

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 623 881**

51 Int. Cl.:

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 38/11 (2006.01)

A61K 38/23 (2006.01)

A61K 38/31 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.11.2004 PCT/GB2004/004696**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.05.2005 WO05046642**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.11.2004 E 04798419 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.03.2017 EP 1682091**

54 Título: **Composiciones de lípidos y péptidos catiónicos**

30 Prioridad:

07.11.2003 GB 0326075

07.11.2003 GB 0326074

04.06.2004 GB 0412544

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

12.07.2017

73 Titular/es:

**CAMURUS AB (100.0%)
IDEON, GAMMA 1, SOLVEGATAN 41
223 70 LUND, SE**

72 Inventor/es:

**JOABSSON, FREDRIK y
TIBERG, FREDRIK**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 623 881 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones de lípidos y péptidos catiónicos

5 La presente invención se refiere a la protección, estabilización y suministro de péptidos y proteínas en composiciones farmacéuticas y neutracéuticas. En particular, la invención se refiere a composiciones y formulaciones para suministrar poli y oligopéptidos catiónicos en sistemas de suministro basados en lípidos para proporcionar mejor protección contra la degradación por peptidasas y proteasas. La invención también se refiere a métodos para formular y suministrar dichos péptidos para proporcionar dicha protección.

10 Existe un enorme potencial en el uso de péptidos y proteínas para tratar diversas patologías, así como en la profilaxis y en la mejora de la salud general y el bienestar de los sujetos. Sin embargo, el rendimiento de los agentes peptídicos administrados está, en general, limitado debido a su escasa biodisponibilidad, que a su vez, está provocada por la rápida degradación de los péptidos y de las proteínas en los fluidos biológicos. Esto hace que aumente la dosis que ha de administrarse y, en muchos casos, restringe las vías de administración eficaces. Además, estos efectos se exageran debido a la permeabilidad con frecuencia limitada de los péptidos y las proteínas a través de membranas biológicas.

20 Los péptidos y las proteínas que se administran al cuerpo del mamífero (por ejemplo, por vía oral, por vía intramuscular, etc.) experimentan degradación por diversas enzimas proteolíticas y sistemas presentes en todo el cuerpo. Los sitios de actividad peptidasa, muy conocidos, incluyen el estómago (por ejemplo, la pepsina) y el tracto intestinal (por ejemplo, la tripsina, la quimotripsina y otras enzimas) pero hay otras peptidasas (por ejemplo, las carboxipeptidasas A, B y C) en todo el cuerpo. Tras la administración oral, la degradación gástrica e intestinal reduce la cantidad de péptido o de proteína que posiblemente podría absorberse a través del revestimiento de la superficie intestinal y de este modo reducir su biodisponibilidad. De forma similar, los péptidos y proteínas libres en el torrente sanguíneo del mamífero también se someten a degradación enzimática (por ejemplo, por carboxipeptidasas de plasma, etc.).

30 En la Tabla 1 se indican algunas proteasas (peptidasas) halladas en el cuerpo de mamífero, junto con su tipo y sitios de acción habituales.

Tabla 1

PROTEASA	FUENTE	TIPO
Quimotripsina A y B	Intestino	Serina proteasa
Quimotripsina C	Intestino	Serina proteasa
Tripsina	Intestino	Serina proteasa
Elastasa	Intestino	Serina proteasa
Pepsina A	Estómago	Proteasa aspártica
Carboxipeptidasa A	Intestino	Metaloproteasa dependiente de cinc
Carboxipeptidasa B-	Intestino	Metaloproteasa dependiente de cinc
Carboxipeptidasa C	Ubicua	Serina proteasa
Catepsina B	Lisosomas	Cisteína proteasa
Catepsina C	Ubicua	Cisteína proteasa
Catepsina G	Leucocitos polimorfonucleares	Serina proteasa
Catepsina H	Lisosomas	Cisteína proteasa
Catepsina X	Ubicua	Cisteína proteasa
Aminopeptidasa A	Ubicua, unida a membrana	Metaloproteasa dependiente de cinc
Aminopeptidasa B	Ubicua, citosólica o unida a membrana	Metaloproteasa dependiente de cinc

Otro obstáculo importante es la baja permeabilidad y la absorción que conducen a la escasa biodisponibilidad de los péptidos en sistemas orales. Se ha demostrado, en algunos casos, que los vehículos lipídicos potencian significativamente la absorción de los péptidos y proteínas pero generalmente la biodisponibilidad (especialmente oral) de los agentes peptídicos es tan baja como para hacerlos esencialmente ineficaces.

5 Son dos ejemplos de agentes activos peptídicos catiónicos, el nonapéptido cíclico, la desmopresina, el análogo de la somatostatina cíclica de 8 aminoácidos, el octreótido y el péptido de 32 aminoácidos, la calcitonina.

10 La calcitonina es una hormona peptídica de origen natural secretada por las células parafoliculares de la glándula tiroidea de mamífero y también se encuentra en aves y peces. Independientemente de su origen, la calcitonina es un péptido de 32 restos con un enlace disulfuro y aunque algunos restos están conservados universalmente, algunas calcitoninas varían significativamente en otras partes de su secuencia primaria. La calcitonina se produce de forma natural en respuesta a niveles de calcio en plasma elevados y puede utilizarse en el control, en el tratamiento y en la profilaxis de afecciones tales como la enfermedad de Paget en el hueso, la hipercalcemia y la osteoporosis postmenopáusia.

15 Las calcitoninas más habitualmente administradas para uso humano son la calcitonina humana sintética y la calcitonina de salmón sintética (que es aproximadamente 50 veces más potente por peso que la hormona humana). La calcitonina puede administrarse solamente por vías parenterales debido en parte a la rápida degradación en el tracto gastrointestinal (tracto GI). Habitualmente, la administración es intravenosa (IV), intramuscular (IM) o subcutánea (SC). Esto es necesario, pero es indeseable debido a que el tratamiento con calcitonina es habitualmente prolongado y un paciente típicamente tendrá que autoadministrarse la hormona por inyección subcutánea regularmente, con frecuencia en sitios alternos. Como resultado, una formulación oral eficaz sería un avance significativo.

20 La desmopresina es un análogo sintético de la hormona de la hipófisis posterior humana natural arginina vasopresina. La desmopresina es un antiurético y se usa para prevenir o controlar la polidipsia, poliuria y deshidratación en pacientes con una deficiencia en vasopresina de la hipófisis posterior endógena (por ejemplo en la diabetes insípida).

25 A diferencia de la calcitonina, la desmopresina puede administrarse por vía oral debido a su alta fuerza y a sus efectos secundarios limitados, pero su disponibilidad oral sigue siendo extremadamente baja. La administración nasal o intravenosa es considerablemente más eficaz que la ingesta, proporcionando la administración nasal al menos 20 veces la biodisponibilidad de la formulación oral y siendo la administración intravenosa más de 600 veces más eficaz. No obstante, la administración oral de la desmopresina es muy preferida y sería considerablemente ventajoso proporcionar composiciones orales de este péptido con mayor biodisponibilidad.

30 El octreótido es un análogo sintético de la hormona reguladora común somatostatina (también conocida como factor inhibidor liberador de hormona del crecimiento o factor inhibidor de liberación de somatotropina), que tiene efectos no solamente mediante el control de la hormona del crecimiento somatotropina sino también alterando la secreción de algunas hormonas de la hipófisis anterior, la función endocrina y exocrina pancreática, la producción de ácido gástrico y hormonas del GI y otros mecanismos. El octreótido está disponible para administración intravenosa, subcutánea e intramuscular a largo plazo y por lo tanto una formulación oral viable sería considerablemente valiosa.

35 Como se ha ilustrado en los ejemplos anteriores, existe una necesidad considerable de un método por el que los agentes activos peptídicos puedan protegerse de la actividad proteolítica del tracto GI. También existe la necesidad de un método por el que los péptidos puedan formularse para inyección de "depósito" intramuscular o subcutánea y permanezcan protegidos de la degradación dentro del cuerpo durante periodos de tiempo más largos.

40 La formulación de agentes activos con anfífilos tales como lípidos ha generado recientemente un interés significativo. Los lípidos tienen un grupo polar hidrófilo y un grupo hidrófobo no polar y estos grupos pueden ensamblarse a través interacciones mutuas en una diversidad de estructuras ordenadas y desordenadas en presencia de disolventes polares y/o no polares. Cuando la curvatura espontánea del lípido es baja, estas estructuras son típicamente lamelares, tales como vesículas mono o multilamelares y liposomas y cuando la curvatura espontánea es mayor, dominarán las fases micelares o fases cristalinas líquidas.

45 Las formulaciones basadas en anfífilos muestran un potencial considerable en el suministro de muchas sustancias, especialmente para el suministro *in vivo* al cuerpo humano o animal. Debido a que el anfífilo tiene grupos tanto polares como apolares que se agrupan para formar regiones polares y apolares, este puede solubilizar eficazmente compuestos tanto polares como apolares. Además, muchas de las estructuras formadas por anfífilos/agentes estructurantes en disolventes polares y/o apolares tienen un área muy considerable de límite polar/apolar en el que otros compuestos anfífilos pueden adsorberse y estabilizarse. Los anfífilos también pueden formularse para proteger agentes activos, en al menos algún grado, de ambientes biológicos agresivos y de este modo proporcionar velocidades y sitios ventajosos de liberación de agente activo.

50

La formación de regiones no lamelares en los diagramas de fase anfífila/agua, anfífila/aceite y anfífila/aceite/agua es un fenómeno muy conocido. Dichas fases incluyen fases cristalinas líquidas tales como las fases cúbica P, cúbica D, cúbica G y hexagonal, que son fluidas a nivel molecular pero muestran un orden de largo alcance significativo, y la fase L_3 que comprende una red bicontinua interconectada múltiple de láminas en bicapas que no son lamelares pero carecen del orden de largo alcance de las fases cristalinas líquidas. Dependiendo de su curvatura, estas fases pueden describirse como normales (curvatura media hacia la región apolar) o inversas (curvatura media hacia la región polar).

Las fases cristalina líquida no lamelar y L_3 son sistemas termodinámicamente estables. Es decir, no son simplemente un estado metaestable que se separará y/o reformará en capas, fases lamelares o similares, sino que son la forma termodinámica estable de la mezcla.

Se ha investigado sistemas tanto lamelares como no lamelares con respecto a sus propiedades como vehículos y/o excipientes para agentes dietéticos, cosméticos, nutricionales, de diagnóstico y farmacéuticos pero se cree que los sistemas no lamelares tienen ventajas considerables con respecto a su área de superficie interna alta y regiones polares y apolares bicontinuas. Esto ha conducido a una investigación considerable de las fases no lamelares, particularmente en formulaciones de liberación controlada y para solubilizar compuestos relativamente insolubles.

Como se ha analizado anteriormente, la fase no lamelar a granel es típicamente un sistema termodinámicamente estable. Además, esta fase a granel puede dispersarse en un disolvente polar o no polar para formar partículas de una fase no lamelar (especialmente cristalina líquida) en un disolvente a granel. Esto permite aplicar las ventajas de fases no lamelares a granel en situaciones en las que el uso de una formulación a granel que no fuera miscible con un fluido corporal provocaría problemas, tal como en aplicaciones parenterales. También puede conseguirse control adicional del perfil de liberación de un compuesto, por ejemplo, optimizando el tamaño, la morfología y las interacciones de membrana transportadora-fármaco de dichas dispersiones.

En muchos casos, una fase cristalina líquida o L_3 está en equilibrio termodinámico o cerca de él con el disolvente en exceso y por lo tanto pueden prepararse dispersiones estables de partículas no lamelares. Dichas partículas pueden ser completamente (es decir termodinámicamente) estables, o pueden degradarse gradualmente, proporcionando de este modo control sobre el perfil de liberación para agentes activos formulados con las mismas. La formación de dispersiones puede ser espontánea o como resultado de fuerza mecánica introducida, por ejemplo, por corte o ultrasonidos. Estas partículas no lamelares son considerablemente interesantes en el suministro de agentes activos y se han propuesto como vehículos para muchos de dichos activos.

