a administrar se combina o se carga con las partículas de dicetopiperazina mediante la formación de micropartículas de DKP en presencia de fármaco (carga útil). Un sistema basado en elementos estructurales de dicetopiperazina, o uno de sus derivados de sustitución, incluyendo, pero no limitado a, dicetomorfolinas y dicetodioxanos, forma micropartículas con distribuciones de tamaño e intervalos pH deseables, así como una buena tolerancia de la carga útil. Se puede generar una amplia gama de características reproducibles estables, con manipulaciones apropiadas de los grupos sustituyentes.

50 Otras dicetopiperazinas que pueden contemplarse en la presente invención pueden incluir 3,6-di(4-aminobutil)-2,5-dicetopiperazina; 3,6-di(succinil-4-aminobutil)-2,5-dicetopiperazina (succinil dicetopiperazina o SDKP); 3,6-di(maleil-4-aminobutil)-2,5-dicetopiperazina; 3,6-di(citraconil-4-aminobutil)-2,5-dicetopiperazina; 3,6-di(glutaril-4-aminobutil)-2,5-dicetopiperazina; 3,6-di(malonil-4-aminobutil)-2,5-dicetopiperazina; 3,6-di(oxalil-4-aminobutil)-2,5-dicetopiperazina y derivados de las mismas. En la presente invención se pueden usar sales de dicetopiperazina y pueden incluir, por ejemplo, una sal farmacéuticamente aceptable tal como el Na, K, Li, Mg, Ca, amonio, o mono-, di- o tri-alkilamonio (como los derivados de trietilamina, butilamina, dietanolamina, trietanolamina, o piridinas y similares). La sal puede ser una mono-, di-, o sal mixta. También se contemplan sales de orden superior para dicetopiperazinas en las que los grupos R contienen más de un grupo ácido. En otros aspectos de la invención, una forma básica del agente puede mezclarse con la dicetopiperazina con el fin de formar una sal de fármaco de la dicetopiperazina, de tal forma que el fármaco sea el contracción de la dicetopiperazina.

La Patente de Estados Unidos n.º 6.444.226, y 6.652.885 describe la preparación y proporciona micropartículas de DKP en suspensión acuosa a la que se añade una solución de principio activo, y después la etapa crítica de liofilizar la suspensión para producir micropartículas que tengan un recubrimiento de principio activo. La base para esta formulación es que el recubrimiento de las micropartículas con el principio activo está dirigido por la eliminación del medio líquido por liofilización. (Véase también la Patente de Estados Unidos n.º 6.440.463). En contraste con las

enseñanzas en la técnica anterior, la presente invención proporciona medios para ajustar la asociación de principio activo con la micropartícula antes de la eliminación del disolvente. Por lo tanto, la eliminación del medio líquido por métodos físicos a granel (por ejemplo, filtración o sedimentación) o métodos de evaporación (por ejemplo, liofilización o secado por pulverización) puede dar lugar a cargas comparables.

5

### **Recubrimiento controlado de micropartículas cristalinas**

El recubrimiento controlado se refiere al proceso dirigido de adsorber principio activo sobre la superficie de una micropartícula cristalina, mediante la alteración de las condiciones de la solución comprende al menos una de cambiar el pH de la solución, la alteración de la polaridad de la solución, añadir iones monovalentes o multivalentes a la solución o derivatización química de la micropartícula; y en el que la etapa de alteración no incluye la etapa de eliminación de disolvente de la suspensión. En consecuencia, el proceso de recubrimiento puede implicar el cambio de las propiedades de la superficie de las micropartículas cristalinas en una suspensión fluida, ya sea cambiando las condiciones de la solución (tales como el pH, la temperatura, la polaridad, la fuerza iónica y los codisolventes) mediante formación de complejos a mono o multivariaciones, o mediante derivatización química. La alteración de las propiedades de la superficie de la micropartícula antes o después de la adición del principio activo afecta a sus interacciones químicas con el principio activo, lo que da lugar a la adsorción del principio activo a la micropartícula cristalina. La interacción química entre la micropartícula y el principio activo dirige la adsorción y da como resultado una monocapa de principio activo sobre la superficie de la micropartícula. Una vez que una molécula de principio activo se adsorbe, dicha parte de la superficie de la micropartícula no está expuesta a interacciones adicionales y la adsorción del principio activo adicional en ese punto de la superficie particular. La monocapa resultante puede ser continua (sin espacios entre las moléculas de principio activo adsorbidas sobre la superficie accesible) o discontinua (espacios de la micropartícula expuestos entre las moléculas de principio activo adsorbidas).

### **Adsorción del principio activo sobre micropartículas**

Como se tratado anteriormente, la adsorción del principio activo sobre las micropartículas tiene como resultado la formación de una monocapa (recubrimiento) del principio activo sobre la micropartícula. Sin embargo, hay más de un mecanismo en juego en la adsorción de un principio activo, tal como, por ejemplo, insulina, en las micropartículas cristalinas:

30

La monocapa de un principio activo, tal como insulina, que recubre la micropartícula es una etapa del proceso de carga de la insulina sobre la micropartícula, pero no es necesariamente el resultado final en el proceso de carga, ya que las capas tanto monoméricas como multiméricas, se pueden formar basándose en la energía del sistema.

35

En condiciones de solubilidad permisiva, tales como una concentración baja de insulina y / o pH bajo un pH sustancialmente por debajo de 5,0), las fuerzas de atracción entre la insulina y la superficie de la partícula FDKP son mucho mayores que las fuerzas de autoasociación para la insulina. Por lo tanto, el recubrimiento de la insulina sobre la micropartícula se produce en forma de monocapa y la saturación se observa sin agregación o formación de múltiples capas sobre la superficie de las micropartículas (véase el Ejemplo 6). A medida que la solubilidad se aproxima a la saturación, debido a la alta concentración de insulina y / o a un pH cerca de 5,0 (una solubilidad mínima para la insulina salvaje), la autoasociación de la insulina se vuelve más energéticamente favorable. Por lo tanto, el recubrimiento puede proceder más allá del punto de una monocapa saturada y se pueden añadir otras capas de insulina a la partícula. Se pueden reconocer dos formas de autoasociación: multimerización y agregación. La multimerización se caracteriza por interacciones intermoleculares específicas y una estequiometría fija. La agregación se caracteriza por interacciones intermoleculares inespecíficas y una estequiometría no definida. En líneas generales, los principios activos multiméricos pueden ser adsorbidos en el estado multimérico, o disociarse en monómeros o multímeros de orden inferior y ser adsorbidos en la superficie en ese estado. En cualquier caso, la agregación puede mediar en la estratificación del principio activo sobre la micropartícula. De acuerdo con la comprensión actual de los inventores, en las condiciones generales utilizadas en los ejemplos de la presente divulgación (tales como la disolución de insulina en ácido acético), el depósito de capas adicionales de insulina procede como la agregación de insulina no hexamérica.

50

### **Método para recubrir las micropartículas**

55

El procedimiento para el recubrimiento de micropartículas cristalinas, tales como micropartículas cristalinas preformadas, con principios activos se describe generalmente como sigue: las micropartículas cristalinas formadas previamente mediante precipitación, u otro método, se suspenden en medio líquido, tal como agua; y el medio se ajusta para alterar la superficie de las partículas, ya sea antes o después de la adición de principio activo. En este punto, el principio activo se adsorberá a la superficie de la micropartículas y después de un intervalo de tiempo (por ejemplo, <1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 minutos; preferentemente de <1 a durante al menos 5 minutos), se completará el proceso de carga. El medio líquido puede eliminarse por cualquier medio, incluyendo filtración, centrifugación, liofilización o secado por pulverización o reemplazarse por intercambio de medios. La adsorción puede confirmarse por cualquiera de dos enfoques experimentales: 1) demostrar la ausencia de cantidades significativas de principio activo en un filtrado o sobrenadante y/o 2) demostrar la presencia del principio activo en fase sólida al tiempo que se muestra que el principio activo no precipita cuando se capta a través del mismo

65

procedimiento en ausencia de las micropartículas.

