

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 642 095**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/00** (2006.01)  
**A61K 9/16** (2006.01)  
**A61K 9/10** (2006.01)  
**A61K 9/19** (2006.01)  
**A61K 38/27** (2006.01)  
**A61K 38/28** (2006.01)  
**A61K 38/21** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.06.2007 PCT/EP2007/055720**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **13.12.2007 WO07141344**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.06.2007 E 07730058 (0)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.07.2017 EP 2043600**

54 Título: **Formulaciones para la liberación prolongada de principio(s) activo(s), así como sus aplicaciones, especialmente terapéuticas**

30 Prioridad:

**09.06.2006 FR 0605152**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**15.11.2017**

73 Titular/es:

**FLAMEL IRELAND LIMITED (100.0%)  
 Block 10-1, Blanchardstown Corporate Park,  
 Ballycoolin  
 Dublin 15, IE**

72 Inventor/es:

**BONNET GONNET, CÉCILE;  
 CHOIGNOT, DAVID;  
 SOULA, OLIVIER y  
 CONSTANCIS, ALAIN**

74 Agente/Representante:

**VEIGA SERRANO, Mikel**

**Observaciones:**

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

ES 2 642 095 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

Formulaciones para la liberación prolongada de principio(s) activo(s), así como sus aplicaciones, especialmente terapéuticas

5

**Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a nuevas formulaciones farmacéuticas basadas en suspensiones coloidales acuosas para la liberación prolongada de principio(s) activo(s) (PA), en particular de proteína(s) y péptido(s), así como a las aplicaciones, especialmente terapéuticas, de estas formulaciones.

10

Estas formulaciones farmacéuticamente activas se refieren tanto a la terapéutica humana como a la veterinaria.

**Estado de la técnica**

15

En el campo de la liberación prolongada de los PA farmacéuticos, especialmente de proteínas terapéuticas, existe la necesidad, en muchos de los casos, de reproducir al máximo posible en los pacientes, una concentración plasmática de proteína o péptido semejante al valor observado en individuos sanos.

20

Este objetivo se enfrenta a la escasa duración de las proteínas en el plasma, lo que conlleva a inyectar repetidamente la proteína terapéutica. La concentración plasmática de la proteína terapéutica presenta, en este caso, un perfil "con dientes de sierra", caracterizado por picos de concentración elevada y mínimos de concentración muy baja. Los picos de concentración, muy superiores a la concentración basal en sujetos sanos, tienen efectos nocivos muy notables debidos a la elevada toxicidad de proteínas terapéuticas tales como la interleuquina IL2. Por otra parte, las concentraciones mínimas son inferiores a la concentración necesaria para tener un efecto terapéutico, lo que conlleva una mala cobertura terapéutica del paciente y a graves consecuencias a largo plazo.

25

Asimismo, para reproducir en el paciente una concentración plasmática de proteína terapéutica cercana al valor ideal para el tratamiento del paciente, es necesario que la formulación farmacéutica en cuestión pueda liberar a la proteína terapéutica durante un tiempo prolongado, para limitar las variaciones de concentración plasmática con el tiempo.

30

Por otra parte, esta formulación activa debe, preferentemente, satisfacer el conjunto de problemas siguientes, ya conocidos por el experto en la técnica:

35

- 1 - liberación prolongada de una proteína terapéutica activa y no desnaturalizada, por ejemplo humana o sintética, de forma que la concentración plasmática se mantenga en el nivel terapéutico;
- 2 - viscosidad en la inyección lo suficientemente baja para que se pueda inyectar con facilidad;
- 3 - forma biocompatible y biodegradable;
- 4 - forma que no presente toxicidad, ni inmunogenicidad;
- 5 - forma que tenga una excelente tolerancia local.

40

Para intentar conseguir estos objetivos, uno de los mejores enfoques propuestos en la técnica anterior fue desarrollar formas de liberación prolongada de proteína(s) terapéutica(s) constituidas por suspensiones líquidas y poco viscosas de nanopartículas cargadas de proteínas terapéuticas. Estas suspensiones han permitido la administración sencilla de proteínas terapéuticas naturales.

45

De este modo, la empresa Flamel Technologies ha propuesto una forma, en la que la proteína terapéutica está asociada a nanopartículas de un copoliaminoácido que comprende grupos hidrófobos y grupos hidrófilos.

50

La patente US-B-5.904.936 describe partículas submicrométricas (NPV) -de tamaño medio comprendido entre 0,01 y 0,5  $\mu\text{m}$ - y partículas micrométricas (MPV) -de tamaño medio comprendido entre 0,5 y 20  $\mu\text{m}$ - de copolímero anfifílico de poliaminoácidos que comprenden al menos dos tipos de aminoácidos, siendo uno neutro hidrófobo, siendo el otro ionizable. Proteínas como la insulina se adsorben espontáneamente en dichas partículas en solución acuosa. El copolímero de poliaminoácido es, por ejemplo, un copolímero en bloques de poli(L-leucina-b-L-glutamato de sodio). Esta patente describe la agregación de NPV en MPV mediante la adición a una suspensión coloidal de poli-Leu/Glu de sales moncatiónicas (sulfato de amonio) o policatiónicas ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Al}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  o  $\text{Cu}^{2+}$ ), de ácido (HCl), de polímeros catiónicos (polilisina).

55

La solicitud de patente WO-A-2005/033181 divulga homopoliaminoácidos lineales, anfifílicos, aniónicos, que comprenden unidades de aspártico o unidades de glutámico y cuyos extremos contienen grupos hidrófobos de 8 a 30 átomos de carbono. En particular, los homopoliaminoácidos telectélicos "hidrófobos modificados" son, por ejemplo, un poli[GluONa] con extremos PheOC18/C18 o un poli[GluONa] con extremos PheOC18/alfa-tocoferol. Estos homopoliaminoácidos telectélicos "hidrófobos modificados" forman espontáneamente en agua una suspensión coloidal de nanopartículas, que son adecuadas para asociarse fácilmente en suspensión acuosa a pH 7,4, con al menos una proteína activa (insulina).

60

La duración de liberación *in vivo* de la (o las) proteína(s) activa(s) (por ejemplo, insulina) "vectorizada" mediante las

65

suspensiones de acuerdo con los documentos US-B-5,904,936 & WO-A-2005/033181 mejoraría si se aumentara.

El aumento de la duración de liberación se ha obtenido parcialmente mediante las formas farmacéuticas descritas en la solicitud PCT WO-A-05/051416. En esta solicitud, una suspensión coloidal de nanopartículas (0,001-0,5  $\mu\text{m}$ ) de poli(L-glutamato de sodio) modificada de forma hidrófoba se inyecta a una concentración tal que, después de la inyección subcutánea, se forma *in situ* en el paciente un gel cuando entra en contacto con la seroalbúmina endógena. A continuación, la proteína se libera lentamente durante un periodo normal de una semana. No obstante, cuando la concentración de proteína terapéutica a administrar es relativamente alta, como en el caso, por ejemplo, de la hormona de crecimiento humana, la duración de la liberación está limitada, solamente, a algunos días.

En cualquier caso, toda esta técnica anterior sobre los coloides de nanopartículas o de micropartículas de poliaminoácidos modificados de forma hidrófoba no revela ninguna formulación que permita:

(I) aumentar la duración de la liberación de la proteína activa tras su inyección por vía parenteral, por ejemplo, subcutánea; especialmente cuando la concentración de proteína es elevada.

(II) y/o reducir el pico de concentración plasmática de la proteína activa después de la inyección de la formulación que la contiene.

### Objeto de la invención

En estas condiciones, uno de los objetivos de la presente invención es, por tanto, proponer una formulación farmacéutica para la liberación prolongada de PA, que corrija las carencias de la técnica anterior y que permita, en particular después de su inyección por vía parenteral (por ejemplo, subcutánea), obtener una duración de liberación *in vivo* prolongada de los PA (por ejemplo, proteínas, péptidos terapéuticos y moléculas pequeñas) no desnaturalizados, por ejemplo, proteínas humanas o sintéticas.

Otro objeto de la invención es proponer una formulación farmacéutica que permita, después de su inyección por vía parenteral (por ejemplo, subcutánea), obtener una duración de liberación *in vivo* prolongada para las proteínas y péptidos terapéuticos muy concentrados, por ejemplo, de varios mg/ml.

Otro objeto de la invención es proponer una formulación farmacéutica de liberación prolongada de los PA *in vivo*, que sea estable durante la conservación en lo que respecta tanto a sus propiedades fisicoquímicas como biológicas.

Otro objeto de la invención es proponer una formulación farmacéutica de liberación prolongada de los PA *in vivo*, que muestre al menos una de las siguientes propiedades: biocompatibilidad, biodegradabilidad, atoxicidad, buena tolerancia local.

Otro objeto de la invención es proponer una formulación farmacéutica para la liberación prolongada lenta de PA *in vivo*, que comprende partículas micrométricas de polímero (PO) autoasociadas o autoasociables a al menos un PA, siendo el PO un polímero biodegradable, hidrosoluble, que contenga grupos hidrófobos (GH) y grupos ionizables (GI), que formen espontáneamente en agua una suspensión de nanopartículas coloidales.

Otro objeto de la invención es proponer una formulación farmacéutica que comprenda partículas micrométricas del polímero PO indicado anteriormente, que pueda liberar, después de su inyección por vía subcutánea, una proteína o un péptido terapéutico con una duración más prolongada que la duración de liberación obtenida después de la administración de la misma proteína mezclada en el medio acuoso del PA con la suspensión coloidal del polímero PO.

Otro objeto de la invención es proponer una formulación farmacéutica de liberación prolongada lenta de PA *in vivo*, comprendiendo esta formulación partículas micrométricas de polímero PO autoasociadas a al menos un PA, siendo el polímero PO, por ejemplo, un poliaminoácido cuya cadena principal está formada por restos de aspártico y/o restos de glutámico, estando una parte de dichos restos modificada por el injerto de al menos un grupo hidrófobo GH, en la cadena y/o en un extremo de la cadena, siendo el PO además biodegradable, hidrosoluble y anfifílico.

Otro objeto de la invención es de proponer productos derivados y/o precursores de la formulación prevista en los objetos anteriormente enunciados.

Es mérito del solicitante haber descubierto que la agregación de las nanopartículas de la formulación de acuerdo con el documento WO 05/051416 en partículas micrométricas que contienen iones multivalentes de polaridad opuesta a la de los grupos GI, en proporciones bien definidas, conduce a una selección de una población específica de micropartículas que permite una prolongación significativa de la duración de liberación del PA (por ejemplo, proteína o péptido) con el que estas micropartículas están asociadas.

Es también mérito del solicitante haber descubierto que determinados iones multivalentes producen una tolerancia excelente de las formulaciones de acuerdo con la invención.

De donde se desprende que la invención se refiere a una formulación farmacéutica líquida para la liberación prolongada de PA, que comprende una suspensión coloidal, acuosa, de viscosidad dinámica a 20 °C menor o igual de 1000 mPa.s, basada en partículas micrométricas de polímero (PO),

5 i. el polímero PO

- que es un copolímero anfifílico, biodegradable, hidrosoluble, donde dicho copolímero es un poliaminoácido cuya cadena principal está formada por restos de aspártico o de restos de glutámico, siendo al menos una parte de estos restos portadores de grupos hidrófobos (GH) y de grupos hidrófilos ionizables (GI), al menos en parte ionizados, y
- que formen espontáneamente en agua una suspensión coloidal de nanopartículas en el agua, a pH = 7,0, en condiciones isotónicas,

15 ii. siendo dichas partículas adecuadas para asociarse espontáneamente de manera no covalente con al menos un principio activo (PA), a pH = 7,0, en condiciones isotónicas,

formulación caracterizada por que las partículas micrométricas de PO tienen un tamaño, medido en una prueba T, comprendido entre 1 y 70 µm, preferentemente entre 2 y 40 µm y por que contiene iones multivalentes de valencia menor o igual a 4, preferentemente iones divalentes, iones trivalentes, o sus combinaciones, de polaridad opuesta a la de los grupos ionizables GI del polímero, habiéndose añadido dichos iones multivalentes para producir la agregación de las nanopartículas de PO en partículas micrométricas en una cantidad tal que la relación r,

25 medida en una prueba M, y que responde a la fórmula  $r = n \times \frac{[IM]}{[GI]}$ , donde

- n es la valencia de dichos iones multivalentes,
- [IM] es la concentración molar de iones multivalentes,
- [GI] es la concentración molar de grupos ionizables GI,

30 está comprendida entre 0,3 y 10, preferentemente entre 0,6 y 5,0 y, más preferentemente aún, entre 0,8 y 3,0.

