

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 640 282**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/16** (2006.01)

**A61K 38/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.2006 E 13176200 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.07.2017 EP 2656836**

54 Título: **Método de formulación de fármacos basado en el aumento de la afinidad de superficies de micropartículas cristalinas para agentes activos**

30 Prioridad:

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

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**02.11.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**OBBERG, KEITH A**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 640 282 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Método de formulación de fármacos basado en el aumento de la afinidad de superficies de micropartículas cristalinas para agentes activos

### Campo de la invención

- 5 Esta invención está generalmente dentro del área de las formulaciones farmacológicas y se refiere particularmente a métodos para revestir agentes activos sobre la superficie de micropartículas cristalinas.

### Antecedentes de la invención

10 El aporte de agentes terapéuticas es un problema importante. La administración oral es una de las vías más comunes y preferidas de aporte debido a la facilidad de administración, el cumplimiento terapéutico de los pacientes y el coste reducido. Sin embargo, las desventajas de esta vía incluyen una potencia baja o variable y una adsorción ineficaz del agente terapéutico. Esto es particularmente evidente cuando el compuesto que se va a aportar es inestable bajo las condiciones encontradas en el tracto gastrointestinal. Se ha desarrollado en la técnica una variedad de revestimientos y métodos de encapsulación, pero solo unos pocos son eficaces para tratar este problema. Además, existen compuestos terapéuticos que tienden a ser menos activos en las condiciones del tracto gastrointestinal y se deben administrar en dosificaciones superiores para ser adsorbidos en la corriente sanguínea en una cantidad eficaz.

20 Se ha desarrollado una amplia gama de sistemas de formulación de fármacos para tratar el problema del aporte óptimo de fármacos y se basan en la incorporación de fármaco en una matriz que actúa como un vehículo. Factores considerados en la formulación de fármacos incluyen los requisitos de que el sistema sea atóxico, no reactivo con el fármaco que se va a aportar, de fabricación económica, esté formado por componentes fácilmente disponibles y sea coherente con respecto a la composición final y las características físicas, incluyendo estabilidad y velocidad de liberación. También es preferible que el sistema de aporte de fármacos esté formado por materiales que se retiren fácilmente del cuerpo mediante procesos fisiológicos normales.

25 Las formulaciones farmacológicas en micropartículas se pueden usar en numerosas vías de administración, pero particularmente son muy adecuadas para el aporte pulmonar. Ventajas de los pulmones para el aporte de agentes que tienen efectos sistémicos incluyen la gran cantidad de superficie específica y la facilidad de captación por la superficie mucosa. La Patente de Estados Unidos N° 6.071.497 describe un sistema de aporte de fármaco pulmonar basado en la formación de micropartículas de dicetopiperacina así como micropartículas basadas en polímero. El documento WO 2004/012672 divulga un complejo que contiene un compuesto y una dicetopiperacina para el aporte a células diana. El documento WO 01/00654 divulga micropartículas de DKP en solución donde las micropartículas tienen un revestimiento de agente activo. El documento WO 96/13250 divulga métodos para revestir con un agente activo micropartículas de látex preformadas.

### Compendio de la invención

35 Se proporcionan medios para formar un revestimiento de agente activo sobre micropartículas cristalinas, que son las propias micropartículas proporcionadas. En general, las micropartículas se revisten con un agente activo al modificar las propiedades superficiales de las micropartículas de modo que el agente activo tenga una afinidad superior por la superficie de las micropartículas que por lo restante en solución.

40 Se describen en la presente memoria métodos para revestir partículas cristalinas tales como micropartículas de fumarildicetopiperacina (FDKP) con agentes activos, tales como proteínas, usando asociaciones estimuladas electrostáticamente, hidrófobamente o por enlaces de hidrógeno. El líquido se puede retirar opcionalmente (para la recuperación de micropartículas revestidas con agente activo) mediante filtración o secado, o se puede reemplazar al intercambiar por un medio de solución diferente. En cualquier caso, la retirada del medio líquido no es una etapa obligatoria en la formación del complejo de agente activo-micropartícula. Se divulga un método para el revestimiento de micropartículas basado en el cambio de las propiedades superficiales de las micropartículas cristalinas para conseguir la adsorción del agente activo en la micropartícula.

45 También se proporciona un método para revestir una micropartícula cristalina preformada en suspensión con un agente activo que comprende: i) ajustar la interacción energética entre el agente activo y la micropartícula cristalina independientemente de la retirada del disolvente; y ii) dejar tiempo para que el agente activo se adsorba sobre la superficie de la micropartícula. El método para revestir una micropartícula cristalina preformada en suspensión con un agente activo puede comprender además una etapa de retirada o intercambio del disolvente sin un efecto sustancial sobre la interacción entre el agente activo y la micropartícula.

50 El método de revestimiento de la micropartícula con agente activo se puede efectuar al modificar las propiedades superficiales de la micropartícula. La modificación de las propiedades superficiales de la micropartícula se consigue al alterar las condiciones de la solución. Estas condiciones, de un modo no limitativo, comprenden el cambio del pH. Las propiedades superficiales de la micropartícula se pueden modificar mediante: 1) la alteración de la polaridad de la solución; 2) la adición de iones monovalentes o multivalentes; y 3) la derivación química de la micropartícula.

También se describen métodos que comprenden además una etapa de disolver el agente activo en la fase fluida de la suspensión de micropartículas y posteriormente cambiar el pH. Esta etapa de disolución del agente activo en una fase fluida se refiere a la disolución de un sólido. Además, esta etapa de disolución del agente activo se refiere a la adición de una solución más concentrada del agente activo además de añadir un sólido.

- 5 Las condiciones de pH de la suspensión de micropartículas se pueden alterar para favorecer interacciones entre el agente activo y la micropartícula antes de, o después, de la adición de agente activo.

El agente activo puede tener más de un tipo de interacción energéticamente favorable con la superficie de las micropartículas.

El agente activo es preferiblemente insulina o puede ser un análogo de la misma.

- 10 Las propiedades superficiales que crean una interacción favorable entre el agente activo y la micropartícula se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en propiedades electrostáticas, propiedades hidrófobas y propiedades de unión por enlaces de hidrógeno.

La micropartícula puede ser porosa y tener superficies interiores accesibles a la masa fluida de la solución. La micropartícula puede comprender una dicetopiperacina tal como fumarildicetopiperacina pero no se limita a esta.

- 15 El método de revestimiento puede producir una monocapa de agente activo sobre la superficie de la micropartícula. La monocapa puede ser continua. El agente activo en la monocapa puede tener una orientación preferida.

También se describe un método para revestir una micropartícula cristalina preformada en suspensión con insulina que comprende ajustar la interacción energética entre el agente activo y la micropartícula cristalina independientemente de la retirada de disolvente; y absorber la insulina sobre la superficie de las micropartículas.

- 20 Disolvente, según se usa en la presente, se refiere al medio fluido en el que se “bañan” en agente activo y la micropartícula. No se debe interpretar que se requiera que todos los componentes estén en solución. En efecto, en muchos casos, se puede usar para referirse al medio líquido en el que están suspendidas las micropartículas.

### Breve descripción de los dibujos

- 25 Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para mostrar adicionalmente ciertos aspectos de los ejemplos divulgados en la presente memoria. La invención se puede entender mejor mediante la referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de las realizaciones específicas presentadas en esta memoria.

- 30 La Figura 1 representa los perfiles de valoración ultrasónica de Hel para separar los componentes de la suspensión de fumarildicetopiperacina (FDKP), partículas de FDKP y tampón, según las enseñanzas de la presente invención. La magnitud de los cambios en el perfil de valoración de la velocidad ultrasónica (Figura 1; Panel A) refleja los cambios de hidratación provocados por la protonación de grupos carboxilato ionizables de los componentes de la muestra. Los picos de exceso de atenuación ultrasónica (Figura 1; Panel B) resultan de la relajación rápida en la reacción de intercambio de protones en el punto de saturación. La frecuencia (F) es 15 MHz, la temperatura es 25°C.

- 35 La Figura 2 representa los perfiles de valoración ultrasónica de ácido acético glacial para partículas de FDKP + insulina y partículas de FDKP solas según las enseñanzas de la presente invención. El perfil de velocidad ultrasónica se calculó al sustraer la contribución de la insulina; la frecuencia es 8 MHz, la temperatura es 25°C. También se representa el exceso de atenuación ultrasónica como una función de la concentración de ácido acético glacial añadido. Dos pasos de acidificación inducida por ácido acético glacial son similares a lo observado mediante valoración de HCl. El panel recuadrado de la izquierda (Panel A) representa la asociación del agente activo con la micropartícula de FDKP a un pH mayor de aproximadamente 2,9. El panel recuadrado de la derecha (Panel B) representa la interacción reducida entre el agente activo y la micropartícula a un pH por debajo de aproximadamente 2,9.

- 45 La Figura 3 representa la adsorción de proteínas sobre micropartículas ionizables según las enseñanzas de la presente invención. Se añadió proteína a la suspensión de micropartículas después del ajuste del pH, la proteína no unida se separó por filtración y las micropartículas se disolvieron para liberar proteína no unida.

