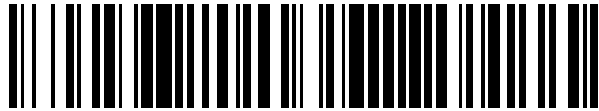


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 559 677**

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 06803583 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.12.2015 EP 1928423**

54 Título: **Método de formulación de fármacos basado en aumentar la afinidad de los principios activos por superficies de partículas microcristalinas**

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:
15.02.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

HOKENSON, MARK y
OBORG, KEITH A.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 559 677 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 aumentar la afinidad de los principios activos por superficies de partículas microcristalinas

Campo de la invención

La presente invención se refiere a formulaciones de fármacos, y está especialmente referida a métodos. Más específicamente, se describe la unión o adsorción de principios activos sobre la superficie de partículas microcristalinas.

Antecedente de la invención

La administración de agentes terapéuticos ha sido un problema importante. La administración oral es una de las vías más frecuentes y preferidas debido a la facilidad de administración, cumplimiento terapéutico del paciente, y menor coste. Sin embargo, las desventajas de esta vía incluyen una potencia baja o variable y una adsorción ineficaz del compuesto terapéutico. Esto es especialmente evidente cuando el compuesto a administrar es inestable en las condiciones que se encuentran en el tracto gastrointestinal. Se han desarrollado en la técnica numerosos métodos de recubrimiento y encapsulación, pero solamente unos pocos son eficaces para resolver este problema. Sin embargo, existen compuestos terapéuticos que tienden a ser menos activos en las condiciones del tracto gastrointestinal y deben administrarse en dosis mayores para que se puedan adsorber en el torrente sanguíneo en una cantidad eficaz.

Se ha desarrollado una amplia gama de sistemas de formulación de fármacos para resolver el problema de una administración de fármacos óptima y se basa en la incorporación de fármaco en una matriz que actúa como transportador. Los factores considerados en la formulación de fármacos incluyen los requisitos de que el sistema sea no tóxico y no reactivo con el fármaco a administrar, económico de fabricar, formado por componentes fácilmente disponibles, y consistente con respecto a la composición final y las características físicas, incluyendo la estabilidad y la tasa de liberación. Es también preferible que el sistema de administración del fármaco esté formado por materiales que el organismo pueda eliminar fácilmente mediante los procesos fisiológicos convencionales.

Los avances en la tecnología de micropartículas han ayudado en el desarrollo de formulaciones farmacológicas mejoradas. Sin embargo, a pesar de estos avances, existe una necesidad en la técnica de formulaciones farmacológicas estables que tengan eficacia a largo plazo y una adsorción óptima cuando se administre como sustancia farmacéutica, especialmente por medios pulmonares. Una solución para resolver esta deficiencia es dirigirse a las características/propiedades estructurales del principio activo que estimulen su adsorción a la superficie de las micropartículas y disminuyan su tendencia a permanecer en solución.

Sumario de la invención

Se proporcionan métodos para unir, recubrir o adsorber un principio activo sobre la superficie de una partícula microcristalina. En general, las micropartículas se recubren con un principio activo mediante la modificación del sistema que comprende las micropartículas y el principio activo disuelto de tal forma que el principio activo tenga mayor afinidad por la superficie de la micropartícula que por permanecer en disolución. En particular, la presente invención busca promover adicionalmente la adsorción de un principio activo en la superficie de una micropartícula que comprende una dicetopiperazina mediante la modificación/uso de las propiedades del principio activo bajo diferentes condiciones de solución.

Un primer aspecto de la invención proporciona un método para promover la unión de un principio activo a una partícula microcristalina preformada en suspensión, comprendiendo la micropartícula una dicetopiperazina, comprendiendo el método las etapas de:

i) modificar el potencial químico del principio activo con un modificador del principio activo en el que dicha modificación permite una interacción energéticamente favorable entre el principio activo y la micropartícula independiente de la eliminación del disolvente; y

ii) adsorber el principio activo sobre la superficie de la micropartícula.

En realizaciones concretas de la presente invención, la modificación del potencial químico comprende modificar la estructura, flexibilidad, rigidez, solubilidad o estabilidad del principio activo, individualmente o en combinación. La modificación del potencial químico del principio activo comprende alterar las condiciones de disolución. Alterar las condiciones de disolución comprende añadir un modificador del principio activo a la solución.

En realizaciones particulares, el modificador del principio activo se selecciona entre el grupo que consiste en sales, tensoactivos, iones, osmolitos, alcoholes, caótrofos, cosmótrofos, ácidos, bases, y disolventes orgánicos. En una realización, la sal es cloruro de sodio.

En otra realización más de la presente invención, el método comprende además la etapa de disolver el principio activo en la fase fluida de una suspensión de micropartículas y cambiar el pH de la fase fluida. En otro aspecto, la etapa de disolver el principio activo en una fase fluida se refiere a la disolución de un sólido. En otro aspecto, la etapa de disolver el principio activo se refiere a la adición de una solución concentrada del principio activo.

5 En otra realización de la presente invención, el modificador del principio activo mejora la estabilidad superficial del principio activo.

10 En otra realización más de la presente invención, el principio activo es una proteína, péptido, polipéptido, molécula pequeña, o molécula de ácido nucleico. En otra realización de la presente invención, el principio activo se selecciona entre el grupo que consiste en insulina, grelina, hormona del crecimiento, y hormona paratiroidea (PTH). El principio activo puede comprender un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. En varios aspectos de la invención, el anticuerpo puede reconocer un antígeno asociado con una enfermedad incluyendo, sin limitación, un antígeno asociado con un tumor o un antígeno relacionado con un patógeno infeccioso.

15 En otra realización más de la presente invención, la molécula pequeña es una molécula ionizable o una molécula hidrófoba tal como, pero sin limitación, ciclosporina A.

20 En otra realización de la presente invención, la modificación del potencial químico del principio activo comprende modular una o más interacciones energéticamente favorables tales como, pero sin limitación, interacciones electrostáticas, interacciones hidrófobas, y/o interacciones de enlaces de hidrógeno entre el principio activo y la superficie de la micropartícula. La micropartícula comprende una dicetopiperazina tal como, pero sin limitación, fumaril dicetopiperazina.

25 En otra realización más de la presente invención, el método comprende además la etapa de eliminar o intercambiar el disolvente. Disolvente, tal 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 como la necesidad de que todos los componentes estén en solución. De hecho, en muchos casos, puede utilizarse para referirse al medio líquido en el que están suspendidas la micropartículas.

30 Un segundo aspecto de la invención proporciona un proceso para preparar una composición de administración de fármaco que comprende un principio activo y una micropartícula cristalina que comprende las etapas de:

35 proporcionar una solución de principio activo que comprende una molécula de principio activo;

modificar el potencial químico del principio activo con un modificador del principio activo en el que dicha modificación permite una interacción energéticamente favorable entre el principio activo y la micropartícula independiente de la eliminación del disolvente, que promueve la unión del principio activo a la micropartícula;

40 proporcionar una micropartícula en suspensión o polvo, en el que la micropartícula comprende una dicetopiperazina;

45 combinar dicha solución de principio activo con dicha suspensión o polvo de micropartícula; y adsorber el principio activo sobre la superficie de la micropartícula. El polvo puede, por ejemplo, estar filtrado pero no seco.

50 En otra realización de la presente invención, el proceso de modificar el potencial químico del principio activo permite la interacción entre el principio activo y la micropartícula. En una realización, la modificación del potencial químico del principio activo comprende añadir un modificador del principio activo a la solución. Dicho modificador del principio activo se puede seleccionar entre el grupo que consiste en sales, tensioactivos, iones, osmolitos, alcoholes, caótropos, cosmótropos, ácido, base, y disolventes orgánicos. En otra realización adicional, el modificador disminuye la solubilidad de la molécula de principio activo, promueve la asociación entre el principio activo y la micropartícula y/o mejora la estabilidad estructural de la molécula de principio activo.

Breve descripción de los dibujos

55 Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se han incluido para demostrar adicionalmente determinados aspectos de los ejemplos descritos en el presente documento. La invención se puede entender mejor por referencia a uno o más de estos dibujos junto con la descripción detallada de las realizaciones específicas presentadas en el presente documento.

60 Las **Figs. 1A-1C** representa gráficamente los efectos de caótropos y cosmótropos en las curvas de carga de los principios activos en micropartículas de fumaril dicetopiperazina (FDCP) en función del pH y agente caotrópico/cosmotrópico 100 mM de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención. **La Fig. 1A** representa gráficamente la carga de 0,75 mg/ml de insulina sobre 5 mg/ml de micropartículas de FDCP en presencia de caótropos y cosmótropos a pH 3,0-5,0. **La Fig. 1B** representa gráficamente la carga de 0,25 mg/ml de péptido 1 análogo a glucagón (GIP1) sobre 5 mg/ml de micropartículas de FDCP en presencia de caótropos y cosmótropos a

pH 2,0-4,0. **La Fig. 1C** representa gráficamente la carga de 0,25 mg/ml de hormona paratiroidea (PTH) mg/ml sobre 5 mg/ml de micropartículas de FDCP en presencia de caótopos fuertes, NaSCN y NaClO₄, entre pH 4,0-5,0.

Las **Figs. 2A-2C** representan gráficamente los efectos de los osmolitos sobre las curvas de carga de los principios activos sobre las micropartículas de FDCP en función del pH y de los osmolitos (100 mM) de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención. **La Fig. 2A** representa gráficamente la carga de 0,75 mg/ml de insulina sobre 5 mg/ml de micropartículas de FDCP en presencia de osmolitos a pH 3,0-5,0. **La Fig. 2B** representa gráficamente la carga de 0,25 mg/ml de GIP1 sobre 5 mg/ml de micropartículas de FDCP en presencia de osmolitos entre pH 2,0-4,0. **La Fig. 2A** representa gráficamente la carga de 0,10 mg/ml del péptido grelina sobre 5 mg/ml de micropartículas de FDCP en presencia de osmolitos fuertes a pH 4,0-5,0.

Las **Figs. 3A-3D** representan gráficamente los efectos de alcoholes sobre las curvas de carga de los principios activos sobre las micropartículas de FDCP en función del pH y de los alcoholes de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención. **La Fig. 3A** representa gráficamente la carga de 0,10 mg/ml de grelina sobre 5 mg/ml de micropartículas de FDCP en presencia de hexafluoroisopropanol (HFIP) al 5 %, 10 %, 15 %, y 20 % v/v entre pH 2,0-4,0. **La Fig. 3B** representa gráficamente la carga de 0,10 mg/ml de grelina sobre 5 mg/ml de micropartículas de FDCP en presencia de trifluoroetanol (TFE) al 5 %, 10 %, 15 %, y 20 % v/v entre pH 2,0-4,0. **La Fig. 3C y 3D** representan gráficamente la carga de 0,25 mg/ml de GIP1 sobre 5 mg/ml de micropartículas de FDCP a pH 2,0-5,0 en presencia de HFIP y TFE, respectivamente.