35 Estas partículas micrométricas seleccionadas de acuerdo con la invención proceden de la agregación de un número elevado de nanopartículas de copolímero anfifílico. Esta agregación se provoca ventajosamente por la presencia de iones multivalentes de polaridad opuesta a la de los grupos ionizables GI (al menos parcialmente ionizados) que contiene el copolímero. Estos iones multivalentes de polaridad opuesta a la de los grupos GI del copolímero, cuando se complejan con las cadenas de polímeros pertenecientes a nanopartículas diferentes, producen la floculación de las nanopartículas de polímero en forma de micropartículas.

40 El PA se puede asociar espontáneamente a las nanopartículas del copolímero PO antes de su agregación en partículas micrométricas y/o a estas últimas durante y/o después de la agregación.

Además, las formulaciones de acuerdo con la invención son no tóxicas, bien toleradas localmente.

45 En la totalidad de la memoria descriptiva, a la diferencia de las micropartículas de tamaño micrométrico (micrónico) de la formulación de acuerdo con la invención, la expresión "partículas submicrométricas" o "nanopartículas" designa partículas de tamaño (medido en una prueba T' descrita más adelante) mayor o igual a 1 nm y menor de 500 nm, preferentemente comprendido entre 5 y 250 nm.

50 En el sentido de la invención, el término "proteína" designa tanto una proteína como un péptido, ya se trate de un oligopéptido o de un polipéptido. Esta proteína o este péptido pueden estar modificados o no, por ejemplo, mediante injerto de uno o varios grupos polioxi-etilénicos.

55 El principio activo se designa por la abreviatura PA en toda la memoria descriptiva; PA se refiere al menos a un principio activo.

60 En el sentido de la invención, y en la totalidad de la memoria descriptiva, los términos "asociación" o "asociar" utilizados para calificar las relaciones entre uno o varios PA y los polímeros PO (los poliaminoácidos) significan que el o los PA están unidos al uno o varios PO mediante un enlace no covalente, por ejemplo, mediante interacción electrostática y/o hidrófoba y/o enlace de hidrógeno y/o impedimento estérico.

Las velocidades angulares de centrifugación se expresan en rpm (revoluciones por minuto), unidad equivalente a la vuelta por minuto (vuelta/min): siendo  $1 \text{ rpm} = \frac{2\pi}{60} \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$

**Prueba T de medida del tamaño de las micropartículas por difracción láser:**

a- Prueba T1 en el caso en que las micropartículas están en forma de dispersión acuosa

5 *1 Material y condiciones operativas*

Granulómetro láser	Malvern Mastersizer 2000
Módulo	Voie Liquide Hydro 2000SM
Volumen de fluido portador dispersante	150 ml
Longitudes de onda (azul y rojo)	466 y 632 nm
Velocidad de agitación	2400 vueltas/min
Campo del análisis	0,02 µm a 2000 µm
Modelo óptico (Teoría de Mie) Valores de los índices de refracción utilizados: Fluido dispersante (agua) Látex de poliestireno	$m_{\text{fluido}} = 1,33 + i.0$ $m_{\text{látex de poliestireno}} = 1,59 + i.0$
Valores de oscurecimiento para iniciar el análisis	Entre 5 % y 20 %
Tiempo de adquisición	10 s

*2 Preparación de la muestra*

- 10 Para preparar la muestra a analizar, deben diluirse 400 µl de la muestra en un tubo de ensayo de 5 ml con 600 µl de agua desmineralizada, a continuación se somete a vortización la preparación durante 10 s ( $10 \pm 5$ ).

*3 Análisis de la muestra*

- 15 El fluido circulante almacenado en el sistema de dispersión de líquido en reposo se vacía y se sustituye por agua desmineralizada nueva. La agitación del móvil Hydro2000SM se ajusta a 2400 vueltas/min.

Iniciar la medición con las condiciones experimentales anteriormente mencionadas:

- 20     1- Alineamiento del haz láser,  
       2- Registro de los ruidos de fondo.

- 25 Después de estas etapas, el operario introduce la muestra a analizar de la manera siguiente: añadir gota a gota (con una pipeta Pasteur) la muestra diluida hasta que el oscurecimiento esté comprendido entre 5 % y 20 %, e iniciar la adquisición.

Se obtienen datos relativos del D50, que es el diámetro por debajo del cual se encuentra el 50 % de los objetos analizados.

- 30 Realizar el promedio del D50 de 3 medidas realizadas para 3 preparaciones diferentes.

b- Prueba T2 en el caso en que las micropartículas están en forma seca

35 *1 Material y condiciones operativas*

Granulómetro láser	Malvern Mastersizer 2000
Módulo	Voie Liquide Hydro 2000SM
Volumen de fluido portador dispersante	150 ml
Longitudes de onda (azul y rojo)	466 y 632 nm
Velocidad de agitación	2000 vueltas/min
Campo del análisis	0,02 µm a 2000 µm
Modelo óptico (Teoría de Mie) Valores de los índices de refracción utilizados: Fluido dispersante (agua)	$m_{\text{fluido}} = 1,39 + i.0$

Látex de poliestireno	$m_{\text{látex de poliestireno}} = 1,59 + i.0$
Valores de oscurecimiento para iniciar el análisis	Entre 5 % y 20 %
Tiempo de adquisición	10 s

2 Preparación de la muestra

- Preparar una solución de Span 80 al 0,1 % en heptano (para ello, pesar 0,01 g de Span 80 en polvo en un matraz de 20 ml y añadir a continuación, mediante pesada, heptano hasta conseguir finalmente 10 g)
- Pesar aproximadamente 6 mg de polvo en un tubo de ensayo de 5 ml,
- Añadir 0,7 g de heptano que contiene el Span 80 al 0,1 % en el tubo de ensayo,
- Introducir el tubo de ensayo durante 2 minutos en un baño de ultrasonidos para dispersar completamente el polvo.

3 Análisis de la muestra

El fluido circulante almacenado en el sistema de dispersión de líquido en reposo se vacía y se sustituye por heptano. La agitación del móvil Hydro2000SM se ajusta a 2000 vueltas/min.

Iniciar la medición con las condiciones experimentales anteriormente mencionadas:

- 1- Alineamiento del haz láser,
- 2- Registro de los ruidos de fondo.

Después de estas etapas, el operario introduce la muestra a analizar de la manera siguiente: añadir gota a gota (con una pipeta Pasteur) la muestra diluida hasta que el oscurecimiento esté comprendido entre 5 % y 20 %, e iniciar la adquisición.

Se obtienen datos relativos del D50, que es el diámetro por debajo del cual se encuentra el 50 % de los objetos analizados.

Realizar el promedio del D50 de 3 medidas realizadas para 3 preparaciones diferentes.

**Prueba T' para medir el tamaño de las nanopartículas por difusión casi elástica de la luz**

El diámetro hidrodinámico promedio de las partículas de polímero PO de acuerdo con la invención se determina según el procedimiento de operación Md definido a continuación:

Se preparan soluciones de PO a concentraciones de 1 o 2 mg/ml en medio NaCl 0,15 M y se dejan en agitación durante 24 h. Estas soluciones se filtran a continuación en 0,8-0,2  $\mu\text{m}$ , antes de analizarse para determinar la difusión dinámica de la luz mediante un aparato de tipo Malvern Compact Goniometer System, que funciona con un haz láser de He-Ne con una longitud de onda de 632,8 nm y polarizado verticalmente. El diámetro hidrodinámico de las nanopartículas de polímero PO se calcula a partir de la función de autocorrelación del campo eléctrico por el método de acumulación, tal como se describe en "Surfactant Science Series" volumen 22, Surfactant Solutions, Ed. R. Zana, cap. 3, M. Dekker, 1984.

**Prueba M de medición del contenido en iones multivalente mediante cromatografía iónica:**

Se toma como ejemplo la cuantificación del ion multivalente  $\text{Mg}^{2+}$ . El método es prácticamente el mismo (solamente cambian los patrones) para la determinación del resto de cationes.

1 Material y reactivos

Cromatografía iónica

Sistema de cromatografía iónica Dionex ICS2500 provisto de un detector de conductividad, un supresor catiónico de funcionamiento interno y un horno termostatzado.

- Columna (Dionex): columna Ion Pac CS16 5x250 mm
- Precolumna (Dionex): precolumna Ion Pac CG16 5x50 mm
- Supresor catiónico (Dionex): CSRS - ULTRA II - 4 mm
- Matraz de plástico para cromatografía iónica (Dionex)
- Agua desmineralizada (MilliQ)
- Ácido clorhídrico HCl 0,1 N (Riedel de Haën)
- Ácido metanosulfónico (MSA) (Aldrich)

## ES 2 642 095 T3

Sulfato del ion multivalente: por ejemplo, MgSO<sub>4</sub> (Aldrich)

### 2 Preparación de las soluciones

5 Disolvente: HCl 0,01 N

En un matraz aforado de 1 l que contiene aproximadamente 500 ml de agua MilliQ, introducir 100 ml de HCl 0,1 N. Completar a 1 l con agua MilliQ y poner en agitación magnética.

10 Fase móvil: MSA 30 mM

En un matraz de plástico de 2 l para cromatografía iónica, introducir 2 l de agua MilliQ mediante una probeta graduada. Añadir 3,89 ml de MSA con una pipeta automática.

15 Colocar en el sistema e iniciar el burbujeo de helio para mezclar y desgasificar la fase.

### 3 Preparación de los patrones y de las muestras

#### Preparación de los patrones:

20

Preparar 3 patrones en un intervalo de concentraciones de Mg<sup>2+</sup> de 1 mg/l a 2,6 mg/l.

		MgSO <sub>4</sub>	HCl 0,01 N	
SM1	Matraz aforado de 100 ml	50 mg	Completar a 100 ml	Agitación magnética
SM2	Matraz aforado de 100 ml	80 mg	Completar a 100 ml	Agitación magnética
SM3	Matraz aforado de 100 ml	130 mg	Completar a 100 ml	Agitación magnética

Preparar las diluciones de las soluciones madre

25

		SMx	HCl 0,01 N
T1	Matraz aforado de 100 ml	1 ml	Completar a 100 ml
T2	Matraz aforado de 100 ml	1 ml	Completar a 100 ml
T3	Matraz aforado de 100 ml	1 ml	Completar a 100 ml

#### Preparación de las muestras

30 Para las formulaciones de micropartículas, vortizar bien inmediatamente antes de tomar la muestra, y mezclar mediante una pipeta automática.

Realizar al menos una dilución adaptando el peso y el volumen de dilución para obtener una concentración de Mg<sup>2+</sup> esperada entre 1 mg/l y 2,6 mg/l. La dilución se realiza en HCl 0,01 N para precipitar el polímero. Proceder si es necesario mediante diluciones sucesivas.

35

Poner en agitación magnética durante al menos 30 min.

Filtrar con 0,45 µm antes de introducirlo en el matraz.

40 Realizar dos preparaciones por muestra.

### 4 Condiciones de la cromatografía iónica

Volumen de inyección	25 µl
Caudal	1 ml/min
Duración del análisis	25 min
Detección	conductividad en µS/min
Eluyente	MSA 30 mM

Temperatura de la columna	40 °C
Supresor	catiónico
Corriente	87 mA

5 *Análisis de los resultados*

5 Determinación de la recta de calibración

La recta de regresión se obtiene teniendo en cuenta todos los patrones de la secuencia. El coeficiente de correlación debe ser > 0,99.