- 50 La Figura 4 representa la dependencia con el pH de la adsorción de agentes activos sobre micropartículas de FDKP según las enseñanzas de la presente invención. La Figura 4A representa la adsorción de insulina; la Figura 4B representa la adsorción de anticuerpo monoclonal anti-SSX-2<sub>41-49</sub>, La Figura 4C representa la adsorción de hormona paratiroidea (PTH) y la Figura 4D representa la adsorción de grelina.

La Figura 5 representa la dependencia con el pH de la adsorción de insulina sobre micropartículas de FDKP con concentración limitativa de insulina según las enseñanzas de la presente invención.

La Figura representa el cambio en la velocidad ultrasónica en una suspensión de micropartículas de FDKP (11

mg/ml) durante la valoración por etapas de micropartículas de FDKP con proteína (10 mg/ml) según las enseñanzas de la presente invención. La contribución de proteína libre y el efecto de la dilución de micropartículas de FDKP se sustrajeron. La temperatura es 25°C.

5 La Figura 7 representa las curvas de saturación para la adsorción del agente activo sobre micropartículas de FDKP según las enseñanzas de la presente invención. Se muestran curvas de carga para agente activo/micropartículas de FDKP como una función de la concentración de agente activo a pH 5,0. La Figura 7A representa la adsorción de péptido glucagonoide 1 (GLP-1); la Figura 7B representa la adsorción de PTH; la Figura 7C representa la adsorción de anticuerpo monoclonal anti-SSX2<sub>41-49</sub> y la Figura 7D representa la adsorción de anticuerpo monoclonal anti-MOPC-21.

10 La Figura 8 representa la adsorción de agentes activos sobre micropartículas a pH 5,0 que está influenciada por concentraciones crecientes de sal según las enseñanzas de la presente invención. El agente activo se añadió a la suspensión de micropartículas después del ajuste del pH, el agente no unido se separó por filtración y las micropartículas se disolvieron para liberar agente unido. La Figura 8A representa la adsorción de insulina, la Figura 8B representa la adsorción de anticuerpo monoclonal anti-SSX-2<sub>41-49</sub>, la Figura 8C representa la adsorción de PTH y la Figura 8D representa la adsorción de grelina.

### Descripción detallada de la invención

#### Agentes a aportar

La sustancia que se va a revestir sobre la micropartícula cristalina se denomina en la presente memoria el agente activo. Ejemplos de clases de agente activo incluyen composiciones farmacéuticas, compuestos sintéticos y macromoléculas orgánicas que tienen utilidad terapéutica, profiláctica y/o diagnóstica.

20 Generalmente, cualquier forma de agente activo se puede revestir sobre la superficie de una micropartícula cristalina. Estos materiales pueden ser macromoléculas orgánicas incluyendo ácidos nucleicos, compuestos orgánicos sintéticos, polipéptidos, péptidos, proteínas, polisacáridos y otros azúcares, y lípidos. Los péptidos, las proteínas y los polipéptidos son todas cadenas de aminoácidos conectados por enlaces peptídicos. Generalmente, se considera que los péptidos tienen menos de 30 residuos de aminoácido, pero pueden incluir más. Las proteínas son polímeros que pueden contener más de 30 residuos de aminoácido. El término polipéptido, según se conoce en la técnica y según se usa en la presente memoria, se puede referir a un péptido, una proteína o cualquier otra cadena de aminoácidos de cualquier longitud que contenga múltiples enlaces peptídicos, aunque generalmente contiene al menos 10 aminoácidos. Los agentes activos usados en la formulación de revestimiento pueden entrar dentro de una variedad de clases de actividad biológica, tales como agentes vasoactivos, agentes neuroactivos, hormonas, anticoagulantes, agentes inmunomoduladores, agentes citotóxicos, antibióticos, agentes antivirales, antígenos y anticuerpos. Más particularmente, los agentes activos pueden incluir, de un modo no limitativo, insulina y análogos de la misma, hormona del crecimiento, hormona paratiroidea (PTH), grelina, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), péptido glucagonoide 1 (GLP-1), rojo de Texas, alquinos, ciclosporinas, clopiogrel y PPACK (D-fenilalanil-L-prolil-L-arginina-clorometil-cetona), anticuerpos y fragmentos de los mismos, incluyendo, pero no limitados a, anticuerpos humanizados o quiméricos; F(ab), F(ab)<sub>2</sub> o anticuerpo monocatenario solo o fusionado a otros polipéptidos; anticuerpos monoclonales terapéuticos o diagnósticos para antígenos cancerosos, citocinas, agentes infecciosos, mediadores inflamatorios, hormonas y antígenos de la superficie celular. Ejemplos no limitativos de anticuerpos para antígenos tumorales incluyen anti-SSX-2<sub>41-49</sub> (sarcoma sinovial, X punto de ruptura 2), anti-NY-ESO-1 (antígeno asociado a tumor esofágico), anti-PRAME (antígeno de melanoma expresado preferentemente), anti-PSMA (antígeno membranario específico de la próstata), anti-Melan-A (antígeno asociado a tumor de melanoma), antitirosinasa (antígeno asociado a tumor de melanoma) y anti-MOPC-21 (proteína de célula plasmática de mieloma).

#### Sistema de aporte – Micropartículas cristalinas

45 Esencialmente, el término "micropartícula" se refiera a una partícula con un diámetro de aproximadamente 0,5-1.000 µm, independientemente de la estructura exterior o interior precisa. Dentro de la amplia categoría de micropartículas, "microesferas" se refiere a micropartículas con una conformación esférica uniforme. Micropartículas cristalinas, según se usa en la presente memoria, se refiere a micropartículas que tienen la estructura interna aunque no necesariamente la forma externa de un cristal y tienen una disposición regular de átomos en una red espacial. Superficies cristalinas ionizables se refiere a micropartículas cristalinas que tienen la capacidad adicional de soportar una carga eléctrica. Preferiblemente, la sustancia química que compone la micropartícula cristalina es reversiblemente reactiva con el agente activo que se va a aportar, así como atóxica y no metabolizada, al menos por roedores y seres humanos. Además, la estructura cristalina de las micropartículas preferidas no se altera sustancialmente en el procedimiento de revestimiento con agente activo. La composición de la micropartícula cristalina determina qué tipo de interacciones químicas se puede manipular para estimular la adsorción de un agente activo a la superficie de las micropartículas.

Se puede usar un número de sustancias para formar las micropartículas cristalinas. Las micropartículas como tales tienen una superficie externa, cuyas propiedades se pueden manipular en el procedimiento de revestimiento.

Materiales representativos a partir de los cuales se pueden formar micropartículas cristalinas incluyen pero no se limitan a: aminoácidos aromáticos, sales con solubilidad limitada en un intervalo de pH definido tales como dicetopiperacinas y sulfatos de morfolina.

5 Las Patentes de Estados Unidos N° 5.352.461 y 5.503.852 describen un sistema de aporte de fármacos basado en la formación de micropartículas de dicetopiperacina (DKP) a partir de derivados de dicetopiperacina tales como 3,6-bis[N-fumaril-N-(n-butil)amino] (también denominada fumarildicetopiperacina o FDKP; también denominada (E)-3,6-bis[4-(N-carboxi-2-propenil)amidobutil]-2,5-dicetopiperacina) que son estables a pH bajo y se disuelven al pH de la sangre o el intestino delgado. Según se divulga en las patentes anteriores, el fármaco que se va a aportar se combina o se carga con las partículas de dicetopiperacina al formar micropartículas de DKP en presencia de fármaco (carga útil). Un sistema basado en elementos estructurales de dicetopiperacina, o uno de sus derivados de sustitución, incluyendo, pero no limitados a, dicetomorfolinas y dicetodioxanos, forma micropartículas con distribuciones de tamaño e intervalos de pH deseables así como buena tolerancia de carga útil. Se puede generar una amplia gama de características reproducibles estables con manipulaciones apropiadas de los grupos sustituyentes. Otras dicetopiperacinas que se pueden contemplar en la presente invención pueden incluir 3,6-di(4-aminobutil)-2,5-dicetopiperacina; 3,6-di(succinil-4-aminobutil)-2,5-dicetopiperacina (succinildicetopiperacina o SDKP); 3,6-di(maleil-4-aminobutil)-2,5-dicetopiperacina; 3,6-di(citraconil-4-aminobutil)-2,5-dicetopiperacina; 3,6-di(glutaril-4-aminobutil)-2,5-dicetopiperacina; 3,6-di(malonil-4-aminobutil)-2,5-dicetopiperacina; 3,6-di(oxalil-4-aminobutil)-2,5-dicetopiperacina y derivados de las mismas. También se pueden utilizar en la presente invención sales de dicetopiperacina y pueden incluir, por ejemplo, una sal farmacéuticamente aceptable tal como la Na, K, Li, Mg, Ca, amonio, o mono-, di- o tri-alkilamonio (según se derive de trietilamina, butilamina, dietanolamina, trietanolamina, o piridinas, y similares). La sal puede ser una monosal, una disal o una sal mixta. También se contemplan sales de orden superior para dicetopiperacinas en las que los grupos R contienen más de un grupo ácido. En otros aspectos de la invención, una forma básica del agente se puede mezclar con la dicetopiperacina a fin de formar una sal con fármaco de la dicetopiperacina, de modo que el fármaco sea el ion conjugado de la dicetopiperacina.