Las **Figs. 4A-4D** representan gráficamente los efectos de la sal sobre las curvas de carga de los principios activos sobre las micropartículas de FDCP en función del pH y de la concentración de NaCl de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención. **La Fig. 4A** representa gráficamente la carga de 0,75 mg/ml de insulina sobre 5 mg/ml de micropartículas de FDCP en presencia de 0-500 mM de NaCl a pH 2,0-5,0. **La Fig. 4B** representa gráficamente la carga de 0,25 mg/ml de GIP1 sobre 5 mg/ml de micropartículas de FDCP en presencia de 0-500 mM de NaCl a pH 2,0-5,0. **La Fig. 4B** representa gráficamente la carga de 0,25 mg/ml del péptido PTH sobre 5 mg/ml de micropartículas de FDCP en presencia de 0-1000 mM de NaCl a pH 2,0-5,0. **La Fig. 4D** representa gráficamente el análisis de la estructura secundaria de la PTH para varias concentraciones de sal (20 °C). La CD del UV lejano de 4,3 mg/ml de PTH a pH 5,8 ilustra que, a medida que la concentración de NaCl aumenta, la estructura secundaria del péptido adopta una conformación más helicoidal.

Las **Figs. 5A-5B** representan gráficamente la adsorción de moléculas hidrófobas sobre las micropartículas de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención. **La Fig. 5A** representa gráficamente la unión de la ciclosporina A a las micropartículas de FDCP con el aumento de antidisolvente (agua) a una concentración del 60 %, 80 % y 90 %. **La Fig. 5B** representa gráficamente el porcentaje de carga teórica máxima conseguida para la ciclosporina A con relaciones másicas variables de ciclosporina A/micropartículas de FDCP en presencia de un 90 % de antidisolvente.

La Fig. 6 representa gráficamente la farmacocinética de una única inyección intravenosa (IV) e insuflación pulmonar (IS) en ratas usando varias relaciones másicas de ciclosporina A/micropartículas de FDCP con un 90 % de antidisolvente de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

Se describen en el presente documento métodos útiles para estabilizar principios activos farmacéuticos junto con micropartículas cristalinas que comprenden una dicetopiperazina. Las composiciones resultantes proporcionan principios activos estables revestidos sobre las superficies de la micropartícula cristalina.

La sustancia a revestir o adsorber sobre la micropartícula cristalina se denomina en el presente documento principio activo. Los ejemplos de clases de principio activo incluyen composiciones farmacéuticas, compuestos sintéticos, y macromoléculas orgánicas que tienen utilidad terapéutica, profiláctica y/o diagnóstica.

En general, la mayoría de principios activos que se pueden revestir o adsorber sobre la superficie de las micropartículas cristalinas incluyen, pero sin limitación, macromoléculas orgánicas, ácidos nucleicos, compuestos orgánicos sintéticos, polipéptidos, péptidos, proteínas, polisacáridos y otros azúcares, y lípidos. Los péptidos, proteínas, y polipéptidos son todos ellos cadenas de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Por lo general, se considera que los péptidos tienen menos de 30 restos de aminoácidos, pero pueden incluir más. Las proteínas son polímeros que contienen más de 30 restos de aminoácidos. El término polipéptido, tal como se conoce en la técnica y 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 generalmente contienen un mínimo de 10 aminoácidos. Los principios activos utilizados en la formulación de revestimiento pueden clasificarse en varias clases de actividad biológica, tales como agentes vasoactivos, agentes neuroactivos, hormonas, anticoagulantes, agentes inmunomoduladores, agentes citotóxicos, antibióticos, antivíricos, antígenos, y anticuerpos.

Los ejemplos de principios activos que se pueden emplear en la presente invención incluyen, de una forma no limitante: hormona del crecimiento, anticuerpos y fragmentos de los mismos, alquinos, ciclosporinas (por ejemplo

ciclosporina A), PPACK (D-fenilalanil-1-prolil-L-arginina clorometilcetona, CMFDA (diacetato de 5-clorometilfluoresceína), Texas Red, clopidogrel, factor estimulador de las colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), péptido 1 análogo a glucagón (GIP-1), grelina, hormona paratiroidea (PTH), insulina y análogos de insulina (por ejemplo, aspartoinsulina e insulina) y anticuerpos y fragmentos de los mismos, incluyendo, pero sin limitación: anticuerpos humanizados o quiméricos; F(ab), F(ab')₂, o anticuerpos monocatenarios solos o fusionados con otros polipéptidos; anticuerpos monoclonales terapéuticos o diagnósticos dirigidos contra antígenos del cáncer, citoquinas, agentes infecciosos, mediadores inflamatorios, hormonas, y antígenos de la superficie celular. Los ejemplos no limitantes de anticuerpos dirigidos contra antígenos tumorales incluyen anti-SSX-241-49 (sarcoma sinovial, X breakpoint 2), anti-NY-ESQ-1 (antígeno asociado al tumor esofágico), anti-PRAME (antígeno de melanoma expresado preferentemente), anti-PSMA (antígeno de membrana específico de la próstata), anti-Melan-A (antígeno asociado al tumor melanoma), anti-tirosinasa (antígeno asociado al tumor melanoma), y anti-MQPC-21 (proteína plasmática de la célula de mieloma).

Micropartículas

Esencialmente, el término "micropartícula" se refiere a una partícula que tiene un diámetro de aproximadamente 0,5-1000 µm, independientemente de la estructura exterior o interior precisa. En la amplia categoría de las micropartículas, las "microesferas" se refieren a micropartículas que tienen una forma esférica uniforme. Las micropartículas cristalinas que se usan en el presente documento se refieren a micropartículas que tienen la estructura interna, aunque no necesariamente la forma externa, de un cristal y tienen una ordenación regular de los átomos en una red cristalina espacial. Las superficies cristalinas ionizables se refieren a micropartículas cristalinas que tienen la capacidad adicional de llevar una carga eléctrica. En algunas realizaciones, la micropartícula puede ser un monocristal de forma regular. En varias realizaciones preferidas, la micropartícula tiene forma irregular, es porosa, tiene superficies interiores accesibles al principio activo, o comprende múltiples cristales, en cualquier combinación. Dichas características aumentarán por lo general el área superficial y, por tanto, la capacidad de carga. Dichas características también pueden contribuir a propiedades aerodinámicas ventajosas, algo importante si el principio activo va a administrarse mediante la inhalación de un polvo seco que comprende las micropartículas.

Preferentemente, la sustancia química que compone la micropartícula cristalina es reactiva reversiblemente con el principio activo a administrar, no tóxica, así como no metabolizable por roedores y seres humanos. Entendiendo lo anterior, se puede tolerar cierto nivel de toxicidad, dependiendo, por ejemplo, de la gravedad de la dolencia a tratar o de la cantidad de la sustancia a la que está expuesto el paciente. De manera similar, no se requiere que la sustancia sea totalmente metabólicamente inerte. Además, la estructura cristalina de las micropartículas preferidas no se ve sustancialmente perturbada durante el proceso de recubrimiento o unión con el principio activo. La composición de la micropartícula cristalina determina qué tipo de interacciones químicas se pueden manipular para impulsar la adsorción de un principio activo en la superficie de una micropartícula.

Numerosas sustancias se pueden usar para formar las micropartículas cristalinas. Las micropartículas de ese tipo tienen superficies, cuyas propiedades se pueden manipular durante el proceso de recubrimiento tal como se describe en el documento US 2007/0059373. Los materiales representativos a partir de los que se pueden formar las micropartículas cristalinas incluyen, pero sin limitación, aminoácidos aromáticos, o compuestos con solubilidad limitada en un intervalo de pH definido tales como dicetopiperazinas y sulfatos de morfolina. Las micropartículas para utilizar en la presente invención comprenden una dicetopiperazina (DCP).

Como se discute en el presente documento, Las micropartículas de DCP se utilizan para facilitar la adsorción del principio activo. Las patentes estadounidenses N.º 5.352.461 y 5.503.852 describen un sistema de administración de fármaco basado en la formación de micropartículas de dicetopiperazina (DCP) a partir de derivados de dicetopiperazina tales como 3,6-bis[*N*-fumaril-*N*-(*n*-butil)amino] (también denominado fumaril dicetopiperazina o FDCP; también denominada (E)-3,6-bis[4-(*N*-carboxi-2-propenil)amidobutil]-2,5-dicetopiperazina) que son estables a pH bajo y se disuelven en el pH sanguíneo o del intestino delgado. Un sistema basado en elementos estructurales de la dicetopiperazina forma micropartículas con distribuciones de tamaño e intervalos de pH deseables, así como buena tolerancia a la carga útil. Se puede generar una amplia gama de características estables y reproducibles con las manipulaciones adecuadas de los grupos sustituyentes. Dichas patentes describen la precipitación de la DCP en la presencia del principio activo para formar micropartículas que comprenden el principio activo. Otros detalles sobre la síntesis, preparación, y uso de las dicetopiperazinas y las micropartículas de dicetopiperazina se describen en las patentes de Estados Unidos 6.071.497; 6.331.318; 6.428.771 y en las publicaciones de patente de Estados Unidos N.º 20060040953 y 20060041133. Las composiciones que comprenden partículas de dicetopiperazina se describen en la patente de Estados Unidos N.º 6.991.779 y en la publicación de patente de Estados Unidos N.º 20040038865.

Otras dicetopiperazinas incluidas en la presente invención incluyen 3,6-di(4-aminobutil)-2,5-dicetopiperazina; 3,6-di(succinil-4-aminobutil)-2,5-dicetopiperazina (succinil dicetopiperazina o SDCP); 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. Las sales de dicetopiperazina también se pueden utilizar en la presente invención, y pueden incluir, por ejemplo, una sal farmacéuticamente aceptable tal como la de Na, K, Li, Mg, Ca, amonio, o mono, di o trialkilamonio (derivadas de trietilamina, butilamina, dietanolamina, trietanolamina, o piridinas, y similares). La

sal puede ser una monosal, disal o sal mixta. Las sales de orden superior también se contemplan para aquellas dicetopiperazinas cuyos grupos R contienen más de un grupo ácido. En otros aspectos de la invención, una forma básica del agente se puede mezclar con la dicetopiperazina para formar un enlace salino entre el fármaco y la dicetopiperazina, de forma que el fármaco es el contracción de la dicetopiperazina. Las sales de DCP para administración de fármacos se describen más detalladamente en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20060040953.

La patente de Estados Unidos n.º 6.444.226, y 6.652.885, describen la preparación y la provisión de micropartículas de DCP en suspensión acuosa, a la que se añade una solución de principio activo, y a continuación, la etapa crítica de liofilizar la suspensión para obtener micropartículas que tienen un revestimiento de principio activo. La base de esta formulación es que el recubrimiento de la micropartícula con el principio activo está impulsado por la eliminación del medio líquido mediante liofilización. (Véase también la patente de Estados Unidos n.º 6.440.463). A diferencia de las enseñanzas de la técnica anterior, la presente invención proporciona medios para ajustar la asociación entre el principio activo y la micropartícula antes de la eliminación del disolvente. De esta manera, la eliminación del medio líquido por métodos físicos no específicos (por ejemplo, filtración o sedimentación) o métodos evaporativos (por ejemplo, liofilización o secado por pulverización) pueden dar como resultado cargas comparables.