10 La ecuación de la recta es la siguiente:

$$Y = a X + b$$

Siendo

- 15 Y = área del pico de magnesio  
X = concentración de la solución patrón (mg/l)

Determinación del contenido en ion magnesio en las muestras

$$M = \frac{(Y_{ensayo} - b) \times V_d}{a \times P_e}$$

20

$$M = \text{contenido en } Mg^{2+} \text{ (g/l)}$$

- 25 Y<sub>ensayo</sub> = área del pico de magnesio para el ensayo  
a = pendiente de la recta de calibración  
b = ordenada al origen de la recta de calibración  
V<sub>d</sub> = volumen de dilución (ml)  
P<sub>e</sub> = adquisición del ensayo de la muestra (mg)

30 El resultado final es la media de dos ensayos. El coeficiente de variación generalmente aceptado en la cromatografía iónica es del 10 %, pero este se confirma durante la validación del método.

Cálculo del cociente r

35 En el protocolo anterior, los autores han descrito la determinación del contenido en magnesio. Igualmente, han determinado por un método análogo el contenido T de otros cationes multivalentes (Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup>, etc.).

Una vez se ha determinado el valor de M de esta forma, se deduce de este la concentración molar de ion multivalente IM:

40

$$[IM] = \frac{M}{M_{ion}} \text{ donde } M_{ion} \text{ es la masa molecular del ion multivalente en g/mol.}$$

45 Si se conoce la estructura del polímero ionizable, concretamente, su grado de polimerización teórico, DP, su masa molecular teórica M<sub>p</sub> y su índice de injerto hidrófobo (es decir, la fracción α<sub>H</sub> de las funciones modificadas mediante injertos hidrófobos), se puede calcular la concentración molar de grupos ionizables para una concentración C de polímero (expresada en g/l):

$$[GI] = (1 - \alpha_H) \times \frac{C \times DP}{M_p}$$

Entonces, se calcula  $r = n \times \frac{[IM]}{[GI]}$  donde n es la valencia del ion multivalente.

50

Preferentemente, la formulación de acuerdo con la invención se caracteriza por que las partículas micrométricas

tienen una densidad aparente  $d_{ap}$  de polímero, medida en una prueba D descrita a continuación, comprendida entre 0,05 y 1,0, preferentemente entre 0,07 y 0,7, preferentemente entre 0,1 y 0,5.

**Prueba D de medición de la densidad aparente  $d_{ap}$ :**

5 La suspensión de micropartículas de concentración C (mg/g) de polímero PO se homogeneiza mediante agitación magnética. Se toma una muestra de 2 ml de suspensión de micropartículas mediante una micropipeta y se introducen en un tubo de centrifuga cuya tara se ha obtenido previamente. La suspensión de micropartículas  
10 introducida en el tubo se pesa a continuación (masa m en g). El tubo se introduce en una centrifugadora, y se deja centrifugar durante 30 min a 8000 vueltas/min. Se recoge el sobrenadante con precisión con micropipetas adaptadas. Se resta el volumen del sedimento  $V_{sed}$  (en ml):  $V_{sed} = V_{tot} - V_{sob}$   
La densidad aparente  $d_{ap}$  de polímero (en g/cm<sup>3</sup>) viene dada por la fórmula:

$$d_{ap} = \frac{m \times c}{\frac{1000}{V_{sed}}}$$

15 La suspensión de partículas micrométricas cargada de PA permite una prolongación especialmente interesante de la duración de liberación del PA (por ejemplo, proteína terapéutica o péptido) así como una reducción del pico de concentración plasmática.

20 La duración de liberación del PA aumenta de forma notable y significativa con respecto a la de las formulaciones de la técnica anterior, especialmente las descritas en la solicitud WO 05/051416. La prolongación de la duración de liberación del PA *in vivo* inducida por las formulaciones de acuerdo con la invención es incluso más apreciable porque los PA (por ejemplo, proteínas terapéuticas) siguen siendo plenamente bioactivos y no están  
25 desnaturalizados.

De este modo, las formulaciones de acuerdo con la invención tienen por característica funcional ventajosa un aumento de la duración  $T_r$  de liberación de un PA dado, tal como se mide en una prueba L, con respecto a la duración  $t_r$  de liberación medida en la misma prueba L, de una formulación idéntica que no contenga iones multivalentes, siendo este aumento preferentemente tal que  $T_r$  es superior o igual a  $1,1 \times t_r$ , y, más preferentemente  
30 aún tal que  $T_r$  es superior o igual a  $1,5 \times t_r$ .

**Prueba L de medición de la liberación del PA desde las partículas micrométricas de acuerdo con la invención :**

35 Recortar cuadrados de 2 x 2 cm en el absorbente de polipropileno. Preparar la solución de tampón fosfato, designada como PBS, disolviendo 1 comprimido de PBS (Aldrich) en 200 ml de agua. Se obtienen 200 ml de una solución que contiene 0,01 M de tampón fosfato + 0,0027 M de cloruro de potasio y 0,137 M de cloruro de sodio.

40 Preparar la solución tamponada de albúmina bovina a 30 mg/g, designada como BSA, disolviendo 6 g de albúmina de suero bovino, fracción V (SAFC) en 294 g de tampón fosfato PBS anteriormente preparado.

Tomar dos tubos Falcon de 50 ml conteniendo uno de ellos PBS y el otro la solución de BSA para empapar los cuadrados de absorbente, y conservarlos en la nevera.

Introducir 4 o 5 ml de estas soluciones en tubos herméticos que contienen 5 ml (tomar 5 muestras de cada uno de los dos medios). Conservarlos en la nevera.

45 Tras 15 h de espera, poner los tubos de 5 ml que contienen las fases continuas a 37 °C una hora antes.

Empapar los cuadrados durante una hora, 5 en el PBS, 5 en la BSA (o más en caso de problemas durante la inyección) a 37 °C. Inyectar 0,5 ml de formulación en 27G (jeringa de 1 ml) en el centro de cada cuadrado (paralelo a su superficie) previamente repartido ligeramente sobre el papel.

Marcar el lado que ha recibido la inyección.

50 Hacer de igual manera para los 10 cuadrados, que se sumergirán inmediatamente en los medios continuos para sincronizar todas las cinéticas. Colocar los cuadrados de modo que el lugar que ha recibido la inyección se encuentre orientado hacia la parte superior del tubo.

55 Colocar las muestras en un soporte, e introducir el conjunto en una estufa a 37 °C, con agitación. La agitación tiene gran influencia sobre la cinética de liberación, y se deba controlar: agitación en 40 y 9 cm entre las dos barras de bloqueo.

Se toman 100 µl de la fase continua a diferentes tiempos.

*Determinación de la dosis de proteína mediante cromatografía en fase líquida HPLC*

60 Se utilizan dos fases eluyentes:

- Fase A: 1260 ml de agua / 680 ml de acetonitrilo / 60 ml de THF / 1,8 ml de TFA

- Fase B: 630 ml de acetonitrilo / 340 ml de agua / 30 ml de THF / 0,8 ml de TFA

La tabla siguiente resume las condiciones de la HPLC

Instrumento	Agilent 1100 provisto de: - Un pasamuestras automatizado refrigerado - Un detector de UV y FLD - Un integrador automático		
Columna	Keystone BetaBasic-18 - 4,6 x 150 mm - 3 $\mu$ m - tamaño de poros 150 Å		
Gradiente	Tiempo (min)	%A	%B
	0	100	0
	15	50	50
	35	10	90
	36	100	0
	40	100	0
Tiempo de análisis	40 min (+ 20 min de lavado entre las inyecciones)		
Caudal	1,5 ml/min		
Temperatura de la columna	38 °C		
Temperatura de las muestras	Refrigerado (4 °C)		
Volumen de inyección	100 $\mu$ l		
Detección	Absorbancia UV a 280 nm Fluorescencia a: - 296 nm (excitación) - 330 nm (emisión)		

5

A continuación se traza la concentración de proteína en el medio continuo en función del tiempo.

Sobre esta curva se lee la cantidad total de proteína liberada cuando la curva alcanza una meseta: este valor debe representar al menos un 40 % de la proteína introducida inicialmente para que la prueba sea válida. A continuación se lee en dicha curva el tiempo señalado como  $T_r$  que es el necesario para liberar el 50 % del PA introducido.

10

De acuerdo con una característica preferida, la formulación farmacéutica líquida de acuerdo con la invención se caracteriza por que las partículas micrométricas de la suspensión se pueden obtener espontáneamente en un líquido acuoso mediante adición, a una suspensión de nanopartículas de polímero PO y, en su caso, un PA, de una sal que contiene iones multivalentes, preferentemente iones divalentes, de polaridad opuesta a la de los grupos GI del polímero PO.

15

De acuerdo con una realización preferida, la formulación de acuerdo con la invención comprende un PA asociado a micropartículas de PO.

20

Esta formulación tiene la ventaja de poderse inyectar por vía parenteral y de ser líquida en las condiciones de inyección.

De acuerdo con la invención, los calificativos "líquido", "viscosidad baja" o "viscosidad muy baja" corresponden, ventajosamente, a una viscosidad dinámica a 20 °C menor o igual a 1000 mPa.s. Preferentemente, la viscosidad dinámica de la formulación, medida a 20 °C, para un gradiente de cizallamiento de 1000  $s^{-1}$ , es preferentemente menor o igual a 500 mPa.s., preferentemente comprendida entre 2 y 200 mPa.s, por ejemplo, comprendida entre 1,0 y 100 mPa.s, es decir, entre 1,0 y 50 mPa.s.

25

### 30 **Medida de la viscosidad dinámica**

La medida de referencia para la viscosidad dinámica se puede realizar, por ejemplo, a 20 °C mediante un reómetro AR1000 (TA Instruments) provisto de una geometría cono-plano (4 cm, 2°). La viscosidad  $v$  se mide con un gradiente de cizallamiento de 1000  $s^{-1}$ .

35

Esta baja viscosidad hace que las formulaciones de la invención se puedan inyectar fácilmente por vía parenteral, en particular por vía mucosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, intraperitoneal, intracerebral o en un tumor, entre otras.

40

La formulación de acuerdo con la invención también se puede administrar por vía oral, nasal, pulmonar, vaginal, ocular o bucal.

Este estado líquido o esta baja viscosidad de las formulaciones de la invención también se encuentra a las temperaturas de inyección correspondientes a las temperaturas ambiente, por ejemplo, comprendidas entre 4 y 30 °C, como la temperatura fisiológica.

5 Los polímeros PO utilizados en la invención son polímeros biodegradables, hidrosolubles y que contienen grupos hidrófobos GH y grupos ionizables GI. Los grupos hidrófobos pueden tener un número reducido con respecto al resto de la cadena, y se pueden situar de forma lateral a la cadena o intercalarse en la cadena, y estar distribuidos de forma aleatoria (copolímero estadístico) o distribuidos en forma de secuencias o injertos (copolímeros de bloque o copolímeros de secuencia).

10 De acuerdo con un modo preferido de realización de la invención, los grupos hidrófobos GH se sitúan lateralmente con respecto a la cadena.

De acuerdo con la invención, PO se selecciona entre los (co)poliaminoácidos anfífilos.

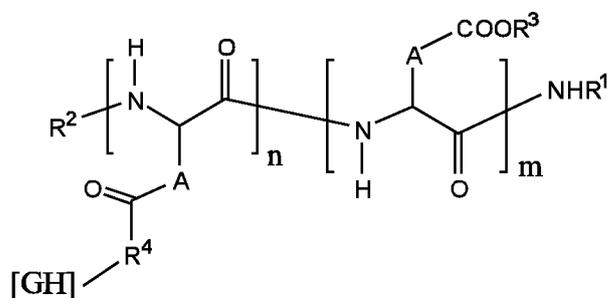
15 En el sentido de la invención, y en la totalidad de la memoria descriptiva, el término "poliaminoácido" abarca tanto los poliaminoácidos naturales como los poliaminoácidos sintéticos, así como los oligoaminoácidos que comprenden de 10 a 20 restos de aminoácido en la misma cantidad que los poliaminoácidos que comprenden más de 20 restos.

20 Preferentemente, los poliaminoácidos utilizados en la presente invención son oligómeros u homopolímeros que comprenden restos recurrentes de ácido glutámico o aspártico o copolímeros que comprenden una mezcla de estos dos tipos de restos de aminoácido. Los restos considerados en estos polímeros son los de los aminoácidos que tienen la configuración D, L o D/L, y están enlazados en sus posiciones alfa o gamma por el resto glutamato o glutámico y alfa o beta para el resto aspártico o aspartato.

25 Los restos preferidos de la cadena de poliaminoácido principal son los que tienen la configuración L y un enlace de tipo alfa.