Las Patentes de Estados Unidos N° 6.444.226 y 6.652.885 describen preparar y proporcionar micropartículas de DKP en suspensión acuosa a la que se añade una solución de agente activo, y a continuación la etapa crítica de liofilizar la suspensión para dar micropartículas que tienen un revestimiento de agente activo. La base de esta formulación es que el revestimiento de la micropartícula con agente activo se estimule mediante la retirada del medio líquido por liofilización. (Véase además la Patente de Estados Unidos N° 6.440.463). En contraste con las enseñanzas de la técnica anterior, la presente invención proporciona medios para ajustar la asociación del agente activo con la micropartícula antes de la retirada del disolvente. Así, la retirada del medio líquido mediante métodos físicos en masa (p. ej., filtración o sedimentación) o métodos evaporativos (p. ej., liofilización o secado por pulverización) puede dar como resultado cargas comparables.

### 35 Revestimiento controlado de micropartículas cristalinas

El revestimiento controlado se refiere al procedimiento dirigido de adsorber agente activo sobre la superficie de una micropartícula cristalina. El procedimiento de revestimiento implica cambiar las propiedades superficiales de las micropartículas cristalinas en una suspensión fluida bien al cambiar las condiciones de la solución (tales como pH, temperatura, polaridad, fuerza iónica y codisolventes), bien mediante complejación a iones mono- o multivalentes, o bien mediante derivación química. Alterar las propiedades superficiales de la micropartícula bien antes o bien después de la adición de agente activo afecta a sus interacciones químicas con el agente activo, dando de ese modo como resultado la adsorción de agente activo a la micropartícula cristalina. La interacción química entre la micropartícula y el agente activo impulsa la adsorción y da como resultado una monocapa del agente activo sobre la superficie de la micropartícula. Una vez que se adsorbe una molécula de agente activo, esa porción de la superficie de la micropartícula no se expone a más interacción y adsorción de agente activo adicional en ese punto superficial particular. La monocapa resultante puede ser bien continua (sin huecos entre moléculas de agente activo adsorbidas sobre la superficie accesible) o bien discontinua (huecos de superficie de micropartícula expuesta entre moléculas de agente activo adsorbidas).

#### Adsorción de agente activo sobre micropartículas

50 Según se analiza anteriormente, la adsorción del agente activo sobre la micropartícula da como resultado una formación de monocapa (revestimiento) del agente activo sobre la micropartícula. Sin embargo, existe más de un mecanismo en juego en la adsorción de un agente activo, tal como por ejemplo insulina, a las micropartículas cristalinas:

55 La monocapa de un agente activo, tal como insulina, que reviste la micropartícula es una fase del procedimiento de carga de insulina sobre la micropartícula pero no es necesariamente el resultado final en el procedimiento de carga ya que se pueden formar capas tanto monómeras como multímeras basándose en la energética del sistema.

Bajo condiciones de solubilidad permisiva, tales como baja concentración de insulina y/o bajo pH (sustancialmente por debajo de 5,0), las fuerzas atractivas entre la insulina y la superficie de las partículas de FDKP son mucho mayores que las fuerzas autoasociativas para la insulina. Así, el revestimiento de insulina sobre la micropartícula se

produce en modo de monocapa y se observa saturación sin agregación o formación de múltiples capas sobre la superficie de la micropartícula (véase el Ejemplo 6). A medida que la solubilidad alcanza la saturación, debido a una alta concentración de insulina y/o un pH cercano a 5,0 (un mínimo de solubilidad para insulina natural), la autoasociación de la insulina se hace más favorable energéticamente. Así, el revestimiento puede ir más allá del punto de una monocapa saturada y se pueden añadir a la partícula capas adicionales de insulina. Se pueden reconocer dos formas de autoasociación: multimerización y agregación. La multimerización se caracteriza por interacciones intermoleculares específicas y estequiometría fija. La agregación se caracteriza por interacciones moleculares inespecíficas y estequiometría indefinida. En general, los agentes activos multímeros pueden ser adsorbidos en estado multímero, o se pueden desasociar en monómeros, o multímeros de orden inferior, y adsorberse a la superficie en ese estado. En cualquier caso, la agregación puede mediar en la formación de capas del agente activo sobre la micropartícula. Según el conocimiento actual de los inventores, bajo las condiciones generales usadas en los ejemplos de la presente divulgación (tal como disolución de insulina en ácido acético), la deposición de capas adicionales de insulina avanza como la agregación de insulina no hexámera.

#### Método para revestir micropartículas

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

#### Manipulación de las propiedades superficiales de las micropartículas

Según se divulga en cualquier parte en la presente memoria, las propiedades superficiales de la micropartícula se pueden manipular por diversos medios. Las propiedades superficiales de las micropartículas que se pueden manipular incluyen, pero no se limitan a, propiedades electrostáticas, hidrófobas y de unión por enlaces de hidrógeno. En diversas realizaciones estas manipulaciones se llevan a cabo en ausencia o presencia del agente activo, o antes o después de que las micropartículas y el agente activo se mezclen entre sí. Cuando la manipulación tiene lugar en presencia del agente activo, por ejemplo al alterar una condición de la solución, también puede haber efectos sobre el agente activo que modifiquen su afinidad por la superficie. Así, en algunas realizaciones de la presente invención, el revestimiento de la micropartícula puede implicar la manipulación de las propiedades superficiales y la modificación de las propiedades del agente activo.

Las interacciones electrostáticas son atracciones entre cargas opuestas o repulsiones entre cargas iguales que se hacen más fuertes a medida que las cargas se acercan entre sí. Las interacciones electrostáticas constituyen un componente clave para entender las interacciones entre cuerpos cargados en soluciones iónicas. Por ejemplo, la estabilidad de partículas coloidales dispersadas en un disolvente se puede explicar al considerar la competición entre interacciones electrostáticas repulsivas y las interacciones de van der Waals atractivas. Además, la funcionalidad química (por ejemplo, pero no limitada a, COOH, NH, etc.) de la superficie de la micropartícula se puede utilizar como un ion conjugado con un agente activo ionizado de modo que el material compuesto de agente activo/partícula comprenda una sal. Las interacciones electrostáticas también son importantes cuando se considera la interacción y la adherencia entre partículas.

Alterar el pH del sistema de solución circundante puede cambiar las propiedades electrostáticas de micropartículas cristalinas ionizables en suspensión. Según se demuestra en el Ejemplo 3, cambiar el pH de la solución cambia la ionización de una micropartícula de modo que el agente activo se adsorbe a la superficie de la micropartícula. Específicamente, el Ejemplo 4 muestra que las micropartículas compuestas por FDKP (3,6-bis[N-fumaril-N-(n-butyl)amino]-2,5-dicetopiperacina) son ionizables. Las micropartículas son insolubles en agua por debajo de pH 3,5 pero la solubilidad se incrementa rápidamente entre pH 3,5 y 5,0, presumiblemente debido a la ionización de los grupos carboxilo. La micropartícula de FDKP es parcialmente ionizada a pH 5 antes de la disolución completa a pH superior, lo que se puede observar indirectamente a través de espectroscopía ultrasónica. El Ejemplo 5 demuestra el revestimiento controlado de proteína sobre la superficie de micropartículas de FDKP.

En una realización, se suspenden micropartículas de dicetopiperacina en una solución ácida, se añade agente activo a la suspensión y el pH de la solución se eleva después de que el agente activo y las micropartículas se mezclen entre sí. El incremento de pH altera las propiedades superficiales de las micropartículas para crear un ambiente en el que el agente activo tiene una afinidad superior por la micropartícula que por el disolvente.

Alternativamente, el pH de la suspensión de micropartículas se puede elevar inmediatamente antes de la adición de agente activo a la solución. Las propiedades de carga superficial de la micropartícula son alteradas por el cambio en

el pH de modo que el agente activo tenga una afinidad superior por la micropartícula que por lo restante en solución y sea adsorbido a la superficie de la micropartícula durante la adición.

5 Los Ejemplos 6 y 7 muestran la carga de insulina sobre partículas de FDKP mediante la manipulación de las condiciones de pH. Finalmente, la saturación de la micropartícula mediante adsorción de proteína y la formación de una monocapa se describen en el Ejemplo 6.

Otros métodos para manipular las superficies de micropartículas

10 Además de las propiedades electrostáticas, otras propiedades de una superficie de micropartícula se pueden explotar para controlar la adsorción de agente activo. Las micropartículas que contienen compuestos con imidazol, piridina, bases de Schiff, cetona, bioisómeros de ácido carboxílico, amidas u otros grupos funcionales que pueden existir en múltiples estructuras se podrían manipular para modificar las propiedades superficiales.

15 Las interacciones hidrófobas son asociaciones de grupos no polares entre sí en soluciones acuosas debido a su insolubilidad en agua. Las interacciones hidrófobas pueden afectar a un número de procesos moleculares incluyendo, pero no limitados a, estabilización estructural (sea de moléculas simples, complejos de dos o tres moléculas o formaciones mayores) y dinámica, y hacen importantes contribuciones a los procesos de unión proteína-proteína y proteína-ligando. También se sabe que estas interacciones representan un papel en casos tempranos de plegamiento de proteínas, y están implicadas en fenómenos de formación de complejos y autoformación (p. ej., formación de membranas).