Promover la adsorción de los principios activos

La adsorción del principio activo en la superficie de una micropartícula cristalina puede implicar alterar las propiedades del principio activo en una solución o suspensión de fluido en varias condiciones de disolución, promoviendo de esta forma la adsorción sobre la superficie de la micropartícula y reduciendo la cantidad de principio activo que permanece en solución. La alteración o las modificaciones del principio activo pueden dar lugar al uso de modificadores tales como, pero sin limitación, caótopos y cosmótopos, sales, sustancias orgánicas tales como, pero sin limitación, alcoholes, osmolitos, y tensioactivos. Estos modificadores pueden actuar sobre el principio activo para alterar su potencial químico y, por tanto, su estructura, flexibilidad, rigidez o estabilidad, sin alterar químicamente el propio agente. El término "potencial químico" es bien conocido por un experto en la materia. En realizaciones de la presente invención, "potencial químico" se refiere a la energía libre necesaria para impulsar una reacción química como, por ejemplo, la interacción entre un principio activo y un disolvente o la adsorción de un principio activo sobre una micropartícula. La expresión "energéticamente favorable" tal como se usa en el presente documento se refiere a la disminución en los niveles de energía libre de los estados absorbidos del principio activo sobre la micropartícula comparado con el nivel de energía libre de la micropartícula sin revestimiento, o principio activo no unido y/o las formas insolubles (incluyendo la agregación o la precipitación) del principio activo. El término "estructura" tal como se usa en el presente documento se refiere a la estructura secundaria de la molécula del principio activo e incluye la formación de alfa-hélices, beta láminas, o hélice aleatoria (sin ordenar) de la molécula de principio activo, tal como una proteína. Adicionalmente, el término estructura también puede incluir las estructuras terciaria y cuaternaria de la molécula, pero no se limita a las mismas y también puede referirse a la autoasociación, agregación, multimerización, dimerización, y similares, de una molécula. El término "estabilidad" tal como se usa en el presente documento se refiere a la estabilización o desestabilización de la estructura del principio activo en la presencia del modificador.

Además, la alteración de las propiedades del principio activo en una solución o suspensión de fluido es probable que afecte las interacciones debidas a las propiedades hidrófobas, propiedades de unión a hidrógeno, y propiedades electrostáticas del principio activo y/o micropartícula.

Las interacciones hidrófobas son asociaciones de los grupos no polares entre sí en soluciones acuosas debido a su insolubilidad en agua. Las interacciones hidrófobas pueden afectar a numerosos procesos moleculares que incluyen, pero sin limitación, estabilización de la estructura (de moléculas simples, complejas de dos o tres moléculas, o conjuntos más grandes) y dinámica de la misma, y realizan importantes contribuciones a los procesos de unión proteína-proteína y proteína-ligando. Se sabe que estas interacciones tienen un papel en eventos tempranos del plegamiento de las proteínas, y están implicados en complejos conjuntos y fenómenos de autoensamblaje (por ejemplo, formación de membranas).

Las interacciones de enlace de hidrógeno son fuerzas dipolo-dipolo especialmente intensas entre 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 vecino, que tiene un par de electrones no compartidos (de forma típica un átomo de F, O, o de N sobre otra molécula). Los enlaces de hidrógeno son responsables de las propiedades únicas del agua y son muy importantes en la organización de moléculas biológicas, especialmente en lo que afecta a la estructura de las proteínas y el ADN.

Las interacciones electrostáticas son atracciones entre cargas opuestas o repulsiones entre cargas similares que se vuelven más intensas a medida que las cargas se acercan entre sí. Las interacciones electrostáticas constituyen un componente clave en la comprensión de las interacciones entre los cuerpos cargados en soluciones iónicas. Por ejemplo, la estabilidad de las partículas coloidales dispersas en un disolvente se puede explicar teniendo en cuenta la competición entre las interacciones electrostáticas de repulsión y las interacciones de van der Waals de atracción. Las interacciones electrostáticas son también de importancia cuando se tiene en cuenta la interacción y la adhesión

entre las partículas.

Sales

5 En algunas realizaciones de la presente invención, las propiedades del principio activo se alteran usando sales tales como, pero sin limitación, cloruro sódico. Los principios activos, por ejemplo, PTH y GLP-1, experimentan cambios estructurales notales en la presencia de sal. Como se muestra en el Ejemplo 5 (Fig. 4D), la presencia de sal aumenta la estructura secundaria de PTH promoviendo una conformación más helicoidal del péptido. También se ha
10 mostrado que la sal afecta a la estructura del GLP-1. Adicionalmente, las sales y otros compuestos iónicos pueden tanto estabilizar como desestabilizar proteínas y péptidos, especialmente cuando la diferencia entre el pH de la solución y el pI de la proteína o el péptido se vuelve mayor por la unión a restos específicamente cargados (Antosiewicz J, et al., J. Mol. Biol. 238:415-436, 1994).

Caótopos

15 Los caótopos, que son bien conocidos en la materia, son iones que muestran interacciones débiles con el agua y por tanto desestabilizan moléculas tales como proteínas o péptidos. Estos compuestos descomponen la red de agua unida por hidrógeno y disminuyen su tensión superficial, promoviendo de esta forma mayor libertad estructural y la desnaturalización de las proteínas y los péptidos. Los ejemplos de caótopos incluyen, pero sin limitación, NaSCN, (CH₃)₃N-HCl, Na₂NO₃, y NaClO₄ y cloruro de cesio (CsCl).
20

Los cosmótopos o liótopos, por otra parte, son iones que muestran interacciones fuertes con el agua y por lo general estabilizan macromoléculas tales como proteínas y péptidos. Este efecto de estabilización se lleva a cabo con el aumento del orden del agua y el aumento de su tensión superficial. Los ejemplos de cosmótopos incluyen, pero sin limitación, citrato de tamoxifeno (citrato Na), y sulfato de sodio (Na₂SO₄).
25

Alcoholes

30 Otra clase de modificador del principio activo utilizado en la presente invención son los alcoholes. Los alcoholes pueden perturbar la estructura nativa de las proteínas y los péptidos y también pueden estabilizar e inducir conformaciones α -helicoidales en macromoléculas, muy especialmente en el interior de proteínas y polipéptidos no estructurados. Dichos alcoholes pueden incluir, pero sin limitación, metanol (MeOH), etanol (EtOH), trifluoroetanol (TFE), y hexafluoroisopropanol (HFIP). De estos, TFE y HFIP son dos de los alcoholes más potentes para inducir transiciones helicoidales en péptidos y proteínas (Hirota et al., Protein Sci., 6:416-421; 1997, incorporado en este
35 documento por referencia para todo su contenido que se refiere a las transiciones helicoidales en péptidos y proteínas). Estos alcoholes pueden afectar a la estructura de proteínas y péptidos debido a su capacidad para perturbar las propiedades de unión al hidrógeno del disolvente (véase Eggers y Valentine, Protein Sci., 10:250-261; 2001, incorporado en este documento por referencia para todo su contenido que se refiere al efecto de los alcoholes sobre la estructura de las proteínas).
40

Osmolitos

45 Otra clase de modificadores que afectan a la afinidad del principio activo por la micropartícula son los osmolitos. Los osmolitos, como es bien conocido del experto en la materia, son compuestos pequeños que producen las células de la mayoría de los organismos en situaciones de elevado estrés (tales como extremas fluctuaciones de temperatura, entornos muy salinos, etc.) para estabilizar sus macromoléculas. No interactúan directamente con la macromolécula, pero actúan mediante la alteración de las propiedades del disolvente en el entorno celular y, por tanto, su presencia indirectamente modifica la estabilidad de las proteínas. Estos compuestos incluyen varios polioles, azúcares, polisacáridos, disolventes orgánicos, y varios aminoácidos y sus derivados. Aunque el mecanismo de los osmolitos debe elucidarse aún, se especula que es probable que estos compuestos actúan aumentando el potencial químico del estado desnaturalizado con respecto a su estado natural, aumentando de esta forma la diferencia de energía de Gibbs (positiva) (ΔG) entre los conjunto natural y desnaturalizado (Arakawa y Timasheff, Biochemistry 29:1914-1923,1990).
50

55 Los osmolitos que se contemplan en la presente invención, incluyen de forma no limitante, hexilenglicol (Hex-Gli), trehalosa, glicina, polietilenglicol (PEG), N-óxido de trimetilamina (TMAO), manitol, y prolina.

Descripción general del método

60 En los métodos de la presente invención, se combinan al menos tres componentes en un medio líquido: al menos un principio activo, micropartículas (preformadas) que comprenden una dicetopiperazina, y al menos un modificador del principio activo como se ha descrito anteriormente. Los componentes de este sistema se pueden combinar en cualquier orden. En algunas realizaciones, el modificador y el principio activo se combinan entre sí antes de que dicha mezcla se combine con una suspensión de las micropartículas. En otras realizaciones, el agente y las
65 micropartículas se combinan en primer lugar y luego se añade el modificador. En algunas realizaciones, el principio activo o el modificador se proporcionan y se combinan con otro componente, o componentes, en forma de una

solución. En otras realizaciones, cualquiera de los componentes se puede proporcionar en forma sólida y disuelta o, en el caso de las micropartículas, suspendidas, en el medio líquido que contiene otro de los componentes. Otras variaciones serán evidentes para el experto en la materia.

5 Las micropartículas se forman antes de combinarse con el resto de componentes del sistema y, como tal, se presentan en forma de una suspensión. No obstante, el medio líquido en el que se han suspendido las micropartículas se denomina en el presente documento, algunas veces, como disolvente. El medio líquido utilizado en el método suele ser acuoso. Sin embargo, en algunos casos, el medio líquido puede comprender más de un compuesto orgánico, por ejemplo, un alcohol utilizado como modificador, en lugar de agua.

10 Tras la unión de todos los componentes del sistema, el principio activo quedará adsorbido sobre la superficie de la micropartícula. En realizaciones crecientemente preferidas de la presente invención, al menos 50, 60, 70, 80, 90, 95 %, o sustancialmente todo, el principio activo del sistema quedará adsorbido sobre las micropartículas, hasta el 100 %. En algunas realizaciones de la presente invención, el área superficial accesible de las micropartículas será suficiente para que todo el principio activo adsorbido esté en contacto directo con la suficiente de la micropartícula, es decir, el recubrimiento es una monocapa. Sin embargo, debe entenderse que pueden estar presentes interacciones adicionales. En algunos casos, por ejemplo, la autoasociación del principio activo también se ve energéticamente favorecida de forma que múltiples capas de principio activo recubren la partícula. No se requiere que ninguna de dichas capas esté completa, o que el espesor del recubrimiento sea uniforme. Se pueden reconocer 20 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 indefinida. Deberá entenderse que los principios activos multiméricos se pueden adsorben en el estado multimérico, o disociarse en monómeros, o multímeros de orden inferior, y adsorberse sobre la superficie en dicho estado. Cualquiera que sea el caso, la agregación puede mediar 25 en la disposición en capas del principio activo sobre la micropartícula.

Las micropartículas cargadas constituyen una composición de administración de fármaco que se puede utilizar en varias formas. Las partículas se pueden utilizar en forma de polvo, en formas farmacéuticas sólidas tales como comprimidos o incluidas en cápsulas, o suspendidas en un transportador líquido. En general, esto requerirá el 30 intercambio y/o la eliminación del medio líquido en el que tiene lugar la carga. Esto se puede llevar a cabo por cualquiera de varios medios, incluyendo medios físicos tales como, pero sin limitación, sedimentación o filtración, y métodos evaporativos tales como, pero sin limitación, liofilización o secado mediante pulverización. Dichas técnicas son conocidas de los expertos en la técnica. En una realización de la invención, el disolvente se elimina mediante secado por pulverización. Los métodos para secar las micropartículas de dicetopiperazina mediante secado por pulverización se describen en, por ejemplo, la solicitud de patente provisional de Estados Unidos N.º 60/776.605 presentada el 22 de febrero de 2006.