Un método para la formación de partículas dispersas de fase no lamelar en disolventes tales como agua se describe en el documento US 5.531.925. Dichas partículas tienen una fase interior cristalina líquida no lamelar o L_3 , o combinaciones de las mismas y típicamente una fase de superficie lamelar o L_3 .

Pueden formarse partículas conocidas de fase interior cristalina líquida o L_3 por métodos tales como adición a esta fase de una solución de agentes estabilizadores y formadores de fase de superficie, agitando para formar una dispersión gruesa y fragmentando la mezcla resultante. También pueden formarse partículas no lamelares espontáneamente cuando se disuelve una composición adecuada de estructura formando y fragmentando/estabilizando agentes en disolvente.

Para evaluar la presencia de una fase cristalina líquida, el orden cristalino líquido analizado anteriormente puede examinarse con difracción de rayos X de ángulo pequeño (SAX, *small-angle X-ray diffraction*), microscopía electrónica de criotransmisión (crio TEM, *cryo-Transmission Electron Microscopy*) o estudios espectroscópicos de resonancia magnética nuclear (RMN). Los tamaños y las distribuciones de tamaños de las partículas dispersas pueden examinarse por dispersión lumínica, particularmente con instrumentos de dispersión lumínica por láser o difracción lumínica por láser.

Se forman en general formulaciones de fase de emulsión, micelar o no lamelar a partir de mezclas que contienen al menos un grupo anfífilo con al menos un grupo de "cabeza" hidrófilo y al menos un grupo de "cola" hidrófobo. En la mayoría de los lípidos de origen natural, estos grupos se unen mediante un enlace éster, consistiendo la "cola" en la cadena de hidrocarburo del ácido o los ácidos grasos. Típicamente, por lo tanto, las preparaciones que contienen anfífilos de agentes activos contienen lípidos que contienen ésteres naturales, anfífilos sintéticos (es decir no hallados en extractos naturales) o mezclas de los mismos.

Los presentes inventores han establecido ahora inesperadamente que el tiempo de vida de los péptidos catiónicos tras administración oral o inyección subcutánea o intramuscular, puede aumentarse considerablemente por formulación de los péptidos catiónicos en una formulación no lamelar en la que la formulación comprende un anfífilo aniónico, particularmente un ácido graso.

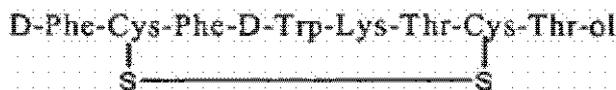
Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende al menos un agente activo peptídico catiónico que tiene un punto isoelectrico por encima de 7,0, al menos un anfífilo formador de estructura neutro, al menos un anfífilo formador de estructura aniónico, y opcionalmente al menos un disolvente, en

- 5 el que los grupos no polares de los anffilos formadores de estructura se seleccionan de grupos alquilo y alqueno C₆-C₃₂ caracterizados porque dicha composición comprende una estructura de fase no lamelar y/o forma una fase cristalina líquida normal o inversa o la estructura de fase L₃ tras exposición a fluidos corporales, en el que dicho anffilo formador de estructura aniónico comprende al menos un ácido graso, y en el que dicho anffilo formador de estructura aniónico está presente en una cantidad de 0,5 a 50 % en peso en relación con el peso del anffilo neutro. Preferentemente, la composición será adecuada para su administración a un cuerpo de mamífero tal como un cuerpo humano, canino, felino, bovino, equino, porcino, caprino u ovino, más preferentemente un cuerpo humano.
- 10 La presente invención da como resultado una biodisponibilidad oral considerablemente mayor en sujetos mamíferos de lo que se ha podido conseguir previamente. En particular, esto puede verse como una mayor proporción de la dosis administrada que es detectable en el torrente sanguíneo, en relación con la cantidad que estaría presente si se administrara la misma dosis directamente (por ejemplo, por vía intravenosa en solución salina).
- 15 En un aspecto adicional, la invención proporciona por lo tanto una composición que comprende al menos un agente activo peptídico catiónico que tiene un punto isoeléctrico de más de 7,0, al menos un anffilo formador de estructura neutro, al menos un anffilo formador de estructura aniónico y opcionalmente al menos un disolvente, en el que los grupos no polares de los anffilos formadores de estructura se seleccionan de grupos alquilo y alqueno C₆-C₃₂ caracterizados porque dicha composición comprende una estructura de fase no lamelar y/o forma una fase cristalina líquida normal o inversa o la estructura de fase L₃ tras exposición a fluidos corporales, en el que dicho anffilo formador de estructura aniónico comprende al menos un ácido graso, en el que dicho anffilo formador de estructura aniónico está presente en una cantidad de 0,5 a 50 % en peso en relación con el peso del anffilo neutro, y en el que la biodisponibilidad oral de dicho agente activo es al menos 1 % cuando se mide como concentración en plasma sanguíneo de agente activo en relación con administración intravenosa en solución salina.
- 20 En un aspecto adicional más, la invención proporciona de forma similar un método para suministro oral de al menos 1 % de un agente activo peptídico catiónico sensible a proteasa (por ejemplo sensible a carboxipeptidasa C), comprendiendo dicho método la formación de una composición de dicho agente activo peptídico, al menos un anffilo formador de estructura neutro, al menos un anffilo formador de estructura aniónico o sal del mismo, y opcionalmente al menos un disolvente y administrar por vía oral dicha composición, en el que dicha composición comprende fase no lamelar (especialmente partículas de la misma) y/o forma fase no lamelar (especialmente partículas de la misma) tras exposición a fluidos corporales y en el que suministro oral se mide como concentración en plasma sanguíneo en relación con administración intravenosa.
- 25 En métodos y composiciones que tienen biodisponibilidad oral potenciada, al menos el 1 % de la concentración de agente activo peptídico está presente en el torrente sanguíneo, en relación con la cantidad medible cuando se administra por vía intravenosa, especialmente en solución salina. Es preferible que esta disponibilidad sea al menos del 1,5 %, más preferentemente al menos del 2 % y más preferentemente al menos del 3 %. También es posible una biodisponibilidad peptídica muy alta (por ejemplo del 5 % o más) con las presentes composiciones.
- 30 En un aspecto adicional, la invención también proporciona el uso de una composición que comprende un agente activo peptídico catiónico sensible a proteasa (por ejemplo sensible a carboxipeptidasa C) que tiene un punto isoeléctrico de más de 7,0, al menos un anffilo formador de estructura neutro, al menos un anffilo formador de estructura aniónico y opcionalmente al menos un disolvente, en el que los grupos no polares de los anffilos formadores de estructura se seleccionan de grupos alquilo y alqueno C₆-C₃₂ caracterizados porque dicha composición comprende una estructura de fase no lamelar y/o forma una fase cristalina líquida normal o inversa o la estructura de fase L₃ tras exposición a fluidos corporales, en el que dicho anffilo formador de estructura aniónico comprende al menos un ácido graso, y en el que dicho anffilo formador de estructura aniónico está presente en una cantidad de 0,5 al 50 % en peso en relación con el peso del anffilo neutro.
- 35 En un aspecto adicional más, la invención también proporciona un método para la formación de una composición de la invención que comprende formar partículas de fase no lamelar y/o partículas que generen fase no lamelar tras exposición a fluidos corporales, comprendiendo dichas partículas al menos un anffilo formador de estructura neutro, al menos un anffilo formador de estructura aniónico o sal del mismo y opcionalmente al menos un disolvente, y posteriormente poner en contacto dichas partículas con una solución de agente activo peptídico catiónico. El método también puede comprender la etapa de secar la dispersión resultante que contiene péptido, por ejemplo, por liofilización o secado por pulverización.
- 40 Sin quedar ligado a la teoría, se cree que la biodisponibilidad aumentada de los péptidos catiónicos administrados como composiciones de la presente invención se debe al menos en parte a la degradación enzimática reducida. En particular, los inventores han mostrado que no solamente las formulaciones en partículas no lamelares proporcionan protección significativa para péptidos contra enzimas proteolíticas, sino que además dichas formulaciones no lamelares que comprenden anffilos aniónicos, y particularmente ácidos grasos, son significativamente más eficaces en dicha protección que otras formulaciones.
- 45 Se ha mostrado que la acción de enzimas proteolíticas, tales como tripsina, en la degradación de péptidos catiónicos, se reduce significativamente con formulaciones que comprenden ácidos grasos de acuerdo con la
- 50
- 55
- 60
- 65

presente invención. Esta reducción en la degradación enzimática da como resultado una mayor proporción del agente activo peptídico que alcanza su sitio de absorción y cruza al torrente sanguíneo. Se ha confirmado en animales que el nivel de péptido absorbido de acuerdo con la presente invención es notablemente mayor que en ausencia de estos efectos protectores (véanse los ejemplos posteriores).

En la presente invención, los agentes activos peptídicos son proteínas o péptidos catiónicos que tienen un punto isoeléctrico por encima de pH 7,0, y pueden variar de oligómeros pequeños (tales como di-, tri- o tetrapéptidos) a proteínas grandes con un peso molecular de muchos miles de Dalton. Todos ellos se denominan en el presente documento "péptidos" independientemente de su estructura secundaria o terciaria. Sin embargo, los péptidos indicados en el presente documento, no serán en general lipoproteínas a no ser que se indique específicamente. De forma similar, los términos "proteasa" y "peptidasa" se utilizan en el presente documento como equivalentes a no ser que se indique de otro modo.

Los péptidos pueden estar exclusivamente constituidos por los 20 α aminoácidos habituales del "código genético" (y opcionalmente por sus estereoisómeros) o pueden contener al menos otra unidad de aminoácido de origen natural o de origen no natural, tal como β , γ o δ aminoácidos o los equivalentes sustituidos de cualquiera de estos, así como alfa aminoácidos no hallados habitualmente en proteínas naturales. Los sustituyentes habituales incluyen sustituyentes de hidrocarbilo (por ejemplo, grupos alquilo, alquenoilo, alquinoilo, arilo, aralquilo o alcarilo), sustituyentes heterocíclicos (por ejemplo sustituyentes mono o policíclicos que contienen nitrógeno, oxígeno o azufre), sustituyentes basados en nitrógeno (por ejemplo sustituyentes de amino, alquilamino, nitro, urea o azo), sustituyentes basados en azufre (por ejemplo sustituyentes de tio, tionalquilo o sulfonilo), sustituyentes basados en halógeno (por ejemplo flúor, cloro, bromo o yodo, clorato, yodato, etc.), sustituyentes basados en oxígeno (tales como sustituyentes de ceto, carboxi, éster, hidroxilo o aldehído, peróxido, éter) y combinaciones de los mismos. Obviamente, ciertos sustituyentes naturales y no naturales son capaces de formar puentes/reticulaciones y frecuentemente pueden estar presentes enlaces disulfuro, éster, amida u otros. Dichas reticulaciones reducirán la libertad conformacional de los péptidos y frecuentemente proporcionarán un efecto biológico más pronunciado. El octreótido es un ejemplo de un péptido que tiene una reticulación Cys-Cys y dos aminoácidos presentes como sus estereoisómeros no habituales en la estructura:



La formulación de los diversos componentes en la presente invención puede llevarse a cabo por métodos conocidos utilizando los componentes anfífilos indicados y agentes activos peptídicos. Los métodos adecuados incluyen los indicados en los presentes Ejemplos y en los documentos US 5.531.925, WO 02/02716, WO 02/068561, WO 02/066014 y WO 02/068562.

Los métodos de dispersión incluyen añadir anfífilos formadores de fase cristalina líquida (con o sin agentes de fragmentación) en forma seca, fundida o en solución, a una solución acuosa (que incluye opcionalmente agentes de fragmentación y que incluye opcionalmente un lípido, tal como fosfatidilcolina-PC) y que permiten la fragmentación natural de la mezcla o que aceleran el proceso, por ejemplo, con agitación mecánica, agitación vorticial, mezcla con rotoestator, homogeneización a alta presión, microfluidificación y/o ultrasonidos.