20 Las interacciones hidrófobas se pueden manipular al cambiar la protonación de micropartículas cristalinas compuestas por histidina. La protonación de la histidina reducirá la nucleofilia de las micropartículas cristalinas e impartirá una carga positiva.

25 Las interacciones por enlaces de hidrógeno son fuerzas dipolo-dipolo especialmente fuertes entre moléculas; un átomo de hidrógeno en un enlace polar (p. ej., H-F, H-O o H-N) puede experimentar una fuerza atractiva con una molécula o ion electronegativo próximo, que tiene un par de electrones no compartido (habitualmente un átomo de F, O o N de otra molécula). Los enlaces de hidrógeno son responsables de las propiedades únicas del agua y son muy importantes en la organización de las moléculas biológicas, especialmente al influir en la estructura de las proteínas y el ADN.

30 En la presente invención, las propiedades de la unión por enlaces de hidrógeno de la superficie de las micropartículas se pueden controlar mediante derivación química. Se pueden añadir químicamente donantes/aceptores de enlaces de hidrógeno para alterar la superficie de la micropartícula. Por ejemplo, el hidrógeno en un enlace N-H puede someterse a unión por enlace de hidrógeno al oxígeno en un enlace C=O. Si el N-H se reemplaza por un N-CH<sub>3</sub>, entonces esta interacción por enlace de hidrógeno particular se retira. Asimismo, la sustitución del grupo C=O por un grupo C=C también retira esta interacción particular.

35 Las micropartículas con superficies que contienen grupos aromáticos ionizables son polares cuando están ionizadas pero hidrófobas en su estado no ionizado. Partir de superficies protonadas y manipular las condiciones de la solución para reducir la ionización superficial de las partículas hace que los agentes activos hidrófobos o aromáticos revistan la superficie de las micropartículas.

40 Las micropartículas con grupos superficiales cetónicos se podrían manipular al cambiar la polaridad de la solución. Al reducir la polaridad del disolvente (añadiendo disolventes orgánicos de baja polaridad a una solución acuosa) la forma enólica se convierte en la especie predominante en la superficie de la partícula. Esta forma enólica es un donante de enlaces de hidrógeno mientras que la forma cetónica es un aceptor de enlaces de hidrógeno. La adsorción de fármacos que contienen nitrógeno sobre la superficie de la micropartícula se promueve de este modo.

45 También se puede inducir a las micropartículas con grupos superficiales que sufren isomerización inducida por pH o temperatura a adsorber moléculas de fármaco al manipular las condiciones de la solución. En el caso de estas superficies, la introducción de un pliegue en un grupo superficial lineal debido a la isomerización incrementa la movilidad (fluidez) de los grupos en la superficie de las micropartículas. Esto permite que la superficie forme más contactos con el agente activo de los que son posibles con una superficie ordenada. Si las interacciones adicionales con el agente activo son cada una favorables, entonces la energía de interacción neta se hace favorable y el fármaco se adsorbe a la superficie de la micropartícula.

Técnicas de retirada del medio fluido

50 La retirada del disolvente después de un revestimiento controlado de las superficies cristalinas con agente activo se puede conseguir mediante métodos que incluyen, pero no se limitan a, sedimentación, filtración o secado. Técnicas de secado incluyen, pero no se limitan a, liofilización y secado por pulverización. Estas técnicas son conocidas por los expertos en la especialidad. En una realización de la presente invención, el disolvente se retira mediante secado por pulverización. Métodos para secar por pulverización micropartículas de dicetopiperacina se divulgan, por ejemplo, en la Solicitud de Patente Provisional de EE. UU. N° 60/776.605 presentada el 22 de febrero de 2006.

Análisis de modificaciones de las propiedades superficiales

La presente invención emplea la técnica de espectroscopía ultrasónica para analizar los cambios en las propiedades superficiales de micropartículas cristalinas en una suspensión fluida, que promueven o potencian la adsorción de un agente activo a la micropartícula cristalina. Según se divulga en cualquier parte en la presente memoria, estos cambios implica cambiar las condiciones de la solución (tales como pH, temperatura, polaridad, fuerza iónica y codisolventes), mediante complejación hasta iones mono- o multivalentes, o mediante derivación química para alterar las propiedades superficiales de la micropartícula bien antes o bien después de la adición del agente activo. La espectroscopía ultrasónica es una herramienta analítica conocida por los expertos. En resumen, la espectroscopía ultrasónica emplea ondas sonoras. En particular, usa una onda acústica de alta frecuencia que sondea fuerzas intermoleculares en muestras/materiales. La compresión (y descompresión) oscilatoria en la onda ultrasónica provoca la oscilación de las disposiciones moleculares de la muestra, lo que responde a atracción o repulsión intermolecular.

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

La velocidad ultrasónica se determina por la elasticidad y la densidad del medio. Los sólidos tienen las interacciones más fuertes entre las moléculas seguidos por los líquidos y los gases y por lo tanto son más rígidos en comparación con los líquidos y los gases. La atenuación ultrasónica es una medida de la energía que las ondas ultrasónicas pierden a medida que viajan a través de una muestra. Caracteriza la transparencia ultrasónica de las muestras y se puede observar como una reducción de la amplitud de la onda.

La medida multifrecuencial de la atenuación ultrasónica en sistemas homogéneos permite el análisis de reacciones químicas rápidas tales como, pero no limitadas a, intercambio protónico, transiciones estructurales (p. ej., isomerización), autoasociación (p. ej., dimerización), agregación, unión de ligandos a macromoléculas, etc.

**Ejemplos**

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar realizaciones de la presente invención. Se debe apreciar por los expertos en la especialidad que las técnicas divulgadas en los ejemplos que siguen representan técnicas descubiertas por el inventor para funcionar bien en la práctica de la presente invención, y así se puede considerar que constituyen modos preferidos para su práctica. Sin embargo, los expertos en la técnica, a la luz de la presente invención, deben apreciar que se pueden realizar muchos cambios en las realizaciones específicas que se divulgan y obtener aun así un resultado igual o similar sin apartarse del espíritu y el alcance de la invención.

**Ejemplo 1**

**Procedimiento general para cargar micropartículas con agentes activos**

La Tabla 1 posterior es un ejemplo de un revestimiento estimulado electrostáticamente de una micropartícula cristalina ionizable (micropartículas de FDKP) utilizando adsorción controlada por pH. En estos experimentos, se prepararon suspensiones de micropartículas de FDKP a pH 2,0 y 4,5. A continuación, se añadió proteína (hormona del crecimiento) a cada una para dar condiciones finales de 5 mg/ml de partículas de FDKP y 200 µg/ml de proteína. Después de la mezclado, el líquido en masa se retiró de la suspensión mediante filtración. A continuación, el material atrapado sobre el filtro se disolvió y se recogió. La concentración de proteína en todas las fracciones se cuantificó mediante HPLC.

A pH bajo (2,0), la proteína no se adsorbía a las partículas y toda la proteína se encontraba en el primer filtrado. al incrementar el pH hasta 4,5, las propiedades superficiales de las partículas se cambiaron para tener una alta afinidad por la proteína. Bajo estas condiciones, la proteína se unía a las micropartículas y no se observaba en el filtrado. Para determinar la cantidad de proteína asociada con las micropartículas, la proteína se recuperaba cuando las micropartículas se disolvían. Los controles libres de partículas demuestran que la proteína, por sí misma, no se retenía sobre el filtro bajo las condiciones usadas, es decir la proteína no se autoasociaba o agregaba de otro modo en partículas mayores que los poros del filtro.

Tabla 1. Concentración de proteína en un experimento de adsorción con micropartículas de FDKP.

Fracción	pH 2,0	pH 2,0	pH 4,5	pH 4,5
	con partículas	sin partículas	con partículas	sin partículas
Conc. inicial (µg/ml)	200	200	200	200
Filtrado (proteína no unida)	146	181	0	145
Partículas disueltas	0	0	180	0

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

#### Ejemplo 2

Control de la ionización de micropartículas de FDKP al manipular el pH

5 La FDKP es una molécula en forma de barra con un grupo funcional ácido carboxílico en cada extremo que es esencialmente insoluble en agua por debajo de pH 3,5 cuando los ácidos carboxílicos están protonados y no soportan carga. La solubilidad de FDKP se incrementa rápidamente por encima de pH 3,5 correspondiendo a la ionización de los grupos carboxilo. El modelado de los cristales de FDKP, que están formados como placas con dos caras planas grandes y bordes estrechos, indica que las moléculas de FDKP de tipo barra se alinean perpendiculares a los bordes de las placas de modo que los extremos de ácido carboxílico de las moléculas estén dispuestos sobre las caras grandes de las placas. Teóricamente, las superficies de los cristales de FDKP se deben ionizar parcialmente alrededor de pH 5,0, donde la solubilidad es aproximadamente 1 mg/ml, justo por debajo del pH al que se disolverá una suspensión de 10 mg/ml de micropartículas.