Si la carga no está sustancialmente completa, las realizaciones de la invención que emplean métodos físicos para eliminar el disolvente perderán normalmente el principio activo no adsorbido, pero por ejemplo pueden ser útiles 40 para garantizar que el recubrimiento no va más allá de una monocapa. Por el contrario, las realizaciones que utilizan el secado por evaporación para la eliminación del disolvente pueden, en algunos casos, depositar principio activo adicional sobre la partícula y de esta forma evitar su pérdida, pero las interacciones adsorptivas implicadas pueden ser diferentes de las ya establecidas por las moléculas unidas en las primeras etapas del método. En otras realizaciones, la eliminación del disolvente mediante evaporación no da como resultado una deposición significativa 45 adicional del principio activo, incluyendo el caso en que prácticamente todo el principio activo ya se ha adsorbido sobre la partícula.

Ejemplos

50 Los siguientes ejemplos se han incluido para demostrar las realizaciones preferidas de la presente invención. Las personas expertas en la materia deberán apreciar que las técnicas descritas en los ejemplos siguientes representan técnicas y composiciones descubiertas por los inventores que funcionan bien en la práctica de la invención, y, por tanto, se puede considerar que constituyen los modos preferidos para su práctica. Aunque la discusión puede centrarse en un mecanismo concreto, deberá entenderse que algunos modificadores pueden tener múltiples efectos 55 sobre el agente, o incluso también sobre la superficie de la partícula, cada uno de los cuales puede contribuir a promover la adsorción del agente en la partícula. Sin embargo, los expertos en la materia, a la luz de la presente divulgación, apreciarán que se pueden realizar muchos cambios en las realizaciones específicas que se describen y obtener además un resultado igual o similar.

60 EJEMPLO 1

Procedimiento experimental: Estudios de adsorción de principio activo/micropartícula FDGP

Los principios activos insulina, PTH, grelina y GLP-1 bien se adquirieron de American Peptide (Sunnyvale, CA) o AnaSpec (San Jose, CA), o se prepararon en el laboratorio (MannKind Corporation, Valencia, CA). Se analizaron 65 muestras acuosas a pH variable y a 20 °C (salvo que se indique otra cosa). Generalmente, las muestras se

prepararon frescas y se mezclaron con el aditivo concreto (por ejemplo, sal, tampón de pH, etc., de utilizarse alguno), antes de añadir las micropartículas de FDCP.

La asociación del principio activo con las partículas de dicetopiperazina (DCP) en suspensión se evaluó mediante la realización de estudios de adsorción. Los parámetros investigados en los estudios de adsorción investigaron los efectos de las interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno, estructura del agua, flexibilidad de la proteína, e interacciones específicas de pares salinos sobre la interacción del principio activo y la micropartícula de fumarildicetopiperazina (FDCP). Además, se sometieron a ensayo varios estabilizantes de proteínas habituales para determinar su interferencia con la adsorción del principio activo sobre las superficies de la micropartícula de FDCP.

Se estudiaron diferentes condiciones que promueven la adsorción del principio activo sobre las superficies de las partículas de FDCP preformadas. Una solución de micropartículas de FDCP 15 mg/ml se combinó con tampón de pH 3X y una solución 3X de aditivo o excipiente. La solución final contenía una concentración de micropartículas de FDCP de 5 mg/ml y una concentración de GLP-1 de 0,25 mg/ml (5 % p/p), o una concentración de PTH de 0,25 mg/ml (5 % p/p), o una concentración de insulina de 0,75 mg/ml (15 % p/p) o una concentración de grelina de 0,10 mg/ml (2 % p/p). El principio activo no unido del sobrenadante se eliminó por filtración de la suspensión. Las partículas de FDCP con el principio activo asociado se disolvieron (reconstituyeron) en 100 mM de bicarbonato de amonio y se filtraron para separar cualesquiera moléculas de principio activo agregadas. La cantidad de principio activo tanto en el sobrenadante como en las fracciones reconstituidas se cuantificó por HPLC. Se llevaron a cabo una serie de experimentos, cuyas condiciones incluyeron el uso de aditivos tales como sales, osmólitos, caótopos y cosmótopos, y alcoholes. Los resultados de estos estudios se describen a continuación.

EJEMPLO 2

Efecto de los caótopos y cosmótopos sobre la adsorción de principio activo sobre partículas de FDCP

Se estudiaron las especies iónicas que afectan a la estructura del agua y de las proteínas (caótopos y cosmótopos) para investigar la adsorción del principio activo sobre la superficie de una micropartícula de FDCP mediante un mecanismo hidrófobo (a bajo pH). La carga del principio activo sobre las partículas de FDCP se realizó a 5 mg/ml de micropartículas y una concentración de GLP-1 de 0,25 mg/ml (5 % p/p), o una concentración de PTH de 0,25 mg/ml (5 % p/p), o una concentración de insulina de 0,75 mg/ml (15 % p/p). La concentración del caótopo o del cosmótopo en las muestras se mantuvo constante a 100 mM y el pH varió de 2,0 a 5,0. Los caótopos o cosmótopos se seleccionaron entre los siguientes: NaSCN, CsCl, Na₂SO₄, (CH₃)₃N-HCl, Na₂NO₃, Citrato Na, y NaClO₄. El control indicó que no se añadieron caótopos o cosmótopos.

Las Figs. 1A-1C representan gráficamente las curvas de carga para la insulina, GLP-1 y PTH, respectivamente, sobre la superficie de la micropartícula de FDCP en función del pH en presencia de varios caótopos o cosmótopos. A pH bajo (3,0) todos los caótopos y cosmótopos analizados mejoraron la afinidad de la insulina por la superficie de la micropartícula y mostraron una carga significativa en comparación con el control. A pH 4, no se observó este efecto (**FIG. 1A**). A pH más alto (5,0), los caótopos y cosmótopos interfirieron con la adsorción de insulina en la superficie de la micropartícula, en comparación con el control, mediante la precipitación de la proteína insulina. De esta forma, estos agentes promueven la unión de la insulina a las partículas de FDCP al pH más bajo, pero tuvieron poco efecto, o incluso un efecto perjudicial, en condiciones de pH más altos.

GLP-1, en la presencia de caótopos y cosmótopos, mostró una afinidad mejorada por las micropartículas de FDCP a pH 2,0-4,0 con un mayor efecto a pH más bajo (**FIG. 1B**). Se describen observaciones similares en la solicitud provisional de Estados Unidos con número de serie 60/744.882. Se observó que aproximadamente 0,02-0,04 mg/ml del péptido GLP-1 (que corresponde a relaciones máscas de 0,004 a 0,008) se detectaban en las muestras de control exentas de micropartículas en la presencia de NaSCN, NaClO₄, Na₂SO₄, Na₂NO₃ y Na citrato, lo que indica que una pequeña proporción del GLP-1 precipitó en lugar de adsorberse en la partícula.

La afinidad de la FDCP por la micropartícula de FDCP fue mayor a un pH de 4,0 a aproximadamente 4,9 en la presencia de caótopos fuertes tales como NaSCN y NaClO₄ (**FIG. 1C**).

Los datos respaldan que los agentes caotrópicos y cosmotrópicos tienen un papel en promover la adsorción del principio activo en las superficies de la micropartícula de FDCP, muy notablemente a pH bajo. Puesto que estos modificadores tienen mayor efecto a pH bajo, cuando la superficie de la micropartícula es menos iónica, es probable que la adsorción proceda de un mecanismo hidrófobo. La disminución en la adsorción observada a pH más alto puede ser resultado de la superficie más cargada de la partícula junto con los efectos que tienen los agentes caotrópicos y cosmotrópicos para aumentar la hidrofobia de los principios activos. Adicionalmente, como especies iónicas, estos agentes pueden competir con el principio activo para su unión a la micropartícula, o perturbar las interacciones electrostáticas entre el principio activo y la micropartícula. Finalmente, también se indica que el apantallamiento de Debye puede contribuir a la disminución de la adsorción en la superficie más cargada.

EJEMPLO 3Efecto de los osmolitos sobre la adsorción del principio activo en partículas de FDCP

5 Para evaluar la importancia de la estabilidad del principio activo en la adsorción, se examinó el efecto de los osmolitos sobre la unión del principio activo a partículas de FDCP. **Las Figs. 2A-2C** muestran las curvas de carga para la insulina (**FIG. 2A**), GLP-1 (**Fig. 28**) y grelina (**FIG. 2C**) sobre partículas de FDCP en función del pH en presencia de estabilizantes habituales (osmolitos). La carga del principio activo sobre las micropartículas de FDCP se realizó a 5 mg/ml de micropartículas y una concentración de insulina de 0,75 mg/ml (15 % p/p), o a una
10 concentración de GLP-1 de 0,25 mg/ml (5 % p/p) o una concentración de grelina de 0,10 mg/ml (2 % p/p). La concentración del osmolito (estabilizador) en las muestras se mantuvo constante a 100 mM y el pH varió de aproximadamente de 2,0 a aproximadamente 5,0. Los osmolitos se seleccionaron entre hexilenglicol (Hex-Gly), trehalosa, glicina, PEG, TMAO, manitol y prolina; el control no indica osmolito.

15 De los principios activos estudiados, la insulina mostró una afinidad significativamente mejorada para la superficie de la partícula de FDCP en presencia de los osmolitos (PEG, glicina, trehalosa, manitol y Hex-Gly) para un intervalo de pH de 3,0 a 5,0 (**FIG. 2A**). De los osmolitos estudiados, PEG y prolina mejoraron la afinidad para la adsorción del GLP-1 sobre la superficie de la partícula de FDCP para un intervalo de pH de 2,0 a 4,0. El osmolito TMAO fue más eficaz que el PEG o la prolina para la unión de GLP-1 sobre la superficie de la micropartícula de FDCP a pH bajo
20 (2,0), pero fue ligeramente perjudicial a pH 3,0 y superior (**FIG. 28**). Sin embargo, la grelina mostró una mayor afinidad por la superficie de la micropartícula en presencia de 100 mM de manitol, PEG, glicina, Hex-Gly, y trehalosa cuando se comparó con el control para un intervalo de pH de aproximadamente 4,0 a 5,0 (Fig. 2C).

25 Estas curvas de carga sugieren que los osmolitos pueden mejorar la adsorción del principio activo sobre la superficie de la micropartícula de FDCP. Es probable que este efecto sea el resultado de la capacidad de los modificadores para estabilizar el principio activo, que permite que la adsorción sea más energéticamente favorable.

EJEMPLO 4Efecto de los alcoholes sobre la afinidad del principio activo en partículas de FDCP

30 Para evaluar el efecto de los modificadores sobre el principio activo que permite la adsorción en la superficie de la micropartícula mediante un mecanismo hidrófobo, se examinó el efecto de los alcoholes. Los alcoholes conocidos por inducir la conformación helicoidal en péptidos y proteínas no estructurados mediante el aumento de la fuerza de los enlaces de hidrógeno fueron evaluados para determinar el papel que tiene la conformación helicoidal sobre la adsorción del principio activo sobre la superficie de partículas de FDCP. Se analizaron principios activos tales como
35 GLP-1 y grelina. La carga del principio activo sobre las partículas de FDCP se realizó a 5 mg/ml de micropartículas y una concentración de GLP-1 de 0,25 mg/ml (5 % p/p) o una concentración de grelina de 0,10 mg/ml (2 % p/p). El efecto de cada alcohol se observó para un intervalo de pH de 2,0 a 5,0. Los alcoholes utilizados fueron trifluoroetanol (TFE) y hexafluoroisopropanol (HFIP). Cada alcohol se evaluó a concentraciones variables que incluyen 5 %, 10 %, 15 %, o 20 % v/v.