### **Manipulación de las propiedades de la superficie de las micropartículas**

5 Como se ha divulgado en otra parte en la presente invención, las propiedades de la superficie de la micropartícula pueden manipularse por diversos medios. Las propiedades de la superficie de las micropartículas que pueden manipularse incluyen, pero no se limitan a, propiedades electrostáticas, hidrófobas y de enlaces de hidrógeno. En diversas formas de realización, estas manipulaciones se llevan a cabo en ausencia o en presencia del principio activo, o antes o después de que las micropartículas y el principio activo se mezclen entre sí. Cuando la  
10 manipulación tiene lugar en presencia del principio activo, por ejemplo mediante la alteración de la condición de la solución, también puede haber efectos sobre el principio activo que modificarán su afinidad por la superficie. Por tanto, en algunas formas de realización de la presente invención, el recubrimiento de la micropartícula puede implicar la manipulación de las propiedades de la superficie y la modificación de las propiedades del principio activo.

15 Las interacciones electrostáticas son atracciones entre cargas opuestas o repulsión entre cargas iguales que crecen más fuertes a medida que cargas se acercan entre sí. Las interacciones electrostáticas constituyen un componente clave en la comprensión de las interacciones entre cuerpos cargados en soluciones iónicas. Por ejemplo, la estabilidad de las partículas coloidales dispersas en un disolvente se puede explicar considerando la competencia entre las interacciones electrostáticas repulsivas y las interacciones de van der Waals atractivas. Asimismo, la  
20 funcionalidad química (por ejemplo, pero no limitado a, COOH, NH, etc.) de la superficie de las micropartículas puede usarse como el contraíon para un principio activo ionizado de forma que el principio activo/compuesto de partícula comprende una sal. Las interacciones electrostáticas son también de importancia al considerar la interacción y la adhesión entre partículas.

25 Alterando el pH de la solución circundante, el sistema puede cambiar las propiedades electrostáticas de las micropartículas cristalinas ionizables en suspensión. Como se ha demostrado en el Ejemplo 3, cambiar el pH de la solución cambia de la ionización de una micropartícula de forma que el principio activo se adsorbe en la superficie de las micropartículas. Específicamente, el Ejemplo 4 muestra que las micropartículas compuestas por FDKP (3,6-bis[*N*-fumaril-*N*-(*n*-butil)amino]2,5-dicetopiperazina) son ionizables. Las micropartículas son insolubles en agua por  
30 debajo de un pH de 3,5, pero la solubilidad aumenta rápidamente a un pH entre 3,5 y 5,0, presumiblemente debido a la ionización de los grupos carboxilo. La micropartícula de FDKP está parcialmente ionizada a pH 5 antes de completar la disolución a pH más alto, que se puede observar mediante espectroscopia ultrasónica indirectamente. El ejemplo 5 demuestra el recubrimiento controlado con proteínas sobre la superficie de las micropartículas de FDKP. En una forma de realización, las micropartículas de dicetopiperazina se suspenden en una solución ácida, se  
35 añade principio activo a la suspensión y el pH de la solución se eleva después de que el principio activo y las micropartículas se mezclen juntos. El aumento del pH altera las propiedades de la superficie de las micropartículas para crear un entorno en el que el principio activo tiene una mayor afinidad por la micropartícula que por el disolvente.

40 Como alternativa, el pH de la suspensión de micropartículas se puede elevar inmediatamente antes de la adición de principio activo a la solución. Las propiedades de carga de la superficie de la micropartícula se ven alterados por el cambio en el pH de tal manera que el principio activo tiene una mayor afinidad por la micropartícula que por lo que permanece en solución y se adsorbe en la superficie de las micropartículas tras la adición.

45 Los ejemplos 6 y 7 demuestran la carga de la insulina sobre las partículas de FDKP mediante manipulación de las condiciones de pH. Por último, la saturación de la micropartícula mediante adsorción de proteínas y la formación de una monocapa se describen en el Ejemplo 6.

### **Otros métodos de manipulación de las superficies de las micropartículas**

50 Además de las propiedades electrostáticas, se pueden explotar otras propiedades de la superficie de una micropartícula para controlar la adsorción de principio activo. Las micropartículas que contienen compuestos con imidazol, piridina, bases de Schiff, cetona, bioésteres de ácidos carboxílicos, amidas, u otros grupos funcionales que pueden existir en múltiples estructuras podrían manipularse para modificar las propiedades de la superficie.

55 Las interacciones hidrófobas son asociaciones de grupos no polares entre sí en soluciones acuosas debido a su insolubilidad en agua. Las interacciones hidrófobas pueden afectar a una serie de procesos moleculares, incluyendo, pero sin limitaciones, la estabilización de la estructura (ya sea de moléculas individuales, complejos de dos o tres moléculas, o ensamblajes más grandes) y la dinámica, y hacer contribuciones importantes a los procesos de unión  
60 proteína-proteína y proteína-ligando. Estas interacciones también se sabe que desempeñan un papel en los acontecimientos tempranos del plegamiento de proteínas, y están implicadas en los fenómenos de ensamblajes complejos y autoensamblajes (por ejemplo, formación de membranas).

65 Las interacciones hidrófobas pueden manipularse mediante el cambio de la protonación de las micropartículas cristalinas compuestas por histidina. La protonación de la histidina reducirá la nucleofilia de las micropartículas cristalinas e impartirá una carga positiva.

Las interacciones de unión de hidrógeno son fuerzas dipolo-dipolo especialmente fuertes entre las moléculas; un átomo de hidrógeno en un enlace polar (por ejemplo, H-F, H-O o H-N) puede experimentar una fuerza de atracción con una molécula o ion electronegativo adyacente, que tiene un par de electrones sin compartir (por lo general un átomo de F, O o N en otra molécula). Los puentes de hidrógeno son responsables de las propiedades únicas de agua y son muy importantes en la organización de las moléculas biológicas, especialmente en influir en la estructura de las proteínas y el ADN.

En la presente invención, las propiedades de unión a hidrógeno de la superficie de las micropartículas pueden controlarse mediante derivatización química. Los donantes / aceptores de unión a hidrógeno se pueden añadir químicamente para alterar la superficie de las micropartículas. Por ejemplo, el hidrógeno en un enlace N-H puede sufrir unión del hidrógeno al oxígeno en un enlace C = O. Si el N-H se sustituye por un N-CH<sub>3</sub>, se elimina esta interacción de enlace de hidrógeno particular. Del mismo modo, la sustitución del grupo C=O con un grupo C=C también elimina esta interacción de unión particular.

Las micropartículas con superficies que contienen grupos aromáticos ionizables son polares cuando están ionizadas o pero hidrófobas en su estado no ionizado. Comenzando con las superficies protonadas y manipulando las condiciones de la solución para reducir la ionización de la superficie de las partículas hace que los principios activos hidrofóbicos o aromáticos para recubrir la superficie de las micropartículas.

Las micropartículas con grupos cetona en la superficie podrían manipularse por el cambio de la polaridad de la solución. Mediante la reducción de la polaridad del disolvente (añadiendo disolventes orgánicos de baja polaridad a una solución acuosa) la forma enol se convierte en la especie predominante en la superficie de la partícula. Esta forma enol- es un donante de enlaces de hidrógeno, mientras que la forma ceto es un aceptor de enlaces de hidrógeno. La adsorción de fármacos que contienen nitrógeno sobre la superficie de las micropartículas se estimula de esta manera.

Las micropartículas con grupos de superficial que sufren isomerización inducida por pH o por la temperatura también pueden inducirse que absorben moléculas de fármaco mediante la manipulación de las condiciones de la solución. En el caso de estas superficies, la introducción de un codo en un grupo de superficie lineal debido a la isomerización aumenta la movilidad (fluidez) de los grupos en la superficie de las micropartículas. Esto permite que la superficie forme más contactos con el principio activo de los que son posibles con una superficie ordenada. Si las interacciones adicionales con el principio activo son cada una favorable, la energía neta de interacción se vuelve favorable y el fármaco se adsorbe en la superficie de las micropartículas.

#### **Técnicas de eliminación del medio fluido**

La eliminación del disolvente después de recubrimiento controlado de las superficies cristalinas con principio activo se puede lograr mediante métodos que incluyen, entre otros, sedimentación, filtración, o secado. Las técnicas de secado incluyen, pero no se limitan a, liofilización y secado por pulverización. Estas técnicas son conocidas para los expertos en la técnica. En una forma de realización de la presente invención, disolvente se elimina mediante secado por pulverización. En, por ejemplo, la solicitud de patente provisional n.º 60 / 776.605 presentada el 22 de febrero de 2006 se divulgan métodos de secado por pulverización de las micropartículas de dicetopiperazina.