15 La ionización de las superficies de los cristales de FDKP se ha observado indirectamente con espectroscopía ultrasónica. En la Figura 1, se muestra la curva de valoración ultrasónica de micropartículas de FDKP y tampón. En este experimento, una solución que contenía 200 mM de HCl se añadió en pequeñas partes alícuotas a una suspensión de 10 mg/ml agitada de micropartículas de FDKP en tampón de acetato amónico 20 mM. El pH inicial era 4,8. Después de cada adición de HCl, se permitió que el sistema se equilibrara y se recogieron los datos ultrasónicos.

20 La disminución en la velocidad ultrasónica observada con concentración de ácido creciente (pH decreciente) refleja la protonación de grupos ácido carboxílico en el sistema. A medida que los grupos se protonaban y se descargaban, la estructura del agua alrededor de ellos se relajaba y las ondas ultrasónicas se transmitían más lentamente (la velocidad ultrasónica disminuía). Debido a las micropartículas de FDKP, las superficies del carboxilato y el grupo carboxilato en el tampón de acetato son muy similares químicamente, las curvas también eran similares. Sin embargo, las diferencias estaban provocadas por las micropartículas de FDKP. En primer lugar, la magnitud del cambio de velocidad con micropartículas de FDKP era mayor. Esta diferencia resulta de la protonación de grupos carboxilato ionizados sobre la superficie de las micropartículas de FDKP. El pico en la curva de atenuación, que se encuentra cerca del punto de protonación completa, se desplazó hasta una concentración de ácido ligeramente superior en la suspensión de FDKP. Finalmente, ambos parámetros de FDKP continuaban cambiando a medida que el pH se reducía de 3,5 a 2,3. Estos cambios reflejan modificaciones adicionales en las propiedades superficiales de las partículas que pueden incluir la ordenación de los grupos carboxilo superficiales u otras modificaciones microestructurales.

#### Ejemplo 3

Carga de proteína sobre micropartículas de FDKP mediante manipulación por pH de las propiedades superficiales

35 La adsorción de proteínas sobre superficies de micropartículas ionizables mediante manipulación por pH se puede conseguir de dos modos. La proteína se puede añadir y a continuación el pH se puede ajustar para provocar la ionización de la superficie con absorción concomitante de proteína. Este proceso es reversible. Alternativamente, el pH de la suspensión de partículas se puede ajustar para provocar la ionización de la superficie antes de que se añada la proteína.

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

45 Se preparó una suspensión de micropartículas de FDKP en tampón de acetato amónico 20 mM, pH 4,8, y se combinó con una solución madre de insulina para dar 800 µl de suspensión con una concentración final de 10 mg/ml de micropartículas de FDKP y una concentración de insulina de 1 mg/ml. Esta suspensión se introdujo en un espectrómetro ultrasónico. Mientras se agitaba suavemente, se añadió gradualmente ácido acético glacial en partes alícuotas de 5 µ para disminuir el pH. En cada etapa en la valoración, se recogieron los datos ultrasónicos.

50 El cambio en la velocidad ultrasónica estaba relacionado (era proporcional) a la cantidad de superficie específica (agua de hidratación) de las partículas y/o las macromoléculas en la muestra. La Figura 2 ilustra que por encima de un pH de aproximadamente 2,9 (10% v/v de ácido acético añadido), las curvas de velocidad para micropartículas solas (partículas de FDKP) y micropartículas con insulina (partículas de FDKP + insulina) coincidían. Esto indicaba que la cantidad de superficie específica en el sistema es esencialmente la misma que la superficie específica de micropartículas de FDKP solas. La insulina tenía una contribución insignificante debido a que es muy pequeña en comparación con las micropartículas. Por debajo de pH 2,9, las curvas de las partículas de FDKP y las partículas de FDKP + insulina divergían. La velocidad ultrasónica de la curva de las partículas de FDKP + insulina era superior aquí, lo que indicaba que no había más superficie específica expuesta a agua que en la muestra de partículas de FDKP solas. Esta superficie específica adicional procedía de insulina libre en la suspensión. A medida que el pH se incrementaba desde aproximadamente 2,7 hasta aproximadamente 2,9, la superficie específica de la insulina se

perdía por la adsorción de insulina a las superficies de micropartículas de FDKP, y la intensidad superior de la curva de micropartículas de FDKP + insulina desaparecía a medida que la insulina libre desaparecía del sistema.

5 Según se apunta anteriormente, el segundo método estimulado por pH para revestir partículas con proteína es suspender las partículas en un medio fluido y ajustar las condiciones de la solución para ionizar la superficie de las partículas. A continuación, la proteína se puede añadir a la suspensión y las moléculas de proteína se adsorberán inmediatamente. La Figura 3 ilustra la cantidad de proteína (insulina) que era adsorbida durante la adición a suspensiones de pH ajustado de micropartículas de FDKP.

10 Se prepararon suspensiones de micropartículas de FDKP en 5 mg/ml y se añadió un exceso de proteína (2 mg/ml). (Un exceso de proteína, según se menciona en la presente memoria, es la cantidad por encima de la cual se cree que es necesario formar una monocapa que cubra la superficie accesible de la micropartícula de FDKP). Después de la incubación, la proteína no adsorbida se retiró mediante filtración. Los sólidos retenidos sobre el filtro (retenido) se disolvieron y las cantidades de micropartículas de FDKP y proteína retenidas sobre el filtro se cuantificaron mediante HPLC. La relación en masa de proteína/partículas se determinó a partir de esta cuantificación. Basándose en la superficie específica conocida de estas partículas y las dimensiones moleculares de la proteína, se estimó que se producía una monocapa continua de proteína adsorbida a una en masa de aproximadamente 0,07. Basándose en esa estimación, se puede observar a partir de este ejemplo que se formaba una monocapa continua a pH 5,0 y que se formaban monocapas no continuas a de pH 3,5 a pH 4,5.

15 Adicionalmente, diferentes lotes de micropartículas de FDKP revestidas con agente activo deshidratado se suspendieron bien en solución ácida (pH final aproximadamente 2,0) o bien en agua (pH final aproximadamente 4,5). Los diferentes agentes activos incluían insulina, hormona del crecimiento e insulina aspart (un tipo de insulina de acción rápida), según se muestra en la Tabla 2. El disolvente se filtró de estas suspensiones y las partículas retenidas se disolvieron y se recogieron. La cantidad de agente activo en todas estas muestras se cuantificó mediante HPLC. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

25 Para cada uno de los lotes, el agente activo se liberó de las partículas en la solución ácida. Por lo tanto, al protonar las superficies de los microcristales, el agente activo se desorbe de las superficies de los cristales. Cuando las partículas se resuspendían en agua, lo que no cambia el estado de ionización de la superficie de las partículas, la proteína seguía adsorbida.

Tabla 2. Agentes activos revestidos sobre micropartículas de FDKP

	Hormona del crecimiento	Insulina	Insulina aspart
Solución estándar de agente activo	250	1103	1099
Resuspendidas en solución ácida	240	980	893
Redisueltas después de separar por filtración la solución ácida	0	49	29
Resuspendidas en agua	0	4	0
Redisueltas después de separar por filtración el agua	191	936	982

Los valores de la tabla son áreas de pico integradas a partir de la cuantificación por HPLC (mAU\*s a 215 nm).

30

#### Ejemplo 4

##### Caracterización de la adsorción estimulada por pH de insulina sobre micropartículas de FDKP

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

40

Adicionalmente, partículas de FDKP se suspendieron en solución de insulina (10 mg/ml) de diferentes pH. La

relación en masa de partículas de FDKP a insulina era 10:1. La concentración de insulina no unida en el sobrenadante se determinó mediante HPLC después de que el sobrenadante se hubiera separado de las partículas mediante centrifugación. La unión a insulina se determinó como la diferencia con respecto a la concentración inicial de insulina. Los datos presentados en la Figura 5 demuestran que el incremento del pH daban como resultado una reducción de insulina en solución y un incremento del contenido de insulina sobre las partículas de FDKP.

Así, la unión de insulina a partículas de FDKP se incrementa con el pH creciente desde aproximadamente pH 3,0 hasta aproximadamente pH 5. Preferiblemente, la solución de insulina se añade a pH 3,6 y bajo estas condiciones aproximadamente 75% de la insulina es adsorbida de la solución sobre las partículas. La unión a insulina se incrementa hasta > 95% a medida que el pH se incrementa hasta  $\geq 4.0$ . La unión sustancialmente completa se alcanza a aproximadamente pH  $\geq 4,2$ , preferiblemente aproximadamente 4,4. A un pH superior a 5,0, las micropartículas de FDKP se empiezan a disolver y ya no retienen la estructura de una micropartícula cristalina.