De acuerdo con la invención, PO es un poliaminoácido formado por restos de aspártico o restos de glutámico, siendo al menos una parte de estos restos portadores de injertos que incluyen al menos un grupo hidrófobo GH. Estos poliaminoácidos son especialmente del tipo de los descritos en la solicitud de patente PCT WO-A-00/30618.

30 De acuerdo con una primera posibilidad, el (o los) PO de la formulación se definen por la fórmula general (I) siguiente:



(I)

35

en la que:

40 ■ R<sup>1</sup> representa un H, un alquilo lineal C2 a C10 o ramificado C3 a C10, un radical bencilo, un resto aminoácido del extremo, o -R<sup>4</sup>-[GH];

■ R<sup>2</sup> representa un H, un grupo acilo lineal C2 a C10 o ramificado C3 a C10, un piroglutamato o -R<sup>4</sup>-[GH];

■ R<sup>3</sup> es un H o una entidad catiónica, preferentemente seleccionada entre el grupo que comprende:

45 - los cationes metálicos ventajosamente seleccionados entre el subgrupo que comprende: sodio, potasio, calcio, magnesio,

- cationes orgánicos ventajosamente seleccionados entre el subgrupo que comprende:

50 • cationes a base de amina,  
 • cationes a base de oligoamina,  
 • cationes a base de poliamina (siendo polietilenimina especialmente preferida),  
 • cationes a base de aminoácido(s) ventajosamente seleccionados en la clase que comprende los cationes a base de lisina o arginina,

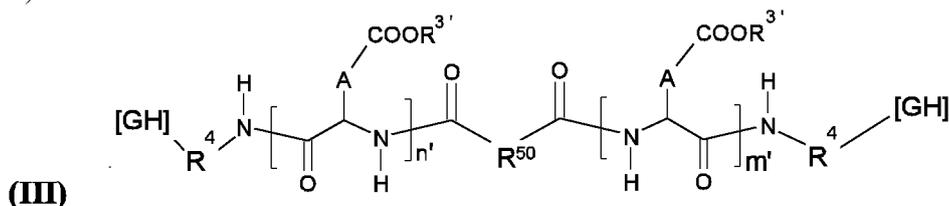
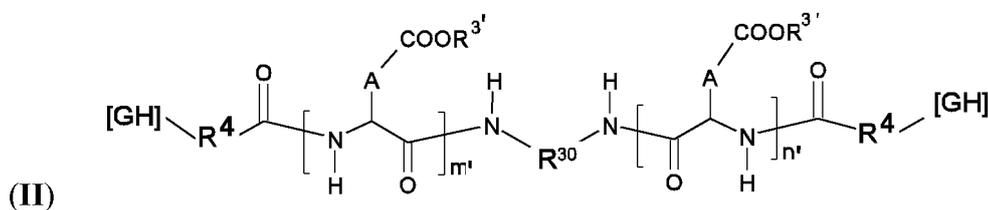
- o los poliaminoácidos catiónicos ventajosamente seleccionados entre el subgrupo que comprende polilisina u

oligolisina;

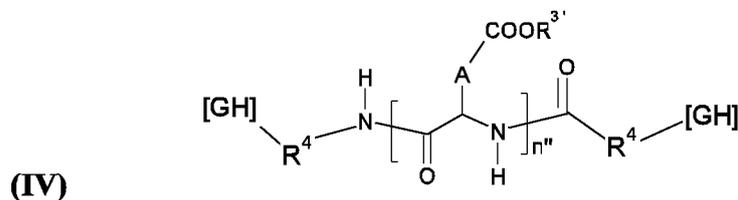
- $R^4$  representa un enlace directo o un separador basado en de 1 a 4 restos aminoácidos;
- A representa independientemente una radical  $-CH_2-$  (resto aspártico) o  $-CH_2-CH_2-$  (resto glutámico);
- 5 ■  $n/(n+m)$  se define como el índice de injerto molar, y su valor es lo suficientemente bajo como para que el  $\text{PO}$  se disuelva en agua a  $\text{pH} = 7$  y  $25^\circ\text{C}$ , forma una suspensión coloidal de partículas submicrométricas de  $\text{PO}$ , preferentemente  $n/(n+m)$  está comprendido entre 1 y 25 % molar y aún mejor entre 1 y 15 % molar;
- $(n+m)$  se define como el grado de polimerización y está comprendido de 10 a 1000, preferentemente entre 50 y 300;
- 10 ■ GH representa un grupo hidrófobo.

En una forma preferida de realización de la invención, la formulación se caracteriza por que el grupo hidrófobo GH procede de un precursor alcohólico seleccionado entre el grupo que comprende: octanol, dodecanol, tetradecanol, hexadecanol, octadecanol, alcohol oleílico, tocoferol o colesterol y por que  $R^4$  representa un enlace directo.

15 De acuerdo con una segunda posibilidad, el (o los) PO de la formulación responde(n) a una de las fórmulas generales (II), (III) y (IV) siguientes:



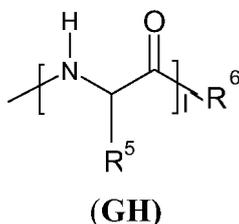
20



en las que:

- 25 ■ GH representa un grupo hidrófobo;
- $R^{30}$  es un grupo alquilo lineal C2 a C6;
- $R^{31}$  es un H o una entidad catiónica, preferentemente seleccionada entre el grupo que comprende:
  - 30 - los cationes metálicos ventajosamente seleccionados entre el subgrupo que comprende: sodio, potasio, calcio, magnesio,
  - cationes orgánicos ventajosamente seleccionados entre el subgrupo que comprende:
    - 35 • cationes a base de amina,
    - cationes a base de oligoamina,
    - cationes a base de poliamina (siendo polietilenimina especialmente preferida),
    - cationes a base de aminoácido(s) ventajosamente seleccionados en la clase que comprende los cationes a base de lisina o arginina,
  - 40 - o los poliaminoácidos catiónicos ventajosamente seleccionados entre el subgrupo que comprende polilisina u oligolisina,
- 45 ■  $R^{50}$  es un grupo alquilo, dialcoxi o diamina C2 a C6;
- $R^4$  representa un enlace directo o un separador basado en de 1 a 4 restos aminoácidos;
- A representa independientemente un radical  $-CH_2-$  (resto aspártico) o  $-CH_2-CH_2-$  (resto glutámico);
- $(n' + m')$  y  $n''$  se definen como el grado de polimerización, y están comprendidos de 10 a 1000, preferentemente entre 50 y 300.

Ventajosamente, los n grupos GH del O representan, cada uno independientemente de los demás, un radical monovalente de la siguiente fórmula:



5 en la que:

- R<sup>5</sup> representa un radical metilo (alanina), isopropilo (valina), isobutilo (leucina), secbutilo (isoleucina), bencilo (fenilalanina);
- 10 - R<sup>6</sup> representa un radical hidrófobo que comprende de 6 a 30 átomos de carbono;
- 1 está comprendido de 0 a 6.

De acuerdo con una característica notable de la invención, todo o parte de los grupos hidrófobos R<sup>6</sup> de los PO se seleccionan de forma independiente, entre el grupo de radicales que comprenden:

- 15 ■ un alcoxi lineal o ramificado que comprende de 6 a 30 átomos de carbono y que puede incluir al menos un heteroátomo (preferentemente O, N o S) donde al menos una insaturación,
- un alcoxi que comprende de 6 a 30 átomos de carbono y que tiene uno o varios carbociclos condensados y que contiene, en su caso, al menos una insaturación o al menos un heteroátomo (preferentemente O, N o S),
- 20 ■ un alcoxiarilo o un ariloxialquilo de 7 a 30 átomos de carbono y que puede incluir al menos una insaturación o al menos un heteroátomo (preferentemente O, N o S).

En la práctica, y sin que esto constituya una limitación, el radical hidrófobo R<sup>6</sup> del injerto del PO procede de un precursor alcohólico seleccionado entre el grupo que comprende: octanol, dodecanol, tetradecanol, hexadecanol, octadecanol, alcohol oleílico, tocoferol o colesterol.

Ventajosamente, la cadena principal del poliaminoácido es:

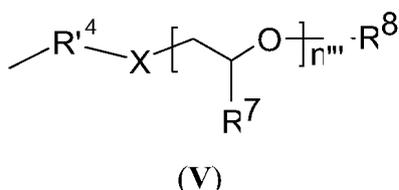
- 30 ► un homopolímero de alfa-L-glutamato o de alfa-L-glutámico;
- un homopolímero de alfa-L-aspartato de alfa-L-aspártico
- o un copolímero de alfa-L-aspartato/alfa-L-glutamato o de alfa-L-aspártico/alfa-L-glutámico.

De forma notable, la distribución de los restos aspártico y/o glutámico de la cadena de poliaminoácido principal del PO es tal que el polímero así constituido sea bien aleatorio, bien de tipo bloque, bien de tipo multibloque.

De acuerdo con otro modo de definición, el PO aplicado en la formulación de acuerdo con la invención tiene una masa molar comprendida entre 2 000 y 100 000 g/mol, y preferentemente entre 5 000 y 40 000 g/mol.

Según una variante, el PO de la formulación de acuerdo con la invención trasporta al menos un injerto del tipo polialquilenglicol unido a un resto glutamato o aspartato.

Ventajosamente, este injerto es del tipo polialquilenglicol y de la fórmula (V) siguiente.



45 en la que:

- R<sup>14</sup> representa un enlace directo o un separador basado en de 1 a 4 restos aminoácidos;
- X es un heteroátomo seleccionado entre el grupo que incluye oxígeno, nitrógeno o azufre;
- 50 - R<sup>7</sup> e R<sup>8</sup> representan independientemente un H, un alquilo lineal C1 a C4;
- n''' está comprendido de 10 a 1000, preferentemente de 50 a 300.

En la práctica, el polialquilenglicol es, por ejemplo, un polietilenglicol.

Es deseable, de acuerdo con la invención, que el porcentaje molar de injerto del polialquilenglicol esté comprendido de 1 a 30 %.

- 5 Los poliaminoácidos PO son además muy interesantes debido a que tienen un índice de injerto ajustable, se dispersan en el agua a pH = 7,4 (por ejemplo, con un tampón fosfato) para proporcionar suspensiones coloidales.

Además, PA tales como proteínas, péptidos o moléculas pequeñas, pueden asociarse espontáneamente a las nanopartículas que contienen estos poliaminoácidos PO.

- 10 Es necesario entender que los PO contienen funciones ionizables que son, dependiendo del pH y de la composición, bien neutras (por ejemplo, COOH), bien iónicas (por ejemplo, COO<sup>-</sup>). Por ello, la solubilidad en una fase acuosa es una función directa del índice de funciones ionizadas y, por tanto, del pH. En solución acuosa, en el caso de funciones carboxílicas, el contraion puede ser un catión metálico como el sodio, calcio o magnesio, o un catión orgánico tal como trietanolamina, tris(hidroximetil)-aminometano o una poliamina como polietilenimina.

- 15 Los PO de tipo poliaminoácido utilizados en la formulación de la invención, por ejemplo, se obtienen por métodos conocidos por el experto en la materia. Los poliaminoácidos estadísticos se pueden obtener mediante injertado de un injerto hidrófobo, previamente funcionalizado con el espaciador, directamente sobre el polímero mediante una reacción de acoplamiento clásica. Los PO poliaminoácidos de bloques o multibloques se pueden obtener mediante polimerización secuencial de los anhídridos de N-carboxi-aminoácido (NCA) correspondientes.

- 20 Por ejemplo, se prepara un poliaminoácido, homopoliglutamato, homopoliaspartato, o un copolímero de glutamato/aspartato, bloque, multibloque o aleatorio, de acuerdo con los métodos clásicos.