#### **Análisis de las modificaciones de las propiedades de la superficie**

La presente invención emplea la técnica de espectroscopia ultrasónica para analizar los cambios en las propiedades de la superficie de las micropartículas cristalinas en una suspensión fluida, que estimulan o mejoran la adsorción de un principio activo en la micropartícula cristalina. Como se divulga en otra parte en la presente invención, tales cambios implican cambios en las condiciones de la solución (tales como el pH, la temperatura, la polaridad, la fuerza iónica y los codisolventes), mediante formación de complejos con iones mono o multivalentes, o mediante derivatización química para alterar las propiedades de la superficie de la micropartícula ya sea antes o después de la adición del principio activo.

La espectroscopia de ultrasonidos es una herramienta analítica conocida por el experto en la materia. En breve, la espectroscopia ultrasónica emplea ondas sonoras. En particular, usa una onda acústica de alta frecuencia que sondea las fuerzas intermoleculares en las muestras / materiales. La compresión (y descompresión) oscilante en la onda ultrasónica provoca la oscilación de las disposiciones moleculares en la muestra, que responde mediante atracción o repulsión intermolecular.

Viajando a través de las muestras, la onda ultrasónica pierde su energía (una disminución de la amplitud) y cambia su velocidad. Esta disminución en la amplitud y cambio de velocidad se analizan como características de la muestra. Por lo tanto, la propagación de las ondas ultrasónicas se determina mediante la velocidad ultrasónica y atenuación.

La velocidad ultrasónica se determina a través de la elasticidad y la densidad del medio. Los sólidos tienen las interacciones más fuertes entre las moléculas, seguido de líquidos y gases y, por lo tanto, son más rígidos en



comparación con líquidos y gases. La atenuación ultrasónica es una medida de la energía que las ondas ultrasónicas pierden a medida que viajan a través de una muestra. Caracteriza la transparencia ultrasónica de la muestra y se puede ver como una reducción de la amplitud de la onda.

5 La medición multifrecuencias de la atenuación ultrasónica en sistemas homogéneos permite el análisis de reacciones químicas rápidas, tales como, entre otros, intercambio de protones, transiciones estructurales (por ejemplo, isomerización), autoasociación (por ejemplo, dimerización), agregación, unión de ligandos a macromoléculas etc.

## 10 Ejemplos

Los ejemplos siguientes se han incluido para demostrar las formas de realización preferidas de la presente invención. Los expertos en la técnica deben apreciar que las técnicas divulgadas en los ejemplos siguientes representan técnicas descubiertas por el inventor para funcionar bien en la práctica de la presente invención y, por tanto, se puede considerar que constituyen modos preferidos para su práctica. No obstante, los expertos en la técnica deberían, a la luz de la presente divulgación, apreciar que se pueden realizar muchos cambios en las formas de realización específicas que se divulgan y seguir obteniendo un resultado parecido o similar sin desviarse del alcance de la invención tal como se expone en las reivindicaciones adjuntas.

### 20 Ejemplo 1

#### Procedimiento general para cargar micropartículas con principios activos

La Tabla 1 siguiente es un ejemplo de recubrimiento dirigido electrostáticamente de una micropartícula cristalina ionizable (micropartículas de FDKP) utilizando la adsorción a pH controlado. En estos experimentos, las suspensiones de micropartículas de FDKP se prepararon a pH 2,0 y 4,5. Después se añadió proteína (hormona de crecimiento) a cada una para dar condiciones finales de 5 mg/ml de las partículas de FDKP y 200 µg/ml de proteína. Después de mezclar, el líquido a granel se eliminó de la suspensión mediante filtración. A continuación, el material atrapado en el filtro se disolvió y se recogió. La concentración de proteínas en todas las fracciones se cuantificó mediante HPLC.

A pH bajo (2,0), la proteína no se adsorbió a las partículas y todas las proteínas se encontraron en el primer filtrado. Al aumentar el pH a 4,5, las propiedades de la superficie de las partículas se cambiaron para tener una alta afinidad por la proteína. En estas condiciones, la proteína se unió a las micropartículas y no se vio en el filtrado. Para determinar la cantidad de proteína asociada con las micropartículas, la proteína se recuperó cuando se disolvieron las micropartículas. Los controles libres de partículas demuestran que la proteína, por sí misma, no se había retenido en el filtro en las condiciones usadas, es decir, la proteína no se autoasoció ni, de otra manera, agregó en partículas más grandes que los poros del filtro.

40 **Tabla 1.** Concentraciones de proteína en un experimento de adsorción con micropartículas de FDKP

Fracción	pH 2,0		pH 4,5	
	con partículas	sin partículas	con partículas	sin partículas
Conc. inicial (µg /ml)	200	200	200	200
Filtrado (proteína sin unir)	146	181	0	145
Partículas disueltas	0	0	180	0

Los valores mostrados son los resultados de la cuantificación mediante HPLC de las soluciones después de la filtración

### Ejemplo 2

#### Control de la ionización de las micropartículas de FDKP mediante la manipulación del pH

45 FDKP es una molécula con forma de barra con un grupo funcional de ácido carboxílico en cada extremo que es esencialmente insoluble en agua a un pH por debajo de 3,5 cuando los ácidos carboxílicos están protonados y no llevan carga. La solubilidad de FDKP aumenta rápidamente a un pH por encima de 3,5 que corresponde a la ionización de los grupos carboxilo. La modelización de los cristales de FDKP, que se forman como placas con dos caras grandes y planas y bordes estrechos, indica que las moléculas de FDKP en forma de barra se alinean perpendicularmente con los bordes de las placas, de manera que el ácido carboxílico de los extremos de la molécula están dispuestos sobre las caras grandes de las placas. Sobre una base teórica, las superficies de cristales de FDKP deben estar parcialmente ionizadas a un pH de aproximadamente 5,0, donde la solubilidad es de aproximadamente 1 mg/ml, justo por debajo del pH al que una suspensión de 10 mg/ml de micropartículas se disolverá.

La ionización de las superficies de cristal de FDKP se ha observado indirectamente con espectroscopia ultrasónica. En la Figura 1, se muestran la curva de valoración por ultrasonidos de las micropartículas de FDKP y el tampón. En este experimento, se añadió una solución que contiene HCl 200 mM en pequeñas alícuotas a una suspensión agitada de 10 mg/ml de micropartículas de FDKP en tampón de acetato amónico 20 mM. El pH inicial fue de 4,8. Después de cada adición de HCl, se dejó equilibrar el sistema y se recogieron los datos de ultrasonidos.

La disminución de la velocidad ultrasónica observada con el aumento de la concentración de ácido (pH decreciente) refleja la protonación de los grupos de ácido carboxílico en el sistema. Como los grupos estaban protonados y no estaban con carga, la estructura del agua a su alrededor se relajó y las ondas ultrasónicas se transmitieron más lentamente (la velocidad ultrasónica disminuye). Dado que las superficies de carboxilato de las micropartículas de FDKP y el grupo carboxilato en el tampón de acetato son químicamente muy similares, las curvas también fueron similares. No obstante, las diferencias estaban provocadas por las micropartículas de FDKP. En primer lugar, la magnitud del cambio de velocidad con las micropartículas de FDKP era más grande. Esta diferencia es el resultado de la protonación de los grupos carboxilato ionizados en la superficie de las micropartículas de FDKP. El pico en la curva de atenuación, que se produce cerca del punto de protonación completa, se cambió a una concentración de ácido ligeramente superior en la suspensión de FDKP. Finalmente, ambos parámetros de FDKP continuaron cambiando a medida que el pH se redujo de 3,5 a 2,3. Estos cambios reflejan modificaciones adicionales en las propiedades de la superficie de las partículas que pueden incluir ordenamiento de los grupos carboxilo de la superficie u otras modificaciones microestructurales.