El comportamiento de fase y la distribución de tamaño de las formulaciones en partículas de la invención también pueden controlarse mediante uno o más (preferentemente uno) ciclos de calentamiento y enfriamiento. Dichos ciclos pueden utilizarse para convertir partículas lamelares en forma no lamelar, y para reducir la proliferación de tamaños de partículas. Cuando se usa este método, las composiciones deberían formularse, preferentemente, de modo que el estado termodinámicamente estable sea no lamelar. Cuando se utilizan ciclos de calor, el agente activo peptídico puede incorporarse en las partículas antes y/o después de los ciclos de calor. Cuando se usa más de un ciclo de calor, el agente activo también puede, como alternativa, incorporarse entre ciclos. Dado que los agentes activos peptídicos son con frecuencia sensibles al calor, el agente activo se incorpora preferentemente solo después de completarse cualquier ciclo de calor. Una excepción notable a esto es el octreótido, que es relativamente termoestable.

Un ciclo de calor lleva la composición, con o sin el agente activo presente, hasta una temperatura suficiente para proporcionar la conversión de al menos una parte de las partículas a una fase no lamelar tras enfriamiento a temperatura ambiente. Esto implicará típicamente calentamiento hasta aproximadamente 90-150 °C durante 1-30 min seguido de enfriamiento a temperatura ambiente. Más típicamente un ciclo de calor implicará calentar a 100-120 °C durante 2-20 minutos antes de enfriar. Las condiciones más adecuadas variarán en detalle entre las composiciones pero un experto habitual las establecerá fácilmente.

En el proceso de ciclos de calor, el tamaño de partícula medio típicamente aumenta pero la distribución de tamaños de partícula se reduce.

Cuando el agente activo peptídico es suficientemente termoestable, pueden utilizarse uno o más ciclos de calor para

ayudar a cargar el agente activo en partículas de la composición de la invención. En particular, el nivel estable de agente activo que puede cargarse por medio de ciclos de calor, es con frecuencia varias veces el nivel de equilibrio cuando los componentes se incuban a temperatura ambiente. Como resultado, el método de síntesis de la invención comprende preferentemente una etapa de carga de ciclos de calor en la que el agente activo es estable en estas condiciones.

La presencia de partículas en forma no lamelar se evaluará preferentemente a partir de un conjunto de imágenes de partículas por microscopía electrónica de criotransmisión, mostrando preferentemente una muestra de más de 30, preferentemente de más de 50 y más preferentemente de más de 100 partículas. La presencia de partículas no lamelares también puede evaluarse por experimentos de dispersión de rayos X.

El término "catiónico" se usa para indicar que los agentes activos peptídicos portan una carga positiva neta al pH de la composición y/o a pH fisiológico. En general, cuando los 20 aminoácidos habitualmente hallados en péptidos y proteínas naturales dominan, un péptido catiónico tendrá un mayor número de aminoácidos básicos tales como lisina o arginina que restos ácidos tales como ácido glutámico o ácido aspártico.

Para permitir el uso de péptidos que no tienen un exceso de grupos funcionales básicos en la presente invención, estos péptidos pueden hacerse sintéticamente "catiónicos", por ejemplo, protegiendo cadenas laterales funcionales ácidas de modo que estas no puedan ionizarse. Por este método, el equilibrio de cargas puede alterarse para proporcionar profármacos peptídicos con una carga positiva neta.

Cuando se protege un grupo con carga negativa potencial, tal como un ácido carboxílico, el grupo protector no debería afectar a la actividad biológica o debería ser preferentemente escindible en el sitio diana y debería liberar una molécula con propiedades fisiológicas aceptables. Pueden utilizarse grupos tanto éster como amida para prevenir la ionización de restos de ácido carboxílico, por ejemplo, y ambos son escindibles química o enzimáticamente dentro del cuerpo. Sería preferible también, por ejemplo, proteger un grupo ácido como el etil o isopropil éster, para generar etanol o isopropanol biológicamente tolerable tras la desprotección, en lugar de utilizar un metil éster que generaría metanol indeseable.

De una manera similar a la anterior, puede añadirse carga positiva adicional a un péptido que no tenga suficiente naturaleza catiónica proporcionando una amina adicional, u otros grupos que tengan una carga positiva a un pH apropiado. Una serina u otro resto que contuviera hidroxilo podría, por ejemplo, esterificarse en el grupo carboxilo de un aminoácido (especialmente un aminoácido natural tal como glicina o alanina) de modo que el grupo amino proporcione un resto básico adicional. Puede llevarse a cabo una reacción similar con un grupo tiol libre de una cistina, que podría unirse por medio de un enlace disulfuro a un amino tiol. Como con la protección de grupos ácidos, la "activación" de grupos neutros de esta manera preferentemente será por medio de enlaces que puedan escindirse (por ejemplo enzimáticamente) en el sitio diana para liberar moléculas que sean biológicamente tolerables (tales como glicina o alanina en el ejemplo anterior). En la técnica se conocen bien métodos para formar muchas sustituciones adecuadas. Las referencias en el presente documento a agentes activos peptídicos también se refieren a sus "profármacos" tales como los descritos anteriormente, a no ser que se indique de otro modo.

El agente activo peptídico catiónico tendrá típicamente actividad farmacéutica o veterinaria (tal como un agente terapéutico, una vacuna, un agente profiláctico o un agente de diagnóstico) pero también podrá ser un agente dietético o cosmético o un estimulante general o agente de refuerzo inmunitario. Puede incorporarse más de un agente activo peptídico catiónico si es apropiado y pueden incorporarse agentes activos adicionales, incluyendo péptidos y no péptidos, en las formulaciones según sea apropiado. Puede estar presente cualquier agente activo adicional para reforzar la actividad del agente activo peptídico catiónico o puede proporcionarse, por ejemplo, para aumentar adicionalmente la captación del péptido catiónico o para suprimir uno o más efectos indeseables del agente activo peptídico catiónico. En una realización preferida de la invención, el agente activo peptídico catiónico se formula de acuerdo con la invención en presencia de al menos un inhibidor de proteasa. Por formulación con un inhibidor de proteasa, el efecto protector de la invención se intensifica adicionalmente y se suministra una proporción aún mayor del agente activo peptídico. Los inhibidores de proteasa adecuados incluyen inhibidores de pepsina, inhibidores de tripsina e inhibidores de quimotripsina, tales como Trasylol® (aprotinina), amastatina, inhibidor de tripsina pancreática bovina leupeptina, ecotina, inhibidor de pepsina de *Streptomyces*, pepstatina, inhibidor de quimotripsina de ácido acético I etc.

En general, el activo peptídico catiónico indicado en la presente invención será "sensible a enzimas" o "sensible a peptidasa". Como se usa en el presente documento, esto indica que al menos uno de los enlaces peptídicos que forman el péptido es susceptible a escisión por enzimas proteolíticas. La sensibilidad a dichas enzimas puede medirse por métodos *in vitro* convencionales con los que estarán familiarizados los expertos en la materia. Dichos métodos son similares a los indicados en los ejemplos posteriores para el ensayo *in vitro* del efecto estabilizador de la presente invención. Típicamente, los péptidos de la presente invención serán sensibles a al menos una peptidasa y/o proteasa que aparezca en el tracto gastrointestinal de mamífero tal como tripsina, carboxipeptidasa C, quimotripsina o pepsina. Preferentemente, los agentes activos peptídicos catiónicos son sensibles a carboxipeptidasa C.

Como se usa en el presente documento, la expresión “no lamelar” se usa para indicar una fase cristalina líquida normal o inversa (tal como una fase cúbica o hexagonal) o la fase L₃ o cualquier combinación de las mismas. Cuando se describe que una partícula tiene una fase o forma no lamelar, esto indica que anfillos en al menos la región interna de la partícula deberían adoptar esta forma. Las partículas generalmente tendrán dos regiones distintas, una región interna y una región de superficie circundante. La región de superficie, incluso en una partícula “no lamelar” será típicamente lamelar, L₃ o cristalina. Por el contrario, una partícula “lamelar”, como se describe en el presente documento, es una partícula que tiene una región núcleo de disolvente, en lugar de no lamelar. Las formas no lamelares preferidas son fases cristalinas líquidas inversas tales como fases cúbicas o hexagonales. Una fase cristalina líquida altamente preferida es la fase hexagonal inversa.

Una composición se considera “no lamelar” si existe una fracción molecular de al menos 30 % del anfillo formador de estructura como partículas de fase no lamelar. De forma similar, una composición forma partículas de fase no lamelar si al menos 30 % del anfillo está en forma de dichas fases después de exposición a un fluido acuoso. Esto será en general al menos 50 % en ambos casos y preferentemente al menos 70 % del componente anfillo debería estar en una forma no lamelar, bien en la composición inversa como se formula o después de exposición a un fluido corporal. Más preferentemente, este es al menos 80 %, más preferentemente 90 % o más.

Las composiciones que forman fases no lamelares tras exposición a fluidos corporales (precursores de composiciones) generalmente contendrán componentes anfílicos, peptídicos activos y opcionalmente de fragmentación en proporciones relativamente similares a las propias dispersiones no lamelares pero típicamente tendrán una proporción menor del disolvente opcional. Este disolvente es generalmente acuoso o miscible con agua y los precursores de composición pueden formarse secando composiciones no lamelares, por ejemplo por secado por pulverización o liofilización. Los precursores también pueden contener componentes tales como azúcares (por ejemplo lactosa) para ayudar a estabilizar y proteger las composiciones tras el secado y/o para ayudar a la rehidratación. Los disolventes miscibles en agua son típicamente biológicamente aceptables e incluyen alcoholes (especialmente etanol e isopropanol), glicerol, etileno/propilenglicol (especialmente oligo-etileno y/o propilenglicol) y monoglicéridos de cadena corta (por ejemplo hasta C₆, especialmente propilo, butilo, pentilo o hexilo de cadena lineal con una o más insaturaciones).

Las dispersiones que contienen principios activos y particularmente las que son para administración intravenosa al cuerpo humano o animal son convenientemente coloidales, es decir deberían ser de un tamaño de partícula no mayor de 10 Φ m, especialmente no mayor que 5 Φ m y particularmente no mayor de 1 Φ m. Si las partículas dentro de la dispersión superan este tamaño entonces la dispersión puede no ser coloidalmente estable y hay un riesgo considerable de provocar embolia cuando las preparaciones se administran por vía intravenosa. Además, es deseable que la distribución de tamaños de partículas sea estrecha para maximizar el control sobre la liberación de cualquier agente activo.

En el presente caso, con frecuencia, las composiciones se administrarán mediante un método que no sea la vía intravenosa (especialmente por vía oral, intramuscular o subcutánea) y por lo tanto no es necesario que el tamaño de la partícula sea coloidal. En dichos casos, los tamaños de partículas típicos varían de aproximadamente 10 Φ m a aproximadamente 200 Φ m. Sin embargo, sigue siendo ventajoso que las composiciones en partículas proporcionen distribuciones de tamaños de partículas bien caracterizados y reproducibles para controlar la velocidad de descomposición de las partículas y/o liberación de los agentes activos.

En una realización de la invención, mediante la administración de la composición de la invención se forma un “depósito” *in vivo*. El depósito comprenderá una estructura de fase no lamelar, generalmente formada al menos en parte después de la administración (por ejemplo por disipación de un disolvente miscible en agua y/o absorción de agua). Las descomposiciones de depósito pueden formar partículas de fase no lamelar como se ha considerado anteriormente, pero pueden formar, y preferentemente formarán, una fase no lamelar a granel. Puede considerarse que esta es una estructura que comprende “partículas” continuas o semicontinuas de fase no lamelar de al menos 0,5 mm en su mayor dimensión, preferentemente de al menos 1 mm y más preferentemente de 5 mm o más. Estas fases a granel pueden liberar el agente activo gradualmente, bien directamente en solución (por ejemplo por medio de degradación en los extremos de la fase a granel) o por medio de liberación de partículas más pequeñas de fase no lamelar a medida que degradan y estas partículas actúan después para liberar el volumen del agente activo.

El “anfillo formador de estructura” como se indica en el presente documento incluye cualquier agente que sea capaz de formar una fase estructurada en presencia de disolvente acuoso, opcionalmente en presencia de otros agentes tales como otros anfillos y/o agentes de fragmentación. Los anfillos tendrán al menos un grupo polar, hidrófilo y al menos un grupo no polar, hidrófobo seleccionado de grupos alquilo o alquenilo C₆-C₃₂.