- 25 Para la obtención de un poliaminoácido de tipo alfa, la técnica más habitual está basada en la polimerización de anhídridos de N-carboxi-aminoácidos (NCA), descrita, por ejemplo, en el artículo *Biopolimers*, 1976, 15, 1869 y en la obra de H.R. Kricheldorf "*alpha-Aminoacid-N-carboxi Anhydrides and relate Heterocycles*" Springer Verlag (1987). Los derivados de NCA son, preferentemente, derivados NCA-O-Me, NCA-O-Et o NCA-O-Bz (Me = metilo, Et = etilo y Bz = bencilo). A continuación, los polímeros se hidrolizan en las condiciones adecuadas para obtener el polímero en su forma ácida. Estos métodos están inspirados en la descripción proporcionada en la patente FR-A-2 801 226 del solicitante. Una serie de polímeros de utilidad de acuerdo con la invención, por ejemplo, de tipo poli(alfa-L-aspartico), poli(alfa-L-glutámico), poli(alfa-D-glutámico) y poli(gamma-L-glutámico) de masas variables están comercialmente disponibles. El poliaspartico de tipo alfa-beta se obtiene por condensación del ácido aspártico (para obtener una polisuccinimida) seguido de hidrólisis básica (véase Tomida et al. *Polymer* 1997, 38, 4733-36).

- 30 El acoplamiento del injerto con una función ácido del polímero se lleva a cabo fácilmente mediante reacción del poliaminoácido en presencia de una carbodiimida como agente de acoplamiento y, opcionalmente, un catalizador tal como 4-dimetilaminopiridina y en un disolvente adecuado tal como dimetilformamida (DMF), N-metil pirrolidona (NMP) o dimetilsulfóxido (DMSO). La carbodiimida es, por ejemplo, dicitohexilcarbodiimida o diisopropilcarbodiimida. El índice de injerto se controla químicamente según la estequiometría de los componentes y reactivos o el tiempo de reacción. Los injertos hidrófobos funcionalizados con un espaciador se obtienen mediante acoplamiento peptídico clásico o mediante condensación directa con catálisis ácida. Estas técnicas son bien conocidas del experto en la técnica.

- 45 Para la síntesis de copolímeros bloque o multibloque, se utilizan derivados de NCA previamente sintetizados con el injerto hidrófobo. Por ejemplo, el derivado NCA-hidrófobo se copolimeriza con el CA-O-Bz, después, los radicales bencilo se eliminan selectivamente mediante hidrólisis.

- 50 Las formulaciones de acuerdo con la invención, en la realización preferida donde incluyen al menos un PA, son el resultado de la asociación no covalente de nanopartículas a base de PO y de al menos un PA, en un medio líquido acuoso.

- 55 Para la preparación, el PO o el PA pueden estar en forma sólida (preferentemente pulverulenta) o en forma líquida (preferentemente una suspensión acuosa coloidal).

- 60 La asociación PA/PO significa, en el sentido de la presente memoria, que el (o los) PA está(n) asociado(s) a el(los) polímero(s) PO [por ejemplo, uno o varios poliaminoácido(s)] mediante uno o varios enlaces diferente(s) de uno (o de varios) enlace(s) químico(s) covalente(s).

- 65 Las técnicas de asociación de uno o varios PA a los PO de acuerdo con la invención, se describen especialmente en la solicitud de patente PCT WO-A-00/30618. Consisten en incorporar al menos un PA en el medio líquido que contiene nanopartículas de PO, de forma que se obtenga una suspensión coloidal de nanopartículas cargadas en, o asociadas, con uno o varios PA.

En el sentido de la invención, la expresión "iones multivalentes" designa iones divalentes, iones trivalentes, iones

tetravalentes, y mezclas de estos iones.

Cuando el PO tiene grupos GI aniónicos, los iones multivalentes son cationes multivalentes, preferentemente cationes divalentes, más preferentemente aún seleccionados entre el grupo que comprende:  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ , o sus mezclas, y/o cationes trivalentes, más preferentemente aún seleccionados entre el grupo que comprende:  $Al^{3+}$ ,  $Fe^{3+}$  o sus mezclas.

Es posible que, además de los iones multivalentes, la formulación de acuerdo con la invención contenga iones (por ejemplo, cationes) monovalentes, posiblemente activos en la agregación de nanopartículas en micropartículas.

Estos iones multivalentes se introducen en la formulación de la invención preferentemente en forma de una solución salina (orgánica o inorgánica) acuosa, por ejemplo, una solución de sulfato, cloruro, acetato, gluconato o glutamato (u otro aminoácido aniónico) de cationes multivalentes.

Para mejorar su estabilidad, es preferible que la formulación incluya al menos un estabilizante seleccionado entre el grupo que comprende:

→ nanopartículas de al menos un polímero PO, siendo PO un copolímero anfílico, biodegradable, hidrosoluble y que contiene grupos hidrófobos (GH) y grupos hidrófilos ionizables (GI), al menos parcialmente ionizados, y que forman espontáneamente en agua una suspensión coloidal de nanopartículas, a pH = 7,0, en condiciones isotónicas,

→ polialquilenglicoles, preferentemente los polietilenglicoles;

→ copolialquilenglicoles, preferentemente los copolímeros de etilenglicol-propilenglicol (de tipo Poloxamer o Pluronic o Lutrol);

→ polímeros celulósicos y sus derivados, preferentemente carboxialquilcelulosas (por ejemplo, carboximetilcelulosas) o alquilcelulosas (por ejemplo, metilcelulosas);

→ ésteres de sorbitán y ácido(s) grasos, preferentemente, los ésteres de polioxialquilen (por ejemplo, etilen) glicol y al menos un ácido (por ejemplo, ácido oleico), de tipo Tween o Polysorbate;

→ tensioactivos a base de fosfolípidos y polialquilenglicoles, preferentemente de polietilenglicoles;

→ sacáridos, hidrogenados o no hidrogenados, como trehalosa, sorbitol, manitol, sacarosa;

→ polioles tales como propilenglicol o glicerol;

→ gelatinas preferentemente hidrolizadas;

→ (co)polímeros nitrogenados, preferentemente del grupo que comprende poliacrilamidas, poli-N-vinilamidas, polivinilpirrolidonas (PVP) y poli-N-vinil-lactamas;

→ alcoholes polivinílicos (APV);

→ y sus mezclas.

Uno de los estabilizantes preferidos de acuerdo con la invención está formado por nanopartículas de al menos un polímero PO, idéntico (preferentemente) o diferente del que compone las micropartículas.

La cantidad de estabilizante aplicada en la formulación está preferentemente comprendida entre 0,01 y 10 % en peso, y más preferentemente entre 0,1 y 5 % en peso. Si se trata de estabilizantes que comprenden nanopartículas, se utilizan ventajosamente en la formulación en cantidad del 1,5 al 3,5 % en peso, por ejemplo, de 2,0 a 3,0 (≈ 2,5) % en peso.

En lo que respecta al PA, preferentemente se selecciona entre el grupo que comprende: proteínas, glicoproteínas, proteínas unidas a una o varias cadenas de polialquilenglicol [preferentemente polietilenglicol (PEG): "proteínas PEGiladas"], péptidos, polisacáridos, lipopolisacáridos, oligonucleótidos, polinucleótidos y sus mezclas, y, más preferentemente aún, del subgrupo de eritropoyetina, oxitocina, vasopresina, hormona adrenocorticotropa, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento plaquetario (PDGF), factores de crecimiento hematopoyéticos y sus mezclas, factores VIII y IX, hemoglobinas, citocromos, albúminas, prolactina, hormona de liberación de la hormona luteinizante (LHRH), antagonistas de la LHRH, agonistas de la LHRH, hormonas del crecimiento (GH) humana, porcina u bovina, hormona de liberación de la hormona del crecimiento, insulina, somatostatina, glucagón, interleuquinas o sus mezclas (IL-2, IL-11, IL-12), interferones  $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\gamma$ , gastrina, tetragastrina, pentagastrina, urogastrona, secretina, calcitonina, encefalinas, endorfinas, angiotensinas, hormona de liberación de la tirotropina (TRH), factores de necrosis tumoral (TNF), factores neurotróficos (NGF), factor de crecimiento granulocitario (G-CSF), factor de crecimiento de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor de crecimiento de macrófagos (M-CSF), heparinas, proteína morfogenética ósea (BMP), péptido auricular natriurético (hANP), péptido 1 análogo al glucagón (GLP-1), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), antígeno recombinante de la hepatitis B (rHB), renina, citoquinas, bradiquinina, bacitracinas, polimixinas, colistinas, tirocidina, gramicidinas, ciclosporinas y análogos sintéticos, modificaciones y fragmentos farmacéuticamente activos de enzimas, de citoquinas, de anticuerpos, de antígenos y de vacunas.

Según una variante, el PA es una molécula pequeña orgánica hidrófoba, hidrófila o anfílica del tipo de las que pertenecen a la familia de las antraciclinas, de los taxoides o de las camptotecinas, o del tipo de las que pertenecen a la familia de los péptidos tales como la leuprolida o ciclosporina y sus mezclas.

En el sentido de la presente memoria, una molécula pequeña es especialmente una molécula pequeña no proteínica, por ejemplo, exenta de aminoácidos.

Según otra variante, el PA se selecciona ventajosamente entre al menos una de las familias de las siguientes sustancias activas: agentes de tratamiento de la alcoholemia, agentes de tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, anestésicos, agentes de tratamiento de la acromegalia, analgésicos, antiasmáticos, agentes de tratamiento de alergias, agentes antineoplásicos, antiinflamatorios, anticoagulantes y antitrombóticos, anticonvulsivos, antiepilépticos, antidiabéticos, antieméticos, antiglaucomas, antihistamínicos, antiinfecciosos, antibióticos, antifúngicos, antivirales, antiparkinsonianos, anticolinérgicos, antitusivos, inhibidores de la anhidrasa carbónica, agentes cardiovasculares, hipolipidémicos, antiarrítmicos, vasodilatadores, antianginosos, antihipertensivos, vasoprotectores, inhibidores de colinesterasa, agentes de tratamiento de trastornos del sistema nervioso central, estimulantes del sistema nervioso central, anticonceptivos, estimulantes de la fecundidad, inductores e inhibidores de las contracciones uterinas, agentes de tratamiento de la fibrosis quística, agonistas de los receptores de dopamina, agentes de tratamiento de la endometriosis, agentes de tratamiento de las disfunciones eréctiles, agentes de tratamiento de la fertilidad, agentes de tratamiento de los problemas gastrointestinales, inmunomoduladores e inmunosupresores, agentes de tratamiento de los problemas de la memoria, antimigrañosos, relajantes musculares, análogos de nucleósidos, agentes de tratamiento de la osteoporosis, parasimpaticomiméticos, prostaglandinas, agentes psicoterapéuticos, sedantes, hipnóticos y tranquilizantes, neurolépticos, ansiolíticos, psicoestimulantes, antidepresivos, agentes de tratamiento dermatológico, esteroides y hormonas, anfetaminas, anoréxicos, medicación contra el dolor sin analgésicos, antiepilépticos, barbitúricos, benzodiacepinas, hipnóticos, laxantes, psicótropos y todas las asociaciones de estos productos.

Desde el punto de vista cuantitativo, es especialmente interesante que la fracción másica del PA no asociado a las partículas micrométricas [PA no asociado] en % en peso sea tal que:

- [PA no asociado] < 1
- preferentemente [PA no asociado] < 0,5.

Según una variante, el PA puede ser la hormona del crecimiento humano recombinante hGH, cuya dosis, por ejemplo, está comprendida entre 0,2 y 2 mg/kg, y preferentemente entre 0,5 y 1 mg/kg.

Según otra variante, el PA puede ser insulina, cuya dosis, por ejemplo, está comprendida entre 0,2 y 2 UI/kg, y preferentemente entre 0,5 y 1 UI/kg.

Según otra variante, el PA puede ser el interferón  $\alpha$ -2b, cuya dosis, por ejemplo, está comprendida entre 20 y 100  $\mu$ g/kg, y preferentemente entre 40 y 80 mg/kg.

Ventajosamente, la formulación de acuerdo con la invención está destinada a la preparación de medicamentos, especialmente para su administración parenteral, mucosa, subcutánea, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, intracerebral o intratumoral, incluso por vía oral, nasal, pulmonar, vaginal u ocular.

De acuerdo con otro de sus aspectos, la invención tiene por objeto un procedimiento de preparación de la formulación anteriormente indicada.