### Ejemplo 3

#### Carga de la proteína sobre micropartículas de FDKP mediante manipulación del pH de las propiedades de la superficie

La adsorción de las proteínas sobre superficies de micropartículas ionizables mediante manipulación del pH se puede lograr de dos maneras. La proteína puede añadirse y después ajustarse el pH para causar la ionización de la superficie con la adsorción concomitante de proteína. Este proceso es reversible. Como alternativa, el pH de la suspensión de partículas se puede ajustar para causar la ionización de la superficie antes de añadir la proteína.

Los datos de valoración ultrasónica mostrados en la Figura 2 indican la asociación de la proteína (insulina) con las micropartículas de FDKP a un pH mayor que aproximadamente 2,9 y la reducción de la interacción a pH por debajo de aproximadamente 2,9.

Una suspensión de micropartículas de FDKP se preparó en tampón de acetato amónico 20 mM, a pH 4,8, y se combinó con una solución madre de insulina para dar 800 µl de la suspensión con una concentración final de 10 mg/ml de micropartículas de FDKP y una concentración de insulina de 1 mg/ml. Esta suspensión se introduce en un espectrómetro de ultrasonidos. Mientras se agitaba suavemente, gradualmente se añadió ácido acético glacial en alícuotas de 5 µl para reducir el pH. En cada etapa en la titulación se recogieron los datos de ultrasonidos.

El cambio en la velocidad de los ultrasonidos estaba relacionada (proporcional) con la cantidad del área de superficie (agua de hidratación) de las partículas y / o las macromoléculas en la muestra. La Figura 2 ilustra que a un pH por encima de aproximadamente 2,9 (10 % v / v de ácido acético añadido), las curvas de velocidad para las micropartículas solas (partículas de FDKP) y las micropartículas con insulina (partículas de FDKP + insulina) coincidieron. Esto indicó que la cantidad del área de superficie en el sistema es esencialmente la misma que el área de superficie de las micropartículas de FDKP solas. La insulina tenía una contribución insignificante porque es muy pequeña en comparación con las micropartículas. A un pH por debajo de 2,9, las curvas de las partículas de FDKP y las partículas de FDKP + insulina divergieron. La velocidad ultrasónica de la curva de partículas de FDKP + insulina fue mayor en el presente documento, lo que indicó que había más área de superficie expuesta al agua que en las partículas de FDKP de la muestra solo. Esta área de superficie adicional procedía de la insulina libre en la suspensión. A medida que el pH aumentó de aproximadamente 2,7 a aproximadamente 2,9, el área de superficie de la insulina se perdió por la adsorción de la insulina en las superficies de las micropartículas de FDKP y la mayor intensidad de la curva de las micropartículas de FDKP + insulina desapareció a medida que la insulina libre desaparecía del sistema.

Como se ha indicado anteriormente, el segundo método dirigido por pH de las partículas de recubrimiento con la proteína es suspender las partículas en un medio fluido y ajustar las condiciones de la solución para ionizar la superficie de las partículas. Después se puede añadir la proteína a la suspensión de proteínas y las moléculas de proteína se adsorberán inmediatamente. La Figura 3 ilustra la cantidad de proteína (insulina) que se adsorbió tras la adición a las suspensiones de pH ajustado de las micropartículas de FDKP.

Las suspensiones de micropartículas de FDKP se prepararon a 5 mg/ml y se añadió un exceso de proteína (2 mg/ml). (Un exceso de proteínas, como se hace referencia en el presente documento, es la cantidad sobre la cual se cree que es necesaria para formar una monocapa que cubre la superficie accesible de la micropartícula de FDKP). Después de la incubación, la proteína no adsorbida se eliminó por filtración. Los sólidos retenidos en el filtro (material retenido) se disolvieron y las cantidades de micropartículas de FDKP y las proteínas retenidas en el filtro se

cuantificaron mediante HPLC. La proporción en masa de las proteínas/partículas se determinó a partir de esta cuantificación. Sobre la base del área de la superficie conocida de estas partículas y las dimensiones moleculares de la proteína, se estimó que se producía una monocapa continua de proteína adsorbida en una relación de masa de aproximadamente 0,07. Sobre la base de dicha estimación se puede ver en este ejemplo que se había formado una monocapa continua a pH 5,0 y que se formaban monocapas no continuas a un pH de 3,5 a 4,5.

Adicionalmente, diferentes lotes de micropartículas de FDKP recubiertas con principio activo se suspendieron en una solución ácida (pH final de aproximadamente 2,0) o agua (pH final de aproximadamente 4,5). Los diferentes principios activos incluyeron insulina, hormona de crecimiento e insulina aspart (un tipo de insulina de acción rápida), como se muestra en la Tabla 2. El disolvente se filtró a partir de estas suspensiones y las partículas retenidas se disolvieron y se recogieron. La cantidad de principio activo en todas estas muestras se cuantificó mediante HPLC. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Para cada uno de los lotes se liberó el principio activo de las partículas en la solución ácida. Por lo tanto, mediante la protonación de las superficies de los microcristales, el principio activo se desorbe de las superficies de cristal. Cuando las partículas se resuspendieron en agua, que no cambia el estado de ionización de la superficie de la partícula, la proteína se mantuvo adsorbida.

**Tabla 2.** Agentes activos recubiertos sobre las micropartículas de FDKP

	Hormona de crecimiento	Insulina	Insulina Aspart
Solución estándar de principio activo	250	1103	1099
Resuspendido en solución ácida	240	980	893
Redisuelto tras la filtración de la solución ácida	0	49	29
Resuspendido en agua	0	4	0
Redisuelto tras la filtración del agua	191	936	982

Los valores de la tabla son áreas de los picos integrados de la cuantificación mediante HPLC (mUA \* s a 215 nm).

#### Ejemplo 4

##### Caracterización de la adsorción dirigida por pH de insulina sobre las micropartículas de FDKP

La insulina se adsorbió (carga) sobre micropartículas de FDKP en un proceso de pH controlado mezclando una suspensión acuosa de micropartículas de FDKP con una solución acuosa de insulina. Para caracterizar el efecto del pH sobre la unión de la insulina a las micropartículas de FDKP se preparó una suspensión de 5 mg/ml de las partículas de FDKP a valores de pH variables. Después se añadió un exceso de insulina disuelta, se dejó adsorber durante aproximadamente 5 minutos, tras lo cual la insulina no unida se eliminó mediante filtración. Las partículas sólidas con insulina adsorbida se recuperaron del filtro (material retenido), se disolvieron y se recogieron. Las cantidades de insulina y las micropartículas de FDKP disueltas se cuantificaron mediante HPLC. La cantidad de insulina adsorbida se calculó como una fracción de la masa total del material retenido. La dependencia del pH de la adsorción de insulina se muestra en la Figura 4A; la adsorción de insulina aumentó como una función del pH. Se obtuvieron resultados similares para el anticuerpo monoclonal SSX-241-49, PTH y grelina, como se ilustra en las Figuras 4B, C y D respectivamente.

Adicionalmente, las partículas de FDKP se suspendieron en soluciones de insulina 10 mg/ml de pH diferentes. La proporción en masa de las partículas de FDKP e insulina fue 10:1. La concentración de insulina no unida en el sobrenadante se determinó mediante HPLC después de que el sobrenadante se hubo separado de las partículas mediante centrifugación. La unión a la insulina se determinó como la diferencia de la concentración inicial de insulina. Los datos notificados en la Figura 5 demuestran que el pH creciente tenía como resultado una reducción de la insulina en solución y aumentaba el contenido de insulina en las partículas de FDKP.

Por tanto, la unión de la insulina a las partículas de FDKP aumenta cuando aumenta el pH desde aproximadamente 3,0 hasta aproximadamente. Preferentemente, la solución de insulina se añade a un pH de 3,6 y en estas condiciones se adsorbe aproximadamente el 75 % de la insulina desde la solución a las partículas. La unión de la insulina aumenta a > 95 % a medida que el pH aumenta a  $\geq 4,0$ . La unión sustancialmente completa se consigue a aproximadamente  $\text{pH} \geq 4,2$ , preferentemente aproximadamente 4,4. A un pH mayor de 5,0, las micropartículas de FDKP comienzan a disolverse y ya no retienen la estructura de una micropartícula cristalina.