40 **Las Figs. 3A-3D** muestran las curvas de carga del principio activo sobre micropartículas de FDCP en función del pH de cada alcohol y de cada principio activo. A pH 2,0-4,0, la grelina mostró una afinidad muy aumentada por la superficie de la micropartícula en presencia de HFIP y TFE a todas las concentraciones sometidas a ensayo (5 %, 10 %, 15 % y 20 %), tal como se demuestra mediante la relación másica entre la grelina y las partículas de FDCP
45 (**FIG. 3A-3B**).

50 A pH 2,0-5,0, GLP-1 mostró una afinidad mejorada por la superficie de la micropartícula en presencia de HFIP y TFE a las concentraciones mostradas (5 % y 10 %) (**FIG. 3C-3D**). El efecto del TFE fue menos marcado, y a los pH más bajos sometidos a ensayo fue perjudicial. Se destaca que se detectó una cantidad sustancial del péptido GLP-1 (0,13-0,19 mg/ml, que corresponde a relaciones másicas de 0,026 a 0,038), en las muestras de control exentas de micropartículas reconstituidas en presencia de HFIP al 10 % y TFE al 4,0, lo que indica que parte del GLP-1 había precipitado. Sin embargo, a un pH más bajo (2,0-3,0), la cantidad de péptido GLP-1 detectado en el control exento de micropartículas reconstituido en presencia de un 10 % de HFIP o TFE disminuyó significativamente. A pH 3,0, fue detectado el péptido GLP-1 de 0 a 0,02 mg/ml, (que corresponde a una relación másica de 0 a 0,004), aunque no se detectó GLP-1 en las muestras de control a pH 2,0. Las relaciones másicas de las Figs. 3C-D reflejan el principio activo tanto adsorbido como precipitado, aunque la precipitación es un componente menos importante a medida que el pH disminuye hacia 3,0.
55

60 Los datos indican que los alcoholes pueden mejorar la adsorción del principio activo sobre las micropartículas de FDCP. Este aumento en la adsorción probablemente dio como resultado una mejora en las interacciones hidrófobas entre el principio activo y la superficie de la micropartícula en presencia de alcoholes.

65

EJEMPLO 5Efecto de la sal sobre la adsorción del principio activo en partículas de FDCP

5 Para resolver adicionalmente el mecanismo hidrófobo de unión, se observaron los efectos de la sal sobre la adsorción del principio activo en micropartículas de FDCP mediante análisis por HPLC.

10 La carga del principio activo sobre las micropartículas de FDCP se realizó a 5 mg/ml de micropartículas y una concentración de insulina de 0,75 mg/ml (15 % p/p), o una concentración de GLP-1 de 0,25 mg/ml (5 % p/p) o una concentración de PTH de 0,25 mg/ml (5 % p/p) en presencia de 0, 25, 50, 100, 250, y 500 mM de NaCl (**FIG. 4A-4C**). La carga de la PTH en las partículas de FDCP también se evaluaron a NaCl 1000 nM. Se evaluó la cantidad del principio activo detectado en las muestras de control exentas de micropartículas reconstituidas en función del pH y la concentración de NaCl. El pH se controló con una mezcla de fosfato de potasio 20 mM /acetato de potasio 20 mM).

15 Tal como se observó en la **FIG. 4A**, la mayor unión (adsorción) de la insulina sobre las partículas de FDCP fue evidente a elevadas concentraciones de sal de 100-500 mM a un pH entre aproximadamente 2,5 y aproximadamente 3,5. A un pH de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 5,0, para todas las concentraciones de sal sometidas a ensayo, se observó una reducción en la adsorción de la insulina a la partícula de FDCP.

20 A un pH de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 3,5 fue evidente una mejora en la unión (adsorción) de GLP-1 a las partículas de FDCP para todas las concentraciones de sal sometidas a ensayo (**FIG. 4B**). A pH 4,0 y superior, también se observó una reducción en la unión.

25 Estudios similares realizados con PTH como principio activo mostraron una unión potenciada de la PTH a las partículas de FDCP a elevadas concentraciones de sal de 250 a 1000 mM a un pH de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 3,5 (**FIG. 4C**). A un pH de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 5,0, la unión de la PTH a la micropartícula disminuyó en presencia de sal.

30 A pH bajo, donde la adsorción no es favorable, la adición de sal pudo modificar el potencial químico del principio activo de forma que aumentara su afinidad por la superficie de la micropartícula. Dicha mejora de la unión probablemente fue resultado de un mecanismo hidrófobo. Adicionalmente, los datos indicaron que a medida que el pH aumentaba, disminuía la adsorción con una mayor concentración de sal. A medida que la superficie de la micropartícula queda más cargada con un pH creciente, se puede esperar que el mecanismo hidrófobo teórico sea menos eficaz para promover la adsorción del principio activo. Esta reducción puede ser también resultado de la competencia de la sal por los sitios de unión sobre la superficie de la micropartícula. Debe indicarse que el apantallamiento de Debye también puede contribuir a la disminución de la adsorción observada.

40 Los datos también muestran que la sal puede alterar la estructura de los principios activos. Por ejemplo, las mediciones de dicroísmo circular con la PTH mostraron que, a medida que la concentración de sal aumenta, la estructura secundaria del péptido adopta una conformación más helicoidal (**FIG. 4D**). Esto sugiere que el cambio en la estructura de la PTH puede promover su unión a la superficie de la micropartícula a pH bajo.

45 En solución acuosa, también se mostró que la presencia de sal reparte el colorante Texas Red sobre la superficie de la micropartícula.

EJEMPLO 6Efectos de la adsorción de ciclosporina A sobre partículas de FDCP

50 Los efectos sobre la adsorción de las moléculas hidrófobas pequeñas sobre las partículas de FDCP se investigó tanto *in vitro* como *in vivo* usando ciclosporina A como principio activo. La adsorción se promovió alterando la solubilidad del principio activo.

55 La ciclosporina A, un polipéptido cíclico lipófilo, se estudió para mostrar cómo se puede fabricar una molécula hidrófoba para adsorberse en micropartículas. Además, el tamaño de la ciclosporina A (PM 1202,61) se utilizó para demostrar las capacidades de carga de las de las micropartículas de compuestos más pequeños.

60 Para realizar la carga, se utilizó un método de disolvente/antidisolvente. El principio básico de esta metodología es disolver el compuesto en un disolvente (metanol) y después usar un antidisolvente (agua) para sacar el compuesto de la solución en dirección a la superficie de las micropartículas. El uso de esta solución de disolvente/antidisolvente, la ciclosporina A se cargó satisfactoriamente sobre la superficie de las micropartículas.

65 En un experimento preliminar para determinar un perfil de solubilidad, se disolvió la ciclosporina A hasta 10 mg/ml en metanol y se analizó mediante HPLC su solubilidad a 1 mg/ml con concentraciones variables de antidisolvente (10-90 % H₂O en incrementos del 10 %). El área del pico de la ciclosporina A se comparó contra la muestra que contenía solamente metanol, para determinar la pérdida porcentual debida a la precipitación. Se observó que la

solubilidad se retuvo en gran medida por debajo del 60 % de H₂O. A un 70 % de H₂O, una mayoría significativa del principio resultó ser insoluble y a un 80-90 % H₂O permanecía menos del 5 % de solubilidad.

5 Para evaluar la carga de la partícula, las micropartículas de FDCP se suspendieron en soluciones metanólicas de ciclosporina A. A continuación se añadió agua de forma progresiva hasta una concentración final de 60, 80, y 90 %. La mitad de la muestra se aglomeró y la otra mitad se liofilizó. Después, cada mitad se redisolvió de forma que los porcentajes finales fueron un 20 % de micropartículas de FDCP/ciclosporina A, 20 % de bromuro de amonio 0,5 M (AmBicarb), y 60 % de metanol (las concentraciones necesarias para la disolución tanto de la micropartícula como de la ciclosporina A). El contenido de ciclosporina A de cada una se analizó mediante HPLC y se comparó para
10 determinar la proporción que había quedado adsorbida en la partícula. Los resultados se presentan a un 60 % de H₂O donde se observó que aproximadamente un 20 % de la ciclosporina A se había unido a la partícula. A 80 % y 90 % de H₂O, las cargas fueron aproximadamente 90 % y 95 %, respectivamente, lo que indica la fuerte unión de la ciclosporina A a las micropartículas de FDCP.

15 La capacidad de carga de las micropartículas para la ciclosporina A se analizó a un nivel de 90 % de antidisolvente variando la entrada de ciclosporina A de forma que el contenido final de los sólidos recubiertos sería de 2 % a 20 %, suponiendo que toda la ciclosporina A quedase adsorbida. Se observó que, a media que la entrada aumentaba sobre este intervalo, el porcentaje de ciclosporina A disponible unida a la micropartícula aumentó de 50 % a 95 % de la entrada (**FIG. 58**). Debe resaltarse que, teniendo en cuenta que la solubilidad de la ciclosporina A es de
20 0,05 mg/ml a 90 % de H₂O, estos resultados indican que prácticamente toda la ciclosporina A insoluble quedó adsorbida en las partículas, en lugar de separarse por precipitación.

EJEMPLO 7

25 Insuflación pulmonar de partículas de ciclosporina A/DCP

Para examinar la farmacocinética de la ciclosporina A/micropartículas de FDCP, se evaluaron las concentraciones plasmáticas de ciclosporina A en ratas Sprague Dawley hembra que recibieron varias formulaciones de ciclosporina A/micropartículas de FDCP mediante insuflación pulmonar o inyección intravenosa. Estos estudios se realizaron
30 usando ciclosporina A/micropartículas de FDCP fabricadas con un 90 % de antidisolvente y una relación máxima teórica de 0,05, 0,10 o 0,20 como se ha descrito en el ejemplo anterior. Se denominan como cargas del 5 %, 10 % y 20 %.

35 Una única dosis de 2,5 mg de ciclosporina A/micropartículas de FDCP se suministró a ocho grupos de ratas mediante insuflación pulmonar o inyección intravenosa. Se extrajeron muestras de sangre el día de la dosificación de cada grupo con la predosis (tiempo 0), y a 5, 20, 40, 60, 240, 480 minutos y a 24 h después de la dosis. En cada punto temporal, aproximadamente 100 µl de sangre completa se recogieron de la vena lateral de la cola en un criovial, invertido y almacenado sobre hielo. Las muestras de sangre se centrifugaron a 4000 rpm y aproximadamente 40 µl de plasma se pipetearon en placas de 96 pocillos que se almacenan a -80 °C hasta su
40 análisis.

Tal como se muestra en la **Fig. 6**, la administración de 2,5 mg de micropartículas de FDCP/ciclosporina A mediante insuflación pulmonar dio como resultado niveles máximos de ciclosporina en suero 24 horas después de la dosis en ratas Sprague Dawley hembra. La carga del 10 % consiguió una C_{máx.} de 32,4 ng/ml en dicho punto temporal. Los
45 animales que recibieron una administración de 2,5 mg micropartículas de FDCP/ciclosporina A en 0,1 ml mediante inyección intravenosa mostraron niveles mínimos de ciclosporina 24 horas después de la dosis. Se observó que los niveles de micropartículas de FDCP alcanzaron un máximo 20 minutos después de la dosis y volvió a los niveles iniciales en 4 horas para los grupos tanto de inyección intravenosa como de insuflación pulmonar.

50 En su conjunto, los datos muestran la biodisponibilidad de la ciclosporina A/micropartícula de FDCP. Se resalta que el único pico a 240 minutos es una anomalía. Para todos los animales tratados, la patología determinada a simple vista y mediante observación microscópica fue normal.