Se conocen bien ejemplos de grupos polares (véase, por ejemplo, la solicitud de patente publicada de Estados Unidos número 20020153509) e incluyen grupos aniónicos tales como carboxilatos, fosfonatos, sulfatos y sulfonatos, grupos no iónicos tales como alcoholes, polioles (por ejemplo azúcares, glicerol, etc.) y ésteres, grupos catiónicos tales como compuestos de amonio cuaternario, sales de piridinio y sales de fosfonio cuaternario y grupos zwitteriónicos tales como grupos de cabeza de fosfolípidos (por ejemplo, fosfatidilcolina, etc.), acetatos de amonio, alcanosulfonatos de amonio y ésteres de trialquilaminoalquilfosfato. El componente anfillo neutro no tendrá carga

neta al pH de la composición y/o pH fisiológico mientras que el componente lipídico aniónico portará una carga negativa neta en dichas condiciones. Preferentemente, el componente anfífilo neutro será no iónico. Además, el lípido aniónico preferentemente incluirá al menos un grupo ácido, o sal del mismo, particularmente un grupo de ácido carboxílico. No se prefieren componentes anfífilos catiónicos y cuando estén presentes habrá una mayor cantidad de anfífilos aniónicos que de anfífilos catiónicos.

Los grupos no polares se seleccionan de grupos alquilo y alqueno C₆-C₃₂, que están presentes típicamente como los ésteres de ácidos carboxílicos de cadena larga. Estos se describen con frecuencia por referencia al número de átomos de carbono y al número de insaturaciones en la cadena de carbono. Por lo tanto, CX:Z indica una cadena de hidrocarburo que tiene X átomos de carbono y Z insaturaciones. Los ejemplos incluyen particularmente grupos caproilo (C6:0), capriloilo (C8:0), caprilo (C10:0), lauroilo (C12:0), miristoilo (C14:0), palmitoilo (C16:0), fitanoilo (C16:0), palmitoleoilo (C16:1), estearoilo (C18:0), oleoilo (C18:1), elaidoilo (C18:1), linoleilo (C18:2), linolenoilo (C18:3), araquidonoilo (C20:4), behenoilo (C22:0) y lignoceroilo (C24:9). Un anfífilo típicamente tendrá uno o dos grupos de "cola" no polares (lípidos de aminoácido y diácido respectivamente) pero pueden tener tres, cuatro o más grupos hidrófobos.

Los ejemplos de anfífilos adecuados para su uso en la presente invención incluyen lípidos naturales, lípidos sintéticos, tensioactivos, copolímeros, proteínas (en particular caseínas y albúmina), hidrótrofos, alcoholes y otros aditivos que pueden formar o facilitar la formación de fases estructuradas. Son agentes preferidos los glicéridos (por ejemplo, monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos), los di y poliglicerolésteres de glicéridos (por ejemplo diglicerol monooleato, diglicerol monocaprato), la grasas y los aceites naturales (por ejemplo aceite de soja, aceite de coco, aceite de maíz, aceite de ricino, aceite de girasol), los aceites fraccionados (por ejemplo aceite de coco fraccionado, Miglyol7 (Condea)), los aceites transesterificados (por ejemplo Maizine7), los productos de transesterificación de aceites y el PEG (por ejemplo aceite de ricino etoxilado (por ejemplo Cremophor® EL (BASF)), aceite de ricino hidrogenado etoxilado (por ejemplo, Cremophor® RH-40 (BASF)), aceite de maíz etoxilado (por ejemplo, Labrafil® M 2125 CS (Gattefossé)), monoglicéridos acetilados, ácidos grasos (por ejemplo, ácidos grasos saturados e insaturados C6-C26), alcoholes grasos (por ejemplo, fitantriol (3,7,11,15-tetrametil-1,2,3-hexadecantriol)), lípidos de éteres (por ejemplo monooleilgliceriléter), fosfolípidos naturales y sintéticos (por ejemplo, lecitina de huevo, lecitina de soja, lecitina hidroxilada, fosfatidilcolina, fosfatidil etanolamina, fosfatidil serina, fosfatidil glicerol, ácido fosfatídico), lisofosfolípidos (por ejemplo, lisolecitina, lisofosfatidilcolina, liso-oleilfosfatidilcolina), compuestos análogos de fosfolípidos (por ejemplo los desvelados en el documento US 6344576), esteroides y derivados de esteroles (por ejemplo, colesterol, sitosterol, lanesterol y sus ésteres, especialmente con PEG o ácidos grasos), galactolípidos (por ejemplo, digalactosil diacilglicerol, monogalactosil diacilglicerol), esfingolípidos (por ejemplo, esfingomielina), tensioactivos no iónicos, en particular tensioactivos etoxilados, tales como, mono y diésteres de ácidos grasos-PEG (por ejemplo de las series Crodet® (Croda), Cithrol® (Croda), Nikkol® (Nikko), Myrj® (ICI), Solutol® HS 15 (BASF), ésteres de ácidos grasos de glicerol PEG (por ejemplo Tagat® L y O (Goldschmidt), serie Glycerox® L (Croda), Capmul® EMG (Abitec)), productos de transesterificación de aceites y PEG (por ejemplo, de las series Labrafil® (Gattefossé), Cremophor® (BASF) Crovol® (Croda) y Nikkol® HCO (Nikko)), ésteres de ácidos grasos de sorbitán-PEG (por ejemplo Tween® 20, Tween® 80 y otros polisorbatos de la serie Tween® (ICI)), alquil ésteres de PEG (por ejemplo de las series Brij® (ICI) y Volpo® (Croda)), tensioactivos de alquil fenol de PEG (por ejemplo de las series Tritón X y N (Rohm & Haas); ácidos grasos poliglicerados (por ejemplo, Nikkol® Decaglyn (Nikko), Pluro® Oleique (Gattefossé)), ésteres de ácidos grasos de propilenglicol, ésteres de ácidos grasos de propilenglicol (por ejemplo Capryol® 90 (Gattefossé), Lutrol® OP2000 (BASF), Captex® (Abitec)), ésteres de ácidos grasos de glicerol/propilenglicol (por ejemplo Arlacel® 186 (ICI)), ésteres de ácidos grasos de sorbitano (por ejemplo de las series Span® (ICI) y Crill® (Croda)), ésteres de azúcar (por ejemplo de las series SUCRO ESTER® (Gattefossé) y Crodesta® (Croda)), copolímeros en bloque de polioxietileno-polioxipropileno (denominados poloxámeros, por ejemplo, de las series Pluronic® (BASF), Synperonic® (ICI) y Lutrol® (BASF)), copolímeros de óxido de etileno y óxido de butileno; tensioactivos aniónicos incluyendo sales de ácidos grasos, sales biliares (por ejemplo colato sódico, glicocolato sódico, taurocolato sódico), carboxilatos tales como carboxilatos de éter, monoglicéridos succinilados, ésteres de ácido tartárico mono/diacetilados de mono y diglicéridos, ésteres de ácido cítrico de mono y diglicéridos, gliceril lacto ésteres de ácidos grasos, acil lactilatos, sales de alginato, alginato de propilenglicol; tensioactivos catiónicos incluyendo aminos etoxiladas (por ejemplo amina de coco polioxietileno-15), betaínas (por ejemplo, N-lauril-N,N-dimetil glicina), sales de alquilpiridinio, sales de amonio cuaternario tales como bromuro de hexadecil triamonio, bromuro de decil trimetilamonio, bromuro de cetiltrimetilamonio; tensioactivos zwitteriónicos incluyendo trimetilamonioetil alquil fosfonatos (por ejemplo, los ejemplos desvelados en el documento US 6344576); y todas las mezclas de los mismos.

Los agentes formadores de estructuras neutros más preferidos son gliceril monooleato, gliceril monolinoleato, gliceril dioleato (GDO), dioleil fosfatidil etanolamina (DOPE), dioleilfosfatidilcolina (DOPC) y fitantriol o lisofosfolípidos, especialmente liso-oleilfosfatidilcolina (LOPC). Cualquier mezcla de estos, particularmente incluyendo GDO/DOPC o GDO:lecitina de huevo (por ejemplo 70:30 p/p de una de ellas) también es adecuada. Se prefieren lípidos de origen natural o de fuentes naturales o sintéticas debido a su perfil de toxicidad en general menor y/o más predecible. Son muy adecuados los lípidos de ésteres de ácidos grasos de origen natural incluyendo los fosfolípidos.

Con frecuencia el componente anfífilo contendrá material en forma de productos naturales extraídos y purificados y por lo tanto contendrá una mezcla de compuestos relacionados. La fosfatidilcolina de soja, por ejemplo, es una

mezcla de compuestos que tiene aproximadamente 60-75 % de grupos acilo C18:2, aproximadamente 12-16 % de C16:0 y otros en equilibrio. De forma similar, la lecitina de huevo comercial tiene típicamente aproximadamente 70-75 % de fosfatidilcolina, aproximadamente 10 % de fosfatidil etanolamina y otros lípidos en equilibrio. Estos dos productos son adecuados para su uso en la presente invención. Diferentes preparaciones comerciales también variaran ligeramente pero siguen siendo adecuadas.

Un ejemplo de un agente estructurador preferido para su uso en la presente invención es el gliceril monooleato (GMO) disponible en el comercio. Como se ha indicado anteriormente, este es principalmente un monoglicérido con una cadena de acilo oleilo (C18:1) pero contiene ciertas cantidades de otros compuestos. Estos se incluyen en la expresión "gliceril monooleato" o "GMO" como se usa en el presente documento. Las preparaciones comerciales de GMO incluyen GMORphic-80 y Myverol 18-99 (disponibles en Eastman Kodak), Rylo MG 19 y Dimodan DGMO (disponibles en Danisco). Puede utilizarse cualquiera de estos anfífilos formadores de estructuras solos o en combinación con uno o más agentes estructuradores anfífilos distintos.

Un componente clave en la presente invención es el componente lipídico aniónico ya que este proporciona niveles inesperadamente altos de protección para el agente activo peptídico contra la degradación enzimática. Puede utilizarse cualquier anfífilo aniónico o combinaciones de los mismos, incluyendo los indicados anteriormente, pero se prefiere utilizar al menos un ácido graso o un componente de sal de ácido graso. Son ácidos grasos preferidos los correspondientes a las cadenas de ácidos grasos de lípidos de ésteres naturales, incluyendo ácidos caproico, caprílico, caprico, láurico, mirístico, palmítico, fitánico, palmitólico, esteárico, oleico, elaídico, linoleico, linoléico, araquidónico, behénico o lignocérico, sus sales o mezclas de los mismos. Las sales de ácidos grasos serán sales fisiológicamente tolerables. Los anfífilos aniónicos más preferidos son ácidos grasos de origen natural insaturados y sus sales, especialmente ácido oleico o sales del mismo.

Las sales preferidas de cualquiera de los componentes aniónicos indicados en el presente documento, particularmente los anfífilos aniónicos, incluyen sales metálicas alcalinas y alcalinotérricas así como sales de amonio y alquilamonio. Los ejemplos preferidos de estas incluyen sales de sodio, potasio, litio, calcio o magnesio, sales de amonio o sales de trietilamonio. Cuando en el presente documento se indica un componente aniónico o un ácido, esa indicación se refiere también a sales fisiológicamente tolerables del mismo, a no ser que se indique de otro modo específicamente.

El componente aniónico estará presente en una cantidad de 0,5-20 p/p en relación con la cantidad combinada de anfífilos formadores de estructura aniónicos y neutros. No siempre son deseables concentraciones muy altas de anfífilos aniónicos, tales como ácidos grasos, sin embargo, desde el punto de vista de otros criterios de rendimiento importantes incluyendo biocompatibilidad, capacidad de dispersión, morfología y estabilidad coloidal, así como la salud del sujeto. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el componente aniónico estará presente en una cantidad no significativamente mayor de lo necesario para proporcionar el nivel deseado de protección enzimática. En general el componente aniónico estará presente en una concentración suficiente para aumentar la semivida del agente activo peptídico (catiónico) en solución de carboxipeptidasa C *in vitro* en al menos 50 % en relación con la composición equivalente en ausencia del componente aniónico. Más preferentemente, esta semivida aumentará en al menos 75 % o 100 % y más preferentemente, será 2, 5, 3 o 4 veces el valor medido en ausencia de anfífilo aniónico.