#### Ejemplo 5

##### Descripción de la carga de micropartículas de FDKP con insulina

En un formato de escala de producción (2-5 kg), las micropartículas de FDKP se forman mediante precipitación ácida con ácido acético y se lavan. Una solución de insulina a pH 3,6 se añade a la suspensión de partículas de FDKP. La solución madre de insulina es 10 % en peso de insulina 2,5 % en peso de ácido acético (pH de aproximadamente 3,6). Se usa hidróxido amónico para ajustar el pH de la mezcla a 4,5. La Tabla 3 indica las cantidades de los diversos componentes por kilogramo de la formulación usada para preparar partículas que contienen ~11,4 % de insulina en peso. Se puede incorporar Polisorbato 80 durante la formación de partículas y puede mejorar las características de manipulación de las partículas finales. Se deja tiempo para la adsorción de la insulina sobre las partículas de FDKP y asegurar una mezcla completa. A continuación, se añade la mezcla gota a gota al nitrógeno líquido para la congelación ultrarrápida de la suspensión. El medio fluido se elimina mediante liofilización para producir el producto farmacológico a granel de partículas de FDKP/insulina. Como alternativa, la mezcla se seca por pulverización. La Tabla 4 indica las cantidades de los diversos componentes en el producto a granel tras la eliminación del medio fluido.

Tabla 3. Composición de la fórmula del lote de partículas de FDKP/insulina

Componente	11,4 % de FDKP/Insulina (Gramos por kg de la formulación)
Insulina, USP	114 g
FDKP	870 g
Polisorbato 80, USP*	34,8 g
Solución fuerte de amoníaco, NF	572 g
Ácido acético (glacial), NF	3680 g
Agua purificada, NF	179000 g
Nitrógeno, NF	según sea necesario

Tabla 4. Composición de las partículas de FDKP/insulina

Componente	11,4 % de FDKP/Insulina, proceso (cantidad por gramo de la formulación)
Insulina, USP	3,0 UI (0,11 mg)
FDKP	0,87 mg
Polisorbato 80, USP*	0,007 mg
Solución fuerte de amoníaco, NF	Eliminado durante el proceso
Ácido acético (glacial), NF	Eliminado durante el proceso
Agua purificada, NF	0,012 mg
Nitrógeno, NF	Eliminado durante el proceso
En las Tablas 3 y 4 anterior, NF indica - Formulario nacional	
* El contenido en polisorbato 80 se estima mediante un ensayo de HPLC/EM.	
**La formulación de FDKP/Insulina contiene aproximadamente 1,2 % de agua residual tras la liofilización. También puede haber presente cantidades trazas de ácido acético e hidróxido amónico.	

## 20 Ejemplo 6

### Saturación de las superficies de las micropartículas por proteínas (formación de una monocapa continua)

El recubrimiento de la superficie de una micropartícula con una monocapa debe ser un proceso saturable. Es decir, su área de superficie accesible y el diámetro de la molécula de principio activo dictarán la capacidad de la superficie de las micropartículas. La Figura 6 ilustra esta saturación.

Se preparó una suspensión de micropartículas de FDKP y el pH se ajustó a entre pH 3,0 y pH 3,5, punto en el cual las superficies se ionizan parcialmente. En este procedimiento, no se pudo utilizar un pH más alto, ya que habría causado autoasociación del principio activo, la insulina. Pequeñas porciones de una solución de insulina concentrada se añadieron a la suspensión agitada. Después de cada adición, la muestra se dejó estabilizar y se recogieron los datos de ultrasonidos.

La Figura 6 muestra que se observa una reducción en la velocidad de ultrasonidos a medida que aumentaba la concentración de proteínas. Este tipo de cambio en la velocidad ultrasónica es típico para la unión del ligando en

soluciones acuosas e indica la adsorción de la proteína activa a las superficies de micropartículas de FDKP. La disminución de la velocidad es el resultado de la liberación de agua de hidratación desde las superficies de las micropartículas de FDKP y las proteínas. Cuando el agua de hidratación se desplaza por la adsorción del principio activo, su estructura se relaja y se produce una disminución neta de la velocidad ultrasónica a través de la muestra.

5 Cuando todos los sitios de unión sobre la superficie de las micropartículas de FDKP se han saturado, es decir, se ha formado una monocapa de proteína, los niveles de la curva se estabilizan. La formación de la monocapa también se demostró con los datos de las Figuras 7A-7D que mostraron que la adsorción de varios principios activos (GLP-1 [Figura 7A]; PTH [Figura 7B]; anticuerpo monoclonal anti-SSX-241-49 [Figura 7C]; y anticuerpo monoclonal anti-MOPC-21 [Figura 7D]), sobre las micropartículas alcanzaron la saturación a medida que aumenta la concentración

10 del principio activo a una concentración constante de las micropartículas de FDKP (5 mg/ml). Estos estudios se realizaron a pH 5,0, donde se observa la adsorción óptima del principio activo a las micropartículas. GLP-1 no se autoasocia a las concentraciones usadas (como se divulga en la solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º 60/744.882).

## 15 Ejemplo 7

### Pruebas para el mecanismo de interacción electrostática

20 Las pruebas de un mecanismo electrostático de interacción es la capacidad para interferir con la adsorción por el debilitamiento de las interacciones electrostáticas. Esto se demuestra mediante la adición de sal al sistema de partícula ionizada / principio activo Las Figuras 8A-8D ilustran que el aumento de la fuerza iónica en un sistema de micropartículas de principio activo-FDKP reducía la adsorción del principio activo sobre la micropartícula.

25 Se preparó una serie de muestras a pH 5,0, en las que la adsorción del principio activo sobre las superficies de las micropartículas de FDKP es fuerte. Cada muestra contenía una cantidad diferente de sal (cloruro de sodio), como se indica debajo de cada barra en las Figuras 8A-8D (las unidades son mM). El principio activo se mezcló en la suspensión para dar una concentración final de 5 mg/ml de micropartículas de FDKP y 0,75 mg/ml de insulina (un exceso; Figura 8A). Después de una breve incubación, el principio activo no unido se eliminó mediante filtración y las partículas con principio activo adsorbido se volvieron a disolver. La cantidad de principio activo y de partículas recuperadas se cuantificó mediante HPLC y se expresó como una relación de masa (% de la carga). Las figuras 8A-8D ilustran que el aumento de la fuerza iónica en un sistema de principio activo -micropartículas de FDKP redujo el grado de adsorción de principios activos que incluyen el anticuerpo monoclonal anti-SSX-241-49 (0,2 mg/ml; la Figura 8B), grelina (0,1 mg/ml; Figura 8C) y PTH (0,25 mg/ml; Figura 8D) en presencia de 5 mg/ml de micropartículas de FDKP.

35 La Figura 8 muestra una correlación inversa entre la adsorción medida y la concentración de sal en la suspensión de carga. Esto se puede interpretar como pruebas de que la sal compitió con el principio activo para la interacción con la superficie de la partícula. A medida que aumentaba la concentración de sal, competía firme y eficazmente por los sitios de unión a la superficie y esencialmente desplazaba el principio activo desde las superficies de las partículas.

40 También se ha especulado que la unión reducida del principio activo a las micropartículas puede ser atribuible a la protección Debye.

45 A menos que se indique otra cosa, debe entenderse que todos los números que expresan cantidades de ingredientes, propiedades, tales como el peso molecular, las condiciones de reacción etc. usadas en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, están modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". De acuerdo con esto, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos expuestos en la memoria descriptiva siguiente y las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar en función de las propiedades deseadas que se busca obtener mediante la presente invención. Como mínimo y no como intento de

50 limitar la aplicación de la doctrina de equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debería interpretarse al menos a la luz del número de dígitos significativos indicados y aplicando las técnicas de redondeo habituales. No obstante, los intervalos numéricos y los parámetros que establecen el amplio alcance de la invención son aproximaciones, los valores numéricos indicados en los ejemplos específicos se indican lo más precisamente posible. Sin embargo, cualquier valor numérico contiene inherentemente ciertos errores que necesariamente son el resultado de la desviación estándar en sus respectivas mediciones de ensayo.