#### Ejemplo 5

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

En un formato de escala de producción (2-5 kg), se forman micropartículas de FDKP mediante precipitación en ácido con ácido acético y se lavan. Una solución de insulina a pH 3,6 se añade a la suspensión de partículas de FDKP. La solución madre de insulina es 10% en peso de insulina y 2,5% de ácido acético (pH de aproximadamente 3,6). Se usa hidróxido amónico para ajustar el pH de la mezcla hasta 4,5. La Tabla 3 indica las cantidades de los diversos componentes por kilogramo de formulación usado para preparar partículas que contienen ~11,4% en peso de insulina. Se puede incorporar polisorbato 80 durante la formación de las partículas y puede mejorar las características de manejo de las partículas finales. Se deja tiempo para la adsorción de insulina sobre las partículas de FDKP y para asegurar la mezclado a fondo. A continuación, la mezcla se añade gota a gota a nitrógeno líquido para congelar instantáneamente la suspensión. El medio fluido se retira mediante liofilización para producir un producto farmacológico a granel de partículas de FDKP/insulina. Alternativamente, la mezcla se seca por pulverización. La Tabla 4 indica las cantidades de los diversos componentes en el producto a granel después de la retirada del medio fluido.

Tabla 3. Composición de la fórmula de la partida de partículas de FDKP/insulina

Componente	11,4% de FDKP/insulina (Gramos por kg de formulación)
Insulina, USP	114 g
FDKP	870 g
Polisorbato 80, USP*	34.8 g
Solución fuerte de amoníaco, NF	572 g
Ácido acético (glacial), NF	3.680 g
Agua purificada, NF	179.000 g
Nitrógeno, NF	según sea necesario

Tabla 4. Composición de las partículas de FDKP/insulina

Componente	11,4% de FDKP/insulina, procedimiento (Cantidad por gramo de formulación)
Insulina, USP	3,0 UI (0,11 mg)
FDKP	0,87 mg
Polisorbato 80, USP*	0,007 mg
Solución fuerte de amoníaco, NF	Retirado durante el procedimiento
Ácido acético (glacial), NF	Retirado durante el procedimiento
Agua purificada, NF	0,012 mg
Nitrógeno, NF	Retirado durante el procedimiento

En las Tablas 3 y 4 anteriores, NF indica - National Formulary

\* El contenido de polisorbato 80 se estima mediante un ensayo de HPLC/MS.

\*\* La formulación de FDKP/insulina contiene aproximadamente 1,2% de agua residual después de la liofilización. También pueden estar presentes cantidades vestigiales de ácido acético e hidróxido amónico.

## 5 Ejemplo 6

Saturación de las superficies de micropartículas mediante proteína (formación de una monocapa continua)

El revestimiento superficial de una micropartícula con una monocapa debe ser un procedimiento saturable. Esto es, su superficies específica accesible y el diámetro de la molécula de agente activo dictarán la capacidad de la superficie de las micropartículas. La Figura 6 ilustra esta saturación.

10 Se preparó una suspensión de micropartículas de FDKP y el pH se ajustó entre pH 3,0 y pH 3,5 en cuyo punto las superficies se ionizan parcialmente. En este procedimiento, no se podía usar un pH superior debido a que provocaría la autoasociación del agente activo, insulina. Porciones pequeñas de una solución concentrada de insulina se añadieron a la suspensión agitada. Después de cada adición, se dejó que la muestra se estabilizara y se recogieron datos ultrasónicos.

15 La Figura 6 muestra que se observa una reducción en la velocidad ultrasónica a medida que se incrementaba la concentración de proteína. Este tipo de cambio en la velocidad ultrasónica es típico para la unión del ligando en soluciones acuosas e indica la adsorción de la proteína activa a las superficies de las micropartículas de FDKP. La disminución de velocidad resulta de la liberación del agua de hidratación de las superficies de las micropartículas de FDKP y la proteína. Cuando el agua de hidratación se desplaza mediante la adsorción del agente activo, su estructura se relaja y produce una disminución neta en la velocidad ultrasónica a través de la muestra. Cuando se han saturado todos los sitios de unión sobre la superficie de las micropartículas de FDKP, es decir, se ha formado una monocapa proteínica, la curva se nivela. La formación de la monocapa también se demostró por los datos de las Figuras 7A-7D que mostraban que la adsorción de diversos agentes activos (GLP-1 [Figura 7A]; PTH [Figura 7B]; anticuerpo monoclonal anti-SSX-241-49 [Figura 7C]; y anticuerpo monoclonal anti-MOPC-21 [Figura 7D]), sobre las micropartículas alcanzaba la saturación a medida que la concentración del agente activo se incrementa a una concentración constante de micropartículas de FDKP (5 mg/ml). Estos estudios se efectuaron a pH 5,0 donde se observa la adsorción óptima del agente activo a micropartículas. El GLP-1 no se autoasocia a las concentraciones usadas (según se divulga en la Solicitud de Patente Provisional de EE. UU. N° 60/744.882).

## Ejemplo 7

### 30 Evidencia del mecanismo de interacción electrostática

La evidencia de un mecanismo de interacción electrostático es la capacidad para interferir con la adsorción al debilitar interacciones electrostáticas. Esto se demuestra al añadir sal al sistema de partícula ionizada/agente activo. Las Figuras 8A-8D ilustran que incrementar la fuerza iónica en un sistema de agente activo-micropartículas de FDKP reducía la adsorción del agente activo sobre la micropartícula.

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

45 La Figura 8 muestra una correlación inversa entre la adsorción medida y la concentración de sal en la suspensión de carga. Esto se puede interpretar como una evidencia de que la sal competía con el agente activo por la interacción con la superficie de las partículas. A medida que se incrementaba la concentración de sal, competía fuertemente y eficazmente por los sitios de unión superficiales, y esencialmente desplazaba al agente activo de las superficies de las partículas. También se especulaba que la disminución de la unión del agente activo a la micropartícula se puede atribuir al blindaje de Debye.

50 A menos que se indique otra cosa, se debe entender que todos los números que expresen cantidades de ingredientes, propiedades tales como el peso molecular, condiciones de reacción, etc. usados en la memoria descriptiva y las reivindicaciones están modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". Según esto, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos indicados en la siguiente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que

55

se busca obtener por la presente invención. Como mínimo, y no como un intento de limitar la aplicación de la doctrina de equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico se debe considerar al menos a la luz del número de dígitos significativos presentados y al aplicar técnicas de redondeo normales. Sin perjuicio de que los intervalos y parámetros numéricos que indican el amplio alcance de la invención sean aproximaciones, los valores numéricos indicados en los ejemplos específicos se presentan tan precisamente como sea posible. Sin embargo, cualquier valor numérico contiene inherentemente ciertos errores que resultan necesariamente de la desviación estándar encontrada en sus medidas de prueba respectivas.

Se debe considerar que los términos "un" y "uno/a" y "el/la" y referencias similares usadas en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) cubren tanto el singular como el plural, a menos que se indique otra cosa en la presente memoria o sea contradicho claramente por el contexto. La cita de intervalos de valores en la presente memoria simplemente pretende servir como un método abreviado para hacer referencia individualmente a cada valor separado que esté dentro del intervalo. A menos que se indique otra cosa en la presente memoria, cada valor individual se incorpora en la memoria descriptiva como si se citará individualmente en la presente. Todos los métodos descritos en la presente se pueden realizar en cualquier orden adecuado a menos que se indique otra cosa en la presente memoria o sea claramente contradicho por el contexto. El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o el leguaje ejemplar (p. ej. "tal como") proporcionado en la presente memoria está destinado simplemente a ilustrar mejor la invención y no plantea una limitación sobre el alcance de la invención reivindicado de otro modo. No se debe considerar que ninguna redacción de la memoria descriptiva indique ningún elemento no reivindicado esencial para la práctica de la invención.

El uso del término "o" en las reivindicaciones se usa para significar "y/o" a menos que se indique explícitamente que se refiere solamente a alternativas o las alternativas sean mutuamente exclusivas, aunque la divulgación apoya una definición que se refiere solamente a alternativas e "y/o."

Los agrupamientos de elementos o realizaciones alternativos de la invención divulgada en la presente no se deben considerar limitaciones. Cada miembro del grupo se puede mencionar y reivindicar individualmente o en cualquier combinación con otros miembros del grupo u otros elementos encontrados en la presente. Se anticipa que uno o más miembros de un grupo se pueden incluir en, o eliminarse de, un grupo por razones de comodidad y/o patentabilidad. Cuando se produzca cualquiera de estas inclusiones o eliminaciones, se considera que la memoria descriptiva contiene el grupo según está modificado cumpliendo así la descripción escrita de todos los grupos de Markush usados en las reivindicaciones adjuntas.

Además, se debe entender que las realizaciones de la invención divulgadas en la presente memoria son ilustrativas de los principios de la presente invención. Otras modificaciones que se puedan emplear están dentro del alcance de la invención. Así, a modo de ejemplo, pero no de limitación, se pueden utilizar configuraciones alternativas de la presente invención según las enseñanzas de la presente. Según esto, la presente invención no se limita a lo que se muestra y describe precisamente.