Este procedimiento de preparación de la formulación está caracterizado por que consiste esencialmente en:

- a. aplicar o preparar una suspensión coloidal de nanopartículas de al menos un PO;
- b. opcionalmente, mezclar esta suspensión coloidal de nanopartículas de PO con al menos un PA, preferentemente en solución acuosa;
- c. opcionalmente, filtrar la suspensión así obtenida;
- d. añadir iones multivalentes (preferentemente en forma de una o varias sales) de polaridad opuesta a la de los grupos GI del polímero PO, añadiéndose dichos iones multivalentes en una cantidad tal que la relación r, según

la fórmula  $r = n \times \frac{[IM]}{[GI]}$ , donde:

- n es la valencia de dichos iones multivalentes,
- [IM] es la concentración molar de iones multivalentes,
- [GI] es la concentración molar de grupos ionizables GI,

está comprendida entre 0,3 y 10, preferentemente entre 0,6 y 5,0 y, más preferentemente aún, entre 0,8 y 3,0;

- e. según necesidad, ajustar el pH o la osmolaridad (por ejemplo, mediante diafiltración).

La preparación de las formulaciones líquidas de acuerdo con la invención se lleva a cabo ventajosamente a temperatura ambiente (25 °C por ejemplo).

Se pueden teorizar diferentes modos de asociación del PA a las micropartículas (*vide supra*). Es ventajoso que el PA esté asociado a las nanopartículas destinadas a constituir las micropartículas por agregación. También es posible asociar el PA directamente a las micropartículas. Ambos métodos de asociación se pueden combinar.

5 Mediante la asociación a las nanopartículas o las micropartículas, el PA se encuentra ventajosamente en forma de suspensión o solución acuosa para su mezcla con la suspensión coloidal de nanopartículas o de micropartículas de PO. Según una variante, el PA en forma sólida se podría incorporar y posteriormente mezclarse con la suspensión de nanopartículas o de micropartículas.

10 La presente invención se refiere también a productos sólidos, derivados de las nanopartículas y de las micropartículas de PO contenido en la formulación de acuerdo con la invención. En la práctica, estos productos derivados pueden estar normalmente compuestos por polvo, geles, implantes o películas, entre otros.

15 De este modo, la invención se refiere a productos derivados de la formulación de acuerdo con la invención, tomados como tales, independientemente de su procedimiento de obtención. El producto derivado en cuestión se caracteriza por que se encuentra en forma no líquida y por que comprende partículas micrométricas de polímero (PO),

i. el polímero PO

20 - que es un copolímero anfífilico, biodegradable, hidrosoluble, donde dicho copolímero es un poliaminoácido cuya cadena principal está formada por restos de aspártico o de restos de glutámico, siendo al menos una parte de estos restos portadores de grupos hidrófobos (GH) y de grupos hidrófilos ionizables (GI),  
 - y que forman espontáneamente en agua una suspensión coloidal de nanopartículas en el agua, a pH = 7,0, en condiciones isotónicas,

25 ii. siendo dichas partículas adecuadas para asociarse espontáneamente de manera no covalente con al menos un PA, a pH = 7,0, en condiciones isotónicas;

30 teniendo estas partículas micrométricas de PO un tamaño, medido en una prueba T, comprendido entre 1 y 70  $\mu\text{m}$ , preferentemente entre 2 y 40  $\mu\text{m}$ ;  
 y por que contiene derivados de iones multivalentes, preferentemente de iones divalentes, de polaridad opuesta a la de los grupos GI del polímero, la relación r,

según la fórmula  $r = n \times \frac{[IM]}{[GI]}$ , donde:

35 - n es la valencia de dichos iones multivalentes,  
 - [IM] es la concentración molar de iones multivalentes,  
 - [GI] es la concentración molar de grupos ionizables GI,

40 estando comprendidas entre 0,3 y 10, preferentemente entre 0,6 y 5,0 y, más preferentemente aún, entre 0,8 y 3,0.

Este producto derivado puede, por ejemplo, estar constituido por un polvo o por un gel.

45 La presente invención se refiere también a estos productos derivados de la formulación de acuerdo con la invención como productos intermedios procedentes de la preparación de la formulación de acuerdo con la invención. Esta última también se refiere, por tanto, a un procedimiento de preparación de al menos uno de estos productos derivados. Este procedimiento está caracterizado por que consiste esencialmente en secar la suspensión de partículas micrométricas, de forma que se obtenga una forma sólida, preferentemente un polvo de partículas micrométricas, adecuado para almacenarse o administrarse.

50 Dichos productos derivados dan lugar a otra forma de preparación de la formulación de acuerdo con la invención. El procedimiento de acuerdo con esta forma está caracterizado por que consiste esencialmente en:

55 - aplicar al menos un producto derivado obtenido según un procedimiento tal como se ha definido anteriormente,  
 - y mezclar este producto derivado con agua o una solución acuosa S de reconstitución.

En este último caso, la formulación farmacéutica líquida se reconstituye inmediatamente por mezcla del producto derivado sólido (por ejemplo, un polvo) con agua o S antes de la inyección.

60 Por ejemplo, S puede incluir una solución acuosa. Puede tratarse simplemente de agua para preparaciones inyectables. S puede contener además, opcionalmente:

- al menos un tampón o al menos un sal inyectable (tampón fosfato, tampón citrato, cloruro de sodio) de concentración por ejemplo, entre 0,001 M y 0,1 M, preferentemente entre 0,005 M y 0,02 M, permitiendo este tampón o sal inyectable ajustar el pH de la solución;

- al menos un tensioactivo inyectable, preferentemente del tipo polisorbato como los Tween® 20 y Tween® 80 o de tipo poloxámero como lutrol® F38, lutrol® F68 o lutrol® F127 en concentraciones comprendidas, por ejemplo, entre 0,01 % y 2 %, preferentemente entre 0,05 y 0,5 %.

5 S puede contener además agentes densificantes tales como sacáridos, es decir sacarosa, D-manitol o trehalosa en concentraciones comprendidas entre 0,1 % y 10 %, preferentemente entre el 0,5 y el 5 %. La solución de reconstitución también puede incluir un polímero viscosificante inyectable seleccionado entre el grupo que comprende polisacáridos, polímeros sintéticos (por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica), poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, polialquilenglicoles (por ejemplo, polietilenglicoles) y sus mezclas.

10 De manera más general, los excipientes que se pueden añadir a la formulación de acuerdo con la invención, son, por ejemplo, antimicrobianos, tampones, antioxidantes, agentes para ajustar la isotonicidad conocidos del experto en la materia. Por ejemplo, se puede consultar la obra: *Injectable Drug Development*, P.K. Gupta et al., Interpharm Press, Denver, Colorado, 1999.

15 De acuerdo con la invención, se puede prever la esterilización mediante filtración con filtros de porosidad igual, por ejemplo, a 0,2 µm, de la suspensión líquida de nanopartículas de la que se obtienen las partículas micrométricas de la formulación de acuerdo con la invención. La agregación en condiciones estériles siguiendo las formas de preparación anteriormente descritas permiten inyectar, por tanto, la formulación directamente a un paciente.

20 Entre las cualidades primordiales de la formulación de acuerdo con la invención se encuentra su capacidad de liberar de forma prolongada el PA durante un periodo de tiempo superior al obtenido con una suspensión coloidal de nanopartículas del mismo polímero, administrada al mismo pH, de la misma concentración de proteína como polímero.

25 La presente invención tiene también por objeto un procedimiento de preparación de medicamentos, especialmente para su administración parenteral, mucosa, subcutánea, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, intracerebral o intratumoral, incluso por vía oral, nasal, pulmonar, vaginal u ocular, caracterizado por que consiste esencialmente en aplicar al menos una formulación como la anteriormente definida *per se* o una formulación obtenida según el procedimiento también anteriormente definido, o cualquier producto derivado o cualquier precursor de dicha formulación.

30 Aunque la formulación de acuerdo con la invención sea preferentemente farmacéutica, esto no excluye, por tanto, las formulaciones cosméticas, dietéticas o fitosanitarias que comprendan al menos un PO como se ha definido anteriormente y al menos un PA.

35 La formulación como se ha definido en la presente memoria descriptiva se puede administrar por vía parenteral, mucosa, subcutánea, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, intracerebral o en un tumor, incluso por vía oral, nasal, pulmonar, vaginal u ocular.

40 La formulación como se ha descrito anteriormente puede administrarse especialmente mediante inyección parenteral, subcutánea, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, intracerebral o intratumoral, preferentemente de manera que forme un depósito en el sitio de inyección.

45 La invención se comprenderá mejor, y sus ventajas y variantes de aplicación se apreciarán bien en los ejemplos siguientes que describen la síntesis de los PO formados con poliaminoácidos injertados con un grupo hidrófobo, su transformación en un sistema de liberación prolongada de PA, es decir, en una formulación de acuerdo con la invención (suspensión coloidal acuosa estable) y la demostración de la capacidad de un sistema de ese tipo no solamente para asociarse a una proteína terapéutica, sino sobre todo para gelificar/reticular para liberar de forma muy prolongada *in vivo* la proteína terapéutica.

50

### Descripción de las figuras

55 La Figura única es una curva que proporciona la liberación de la hormona del crecimiento humano [hGH en % con respecto a la concentración total inyectada] en función del tiempo [t en minutos] en la prueba L porque está incluida en nanopartículas de PO [■ nanopartículas 23 mg/g] o micropartículas de PO [♦ micropartículas 73 mg/g] preparadas según el ejemplo 8.

### Descripción detallada de la invención

60

#### Ejemplos:

#### Ejemplo 1: Polímero anfifílico PO

65 Síntesis de un poliglutamato injertado con alfa-tocoferol de origen sintético

Se disuelven 15 g de un ácido alfa-L-poliglutámico (de masa equivalente a aproximadamente 16 900 Da con respecto a un patrón de polioxietileno obtenido mediante polimerización de NCAGluOMe seguido de hidrólisis como se describe en la solicitud de patente FR-A-2 801 226) en 288 ml de dimetilformamida (DMF) calentando a 80 °C hasta disolución del polímero. La solución se enfría a 15 °C y se añaden sucesivamente 2,5 g de D,L-alfa-tocoferol (> 98 % obtenido de Fluka®) previamente disuelto en 8 ml de DMF, 280 mg de 4-dimetilaminopiridina previamente disuelta en 1 ml de DMF y 1,6 g de diisopropilcarbodiimida previamente disuelta en 6 ml de DMF. Después de 3 h en agitación, el medio de reacción se vertió sobre 1200 ml de agua que contenía un 15 % de cloruro de sodio y ácido clorhídrico (pH = 2). El polímero precipitado se recuperó posteriormente mediante filtración, se lavó con ácido clorhídrico 0,1 N, agua, y diisopropil éter. El polímero se secó a continuación en la estufa al vacío a 40 °C. Se obtiene un rendimiento de aproximadamente un 90 %. La masa molecular medida mediante cromatografía de exclusión por tamaños fue de 15.500 con respecto a un patrón de polioxietileno. El índice de tocoferol injertado, estimado por espectroscopia de RMN de protón, es del 5,1 % molar. Se obtiene una suspensión de nanopartículas de polímero en agua disolviéndola en agua y después ajustando el pH (neutralización de los carboxilatos) a  $7 \pm 1$ .

## 15 **Ejemplo 2: Preparación de 100 g de una suspensión coloidal de nanopartículas del polímero PO cargado con hGH**

### 2.1 Preparación de una suspensión coloidal de polímero anfifílico PO:

20 Se deja termostatar a 30 °C el polímero en solución durante la noche.

Se pesan 35,3 g de polímero PO del ejemplo 1.

Se diluye con 26,65 g de agua estéril para inyección (para un polímero de PO a 28,4 mg/g).

25 La solución de polímero se mantiene con agitación magnética.

La osmolaridad de la solución se ajustó a  $300 \pm 20$  mOsm introduciendo 1,89 g de una solución acuosa de NaCl 5,13 M (30 % p/p).

30 El pH se ajustó a  $7,4 \pm 0,2$  por adición de 0,38 g de una solución de NaOH 1 N.

Se obtienen entonces 64,22 g de una solución de polímero de 15,61 mg/g.

### 35 2.2 Asociación de la proteína al polímero:

Se descongela a 25 °C durante 90 min la solución de la hormona del crecimiento humano recombinante, denotada como hGH.

40 Se añaden a continuación 35,92 g de solución de hGH (concentrada 3,9 mg/g) a 64,15 g de la solución coloidal de polímero preparada anteriormente con agitación.