La concentración de anfífilo aniónico necesaria se podrá determinar fácilmente por experimentación sencilla, pero la proporción de anfífilo aniónico con respecto a anfífilo neutro estará en el intervalo de concentración de 0,5-20 % p/p y más preferentemente entre 1-10 % p/p. El intervalo más preferido es entre 2 y 8 % p/p.

Preferentemente las dispersiones en partículas indicadas en el presente documento contendrán al menos un agente de fragmentación. El agente de fragmentación sirve para mejorar la capacidad de dispersión de la fase no lamelar, forma una fase de estabilización alrededor de la partícula no lamelar y/o estabiliza la dispersión. Los agentes de fragmentación adecuados serán agentes que ayuden a la dispersión de anfífilo en partículas (especialmente partículas de fase no lamelar) o estabilizarán dichas partículas. Típicamente un agente de fragmentación será un tensioactivo tal como un copolímero en bloque anfífilo.

Los agentes de fragmentación importantes incluyen lípidos naturales, lípidos sintéticos, tensioactivos, copolímeros, proteínas (en particular caseínas y albúmina), hidrótrofos, alcoholes y otros aditivos que puedan facilitar la fragmentación espontáneamente o con la ayuda de fuerzas y presiones aplicadas de forma externa y contribuyen a la estabilización. Esto incluye también nanopartículas y combinaciones de polímero y nanopartículas (véase, por ejemplo, el documento WO 99/12640).

Son agentes de fragmentación preferidos los copolímeros y estos pueden tener bloques que comprendan polioxiálquilenos, polivinilpirrolidona, polivinilacetato, alcohol polivinílico, poliésteres, poliamidas y/o polialquenos. El copolímero en bloque comprenderá al menos dos bloques de polímero que tienen diferentes grados de hidrofiliidad. Ciertas proteínas (tales como caseína) también son de carácter anfífilo y pueden utilizarse como agentes de fragmentación. Cuando el agente activo peptídico catiónico sea una proteína anfífilica, esta puede actuar tanto como agente activo y como agente de fragmentación, o puede incluirse además de otro agente activo y/o agente de fragmentación.

Son ejemplos preferidos de copolímeros en bloque anfífilos, los poloxámeros, que comprenden al menos un bloque de polioxietileno y al menos un bloque de polioxipropileno. Los agentes de fragmentación más preferidos son poloxámero 407 (por ejemplo Pluronic® (Lutrol) F127, BASF), poloxámero 188 (por ejemplo Pluronic® F68, BASF) y polisorbato 80 (por ejemplo, Tween® 80, ICI).

Cuando se incluya para ayudar a la dispersión, el agente de fragmentación estará presente a un nivel suficiente para producir la fragmentación de la composición y/o estabilizar las partículas fragmentadas (que preferentemente estarán en fase no lamelar). Dicha fragmentación puede ser espontánea o puede requerir fragmentación física tal como por cizalladura y/o ultrasonidos. Para que la composición sea físicamente estable es preferible que esté presente suficiente agente de fragmentación. Típicamente una fragmentación proporcionará un efecto deseado a un nivel de 1-30 % en peso, en relación con el contenido de anfífilo total de la composición. Esto será más típicamente 5-15 % en peso y más preferentemente 8-12 % en peso.

Son agentes activos adecuados para la presente invención los péptidos catiónicos naturales y sintéticos que tengan un punto isoeléctrico por encima de pH 7,0 e incluyen fármacos y vacunas de uso humano y veterinario, agentes de diagnóstico, agentes cosméticos, nutrientes, complementos dietéticos, etc. Estos pueden ser inherentemente catiónicos o pueden hacerse catiónicos por protección sintética apropiada o activación como se ha comentado anteriormente. También pueden comprender aminoácidos no naturales como se ha indicado anteriormente.

Los ejemplos de fármacos adecuados incluyen agentes antibacterianos que incluyen antibióticos peptídicos macrocíclicos, agentes antifúngicos, agentes antineoplásicos y/o antiviricos, antiinflamatorios, fármacos cardiovasculares incluyendo agentes reductores de colesterol y reductores de la tensión arterial, analgésicos, antidepresivos, hormonas, vacunas y moduladores óseos. Los agentes de diagnóstico incluyen compuestos marcados con radionúclidos y agentes de contraste incluyendo agentes potenciadores de rayos X tales como compuestos yodados y compuestos emisores de radiación gamma. Los nutrientes incluyen complementos dietéticos, etc.

Los agentes activos preferidos incluyen fármacos peptídicos humanos y veterinarios seleccionados del grupo que consiste en hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y sus fragmentos, angiotensina y sus péptidos relacionados, anticuerpos y sus fragmentos, antígenos y sus fragmentos, péptidos natriuréticos auriculares, péptidos bioadhesivos, bradiquininas y sus péptidos relacionados, calcitoninas y sus péptidos relacionados, fragmentos proteicos de receptores de superficie celular, péptidos quimiotácticos, ciclosporinas, citocinas, dinorfinas y sus péptidos relacionados, endorfinas y fragmentos de P-lidotropina, encefalina y sus proteínas relacionadas, inhibidores enzimáticos, fragmentos de fibronectina y sus péptidos relacionados, péptidos gastrointestinales, péptidos liberadores de hormona de crecimiento, péptidos inmunoestimuladores, interleucinas, hormonas liberadoras de hormona luteinizante (LHRH) y sus péptidos relacionados, hormonas estimuladoras de melanocitos y sus péptidos relacionados, péptidos relacionados con señales de localización nuclear, neurotensinas y sus péptidos relacionados, péptidos neurotransmisores, péptidos opioides, oxitocinas, vasopresinas y sus péptidos relacionados (especialmente desmopresina), hormona paratiroidea y sus fragmentos, proteína quinasas y sus péptidos relacionados, somatostatinas y sus péptidos relacionados, sustancia P y sus péptidos relacionados, factores de crecimiento transformante (TGF) y sus péptidos relacionados, fragmentos de factor de necrosis tumoral, toxinas y toxoides y péptidos funcionales tales como péptidos antineoplásicos incluyendo angiostatinas, péptidos antihipertensivos, péptidos anticoagulación sanguínea, y péptidos antimicrobianos; seleccionados del grupo que consiste en proteínas tales como inmunoglobulinas, angiogeninas, proteínas morfogénicas óseas, quimiocinas, factores estimuladores de colonias (CSF), citocinas, factores de crecimiento, interferones, interleucinas, leptinas, factores inhibidores de leucemia, factores de células madre, factores de crecimiento transformante y factores de necrosis tumoral, todos derivatizados según sea necesario para hacerlos catiónicos.

Más preferentemente, el agente activo peptídico catiónico será inherentemente catiónico, ya que tendrá una carga positiva neta al pH de la formulación, sin ninguna modificación química.

Algunos ejemplos de agentes activos peptídicos, junto con un perfil de algunas de sus propiedades y/o indicaciones diana, se proporcionan posteriormente en la Tabla 2. La tabla también muestra el número de aminoácido y el punto isoeléctrico de ciertos péptidos.

Los agentes activos peptídicos preferidos son catiónicos y esto puede medirse por el pH isoeléctrico del péptido, por ejemplo, en su forma activa y/o cuando se modifica como un profármaco (como se ha descrito anteriormente). A un pH por debajo del valor isoeléctrico, un péptido puede considerarse catiónico. Por lo tanto los péptidos tendrán un punto isoeléctrico de al menos 7,0 (por ejemplo, de al menos 7,5, preferentemente de al menos 7,8) y más preferentemente de alrededor de 8 o más (por ejemplo de al menos 8,0, al de menos 8,5 o de al menos 9,0). La calcitonina, por ejemplo, tiene su punto isoeléctrico a aproximadamente pH 8,9 y la vasopresina a aproximadamente 8,0. El punto isoeléctrico del octreótido es también de aproximadamente 8,0. Se proporcionan ejemplos de todos estos péptidos en la Tabla 2. De forma correspondiente, los agentes activos peptídicos son preferentemente no péptidos tales como lepuridina o insulina α , que tienen un valor isoeléctrico de aproximadamente 4.

Tabla 2 - Agentes activos peptídicos y proteicos

1a HORMONAS y DERIVADOS DE HORMONAS	Aminoácidos	PH Isoeléctrico
Somatostatina (y análogos)	28	9,58
Acromegalia y tumores carcinoides y de péptidos intestinales vasoactivos Calcitoninas (salmón)	32	8,86
Osteoporosis Gonadorelina	10	8,75
Control de la ovulación <i>Derivados:</i> leuprolida; Goserelina; Triptorelina		
Vasopresina	9	8,06
Diabetes insípida, varices esofágicas hemorrágicas, etc. <i>Derivados:</i> desmopresina, Felipresina		
Folitropina-alfa	116	8,38
Infertilidad Gonadotropina beta coriónica humana	145	8,65
Infertilidad Tirotropina alfa	92	8,38
herramienta de diagnóstico adyuvante para tiroglobulina en suero Secretina (por ejemplo, porcina)	27	9,45
evaluación pancreática Bradiquinina	9	
hormona tisular hipotensiva		
1b ANTIVÍRICO, ANTIBACTERIANO Y ANTIFÚNGICO	Aminoácidos	PH Isoeléctrico
Interferón beta	166	8,93
Interferón gamma	166	9,54
en diferentes formas recombinantes, anti hepatitis C, leucemia, esclerosis Taquiplesina I	17	9,93
Antibacteriano, antivírico	-	
Tuftsina	4	11
inmunomodulador, antimicrobiano, antivírico, antineoplásico Magainina I	23	10

ES 2 623 881 T3

Magainina II	23	10
Inhíbe el crecimiento de numerosas bacterias y hongos		
Indolicidina (por ejemplo bovina)	13	12,01
Antibacteriano, antifúngico, antineoplásico, antivírico, antiparasitario		
Protegrina (por ejemplo, porcina)	18	10,66
antibacteriano, antifúngico, antivírico		
Polifemusina I	18	10,33
Polifemusina II	18	10,1
antibacteriano, antifúngico, antivírico		
Polimixina B		
antibacteriano		
Gramicidina S	10	
antifúngico		
1c OTROS PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS	Aminoácidos	PH Isoeléctrico
Molécula de Adhesión Intercelular 1	23	9,51
Alteplasa	527	7,61
Infarto de miocardio agudo e ictus isquémico agudo		
Antagonista de receptor de interleucina 1	550	8,51
anti artritis reumatoide		
Becaplermina	109	9,38
Úlceras de pie diabético		
péptidos de tipo conotoxina alfa	16	
analgésico (véase documento WO 02/079236)		
Melitina	26	12,02
analgésico, antibacteriano		
1d INTERLEUCINAS (IL)	Aminoácidos	PH Isoeléctrico
IL-2	133	7,05
Factor de crecimiento de linfocitos T (TCGF) (Aldesleukina).		
IL-4	129	9,26
Factor estimulante de linfocitos B		
IL-5	115	7,02
Factor de reemplazo de linfocitos T		

IL-7	152	8,72
IL-8	77	9,24
Activador de neutrófilos		
IL-9	126	
Factor de crecimiento de linfocitos T P40		
IL-10	160	7,63
Factor inhibidor de síntesis de citocinas		
IL-11	178	11,16
Factor inhibidor de adipogénesis		
IL-13	112	8,81
IL-17	132	8,62
Antígeno 8 asociado a linfocitos T citotóxicos		
IL-19	153	7,8
Proteína de tipo proteína asociada a diferenciación de melanoma		
IL-20	152	8,77
Citocina de cuatro hélices alfa ZCYTO10		
IL-24	158	8,6
Proteína 7 asociada a diferenciación de melanoma		
IL-26	150	9,99

5 Los ejemplos preferidos, particularmente de esta lista, incluyen somatostatina (y análogos incluyendo octreótido), Calcitonina (salmón), Gonadorelina, Vasopresina, Folitropina alfa, Gonadotropina coriónica humana beta hCG-beta, Insulina y análogos de Insulina, Tirotropina alfa, Secretina, Bradiquinina, Interferón beta, Interferón gamma, Taquiplesina I, Tuftsina, Magainina I, Magainina II, Indolicidina, Protegrina, Polifemusina I, Polifemusina II, Polimixina B, Gramicidina S, Molécula de Adhesión Intercelular 1, Alteplasa, Antagonista del receptor de Interleucina 1, Becaplermina, péptidos de tipo conotoxina Alfa, Melitina, IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-13, IL-19, IL-20, IL-24 e IL-26. Los agentes activos peptídicos catiónicos más preferidos son los péptidos inherentemente catiónicos calcitonina (humana o preferentemente de salmón), octreótido y otros análogos de somatostatina (tales como los desvelados e indicados en Janecka *et al.* In *Endocrine Regulations* 35 75-79,2001) y desmopresina.