55 El uso de los términos "un", "una/uno". "el/la" y referencias similares usadas en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) se deberá interpretar que abarca tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o esté claramente contraindicado por el contexto. La mención de intervalos de valores en el presente documento solo está destinada para servir como procedimiento acortado de hacer referencia individual a cada valor separado que entra dentro del intervalo. A menos que se indique lo contrario en el presente documento, cada valor individual se incorpora en la memoria descriptiva como si se mencionara de forma individual en el presente documento. Todos los procedimientos descritos en el presente documento se pueden realizar en cualquier orden adecuado, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o que, de otro modo, claramente se contradiga en el contexto. El

60 uso de cualquiera y todos los ejemplos, o términos ilustrativos (p. ej., "tal como") proporcionados en el presente documento está destinado simplemente a iluminar mejor la invención y no impone una limitación del alcance de la

invención reivindicada de otro modo. Ninguna expresión en la memoria descriptiva se debe interpretar como indicativa de ningún elemento no reivindicado esencial en la práctica de la invención.

5 El uso del término "o" en las reivindicaciones se utiliza para significar "y / o" a menos que se indique de forma explícita para referirse únicamente a las alternativas o las alternativas son mutuamente excluyentes, aunque la divulgación apoya una definición que se refiere sólo a las alternativas y a "y / o".

10 Los grupos de elementos o realizaciones alternos de la invención divulgados en el presente documento no deben interpretarse como limitaciones. A cada miembro del grupo se puede hacer referencia a y reivindicar individualmente o en cualquier combinación con otros miembros del grupo u otros elementos hallados en el presente documento. Se prevé que uno o más miembros de un grupo se incluyan en, o eliminen de, un grupo por motivos de comodidad y/o patentabilidad. Cuando se produce inclusión o deleción, se estima que el presente documento contiene el grupo según está modificado, de modo que cumple la descripción escrita de todos los grupos Markush usados en las reivindicaciones adjuntas.

15 Realizaciones preferidas de la presente invención se describen en el presente documento, incluido el mejor modo conocido por los inventores para llevar a cabo la invención. Por supuesto, las variaciones de estas realizaciones preferidas serán evidentes para los expertos en la técnica a la luz de la lectura de la descripción anterior. El inventor espera que los expertos usen dichas variaciones según sea adecuado y los inventores pretenden que la invención se ponga en práctica de otro modo distinto a lo descrito específicamente en el presente documento. De acuerdo con esto, la presente invención incluye todas las modificaciones y equivalentes de la materia objeto citada en las reivindicaciones adjuntas según lo permitido por la legislación aplicable. Además, cualquier combinación de los elementos descritos anteriormente en todas las posibles variaciones de la misma entra dentro de la invención a menos que se indique lo contrario en el presente documento o el contexto contradiga claramente lo otra cosa.

25 Adicionalmente, se han hecho numerosas referencias a las patentes y publicaciones impresas a lo largo de esta memoria descriptiva.

30 Adicionalmente, se ha de entender que las formas de realización de la invención divulgadas en el presente documento son ilustrativas de los principios de la presente invención.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de recubrimiento con un principio activo de una micropartícula cristalina preformada en suspensión, comprendiendo dicho método las etapas de:
- 5
- i) obtener una micropartícula cristalina preformada que comprenda una dicetopiperazina;
  - ii) proporcionar una suspensión que comprenda la micropartícula cristalina preformada, el principio activo y un disolvente; y
  - iii) alterar después las condiciones de la solución en la suspensión proporcionada para modificar una interacción energética entre el principio activo y la micropartícula cristalina con el fin de modificar una propiedad de superficie de la micropartícula cristalina, comprendiendo la etapa de alterar las condiciones de la solución al menos una de cambio del pH de la solución, alterar la polaridad de la solución, añadir iones monovalentes o multivalentes a la solución o la derivatización química de la micropartícula; y
- 10
- produciendo dicha etapa de alteración la adsorción del principio activo sobre una superficie de la micropartícula cristalina para proporcionar un recubrimiento del principio activo sobre la micropartícula cristalina y no incluyendo la etapa de alteración la etapa de eliminar el disolvente de la suspensión.
- 15
2. Método de la reivindicación 1 que comprende además la etapa de eliminar o intercambiar el disolvente después de la adsorción del principio activo sobre la superficie de micropartículas cristalinas.
- 20
3. Método de la reivindicación 2, en el que la etapa de eliminar o intercambiar el disolvente no tiene un efecto sustancial sobre la interacción entre el principio activo y la micropartícula.
4. Método de la reivindicación 1, en el que la alteración de las condiciones de la solución comprende cambiar el pH.
- 25
5. Método de la reivindicación 4 que comprende además la etapa de disolver el principio activo en una fase fluida de la suspensión de micropartículas y cambiar después el pH de la fase fluida.
6. Método de la reivindicación 5, en el que el pH se cambia antes de o después de la adición del principio activo.
- 30
7. Método de la reivindicación 1, en el que la alteración de las condiciones de la solución comprende alterar la polaridad de la solución.
8. Método de la reivindicación 1, en el que la alteración de las condiciones de la solución comprende la adición de iones monovalentes o multivalentes.
- 35
9. Método de la reivindicación 1, en el que la alteración de las condiciones de la solución comprende la derivatización química de la micropartícula.
- 40
10. Método de la reivindicación 1, en el que las propiedades de la superficie comprenden propiedades electrostáticas.
11. Método de la reivindicación 1, en el que las propiedades de la superficie comprenden propiedades hidrófobas.
- 45
12. Método de la reivindicación 1, en el que las propiedades de la superficie comprenden propiedades de unión al hidrógeno.
13. Método de la reivindicación 1, en el que la micropartícula es porosa y presenta superficies interiores accesibles al fluido general de la solución.
- 50
14. Método de la reivindicación 1, en el que la dicetopiperazina es fumaril dicetopiperazina.
15. Método de la reivindicación 1, en el que la adsorción produce una monocapa de principio activo sobre la superficie de la micropartícula.
- 55
16. Método de la reivindicación 15, en el que la adsorción produce una monocapa continua del principio activo sobre la superficie de la micropartícula cristalina.
17. Método de las reivindicaciones 15 o 16, en el que el principio activo en la monocapa presenta una orientación preferida.
- 60
18. Método de la reivindicación 1, en el que el principio activo es insulina o un análogo de insulina.
19. Método de recubrimiento de una micropartícula cristalina preformada en suspensión con insulina, comprendiendo el método las etapas de:
- 65

- i) disolver la insulina en un disolvente;
- ii) obtener micropartículas de dicetopiperazina cristalinas preformadas;
- iii) proporcionar una suspensión que comprende las micropartículas cristalinas preformadas, insulina y el disolvente;
- 5 iv) alterar después las condiciones de la solución en la suspensión proporcionada para modificar la interacción energética entre la insulina y la micropartícula cristalina, modificando la etapa de alteración una propiedad de superficie de la micropartícula cristalina y provocando la etapa de alteración la adsorción de la insulina sobre una superficie de la micropartícula cristalina para proporcionar un recubrimiento de insulina sobre la micropartícula cristalina, incluyendo dicha etapa de alteración la etapa de eliminar el disolvente de la suspensión, y
- 10 comprendiendo la etapa de alteración de las condiciones de la solución al menos una de cambio del pH de la solución, alterar la polaridad de la solución, añadir iones monovalentes o multivalentes a la solución o derivatización química de la micropartícula.