## REIVINDICACIONES

1. Una micropartícula cristalina que comprende una dicetopiperacina y polisorbato 80, incluyendo la micropartícula un agente activo adsorbido, y en donde la dicetopiperacina es 3,6-di(fumaril-4-aminobutil)-2,5-dicetopiperacina, en donde el agente activo comprende una insulina.
- 5 2. La micropartícula según la reivindicación 1, en la que el agente activo se adsorbe a una superficie cristalina de la micropartícula de dicetopiperacina.
3. La micropartícula según la reivindicación 1 o 2, en la que el agente activo forma una monocapa sobre la superficie cristalina.
4. La micropartícula según la reivindicación 3, en la que la monocapa es continua.
- 10 5. La micropartícula según la reivindicación 3, en la que la adsorción del agente activo está mediada por una interacción electrostática, una interacción hidrófoba o unión por enlaces de hidrógeno.
6. La micropartícula según la reivindicación 1, que comprende polisorbato 80 y dicetopiperacina en una relación en peso de aproximadamente 0,008 a 1; y que comprende además el agente activo revestido sobre la superficie de la micropartícula.
- 15 7. Un método para mejorar las características de manejo de una micropartícula de dicetopiperacina que comprende formar una micropartícula de dicetopiperacina en presencia de polisorbato 80, preparando de ese modo una micropartícula que comprende dicetopiperacina y polisorbato 80, donde la dicetopiperacina es 3,6-di(fumaril-4-aminobutil)-2,5-dicetopiperacina.
- 20 8. El método según la reivindicación 7, en donde el método comprende obtener una solución de la dicetopiperacina, polisorbato 80 y ácido acético, en donde la dicetopiperacina tiene solubilidad limitada y precipita a pH bajo.
9. Un método para revestir una micropartícula cristalina con un agente activo en una suspensión, comprendiendo dicho método las etapas en la secuencia indicada de:
- i) realizar el método según la reivindicación 8 para preparar una micropartícula cristalina que comprende 3,6-di(fumaril-4-aminobutil)-2,5-dicetopiperacina y polisorbato 80;
- 25 ii) proporcionar una suspensión que comprende la micropartícula, un agente activo y un disolvente;
- iii) a continuación alterar las condiciones de la suspensión en dicha suspensión proporcionada para modificar una interacción energética entre dicho agente activo y dicha micropartícula cristalina preformada, en donde dicha alteración de las condiciones de la suspensión se selección del grupo que consiste en alterar el pH del disolvente, añadir iones monovalentes o multivalentes, alterar la polaridad y añadir donantes o aceptores de enlaces de hidrógeno para modificar una propiedad superficial de dicha micropartícula cristalina preformada, en donde dicha etapa de alteración no incluye una etapa de retirada de dicho disolvente de dicha suspensión; y
- 30 iv) adsorber dicho agente activo sobre una superficie de dicha micropartícula cristalina para proporcionar un revestimiento de dicho agente activo sobre dicha micropartícula cristalina sin retirar el disolvente de dicha suspensión; en donde dicha etapa de alteración provoca la adsorción de dicho agente activo sobre una superficie de dicha micropartícula cristalina; en donde el agente activo comprende una insulina.
- 35 10. La micropartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el polisorbato 80 mejora las características de manejo de la micropartícula.
11. La micropartícula según la reivindicación 1, que comprende polisorbato 80 y 3,6-di(fumaril-4-aminobutil)-2,5-dicetopiperacina en una relación en peso de aproximadamente 0,008 a 1.

40

FIGURA 1

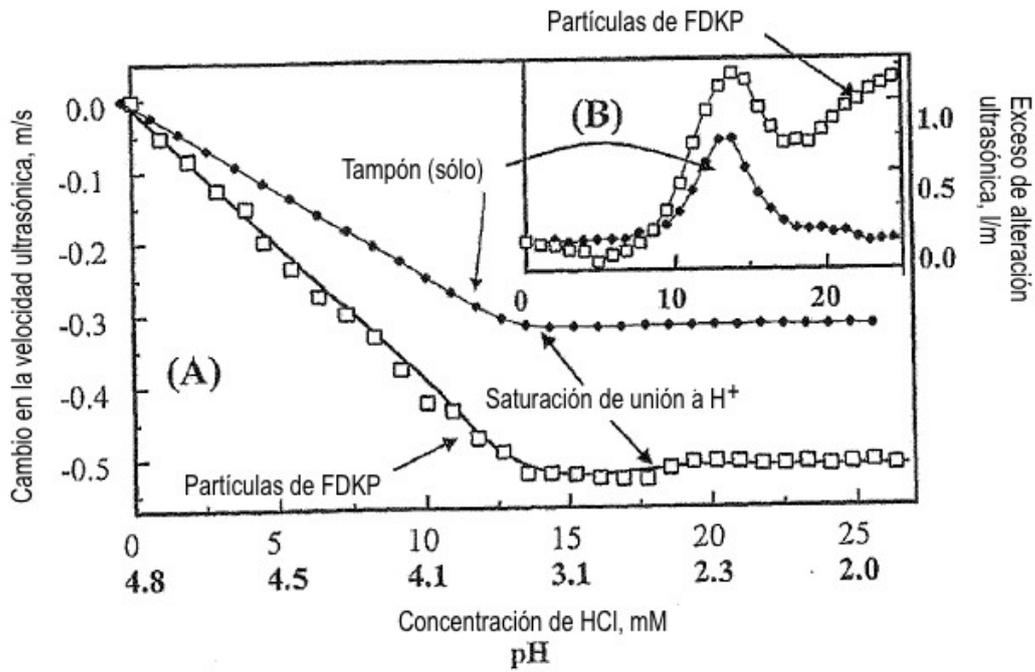


FIGURA 2

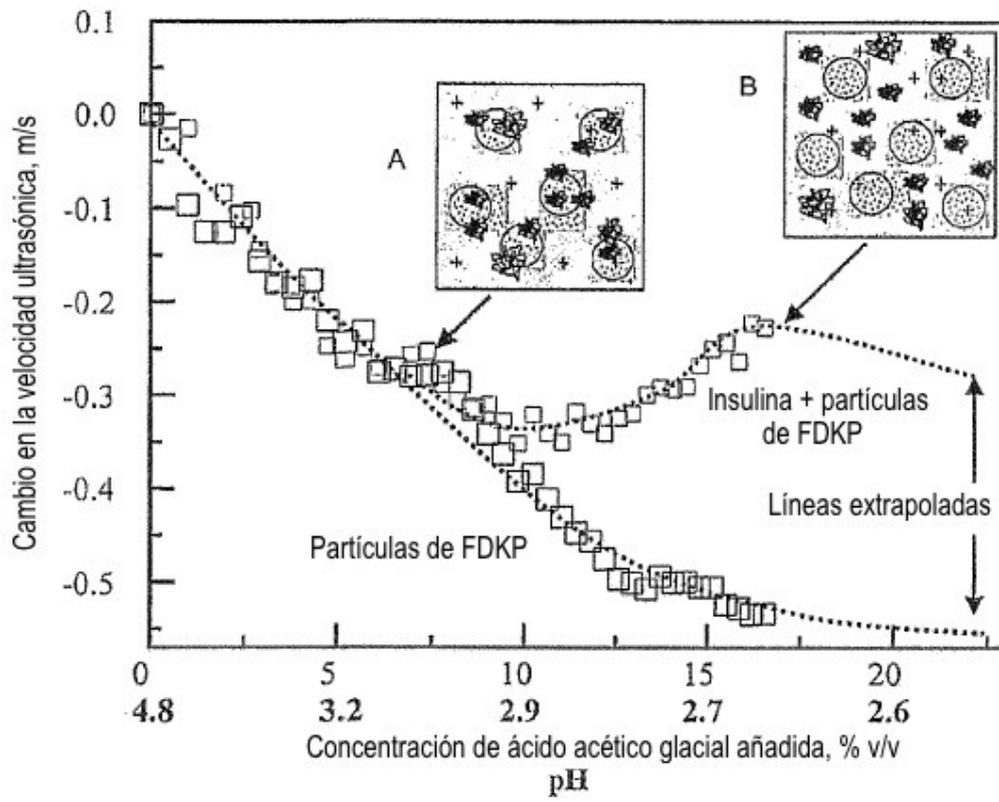
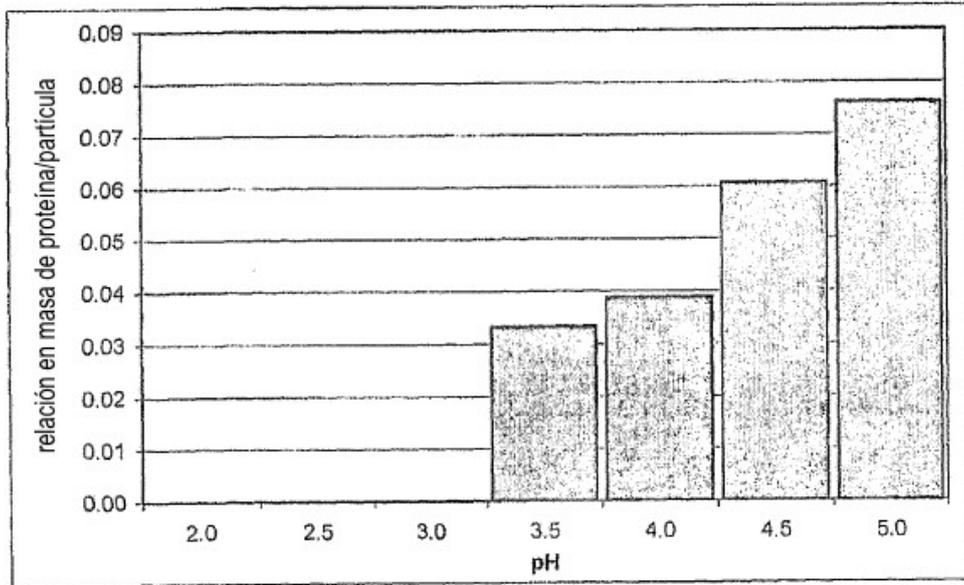