15 Las composiciones de la presente invención pueden formularse como productos farmacéuticos por métodos bien conocidos en la técnica. Estas formulaciones serán típicamente formulación oral tal como comprimidos, comprimidos recubiertos (tales como comprimidos de liberación controlada), cápsulas, suspensiones, dispersiones, jarabes o polvos, pero pueden ser formulaciones para inhalación (tales como polvos o aerosoles) o para administración parenteral (por ejemplo subcutánea, intramuscular o intravenosa) en forma de, por ejemplo, dispersiones estériles en solución salina, o precursores de los mismos. Una realización particularmente interesante relacionada con la administración de "depósito" parenteral se describe en detalle posteriormente.

20 Las composiciones pueden formularse con vehículos, diluyentes y/o excipientes farmacéuticos convencionales, tales como vehículos acuosos (por ejemplo, agua para inyección), disolventes, aglutinantes, cargas, estabilizadores, agentes de ajuste de la osmolalidad, agentes efervescentes, tampones y modificadores de pH, modificadores de la viscosidad, edulcorantes, lubricantes, emulsionantes, saporíferos, agentes de recubrimiento (por ejemplo, recubrimientos resistentes a jugos gástricos) etc. Las formulaciones que comprenden al menos un vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable forman por lo tanto un aspecto preferido adicional de la invención.

25 La dosificación de las composiciones de la invención para administrar a un sujeto dependerá del agente activo, de la especie, del tamaño, la madurez, la salud y la condición del sujeto y de la formulación elegida. Las composiciones también pueden suministrar una mayor proporción del agente activo al sujeto que las formulaciones tradicionales y

esto debería tenerse en cuenta. Las dosificaciones adecuadas se establecerán fácilmente para péptidos terapéuticos conocidos por referencia a la biodisponibilidad cuando se formulan en las composiciones de la invención y la dosificación y biodisponibilidad conocidas cuando se suministran por métodos establecidos.

5 Como alternativa, las composiciones pueden formularse como alimentos o bebidas funcionales, en cuya situación los vehículos y excipientes comprenderán típicamente productos alimentarios o de bebidas comestibles. Dichos productos pueden ser alimentos procesados para consumo en caliente, tales como platos precocinados, pero serán más preferentemente alimentos fríos incluyendo pastas para untar (por ejemplo margarina o pastas para untar bajas en grasas), bebidas sin alcohol, cereales para el desayuno, barritas para el desayuno, panes, galletas, helados, postres fríos tales como yogures, mousses o trifle, leche o bebidas a base de leche.

10 Cuando los agentes activos peptídicos presentes en las composiciones de la invención se formulan como alimentos o bebidas funcionales, será importante que la dosis máxima que pueda consumirse accidentalmente por sobrealimentación de dichos alimentos no sea excesiva.

15 En una realización alternativa de la invención, las composiciones de la invención comprenden o forman una estructura de fase no lamelar a granel, en lugar de partículas de fase no lamelar. Esta es una realización particularmente adecuada para la generación de composiciones de "depósito" que se degradan gradualmente liberando *in vivo* el agente activo peptídico como resultado de esta degradación o por difusión gradual (o ambas). Dado que las composiciones de la invención son muy eficaces para proteger a agentes activos peptídicos de la degradación *in vivo*, estas composiciones suponen composiciones y precursores de depósito muy eficaces. Generalmente, las composiciones de depósito se administran por vía parenteral, especialmente por inyección intramuscular o subcutánea y pueden dar como resultado la liberación del péptido activo durante un período de días (por ejemplo de 1 a 14 días), semanas (por ejemplo 2-8 semanas) o incluso varios meses (por ejemplo 1-3 meses).

20 En una realización de depósito, es preferible en general que en el momento de la administración las composiciones no adopten una estructura de fase no lamelar. Esto es porque las fases no lamelares a granel (a diferencia de las partículas) son con frecuencia viscosas y difíciles o dolorosas de inyectar. Como resultado, en esta realización, las composiciones contienen típicamente de aproximadamente 0,5 a 50 % en peso de un disolvente orgánico que contiene oxígeno, tal como un alcohol, una cetona, un sulfóxido, un éster o un éter. La adición de dichos disolventes permite la formación de una preformulación de baja viscosidad que posteriormente formará una composición no lamelar de la invención tras su contacto con fluidos corporales. Obviamente dichas preformulaciones también son composiciones de la invención. En una realización preferida, las composiciones de la invención comprenden por lo tanto además del 0,5 al 50 %, preferentemente del 2 al 30 %, más preferentemente del 5 al 20 % en peso de un disolvente orgánico biotolerable que contiene oxígeno. En esta realización, es preferible que la composición no esté inicialmente en forma de una fase no lamelar, sino que forme dicha fase (como se describe en el presente documento) tras el contacto con un fluido corporal después de la administración.

25 Los disolventes típicos adecuados para su uso en las composiciones incluyen al menos un disolvente seleccionado de alcoholes, cetonas, ésteres (incluyendo lactonas), éteres y sulfóxidos. Los ejemplos de alcoholes adecuados incluyen etanol, isopropanol y glicerol formal. Los ejemplos de cetonas incluyen acetona y n-metilpirrolidiona. Los éteres adecuados incluyen el dietiléter, glicofuro y dimetilisobarbida. Los ésteres adecuados incluyen etil acetato e isopropil acetato y el dimetil sulfuro es un disolvente de sulfuro adecuado.

30 Cuando la composición es una composición o preformulación de depósito, es preferible que el componente anfílico neutro comprenda un lípido de diacilo, especialmente un diacil glicerol, y un fosfolípido en proporciones de 5:95 a 95:5 en peso, preferentemente de 10:90 a 90:10 y más preferentemente de 10:90 a 45:55 de lípido de diacilo: fosfolípido.

35 Correspondientemente, en una realización adicional, la presente invención proporciona un método para administrar un péptido catiónico a un paciente que comprende la inyección de una composición de la invención que comprende un disolvente orgánico (como se describe en el presente documento) que forma posteriormente una composición de "depósito" no lamelar de la invención *in vivo* tras su contacto con un fluido corporal.

40 La invención se ilustrará ahora adicionalmente por referencia a los siguientes ejemplos no limitantes y a las figuras adjuntas, en las que:

45 La Figura 1 muestra la proporción de agente activo peptídico calcitonina restante no degradado a lo largo del tiempo con diferentes formulaciones lipídicas;

50 La Figura 2 muestra concentraciones de calcitonina de salmón (CTs) en plasma después de suministro oral en formulaciones cristalinas líquidas cúbicas de GMO/OA (95 %/5 %) o GMO (100 %); y

55 La Figura 3 muestra concentraciones en plasma de agente activo en ratas después de administración subcutánea de dos formulaciones de depósito. Se usó como referencia un depósito a base de aceite de sésamo.

Ejemplos:

En los siguientes ejemplos se utilizan las siguientes abreviaturas:

E200	Epikuron 200 (lecitina de soja)
F127	Pluronic™F 127 (BASF)
GDO	Glicerol Di Oleato
GMO	Glicerol Mono Oleato
AL	Ácido Linoleico
DL	Difracción por Láser
AO	Ácido Oleico
PC	Fosfatidil colina
Ret Pal	Retinil palmitato
SAXS	Dispersión de rayos X de Ángulo Pequeño
CTs	Calcitonina (Salmón)
MET	Microscopía Electrónica de Transmisión
Tri Gli	Tri-Glicérido

5

Ejemplo 1 - Partículas de GMO/OA

1.1 - Preparación de una dispersión a alta presión

10 Se formó una dispersión gruesa de partículas principalmente cúbicas mezclando Rylo MG 19 GMO (Danisco, 4,70 g) y ácido oleico (Apoteket, 0,24 g) y añadiendo la mezcla en gotas a poloxámero 147 (BASF, 0,5 g) en agua desionizada (45,7 g) con agitación vigorosa a temperatura ambiente. Se permitió que la dispersión gruesa resultante se equilibrara durante aproximadamente 30 minutos antes de la homogeneización en un microfuidificador a alta presión (35.000 kPa) durante 10 min (6 ciclos) a 40 °C.

15 El tamaño de partícula se midió utilizando difracción por láser (Coulter LS230) antes y después de la homogeneización. La morfología de partículas y comportamiento de fase del homogeneizado se analizó utilizando dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS) y mediante criomicroscopía electrónica de transmisión (crio MET).

20 El homogeneizado fue una dispersión coloidal con tamaños de partícula por debajo de 1 µm que consistía principalmente en vesículas con una proporción de partículas de núcleo de fase cúbica. Las partículas preparadas por este método se expusieron en general a una etapa de tratamiento de calor antes de la carga.

1.2 - Preparación de una dispersión a baja presión

25 El procedimiento del Ejemplo 1.1 se repitió, excepto que se llevó a cabo la etapa de homogeneización a baja presión (17.400 kPa) durante un período más corto (5 ciclos).

30 El método de baja presión produjo una mayor proporción de partículas de núcleo de fase cúbica y algunas vesículas con una distribución de tamaño de partícula bimodal. El homogeneizado se expuso opcionalmente a un ciclo de tratamiento con calor antes de la carga.

1.3 - Tratamiento con calor

35 Se llevó a cabo un ciclo opcional de tratamiento con calor de la dispersión no lamelar preparada en los Ejemplos 1.1 y 1.2 para convertir una mayor proporción de las partículas a fase no lamelar. Las partículas del método del Ejemplo 1.1 se trataron habitualmente con un ciclo de tratamiento con calor.

40 Se esterilizó con autoclave (121 °C, 20 min) una muestra de la dispersión generada en el Ejemplo 1.1 o 1.2 (10 ml) y se enfrió a temperatura ambiente. Cuando se examinó por crio MET, prácticamente todas las partículas en la dispersión mostraban un carácter no lamelar. La distribución de tamaño de partículas también se estrecha en cierta medida en comparación con la dispersión antes del tratamiento con calor y el tamaño de partículas promedio aumentó ligeramente. Las partículas tratadas con calor mostraron estabilidad mejorada a almacenamiento.

Ejemplo 2 - Dispersiones no lamelares y carga adicionales

2.1 - Composiciones de dispersiones no lamelares

5 Pueden prepararse dispersiones no lamelares de diversos componentes en agua por el método del Ejemplo 1.1 y tratarse opcionalmente con el método de tratamiento con calor del Ejemplo 1.2. La dispersión resultante se analiza con respecto al tamaño de partículas y comportamiento de fase.

n.º	Anfífilo(s) neutro(s)	% p ¹	anfífilo aniónico	% p ¹	Agente de fragmentación	% p ¹	% de Agua ²	Fase Dominante
1	GMO	94	OA	5	F127	1	91	Cúbica
2	GMO	89	OA	20	F127	1	91	Hex ³
3	GMO	49.5	OA	49.5	F127	1	91	Hex ³⁺ + L ₂ ⁴
4	GMO	94	LA	5	F127	1	90	Cúbica
5	E200: GDO	50:32	OA	5	F127	13	90	Hex ³
6	GMO:RetPal	73:12	OA	5	F127	10	90	Hex ³
7	GMO: Tri Gli	76:9	OA	5	F127	10	91	Hex ³
8	E200: GDO	51:33	LA	4	F127	12	91	Hex ³
9	GMO:RetPal	73:12	LA	5	F127	12	91	Hex ³

10 Tabla 3

¹% en peso de anfífilo y agente de fragmentación

²% en peso de agua en la dispersión final

³Hex = fase hexagonal

15 ⁴Fase micelar inversa

2.2 - Carga peptídica

20 A cada una de las dispersiones del Ejemplo 2.1 se añade el péptido catiónico desmopresina a una concentración final de 1 mg/ml. Se permite que la dispersión se equilibre durante 60 minutos a temperatura ambiente.