FIGURA 1

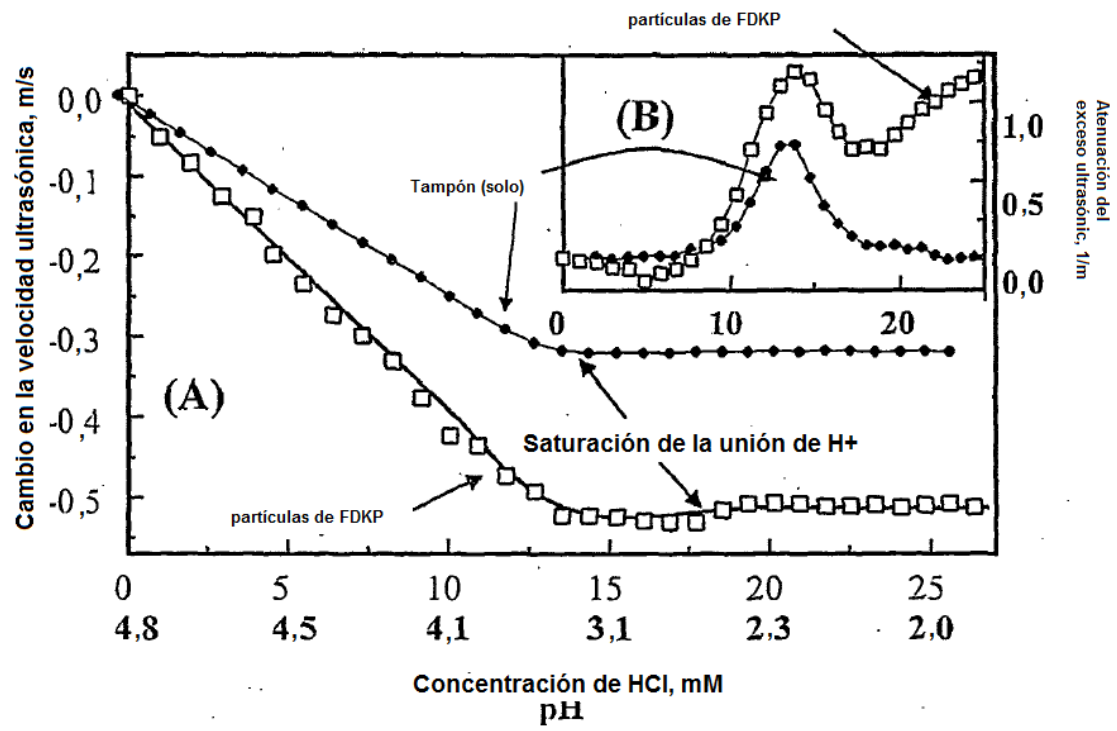


FIGURA 2

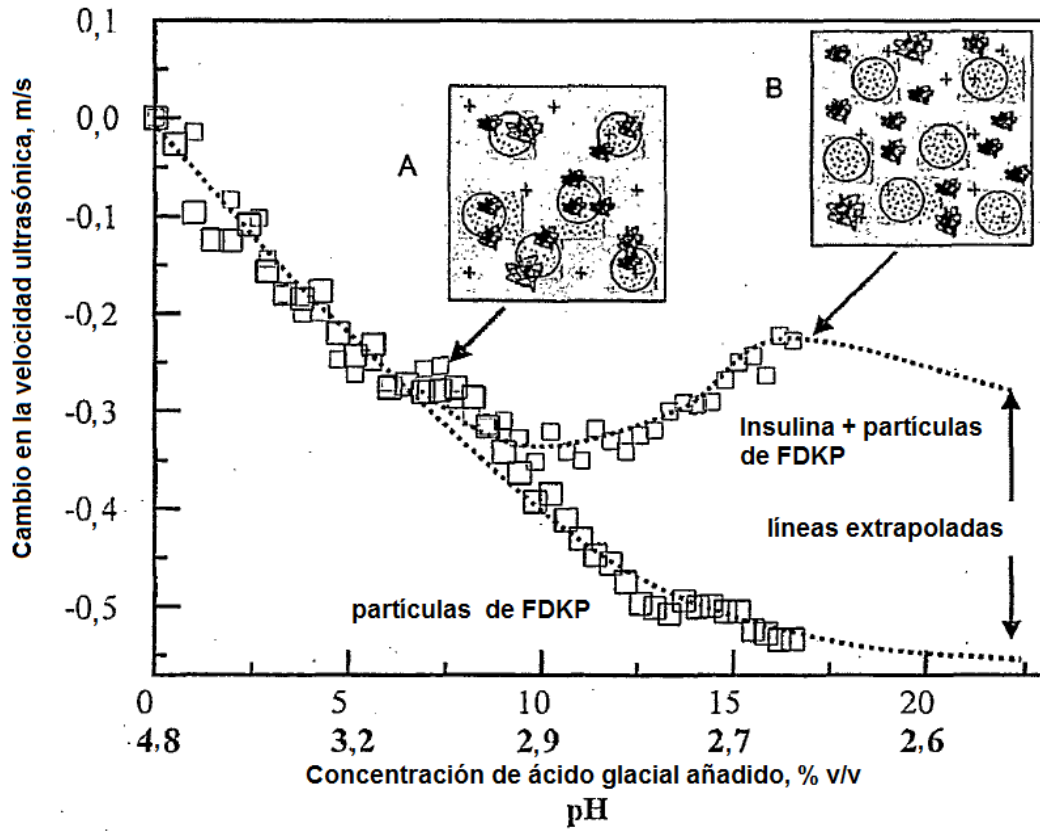
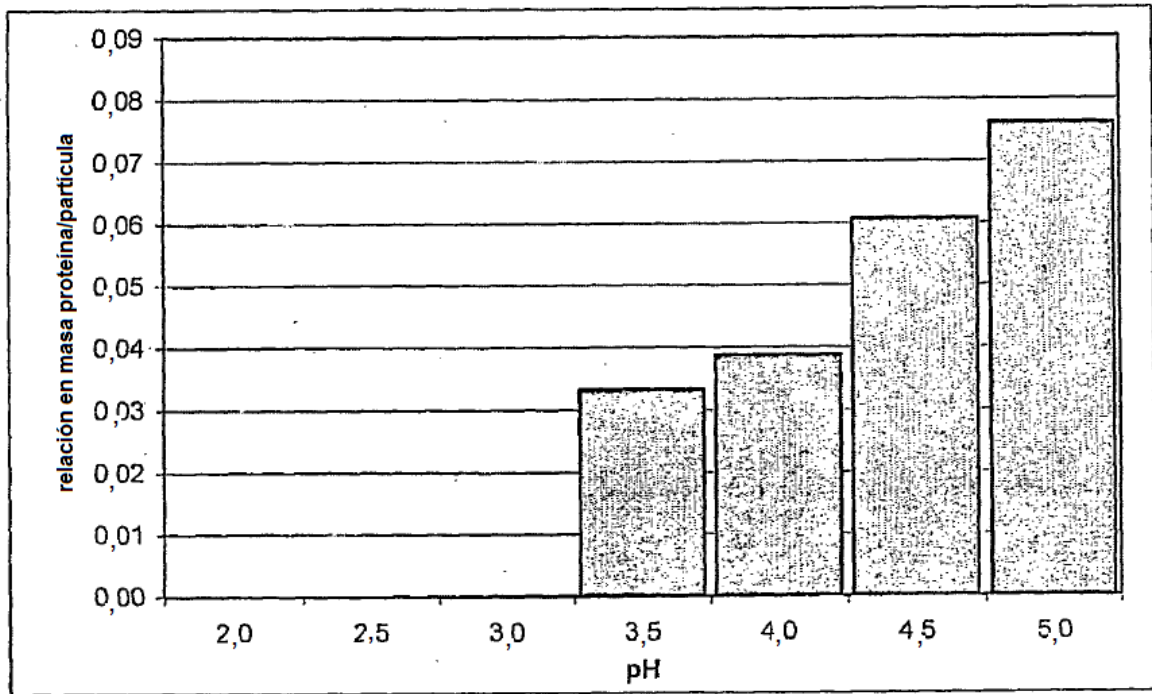