La solución cargada de proteína se deja madurar durante 2 horas a temperatura ambiente.

45 A continuación se filtró con 0,8-0,2  $\mu\text{m}$  y se dejó madurar durante la noche.

Se obtuvieron así 100 g de una formulación lista para inyectar que contenía 1,4 mg/g de hGH y 10 mg/g de polímero de tipo PO.

## 50 **Ejemplo 3: Preparación de una suspensión de partículas micrométricas mediante $\text{MgCl}_2$**

La suspensión se preparó a partir de una solución preparada según el ejemplo 2, ajustada para el pH y osmolaridad, y con 10,0 mg/g de PO.

55 a) Floculación de la solución por adición de una solución de  $\text{MgCl}_2$  1 M, con agitación (posición n.º9) con un émbolo automático que suministra aproximadamente 20 ml/h. La relación que caracteriza la adición de cationes

$$r = 2 \times \frac{[\text{Mg}^{2+}]}{[\text{Glu}]}$$

60 aquí es igual a 3,36. Se obtiene una solución de 8,51 mg/g de PO.

b) Centrifugación durante 25 min a 2500 rpm. El sobrenadante clarificado tiene 646 mOsm.

c) Lavado del aglomerado con 1/8 del volumen de la solución inicial de agua estéril y centrifugación durante 10 min a 2500 rpm. El sobrenadante clarificado tiene 350 mOsm.

d) Centrifugación durante 10 min a 2500 rpm.

Esta formulación se caracteriza de la siguiente forma

pH	6,64
Osmolalidad	349 mOsm
[PO]	50,77 mg/g
Diámetro de las partículas D50 (según la prueba T1)	2 µm

5

**Ejemplo 4: Obtención de una suspensión de micropartículas fabricada con CaCl<sub>2</sub> y con disminución del pH**

La suspensión se preparó a partir de una solución preparada según el ejemplo 2, que tiene por características finales 1,2 mg/g de hGH y 25,9 mg/g de PO

10

a) Ajuste a pH = 5,52 de la formulación inicial con HCl 0,1 N en agitación (600 rpm) con un émbolo automático que suministra aproximadamente 70 ml/h.

b) Floculación del polímero por adición de una solución de CaCl<sub>2</sub> 1 M con agitación (600 rpm) con un émbolo automático que suministra aproximadamente 39 ml/h. La relación que caracteriza la adición de cationes

15

$$r = 2 \times \frac{[Ca^{2+}]}{[Glu]}$$

aquí es igual a 1,68.

c) Centrifugación durante 8 min a 2500 rpm. El sobrenadante clarificado tiene un pH = 4,73 y 653 mOsm.

20

d) Lavado del aglomerado con 1/8 del volumen de la solución inicial de agua milli-Q y centrifugación durante 4 min a 2500 rpm. El sobrenadante clarificado tiene un pH = 4,72 y 378 mOsm.

e) Concentración del aglomerado por centrifugación durante 4 min a 2500 rpm para obtener una suspensión concentrada.

La suspensión obtenida tiene las siguientes características:

25

pH	4,88
Osmolalidad	386 mOsm
[PO]	122,88 mg/g
[hGH]	4,9 mg/g
Diámetro de las partículas D50	23 µm
(según la prueba T1)	

**Ejemplo 5: Obtención de una suspensión de micropartículas fabricada con CaCl<sub>2</sub>**

La suspensión se preparó a partir de una solución preparada según el ejemplo 2, que tiene por características finales 1,2 mg/g de hGH y 26,01 mg/g de PO.

30

a) Floculación de la formulación inicial por adición de una solución de CaCl<sub>2</sub> 1 M con agitación (600 rpm) con un émbolo automático que suministra aproximadamente 40,3 ml/h hasta conseguir una relación r = 3,36. Se obtiene una formulación que comprende 0,93 mg/g de hGH en 20,28 mg/g de PO.

35

b) Centrifugación durante 4 min a 2500 rpm. El sobrenadante clarificado tiene un pH = 6,34 y 832 mOsm.

c) Lavado del aglomerado con 1/3 del volumen de la solución inicial de agua milli-Q y centrifugación durante 8 min a 2500 rpm. El sobrenadante clarificado tiene un pH = 6,56 y 334 mOsm.

d) Concentración del aglomerado por centrifugación durante 8 min a 2500 rpm para obtener una suspensión concentrada.

40

Esta formulación se caracteriza de la siguiente forma:

pH	6,25
Osmolalidad	343 mOsm
[PO]	101,87 mg/g
[HGH]	4,7 mg/g
Diámetro de las partículas D50 (según la prueba T1)	13 µm

**Ejemplo 6: Obtención de una suspensión de micropartículas fabricada con ZnCl<sub>2</sub>**

La suspensión se preparó a partir de una solución preparada según el ejemplo 2, que tiene por características finales 1,4 mg/g de hGH y 10,00 mg/g de PO.

- 5 a) Floculación de la solución por adición de una solución de ZnCl<sub>2</sub> 1 M, con agitación (posición n.º9) con un émbolo automático que suministra aproximadamente 20 ml/h hasta obtener una relación  $r = 1,54$ . Se obtiene una solución de 9,64 mg/g de PO.
- 10 b) Centrifugación durante 4 min a 2500 rpm. El sobrenadante clarificado tiene 389 mOsm.
- c) Lavado del aglomerado con 1/13 del volumen de la solución inicial de agua estéril y centrifugación durante 8 min a 2500 rpm. El sobrenadante clarificado tiene 237 mOsm.
- 15 d) Lavado del aglomerado con 1/8 del volumen de la solución inicial de NaCl 0,9 %. Centrifugación durante 8 min a 2500 rpm. El sobrenadante clarificado tiene 253 mOsm. La concentración teórica calculada es, en este caso, de 64,97 mg/ml.

Esta formulación se caracteriza de la siguiente forma:

pH	5,86
Osmolalidad	256 mOsm
[PO]	63,51 mg/g
Diámetro de las partículas D50 (según la prueba T1)	9 µm

**Ejemplo 7: Obtención de una suspensión de micropartículas fabricada con MgCl<sub>2</sub> en las condiciones 1.**

La suspensión se preparó a partir de una solución preparada según el ejemplo 2, que tiene por características finales 0,48 mg/g de hGH / 23,05 mg/g de PO, ajustada para el pH y la osmolaridad.

- 20 a) Dilución a 10,0 mg/g con NaCl al 0,9 %.
- 25 b) Floculación de la solución por adición de una solución de MgCl<sub>2</sub>, 6 H<sub>2</sub>O, 1 M, con agitación (posición n.º 10), con un émbolo automático que suministra aproximadamente 20 ml/h hasta obtener una relación  $r = 6,93$ . Se obtiene una solución de 8,59 mg/g de PO.
- 30 c) Centrifugación durante 10 min a 2500 rpm. El sobrenadante clarificado tiene 654 mOsm.
- d) Lavado del aglomerado con 1/7 del volumen de la solución inicial de agua estéril y centrifugación durante 10 min a 2500 rpm. El sobrenadante clarificado tiene 291 mOsm.

Esta formulación se caracteriza de la siguiente forma:

pH	6,56
Osmolalidad	323 mOsm
[PO]	75,7 mg/g
[hGH]	1,3 mg/g
Diámetro de las partículas D50 (según la prueba T1)	8,6 µm

**Ejemplo 8: Obtención de una suspensión de micropartículas fabricada con MgCl<sub>2</sub> en las condiciones 2.**

La suspensión se preparó a partir de una solución preparada según el ejemplo 2, que tiene por características finales 1,33 mg/g de hGH / 10,10 mg/g de PO, ajustada para el pH y la osmolaridad.

- 40 a) Floculación de la solución en presencia de una corriente de nitrógeno por adición de una solución de MgCl<sub>2</sub>, 6 H<sub>2</sub>O, 2 M con burbujeo de nitrógeno, con agitación (500 rpm), con una bomba que suministra aproximadamente 8 ml/min hasta obtener una relación  $r = 10,01$ . Se obtiene una solución de 8,98 mg/g de PO, 914 mOsm.
- b) Maduración durante 3 h con agitación.
- 45 c) Utilización de un módulo Microza (UJP-0047R - Pall) de superficie específica igual a 0,02 m<sup>2</sup>. Este módulo se había acondicionado previamente (eliminación del glicerol y del etanol por inmersión en agua), despirogenizado (NaOH al 7 % y posterior enjuagado con agua) y autoclavado.
- d) Acondicionamiento del módulo con una solución de MgCl<sub>2</sub> 900 mOsm.
- 50 e) Lavado con 1,04 veces el volumen de la formulación floculada de agua estéril que se añade a razón de 8 ml/min para mantener el volumen global constante. La circulación se garantiza con una bomba al 25 % de su potencia, manteniendo a la vez una presión de 0,3 bar (30 kPa). Esta etapa dura 3 h. El filtrado clarificado tiene finalmente 459 mOsm.
- f) Utilización de un módulo Microza (0,02 m<sup>2</sup>) cuya circulación se realiza con una bomba al 25 % de su potencia. Concentración con un caudal de permeato de 4,4 ml/min. Esta etapa dura 160 min. El filtrado tiene finalmente

324 mOsm.

Esta formulación, que es una suspensión fluida y blanca, tiene las siguientes características:

Osmolalidad	329 mOsm
[Mg]	6,8 mg/g
[micropartículas]	43,6 mg/g
[hGH]	4,56 mg/g
r (según la prueba M)	2,30
T <sub>r</sub> (según la prueba L)	16 h
d <sub>ap</sub> (según la prueba D)	0,15

5

**Ejemplo 9: Obtención de una suspensión estable de micropartículas fabricadas con MgCl<sub>2</sub> en las condiciones 3.**

10 a) Preparación de una solución de PO preparada según el ejemplo 2, denominada a continuación formulación inicial hGH 1,4 mg/g / PO 10 mg/g

Una solución de la hormona del crecimiento humana recombinante se descongeló 2 h a 25 °C ([hGH] = 3,9 mg/ml, pH = 7,2, 330 mOsm).

15 El polímero PO se diluyó y se ajustó (300 mOsm, pH = 7,4, 15,6 mg/g).

La solución de hGH se vertió sobre el polímero, a continuación, la mezcla GH/PO (1,4/10 mg/g) se desgaseificó.

La asociación se realizó durante la noche a temperatura ambiente.

20

PO	M (PO)	2317,90 g
pH = 7,4 - 300 mOsm	[PO]	15,61 mg/g
hGH	M (hGH)	1302,30 g
	[hGH]	3,9 mg/g
Formulación inicial	M	3497,00 g
	[hGH]	1,35 mg/g
	[PO]	10,01 mg/g

b) Preparación de micropartículas de hGH 5 mg/g / micropartículas de Mg 40 mg/g

25 La formulación inicial se floculó por adición controlada de MgCl<sub>2</sub> 2 M con una relación r = 9,01, a continuación, el conjunto se dejó durante 1 hora (maduración).

La suspensión se lavó con agua hasta conseguir una osmolalidad de aproximadamente 300 mOsm por microfiltración tangencial (módulo Microza de Pall con una superficie específica de 0,32 m<sup>2</sup>). A continuación se concentró hasta conseguir una concentración de PO comprendida entre 38 y 41 mg/g.

30

Formulación inicial	M	3458,4 g
	[hGH]	1,399 mg/g
	[PO]	10,01 mg/g
Floculación	M (MgCl <sub>2</sub> , 2 M)	457,6 g
	caudal	8,47 g/min
	M (suspensión)	3883,4g
	[PO]	8,84 mg/g
	Osmolalidad	942 mOsm
lavado	M (H <sub>2</sub> O)	4241 g
	caudal	42,43 mg/min
	Osmolalidad	330 mOsm

Concentración	M (filtrado)	3157 g
	caudal	39,46 mg/min
	M (micropartículas concentradas)	713,8 g
	[hGH]	5,28 mg/g
	[PO]	50,9 mg/g
Dilución	M (MgCl <sub>2</sub> , 0,1 M)	179,9 g
	M (micropartículas concentradas)	893,7 g
	[hGH]	4,22 mg/g
	[PO]	40,65 mg/g

c) Preparación de la formulación mixta hGH 5 mg/g / micropartículas de Mg 40 mg/g / PO 23 mg/g

Las micropartículas se estabilizaron mediante la adición del polímero de tipo PO en su forma liofilizada.