Salvo que se indique de otra forma, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, propiedades tales como el peso molecular, condiciones de reacción, y otros que se usan en la memoria descriptiva y las reivindicaciones están previstos para modificarse en todos los casos por el término "aproximadamente". De acuerdo con ello, a no ser que se indique lo contrario, los parámetros numéricos definidos en la siguiente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se desean obtener mediante la presente invención. Como mínimo, y no como intento de limitar la aplicación de
60 la doctrina de los equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debería considerarse al menos teniendo en cuenta el número de cifras significativas notificadas y aplicando las técnicas de redondeo usuales. Sin perjuicio de que los intervalos y parámetros numéricos que muestran el amplio alcance de la invención sean aproximaciones, los valores numéricos definidos en los ejemplos específicos se han notificado de forma tan precisa como ha sido posible. Cualquier valor numérico, sin embargo, contiene de forma inherente algunos errores que son necesariamente el resultado de la desviación estándar que se encuentra en sus respectivas medidas de
65 ensayo.

5 Los términos "un" y "uno" y "el" y los referentes similares utilizados en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) deben tomarse para incluir el singular y el plural, a no ser que se indique otra cosa en el presente documento o se contradiga claramente por el contexto. Se pretende que la enumeración de los intervalos de valores en el presente documento sirva como método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que se encuentra comprendido en el intervalo. Salvo que se indique de otra forma en el presente documento, cada valor individual se incorpora a la memoria descriptiva como si se enumerara individualmente en el presente documento. Todos los métodos descritos en el presente documento se pueden llevar a cabo en cualquier orden adecuado a no ser que se indique de otra manera en el presente documento o se contradiga claramente por el contexto. Se pretende que el uso de cualquiera y de todos los ejemplos, o lenguaje ilustrativo (por ejemplo "tal como") proporcionado en el presente documento sea meramente para discernir mejor la invención y no plantee una limitación en el alcance de la invención por otra parte reivindicada. Ninguna redacción de la memoria descriptiva debe tomarse como una indicación de cualquier elemento no reivindicado esencial para la práctica de la invención.

15 El uso del término "o" en las reivindicaciones se usa para significar "y/o" a no ser que se indique de manera explícita para referirse solo a alternativas o las alternativas son mutuamente exclusivas, aunque la divulgación apoye una definición que se refiera a únicamente a alternativas e "y/o."

20 Las agrupaciones de elementos o realizaciones alternativas de la invención descritas en el presente documento no deben tomarse como limitaciones. Cada miembro del grupo se puede denominar y reivindicar individualmente o en cualquier combinación con otros miembros del grupo u otros elementos que se encuentran en el presente documento. Se anticipa que uno o más miembros de un grupo pueden incluirse, o eliminarse de, un grupo por motivos de conveniencia y/o patentabilidad. Cuando se produce cualquiera de dichas inclusiones o eliminaciones, se considera que la memoria descriptiva del presente documento contiene el grupo tal como se ha modificado cumpliendo de esta manera la descripción escrita de todos los grupos de Markush utilizados en las reivindicaciones adjuntas.

30 En el presente documento se describen realizaciones preferidas de la presente invención, incluyendo el mejor modo conocido por los inventores de llevar a cabo la invención. Por supuesto, serán evidentes para las personas normalmente expertas en la técnica variaciones de dichas realizaciones preferidas tras la lectura de la descripción anterior. El inventor espera que los técnicos expertos empleen dichas variaciones cuando sea adecuado, y los inventores pretenden que la invención se lleve a la práctica de formas diferentes a las descritas en el presente documento. De acuerdo con ello, la presente invención incluye todas las modificaciones y equivalentes de la materia sujeto enumeradas en las reivindicaciones adjuntas a esta según permita la legislación aplicable. Además, cualquier combinación de los elementos anteriormente descritos en todas sus posibles variaciones queda abarcada por la invención a no ser que se indique de otra forma en el presente documento o se contradiga claramente de otra manera por el contexto.

40 Adicionalmente, se han realizado numerosas referencias a patentes y publicaciones impresas en la totalidad de esta memoria descriptiva. Cada una de las referencias citadas y publicaciones impresas se incorporan individualmente en el presente documento por referencia en su totalidad.

45 Además, debe entenderse que las realizaciones de la invención descritas en el presente documento son ilustrativas de los principios de la presente invención.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para promover la unión de un principio activo a una partícula microcristalina preformada en suspensión, comprendiendo la micropartícula una dicetopiperazina, comprendiendo el método las etapas de:
- i) modificar el potencial químico del principio activo con un modificador del principio activo en donde dicha modificación permite una interacción energéticamente favorable entre el principio activo y la micropartícula independiente de la eliminación del disolvente; y
- ii) adsorber el principio activo sobre la superficie de la micropartícula.
- 10 2. El método de reivindicación 1, en el que la modificación del potencial químico comprende modificar la estructura, la flexibilidad, la rigidez, la solubilidad o la estabilidad del principio activo.
- 15 3. El método de la reivindicación 2, en el que la modificación del potencial químico del principio activo comprende alterar las condiciones de disolución.
4. El método de la reivindicación 3, en el que alterar las condiciones de disolución comprende añadir un modificador del principio activo a la solución.
- 20 5. El método de la reivindicación 4, en el que el modificador del principio activo se selecciona entre el grupo que consiste en sales, tensioactivos, iones, osmolitos, alcoholes, caótopos, cosmótopos, ácido, base y disolventes orgánicos.
- 25 6. El método de la reivindicación 5, en el que dicha sal es cloruro sódico.
7. El método de la reivindicación 1 que comprende además una etapa de disolver el principio activo en una fase fluida de la suspensión de micropartículas y cambiar el pH de la fase fluida.
- 30 8. El método de la reivindicación 7, en el que el pH se cambia antes de añadir el principio activo.
9. El método de la reivindicación 7, en el que el pH se cambia después de añadir el principio activo.
- 35 10. El método de la reivindicación 5, en el que el modificador del principio activo mejora la estabilidad estructural o la farmacodinámica del principio activo.
11. El método de la reivindicación 1, en el que el principio activo es una proteína, un péptido, un polipéptido, una molécula pequeña o una molécula de ácido nucleico.
- 40 12. El método de la reivindicación 11, en el que el principio activo se selecciona entre el grupo que consiste en insulina, grelina, hormona del crecimiento y hormona paratiroidea (PTH).
13. El método de la reivindicación 11, en el que el principio activo comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo.
- 45 14. El método de la reivindicación 11, en el que la molécula pequeña es una molécula hidrófoba.
15. El método de la reivindicación 14 en el que la molécula pequeña es ciclosporina A.
- 50 16. El método de la reivindicación 11, en el que la molécula pequeña es una molécula ionizable.
17. El método de la reivindicación 2, en el que la modificación del potencial químico del principio activo comprende modular una o más interacciones energéticamente favorables con la superficie de la micropartícula.
- 55 18. El método de la reivindicación 17, en el que la una o más interacciones energéticamente favorables entre el principio activo y la micropartícula comprenden una interacción electrostática.
19. El método de la reivindicación 17, en el que la una o más interacciones energéticamente favorables entre el principio activo y la micropartícula comprenden una interacción hidrófoba.
- 60 20. El método de la reivindicación 17 en el que la una o más interacciones energéticamente favorables entre el principio activo y la micropartícula comprenden una interacción de enlace de hidrógeno.
21. El método de cualquier reivindicación anterior, en el que la dicetopiperazina es fumaril dicetopiperazina.
- 65 22. El método de cualquier reivindicación anterior, que comprende además una etapa para eliminar el disolvente.

23. Un proceso para preparar una composición de administración de fármaco que comprende un principio activo y una micropartícula cristalina, que comprende las etapas de:

- 5 proporcionar una solución de principio activo que comprende una molécula de principio activo;
 modificar el potencial químico del principio activo con un modificador del principio activo en donde dicha modificación permite una interacción energéticamente favorable entre el principio activo y la micropartícula independiente de la eliminación del disolvente, que promueve la unión del principio activo a la micropartícula;
 proporcionar una micropartícula en suspensión o polvo, en donde la micropartícula comprende una dicetopiperazina;
 10 combinar dicha solución de principio activo con dicha suspensión o polvo de micropartícula; y
 adsorber el principio activo sobre la superficie de la micropartícula.

15 24. El proceso de la reivindicación 23, en el que la modificación del potencial químico del principio activo comprende añadir un modificador del principio activo a la solución.

25 25. El proceso de la reivindicación 24, en el que el modificador del principio activo se selecciona entre el grupo que consiste en sales, tensioactivos, iones, osmolitos, alcoholes, caótopos, cosmótopos, ácido, base y disolventes orgánicos.

20 26. El proceso de la reivindicación 25, en el que el modificador del principio activo disminuye la solubilidad de la molécula de principio activo.

25 27. El proceso de la reivindicación 25, en el que el modificador del principio activo mejora la estabilidad estructural de la molécula de principio activo.

28. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 23 a 27, en el que la dicetopiperazina es fumaril dicetopiperazina.

30 29. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22 o el proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 28, en el que el principio activo o la molécula de principio activo son insulina o un análogo de insulina.

35 30. El método de la reivindicación 1, en el que el principio activo es insulina o un análogo de insulina y en donde el método comprende las etapas de:

- (i) obtener una micropartícula cristalina de dicetopiperazina en donde la micropartícula cristalina de dicetopiperazina comprende fumaril dicetopiperazina;
 (ii) formar una suspensión que comprende la micropartícula cristalina de dicetopiperazina y un disolvente acuoso;
 40 (iii) disolver la insulina o el análogo de insulina en la fase fluida de la suspensión;
 (iv) aumentar el pH de la fase fluida a entre 4,0 y 5,0;
 (v) adsorber la insulina o el análogo de insulina sobre una superficie de la micropartícula de dicetopiperazina para proporcionar un recubrimiento de la insulina o del análogo de insulina sobre la micropartícula cristalina de dicetopiperazina; y
 45 (vi) eliminar o intercambiar el disolvente tras la etapa (v).