FIGURA 3



FIGURAS 4A-4D

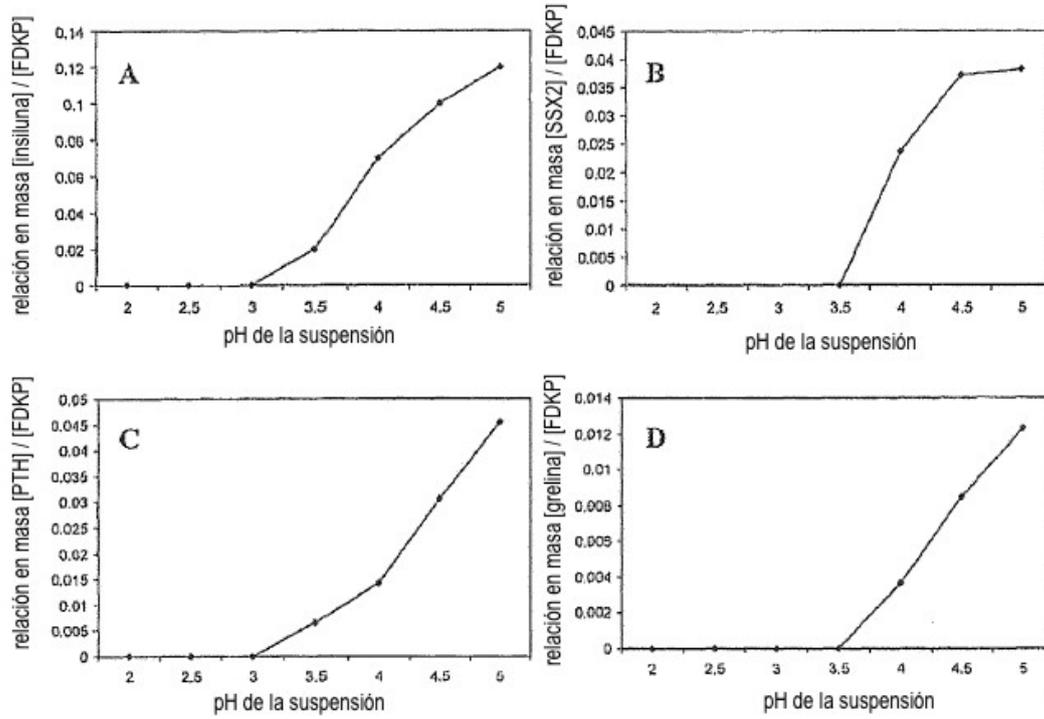


FIGURA 5

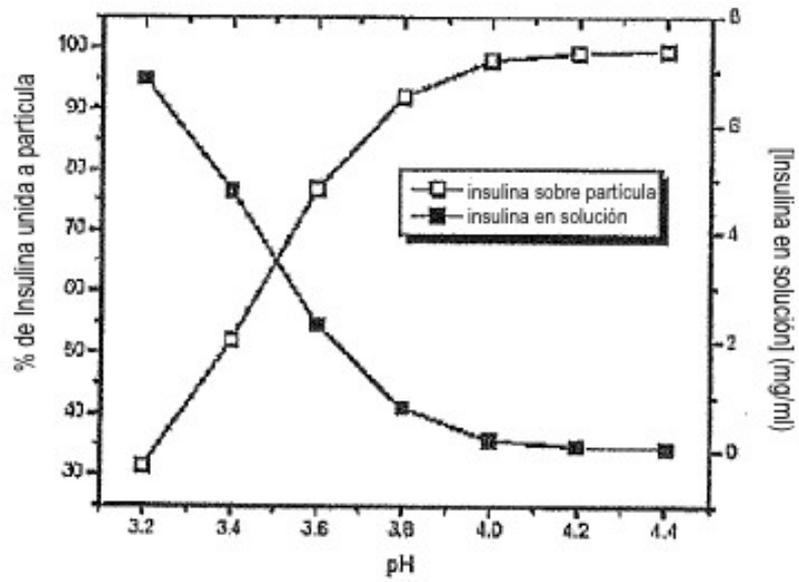
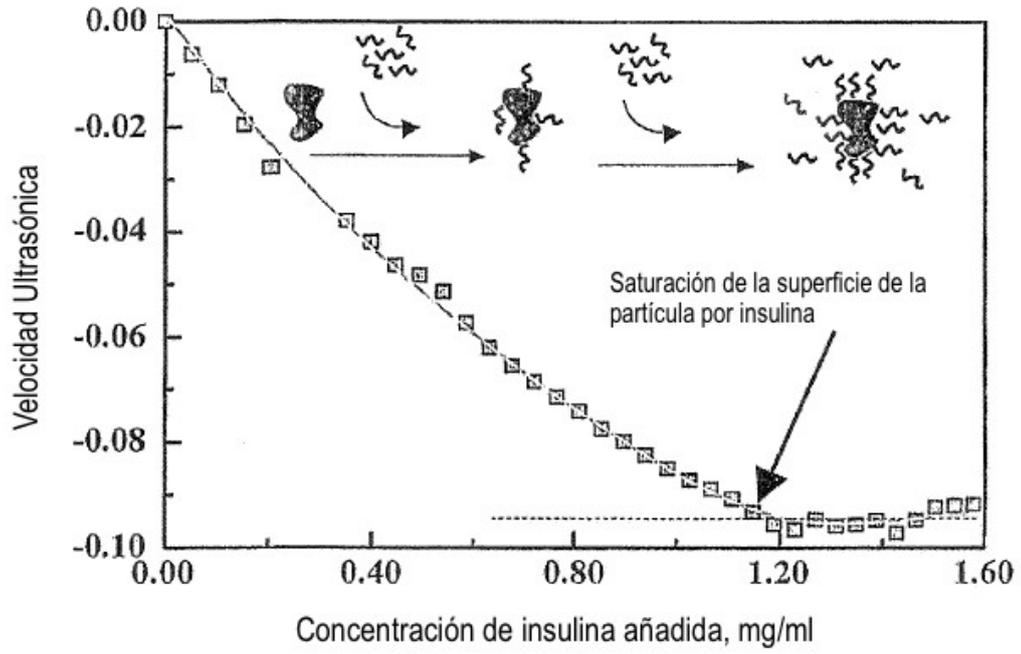
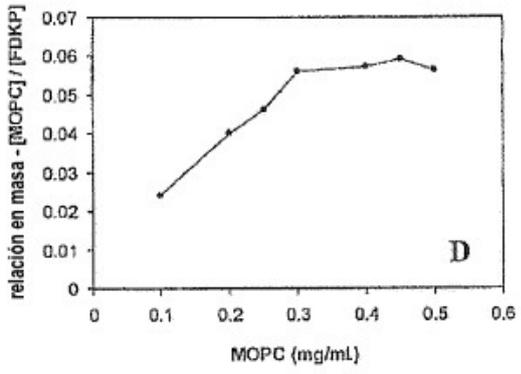
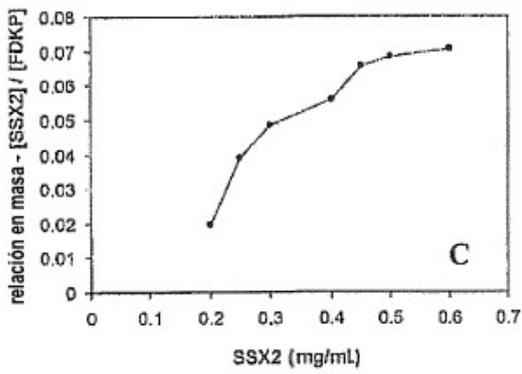
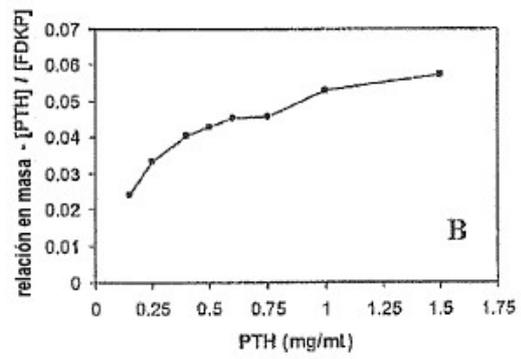
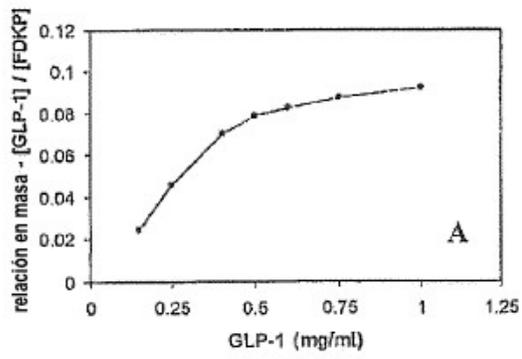


FIGURA 6



FIGURAS 7A-7D



FIGURAS 8A-8D