2.3 Carga de inhibidor de peptidasa y péptido

25 A cada una de las dispersiones del Ejemplo 2.1 se añade el péptido catiónico calcitonina a una concentración de 0,8 mg/ml y uno o más inhibidores de peptidasa seleccionados de aprotinina (Trasylo®), amastatina y/o leupeptina a una concentración total de 0,4 mg/ml. Se permite que la dispersión repose durante 3 horas a temperatura ambiente.

Ejemplo 3 - Degradación de péptidos por proteasa tripsina

30 3.1 Método de ensayo de proteasa y carga de péptidos

35 Se disolvió calcitonina de salmón (CTs) en dos viales con solución salina 0,9 % y en un vial con la dispersión no lamelar de ensayo en solución salina, a una concentración de 1 mg de CTs/ml. Los viales se colocaron en un baño de agua a 37 °C con agitación.

A un vial con CTs en solución salina se añadió un inhibidor, aprotinina (Trasylo®) (10.000 KIE/ml, 125 µl/ml de solución salina).

40 Se tomaron muestras cero de los dos viales de solución salina y de la dispersión no lamelar.

La proteasa Tripsina (500 µg/ml, 30 µl/ml de solución salina) se añadió a todos los viales.

Después de intervalos de tiempo fijos, las muestras se transfirieron a viales de HPLC y el inhibidor Trasylol® se añadió a las muestras de dispersión no lamelar y las muestras en solución salina sin Trasylol®.

5 A una muestra de 100 µl se añadieron 230 µl de metanol y entre 40 y 115 µl de cloroformo (ajustándose los volúmenes dependiendo de la composición lipídica y concentración de la dispersión no lamelar) para formar un sistema de una fase. Las muestras se mezclaron exhaustivamente y se permitió que reposaran durante cinco minutos.

10 El sistema de una fase se dividió en dos fases añadiendo 230 µl de cloroformo y 700 µl de agua. Las muestras se mezclaron y se centrifugaron durante 5 minutos a 13.000 rpm. Se transfirieron 200 µl de la fase de agua/metanol superior a un vial de inserción de 300 µl.

15 Se realizó un análisis de la cantidad de péptido no degradado utilizando HPLC.

3.2 Ensayo de proteasa comparativo de GMO/OA/CTs

20 Se repitió el procedimiento de carga y ensayo anterior con muestras de dispersión no lamelar que contenían una proporción variante de ácido oleico (AO) como un componente lipídico aniónico, preparado como se indica en el Ejemplo 1.1 y 1,3 con NaCl añadido a una concentración final de 0,9 % después del tratamiento con calor. Los controles y las dispersiones no lamelares se trataron con CTs y Trasylol® en las concentraciones proporcionadas anteriormente en el Ejemplo 3.1.

25 La fase no lamelar fue una dispersión de partículas de fase cristalina líquida no lamelar GMO/OA (de aproximadamente 1 µm) que contenía lípido 9 % con respecto a agua con relaciones de GMO/OA de 100/0, 95/5 y 50/50 y 1 % de estabilizador polimérico Pluronic™ F127 (BASF). Los controles fueron solución salina sin Trasylol® y solución salina con Trasylol® como se ha indicado anteriormente.

30 Los resultados del análisis de HPLC se muestran en la Figura 1, que indica claramente que el aumento de la concentración de un anfífilo aniónico dio como resultado una velocidad de degradación reducida del agente activo peptídico CTs. Puede verse que la dispersión de GMO/OA 50/50 proporciona un mayor grado de protección que se proporciona incluso por el inhibidor de peptidasa Trasylol®.

35 Ejemplo 4 - Estudio de biodisponibilidad animal

4.1 - Procedimiento general

40 El primer día del experimento, las ratas se prepararon insertando un catéter de silicio (DE aprox. 1 mm) en la vena yugular con anestesia de ketalar/xilazina. El catéter se introdujo bajo la piel y se exteriorizó entre las escápulas. Después de la cirugía se permitió a las ratas 48 horas de recuperación antes de la dosificación. El catéter se aclaró con NaCl 0,9 % que contenía EDTA 1 mM, cada mañana durante el período de recuperación.

45 Por la mañana, después de aproximadamente 16 horas de ayuno (con acceso a agua), se dosificó a los animales y se extrajo sangre. Se permitió a los animales acceso libre al agua después de la dosificación, pero no tuvieron acceso a alimento. Después de la última toma de muestras, todos los animales se sacrificaron.

50 Se prepararon dispersiones particulares no lamelares por el método de alta presión del Ejemplo 1.1 seguido de tratamiento con calor como se expone en el Ejemplo 1.3 y carga de calcitonina.

4.2-Dosificación

55 Se dosificó a las ratas por vía intravenosa a través del catéter venoso o por sonda con un tubo de sonda con punta de bola de plástico. Las ratas recibieron por vía intravenosa una dosis de 1 mg de CTs por kg de peso corporal en 0,5 ml/kg de un tampón de acetato estéril y las ratas con sonda recibieron dispersiones en agua de dispersiones no lamelares que contenían CTs a una dosis de 0,5 mg de CTs por kg de peso corporal. Las dispersiones no lamelares y las concentraciones de CTs totales se variaron y el volumen de dosis oral total varió de 2,5 a 25 mg/kg de peso corporal. La dosificación oral se realizó con anestesia de isoflurano ligera.

60 4.3-Toma de muestras

65 Se extrajeron muestras sanguíneas (0,5 ml) antes de la dosis (un día antes de la dosificación), 10 minutos, 30 minutos, 1 h, 3 h, 6 h y 24 h después de la dosificación en tubos de ensayo tratados con EDTA que también contenían 500 KIE de aprotinina (Trasylol®) por ml de muestra. Todas las muestras sanguíneas se mezclaron suavemente y se mantuvieron en hielo (máximo durante 10 minutos) antes de centrifugarse a 2.000 g durante 10 minutos a +4 °C. Después, el plasma se transfirió inmediatamente a nuevos tubos de ensayo y se puso en hielo

seco. Las muestras se conservaron a -80 °C hasta su análisis.

4.4-Análisis

- 5 El contenido de CTs en todas las muestras de plasma se midió con un kit de inmunoensayo ligado a enzima disponible en el comercio.

Se utilizaron datos de concentración de CTs de plasma para calcular el área bajo la curva (ABC) de 0 a 6 horas por el método trapezoidal.

- 10 La biodisponibilidad absoluta corregida con respecto a dosis de CTs en las formulaciones no lamelares orales se calculó como:

$$\text{Disponibilidad (F)} = (\text{ABC}_{\text{oral}} \times \text{Dosis}_{\text{iv}}) / (\text{ABC}_{\text{iv}} \times \text{Dosis}_{\text{oral}}) \times 100$$

15 4.5-Resultados

- 20 Se dosificó a las ratas con una solución de CTs intravenosa, y por vía oral con una dispersión no lamelar de CTs GMO/OA (95 %/5 %) o GMO (100 %), de acuerdo con el método anteriormente descrito. Todas las dispersiones fueron predominantemente fases dispersas cristalinas líquidas cúbicas. Se analizaron los contenidos de CTs en plasma y las concentraciones en plasma de CTs se representaron a lo largo del tiempo (Figura 2). La biodisponibilidad absoluta (F) de la CTs administrada por vía oral en la formulación de GMO/OA fue de aproximadamente 1 %, mientras que la CTs suministrada en la formulación de GMO pura dio como resultado una biodisponibilidad de aproximadamente 0,5 %. Por lo tanto, el GMO/OA (95 %/5 %) tiene un efecto potenciador de aproximadamente el doble de la biodisponibilidad oral de CTs en comparación con la formulación de GMO no lamelar (100 %).

Ejemplo 5

30 Composición de depósito y estudio de fase *in vitro*

Se prepararon formulaciones inyectables que contenían fosfatidil colina ("PC" - epicure 200) y glicerol dioleato (GDO) con y sin el lípido aniónico ácido oleico (AO) y con EtOH como disolvente, para ilustrar que puede accederse a composiciones de "depósito" cristalinas líquidas.

- 35 Se pesaron cantidades apropiadas de PC y EtOH en viales de vidrio y la mezcla se colocó en un agitador hasta que la PC se disolvió completamente hasta formar una solución líquida transparente. Después se añadió GDO y opcionalmente OA para formar una solución homogénea inyectable.

- 40 Las formulaciones se fabricaron con composiciones de acuerdo con la Tabla 4. Se añadió una sustancia activa peptídica catiónica, calcitonina de salmón (CTs), a cada formulación hasta una concentración de 700 µg de CTs/g de formulación. Las formulaciones se diseñaron como suspensiones homogéneas para administración parenteral (se requiere mezclado justo antes del uso ya que el fármaco no se disolvió completamente en el sistema de PC/GDO/EtOH). La formulación G contenía AO.

- 45 El estudio de fase en este ejemplo se realizó con exceso de suero de rata a 37 °C para simular una situación *in vivo*. La Tabla 4 muestra las mismas fases formadas

TABLA 4

Formulación	PC (% p)	GDO (% p)	AO (% p)	EtOH (% p)	Fase en suero de rata
F	36	54	-	10	I _{II}
G	34	51	5	10	I _{II}

- 50 I_{II} = fase cristalina líquida cúbica inversa
AO = Ácido Oleico

Ejemplo 6

55 Estudio de liberación *in vivo* de formulaciones de depósito

- 60 Las formulaciones F y G en el Ejemplo 5 se utilizaron en un estudio de liberación de fármaco *in vivo* en rata. Las formulaciones se administraron por vía subcutánea entre las escápulas utilizando una jeringa y la dosis de CTs fue de 500 µg/kg de peso corporal. El perfil de liberación se supervisó durante un período de 13 días. La concentración de CTs en las muestras de plasma de rata se analizó con un kit comercial de DSLabs. El fármaco se amplificó enzimáticamente con inmunoensayo de tipo sándwich utilizando biotina-estreptavidina como sistema de detección.

La Figura 3 muestra los resultados. Se seleccionó un vehículo de triglicéridos puro a base de aceite de sésamo como un sistema de referencia de lípidos.

5 La formulación que contiene AO presenta una liberación más lenta de CTs y una biodisponibilidad mejorada durante el período de 14 días sobre el que se siguió la concentración en plasma. Esto es coherente con una estabilidad mejorada del fármaco peptídico.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende al menos un agente activo peptídico catiónico que tiene un punto isoelectrico por encima de 7,0, al menos un anfífilo formador de estructura neutro, al menos un anfífilo formador de estructura aniónico y opcionalmente al menos un disolvente, en la que los grupos no polares de los anfífilos formadores de estructura se seleccionan de grupos alquilo y alqueno C₆-C₃₂, caracterizada por que dicha composición comprende una estructura de fase no lamelar y/o forma una fase cristalina líquida normal o inversa o la estructura de fase L₃ tras exposición a fluidos corporales y en la que dicho anfífilo formador de estructura aniónico comprende al menos un ácido graso, y en la que dicho anfífilo formador de estructura aniónico está presente en una cantidad de 0,5 a 50 % en peso en relación con el peso de anfífilo neutro.
2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha fase no lamelar es una fase cúbica, hexagonal o una fase L₃.
3. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que dicho péptido catiónico es una hormona peptídica.
4. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicho péptido catiónico se selecciona del grupo que consiste en desmopresina, octeotido, calcitonina de salmón y calcitonina humana.
5. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la biodisponibilidad oral es al menos 1 % cuando se mide como concentración en plasma sanguíneo de agente activo en relación con la administración intravenosa en solución salina.
6. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además un inhibidor de peptidasa.
7. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que dicho anfífilo formador de estructura neutro comprende al menos uno de gliceril monooleato, gliceril monolinoleato, gliceril dioleato (GDO), dioleil fosfatidil etanolamina (DOPE), dioleil fosfatidilcolina (DOPC) y fitantriol, liooleil fosfatidilcolina (LOPC) y mezclas de los mismos.
8. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho ácido graso es al menos uno de ácido caproico, caprílico, cáprico, láurico, mirístico, palmítico, fitánico, palmitólico, esteárico, oleico, elaídico, linoleico, linoléico, araquidónico, behénico o lignocérico, sus sales o mezclas de los mismos.
9. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que dicho anfífilo formador de estructura aniónico está presente en una cantidad suficiente para aumentar la semivida de dicho agente activo peptídico en una solución de carboxipeptidasa C en al menos 50 % en relación con la semivida de una composición equivalente que no incluye dicho anfífilo formador de estructura aniónico.
10. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende además un agente de fragmentación.
11. Una formulación farmacéutica que comprende una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, y al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente tolerable.
12. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende o forma partículas de dicha estructura de fase no lamelar.
13. Una composición de acuerdo con la reivindicación 12, en la que dichas partículas son coloidales.
14. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende además un disolvente orgánico biotolerable que contiene oxígeno.
15. Una composición de acuerdo con la reivindicación 14, en forma de una solución que forma una fase no lamelar a granel tras su contacto con un fluido corporal.
16. Una composición de acuerdo con la reivindicación 15, en la que dicha composición comprende un diacilglicerol.
17. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en la que dicho agente activo se libera durante un periodo de al menos 2 a 14 días.
18. Un método para la formación de una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende la formación de partículas de fase no lamelar y/o de partículas que generan fase no lamelar tras exposición a fluidos corporales, comprendiendo dichas partículas al menos un anfífilo formador de estructura neutro,

al menos un anfífilo formador de estructura aniónico o sal del mismo y opcionalmente al menos un disolvente, y posteriormente poner en contacto dichas partículas con una solución de agente activo peptídico catiónico.