FIG. 1A

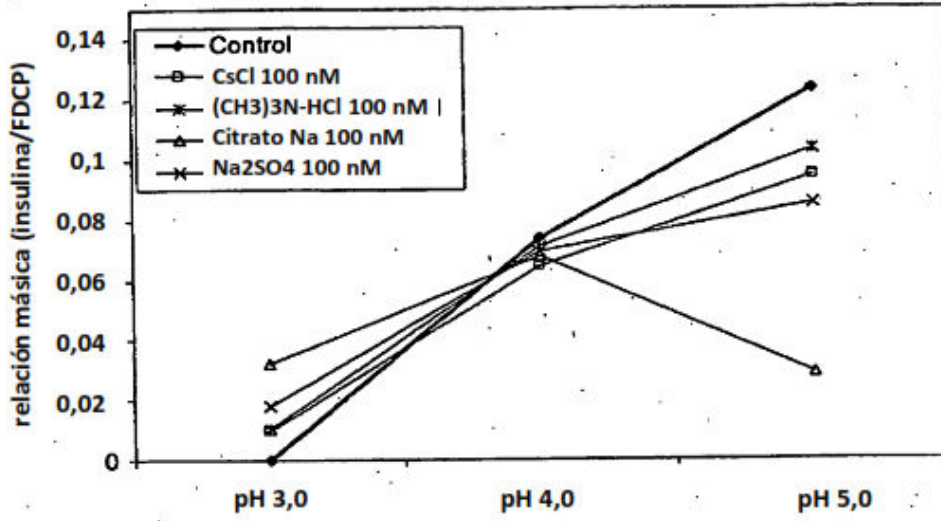


FIG. 1B

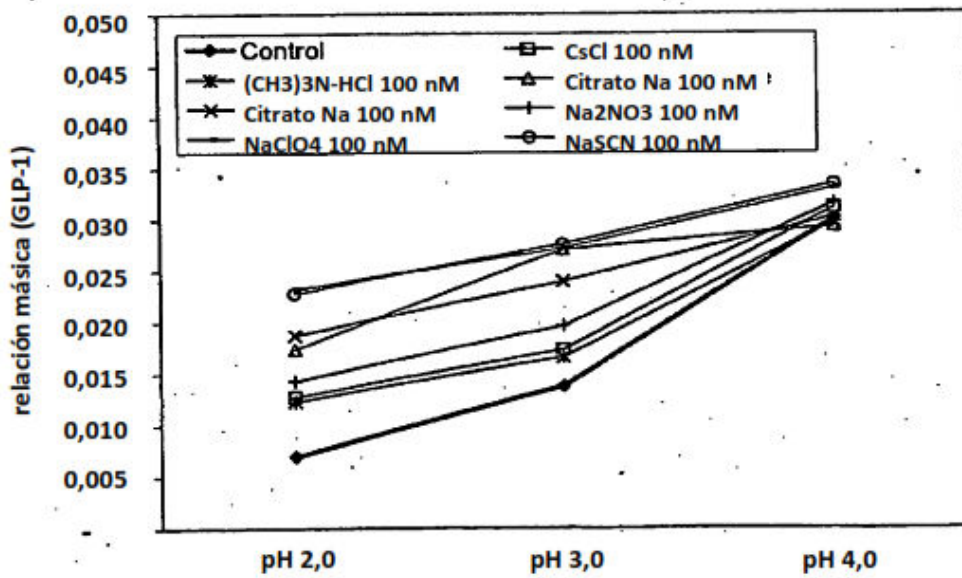


FIG. 1C

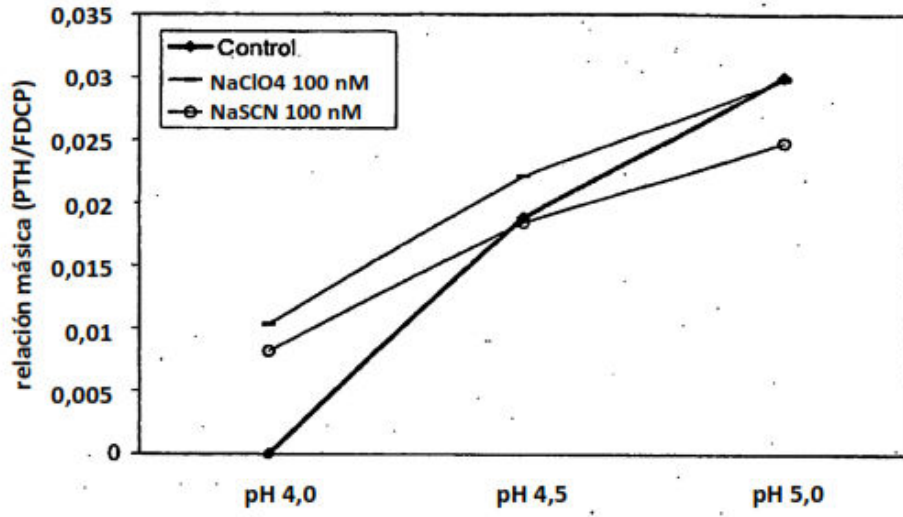


FIG. 2A

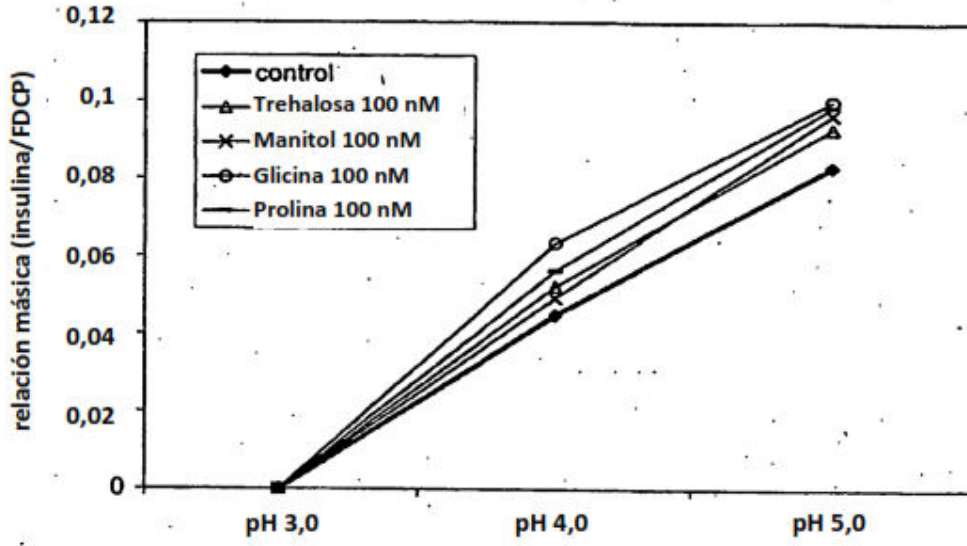


FIG. 2B

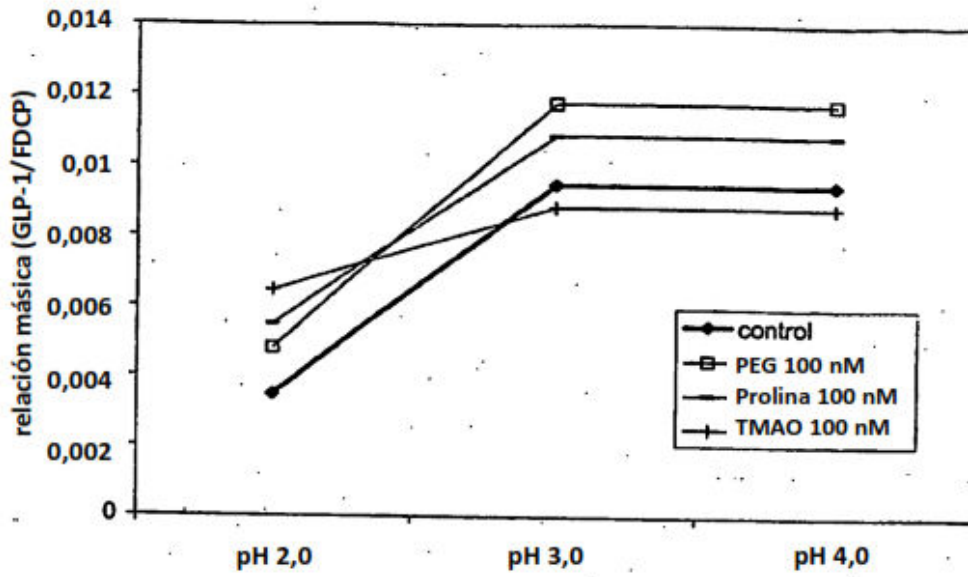
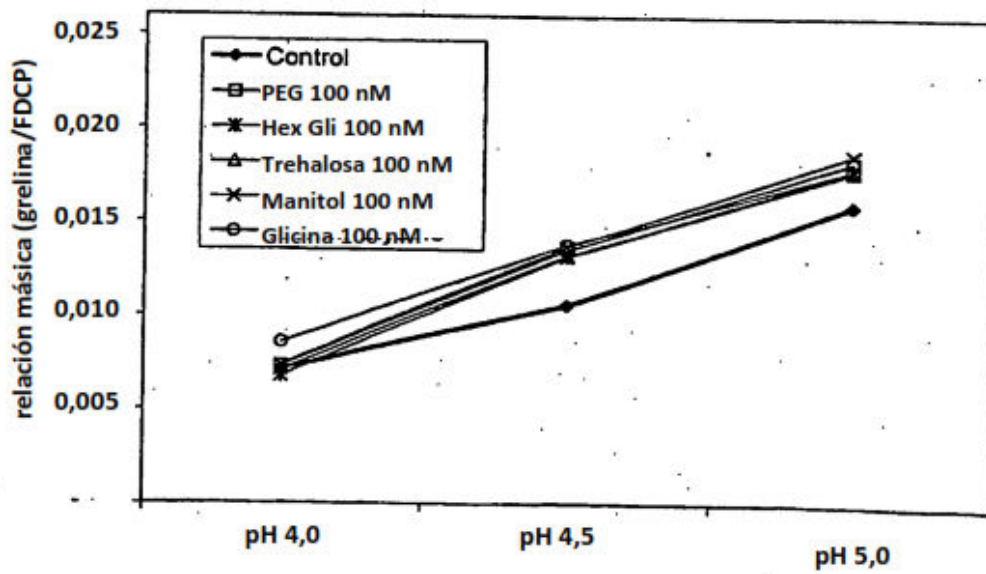