FIGURA 3



FIGURAS 4A-4D

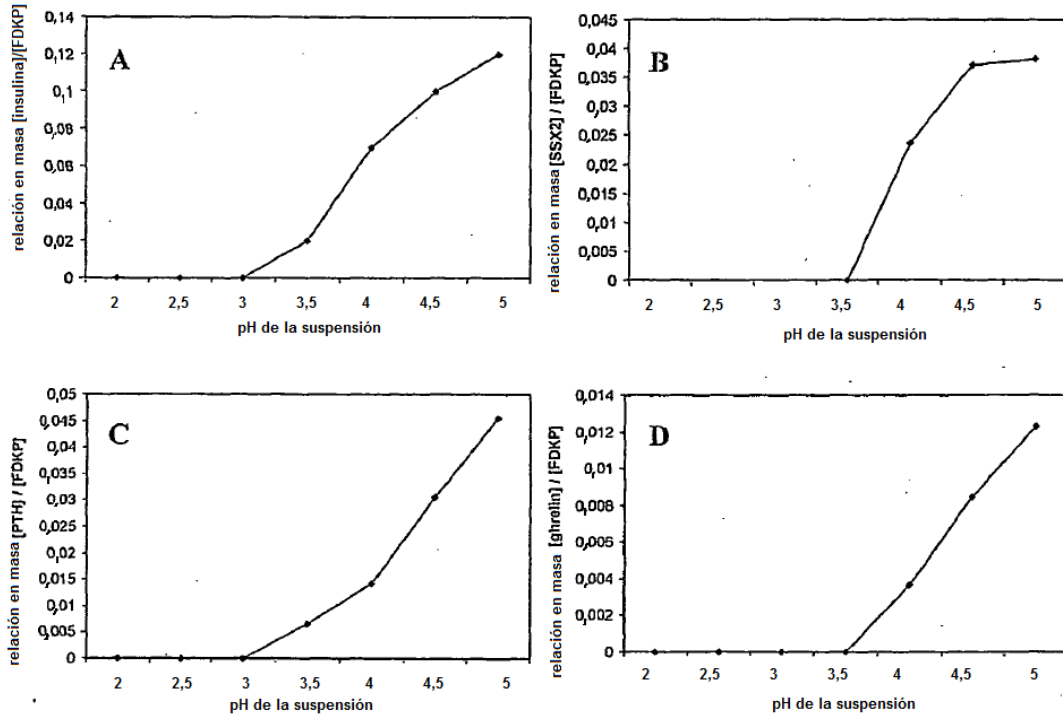
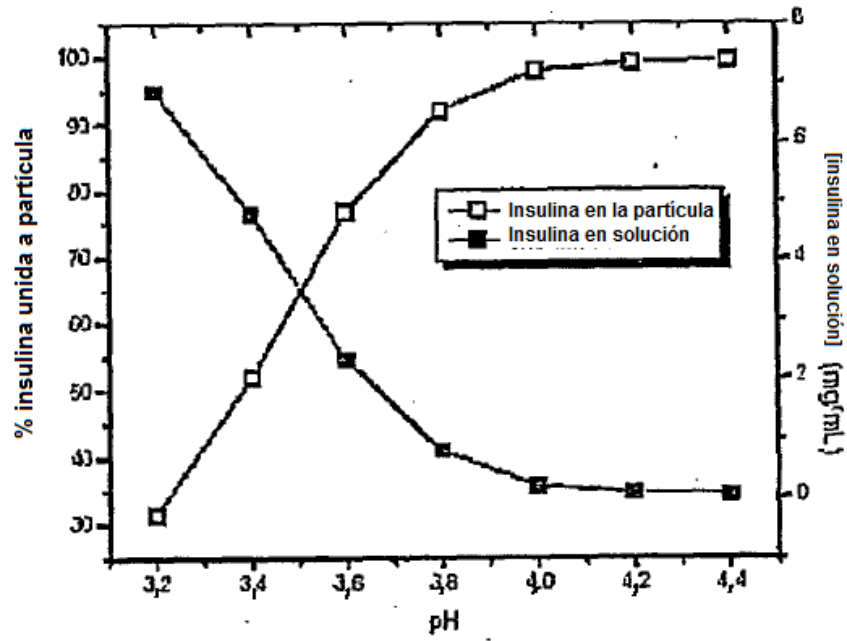
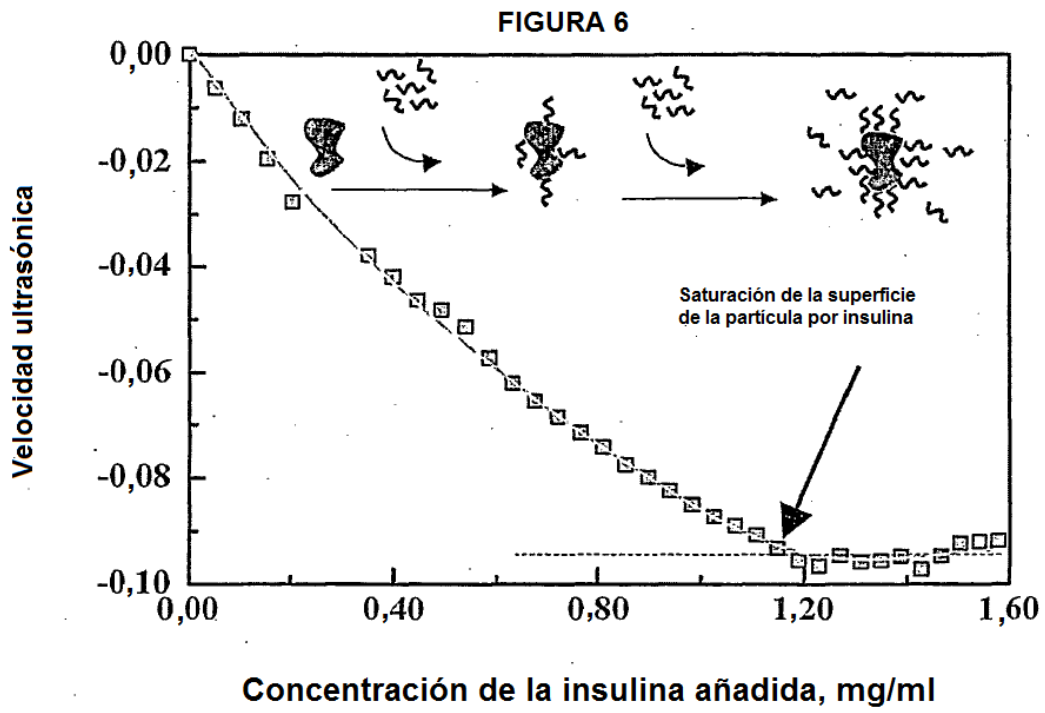
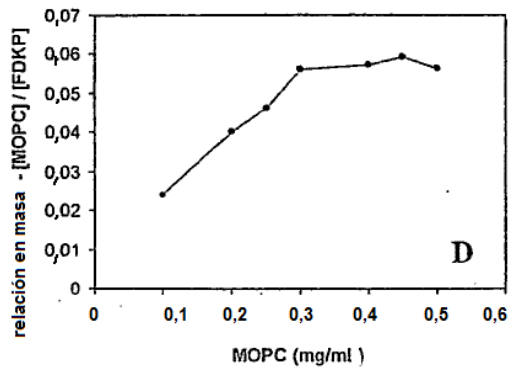
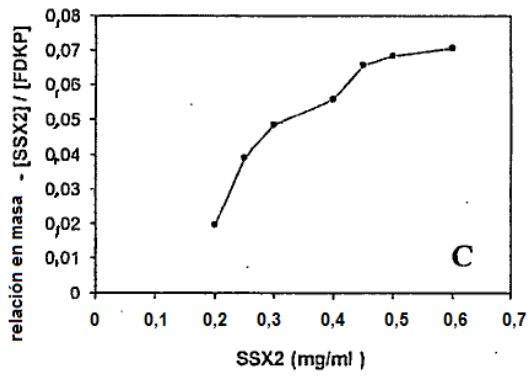
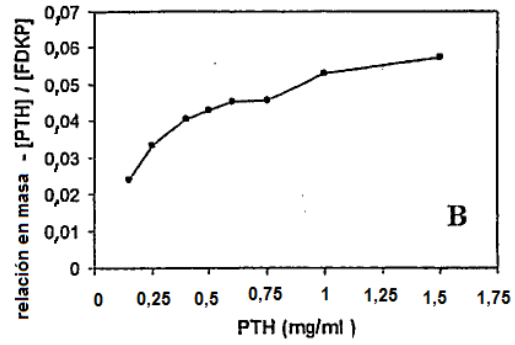
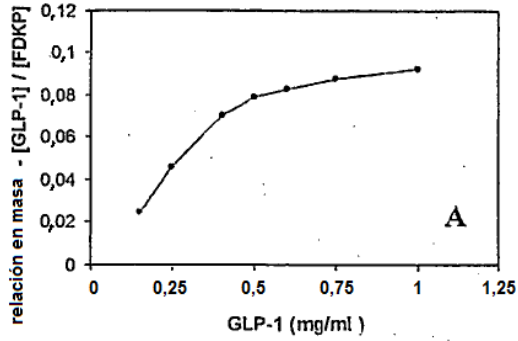


FIGURA 5





FIGURAS 7A-7D



FIGURAS 8A-8D