- 5 19. Una composición de acuerdo con la reivindicación 14, para su uso en terapia.
20. Una composición de acuerdo con la reivindicación 14, para uso en la administración de un péptido catiónico a un paciente.
- 10 21. Una composición para uso de acuerdo con la reivindicación 20, en la que dicha composición se formula de tal manera que, después de la inyección, se forme posteriormente *in vivo* un "depósito" no lamelar, tras el contacto con un fluido corporal.
- 15 22. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 20 o 21, en la que después de la administración de dicha composición dicho péptido está protegido de la degradación enzimática *in vivo*.

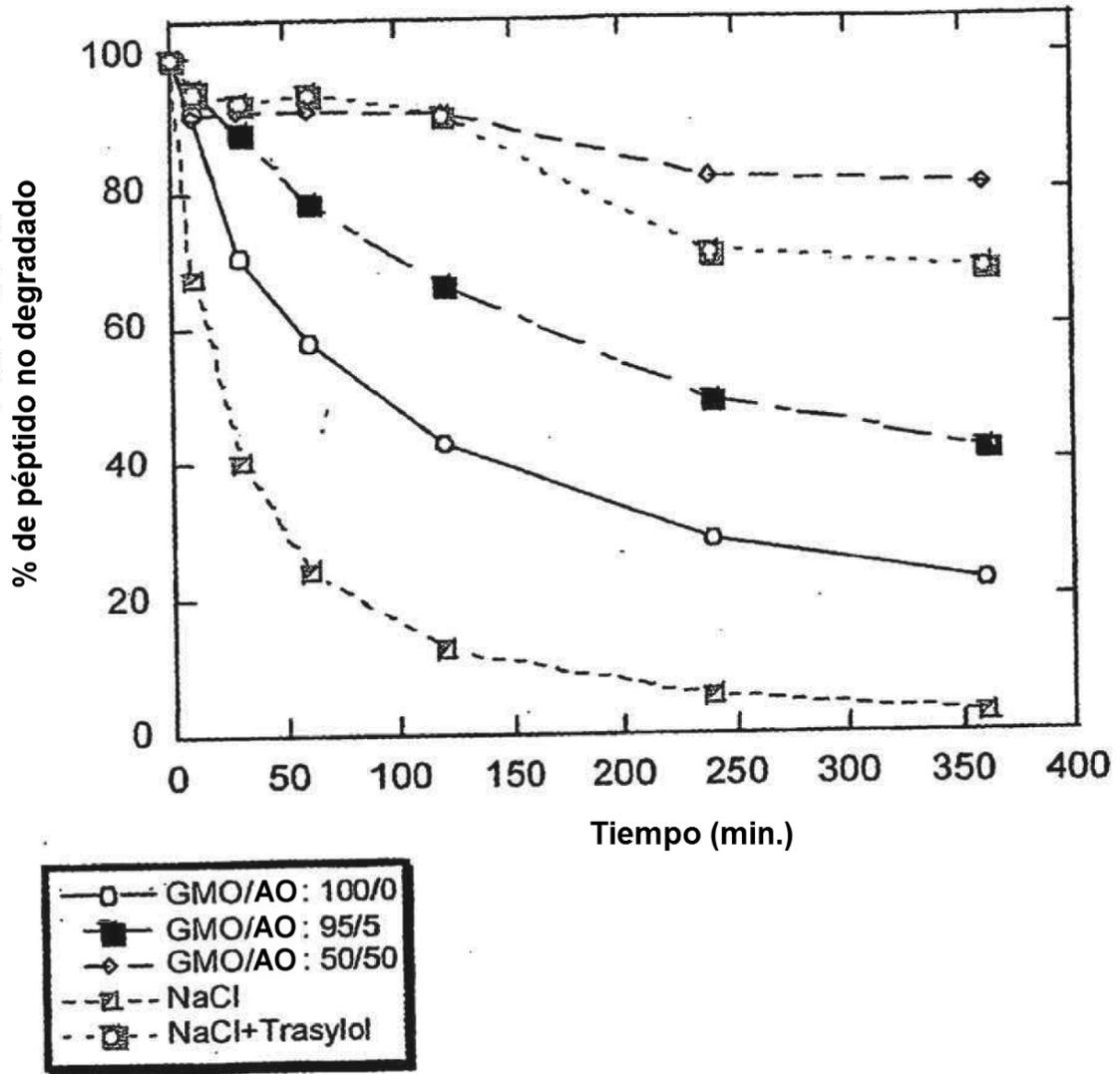


Fig. 1

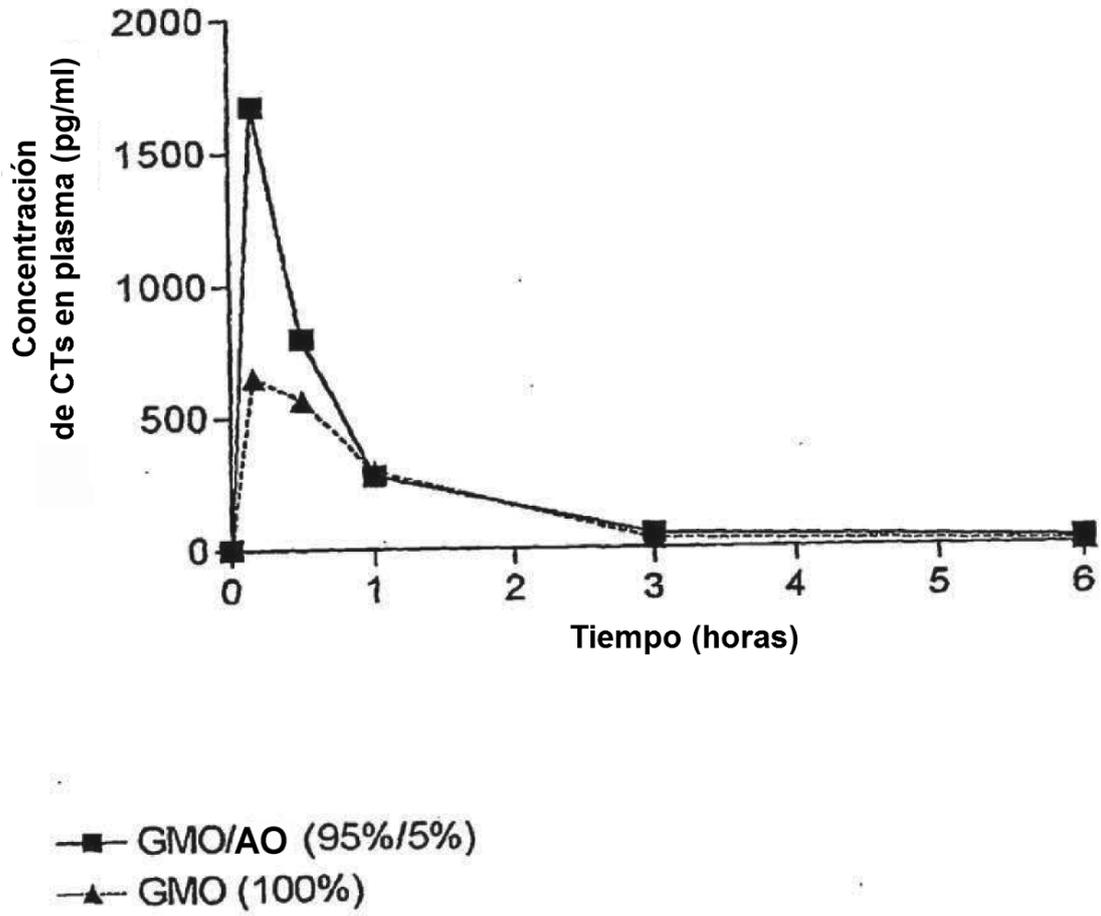


Fig. 2

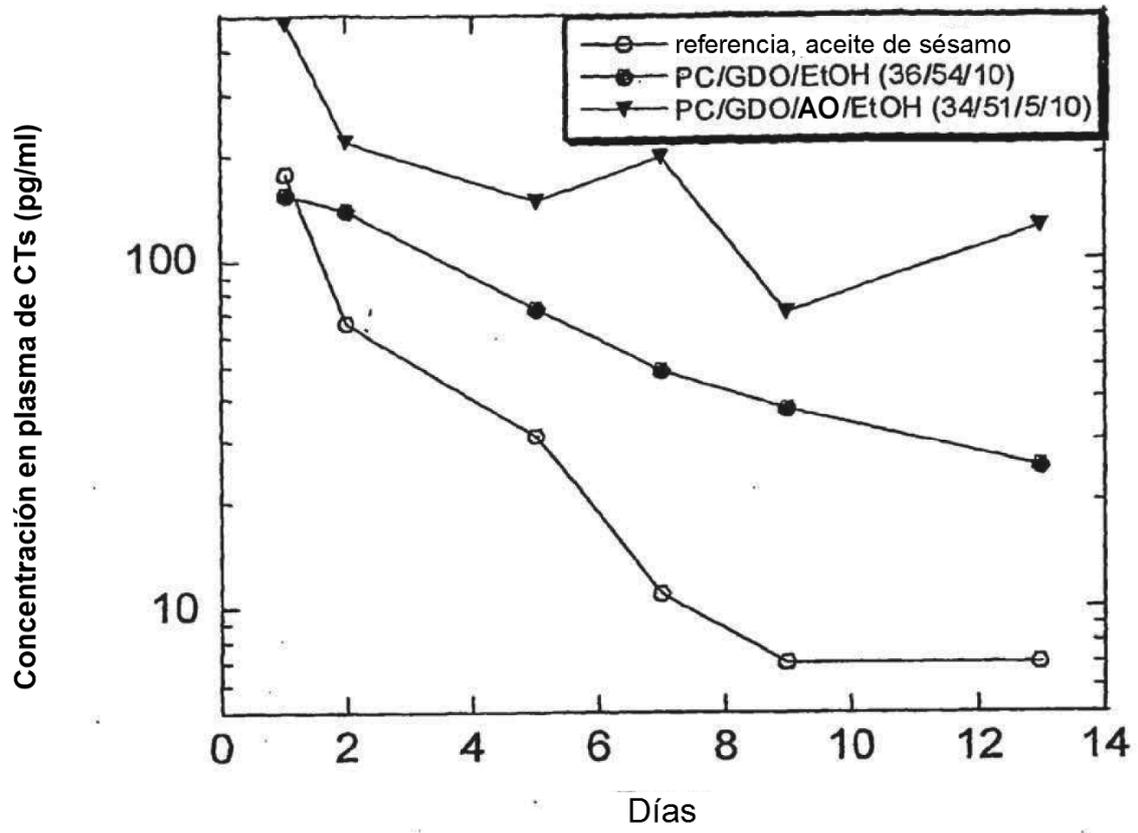


Fig. 3