FIG. 2C



FIGS. 3A-3D

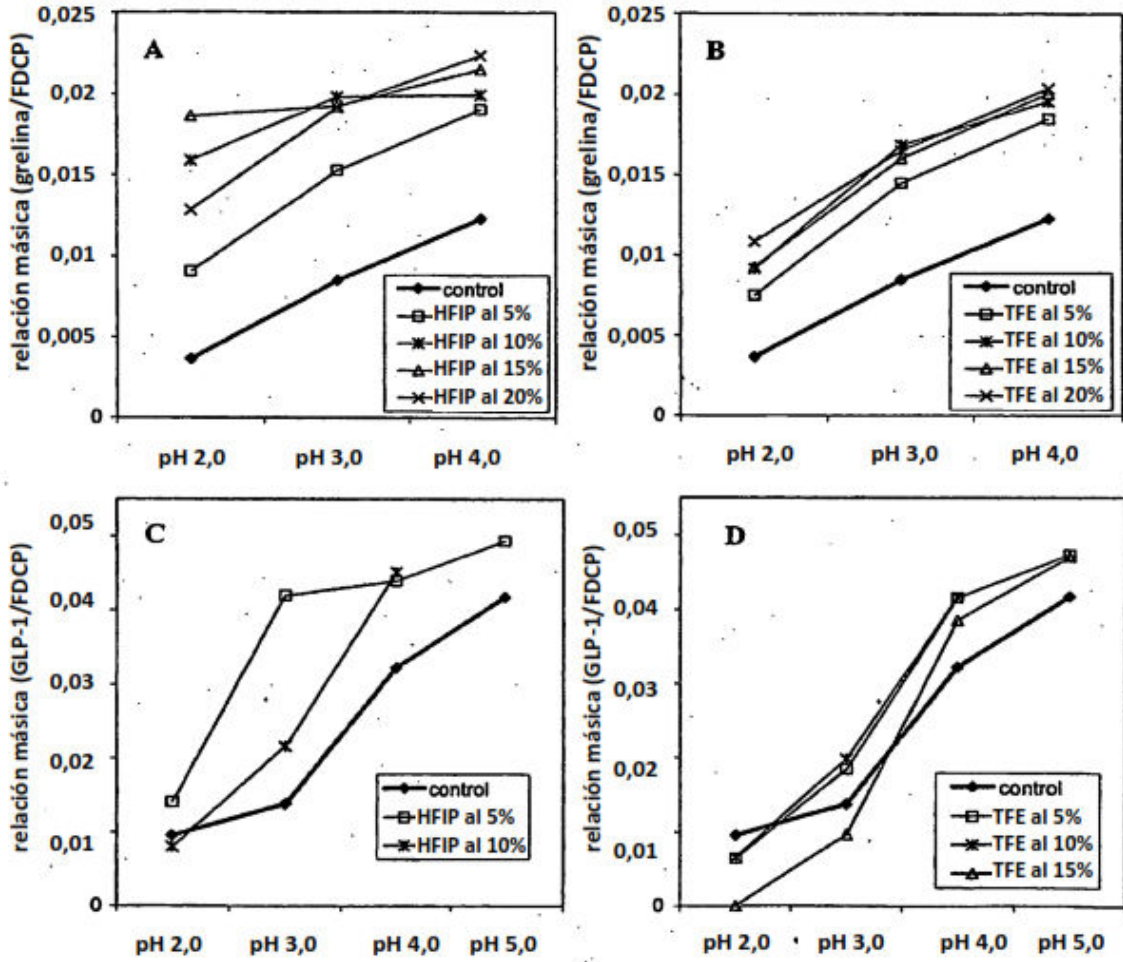


FIG. 4A

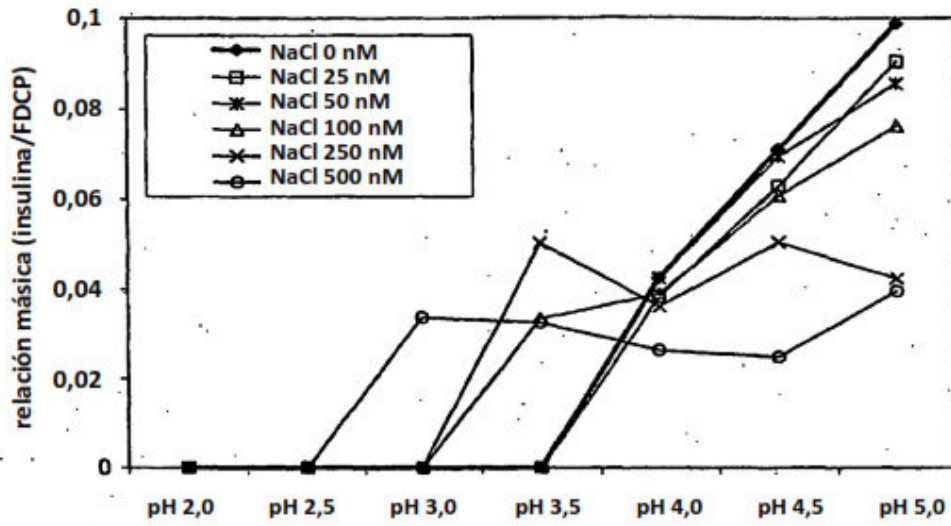


FIG. 4B

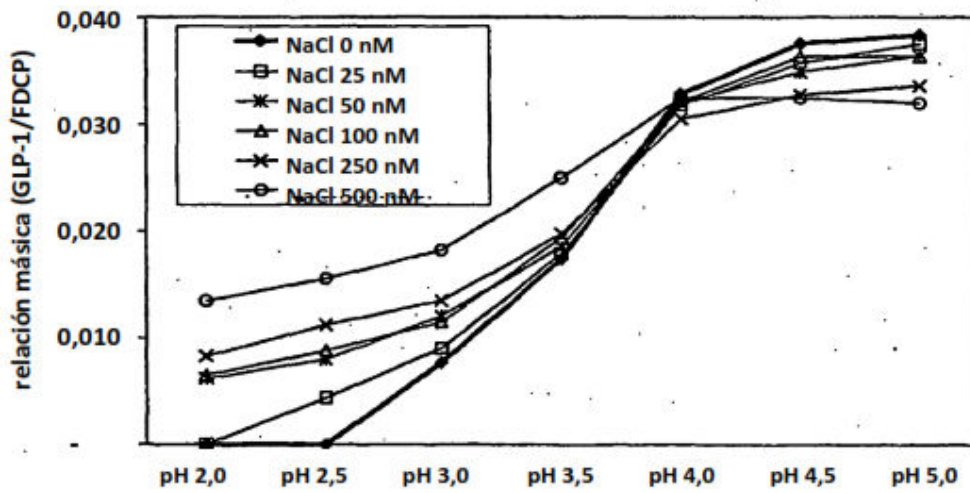


FIG. 4C

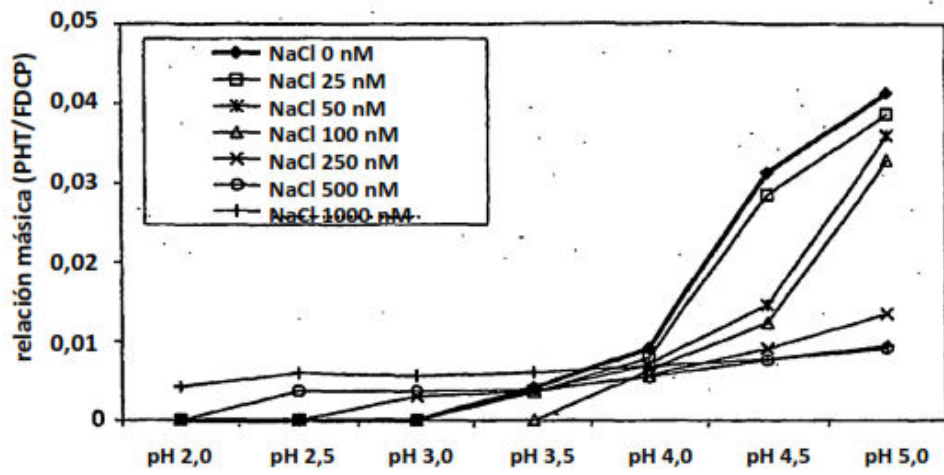


FIG. 4D

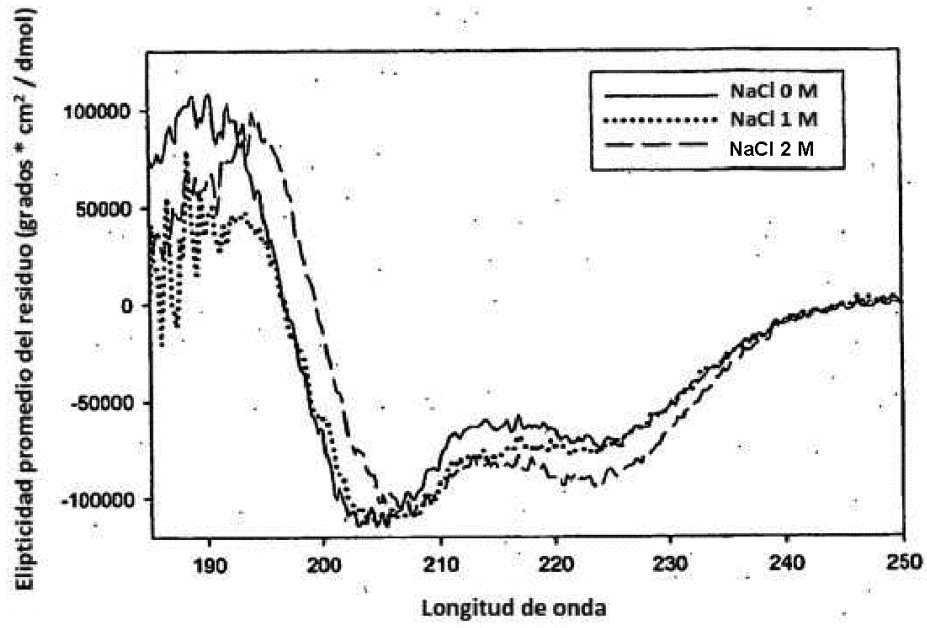


FIG. 5A

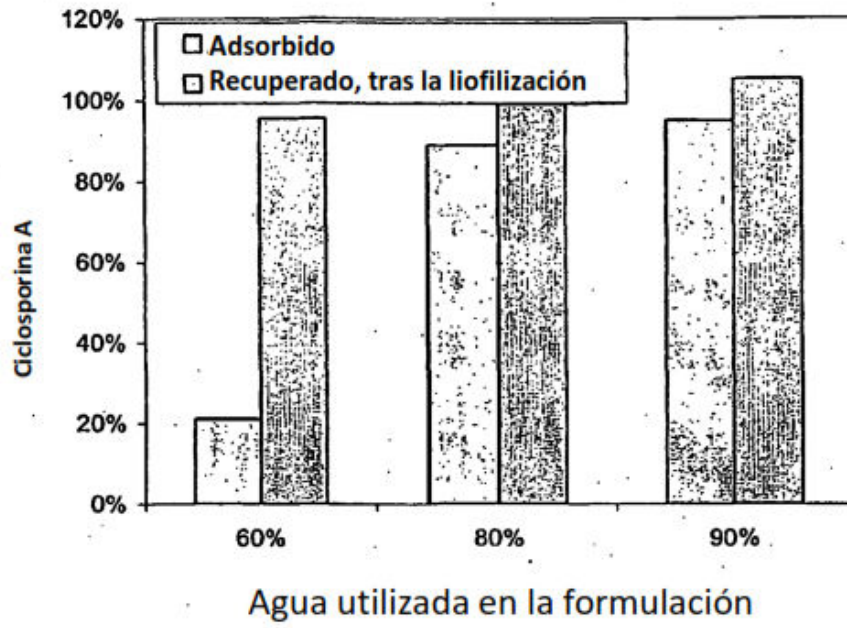


FIG. 5B

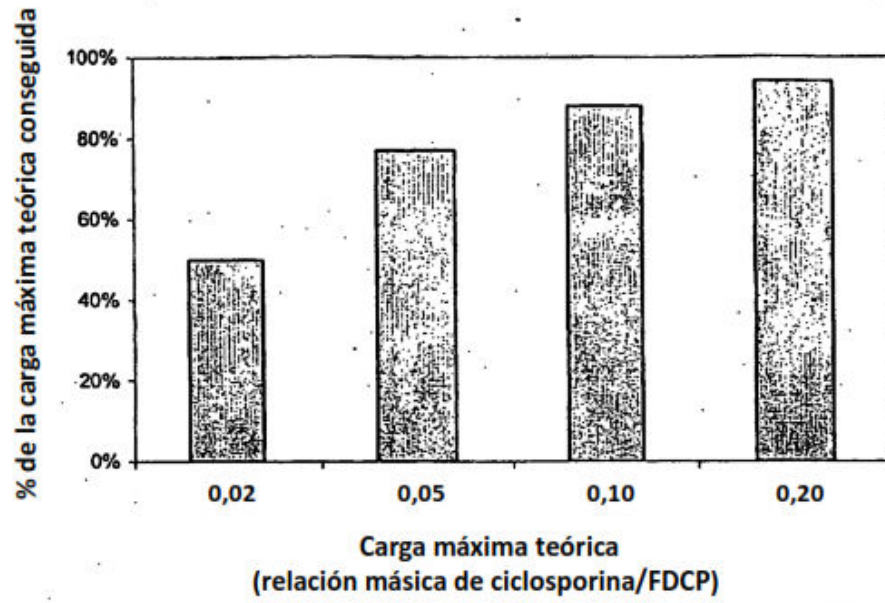


FIG. 6,

Estudio farmacocinético con ciclosporina/FDCP administrada mediante una única insuflación pulmonar o inyección intravenosa a ratas Sprague Dawley hembra