5

El liofilizado se añadió a la suspensión en agitación.

El conjunto se puso al vacío (30 mbar, 3 kPa) y con agitación hasta el día siguiente.

Suspensión	M (micropartículas concentradas)	872,5 g
PO liofilizado	[H <sub>2</sub> O]	10,125 %
	M añadida	23,175 g
formulación final	M	895,68 g
	[hGH]	4,11 mg/g
	[PO en las micropartículas]	39,60 mg/g
	[PO añadido]	23,00 mg/g
	pH	6,4
	Osmolalidad	409 mOsm
	[Mg]	4,0 g/l
	r (según la prueba M)	0,94
	d <sub>ap</sub> (según la prueba D)	0,14
	T <sub>r</sub> (según la prueba L)	30,56 h

10

**Ejemplo 10 Preparación de partículas micrométricas secas cargadas de hGH a partir de una suspensión de micropartículas para una primera realización del procedimiento de acuerdo la invención.**

Una suspensión de micropartículas cargadas de hGH se fabricó en primer lugar en las condiciones descritas en las etapas a) a e) del ejemplo 8 (floculación, maduración, lavado). La suspensión se lavó hasta obtener una osmolalidad de 280 mOsm aproximadamente. La suspensión de aproximadamente 10 mg/g de polímero se liofilizó a continuación en un aparato de tipo Bioblock ALPHA 1-4 LSC tras haberse congelado en nitrógeno líquido durante 76 horas.

15

20 Reconstitución y caracterización de la suspensión:

A 40 mg de polvo se añadió 1 ml de agua PPI. La solución se agitó manualmente durante varios segundos hasta que el polvo se humedeciera de forma homogénea. La solución se dejó reposar durante aproximadamente 10 min. Se homogeneizó varios segundos mediante agitación manual y se aspiró con una aguja 21G. De esta forma se obtiene 1 ml de una solución lista para inyectar.

25

Las características de la suspensión se describen a continuación:

$r = 2 \times \frac{[Mg^{2+}]}{[COO^-]}$ (según la prueba M)	pH	Osmolalidad	d <sub>ap</sub> (mg/ml) (según la prueba D)
1,4	6,6	338	0,10

**Ejemplo 11 Preparación de partículas micrométricas secas de polímero cargado de hGH a partir de una suspensión de micropartículas para una segunda realización del procedimiento de acuerdo con la invención.**

5 Una suspensión de micropartículas cargadas de hGH se fabricó en primer lugar en las condiciones descritas en las etapas a) a e) del ejemplo 8 (floculación, maduración, lavado). La suspensión se lavó hasta obtener una osmolalidad de 280 mOsm aproximadamente. La suspensión de aproximadamente 10 mg/g de polímero se secó a continuación en un aparato de atomización de tipo Büchi B290. La solución líquida se aspiró a una velocidad de 5 ml/min y se nebulizó a través de una boquilla de pulverización alimentada con nitrógeno (7 bares (700 kPa) - 500 l/h). El caudal de aspiración (aire de secado) es de 40 m<sup>3</sup>/h. La temperatura de entrada se mantuvo a 90 °C, lo que indujo, en estas  
10 condiciones, una temperatura de salida de 45 °C. En estas condiciones, el tamaño de las partículas obtenidas (según la prueba T2) es de D(0,5) = 5 µm (50 % del volumen está ocupado por partículas que tienen un diámetro < 5 µm).

Reconstitución y caracterización de la suspensión:

15 A 30 mg de polvo se añadió 1 ml de agua PPI. La solución se agitó manualmente durante varios segundos hasta que el polvo se humedeciera de forma homogénea. La solución se dejó reposar durante aproximadamente 10 min. Se homogeneizó varios segundos mediante agitación manual y se aspiró con una aguja 21G. De esta forma se obtiene  
20 1 ml de una solución lista para inyectar.

Las características de la suspensión se describen a continuación:

$r = 2 \times \frac{[Mg^{2+}]}{[COO^-]}$ (según la prueba M)	pH	Osmolalidad	Tamaño D (0,5) µm (según prueba T1)	d <sub>ap</sub> (mg/ml) (según la prueba D)
2,3	6,8	598	10,0	0,15

**Ejemplo 12: Farmacocinética de la hGH en perros tras la inyección subcutánea de diversas formulaciones basadas en poliaminoácidos anfifílicos en forma de nanopartículas y micropartículas.**

25 Doce perros Beagle no expuestos antes a tratamiento (peso de 7 a 10 kg) se trataron con las formulaciones siguientes:

Formulación	Número de perros	[hGH] (mg/ml)	[PO] (mg/ml)	Dosis (mg/kg)	Volumen de dosis (ml/kg)
hGH IR	4	4	0	1	0,23
Formulación 1	4	5	22,6	1	0,22
Formulación 2	4	5	117,5	1	0,20

30 hGH IR corresponde a una solución de la hormona del crecimiento humana recombinante ([hGH] = 4 mg/ml, pH = 7,2, 330 mOsm).

35 La formulación 1 se preparó según el ejemplo 2 y la formulación 2 según el ejemplo 7. hGH se dosifica según una prueba ELISA (kit DSL 10-1900).

Los datos farmacocinéticos se recogen en la tabla siguiente:

Formulación	C <sub>máx</sub> ± DE (ng/ml)	T > 5ng/ml ± DE (h)	ABC <sub>0-final</sub> ± DE (ng.h/ml)	RBA (%)	T <sub>50%abc</sub> ± DE (h)
hGH IR	582 ± 155	18 ± 3	3209 ± 276	100	4 ± 1
Formulación 1	135 ± 37	44 ± 6	2579 ± 516	80	25 ± 5
Formulación 2	25 ± 5	129 ± 26	1759 ± 246	55	121 ± 33

40 donde:

- C<sub>máx</sub> es la concentración sérica máxima de hGH
- T > 5 ng/ml es el tiempo en el que la concentración sérica de hGH es superior a 5 ng/ml
- ABC representa el área bajo la curva de concentración sérica de hGH frente al tiempo

- RBA representa la biodisponibilidad con respecto a una formulación de liberación inmediata
- $T_{50\%abc}$  representa el tiempo necesario para liberar el 50 % de la hGH liberada en total.

5 hGH IR presenta un perfil de liberación rápida con una concentración sérica máxima de  $582 \pm 155$  ng/ml que se alcanza después de un tiempo medio de 2 h. A continuación, la hGH se elimina bastante rápidamente ( $T_{1/2}$  aparente de aproximadamente 2 h) siguiendo un decrecimiento monoexponencial. La hGH circulante ya no se puede cuantificar posteriormente transcurridas 24 h.

10 La formulación 1 muestra un perfil de liberación prolongada de la hGH con una fase de absorción lenta, antes de alcanzar concentraciones séricas máximas comparables ( $44 \pm 6$  y  $37 \pm 4$  ng/ml respectivamente) después de un tiempo medio de 24 horas. La pendiente de eliminación indica la ausencia de hGH cuantificable transcurridas 48 h (siendo la concentración sérica de  $4,8 \pm 3,1$  ng/ml).

15 Esta formulación ha mostrado en el presente documento una liberación más lenta de hGH en el compartimento sanguíneo, que se ilustra por el desfase de la  $C_{m\acute{a}x}$  centrada en 24 h. Sin embargo, este fenómeno no parece prolongar significativamente la presencia de la hGH en el suero, ya que la concentración circulante a 48 h parece ser nula. El ABC de la formulación 1 aparece algo disminuida con respecto a la referencia IR: la biodisponibilidad es del 80 %.

20 En cuanto a la formulación 2, esta ofrece una modificación importante del perfil farmacocinético, con una liberación muy lenta, seguida por un tiempo de latencia (*lag-time*) de 4 h, a continuación, una concentración sérica máxima de  $25 \pm 5$  ng/ml alcanzada después de un tiempo medio de 108 horas (extensión: 72 - 168 h). El aspecto general de la farmacocinética de la formulación 2 es un perfil muy plano en pseudomeseta, tipo perfusión (*infusion-like*). El nivel de hGH circulante vuelve a una concentración no cuantificable después de entre 168 h y 240 h (7 y 10 días). Esta formulación presenta, por su parte, un ABC mucho menor: pérdida de biodisponibilidad relativa del 45 % (RBA = 55 %).

30 **Ejemplo 13: Farmacocinética de la hGH en perros tras la inyección subcutánea de una formulación basada en poliaminoácidos anfífilicos en forma de micropartículas**

Doce perros Beagle no expuestos antes a tratamiento (peso de 7 a 10 kg) se trataron con las formulaciones siguientes:

Formulación	Número de perros	[hGH] (mg/ml)	[PO] (mg/ml)	pH / mOsm	Dosis (mg/kg)	Volumen de dosis (ml/kg)
hGH IR	6	4,1	0	7,4 /321	5 x 0,1 diario	0,024
Formulación 3	6	4,3	64,2	6,4 /409	0,5	0,122

35 hGH IR corresponde a una solución de la hormona del crecimiento humana recombinante ([hGH] = 4,1 mg/ml, pH = 7,2, 330 mOsm). La formulación 3 se preparó según el ejemplo 9.

Los datos farmacocinéticos se recogen en la tabla siguiente:

Formulación	$C_{m\acute{a}x} \pm DE$ (ng/ml)	$T > 1$ ng/ml $\pm DE$ (h)	$ABC_{0-final} \pm DE$ (ng.h/ml)	RBA (%)	$T_{50\%abc} \pm DE$ (h)
hGH IR	$90 \pm 24$	39	$258 \pm 26$	100	$2 \pm 0,3$
Formulación 3	$26 \pm 16$	$108 \pm 38$	$999 \pm 294$	77	$66 \pm 14$

40 donde:

- $C_{m\acute{a}x}$  es la concentración sérica máxima de hGH;
- $T > 1$  ng/ml es el tiempo en el que la concentración sérica de hGH es superior a 1 ng/ml;
- ABC representa el área bajo la curva de concentración sérica de hGH frente al tiempo;
- RBA representa la biodisponibilidad con respecto a una formulación de liberación inmediata;
- $T_{50\%abc}$  representa el tiempo necesario para liberar el 50 % de la hGH liberada en total.

50 Las micropartículas liberan hGH durante más de 5 días con una pérdida de biodisponibilidad del 23 %.

**Ejemplo comparativo 14: Liberación *in vitro* (prueba L) de hGH desde micropartículas de acuerdo con la invención y de nanopartículas de PO**

En la prueba L se realizó una comparación de la liberación de hGH desde nanopartículas de PO (ejemplo 2) y de micropartículas de PO (ejemplo 8). La fase continua es una solución tamponada de albúmina 30 mg/g.

5 En la única figura anexa se puede leer el tiempo necesario para liberar el 50 % de la proteína (hGH) en las condiciones de concentración donde la formulación es inyectable:

- nanopartículas de 23 mg/g:  $t_r = 40$  min es decir 0,67 h
- micropartículas de 73 mg/g:  $T_r = 973$  min es decir 16,22 h

10 La hGH contenida en las micropartículas se libera 24 veces más lentamente que la contenida en las nanopartículas.

**Ejemplo 15: Preparación de frascos individuales que contienen un polvo seco liofilizado de micropartículas de polímero PO e insulina (100 UI/frasco)**

15 Preparación de 350 g de una solución de insulina concentrada de 500 UI/g (17,5 mg/g):

6,4 g de insulina humana recombinante (polvo) de actividad 28,6 UI/g y que contenía un 4,5 % de humedad se introdujeron en un frasco de vidrio. Se añadieron 157 g de agua, y la insulina se dispersó con agitación magnética lenta. Se añadieron 46,6 g de HCl 0,1 N hasta obtener una solución transparente de insulina ácida. Se añadieron a 20 continuación 69,8 g de sosa 0,1 N para obtener una solución final transparente con un pH comprendido entre 7 y 8. La solución se diluyó hasta la concentración deseada por adición de 70,2 g de agua.

Mezcla con la solución de polímero PO:

25 326 g de la solución de la insulina concentrada anterior se vertieron lentamente (con agitación magnética) en 3426 g de solución de polímero PO a 11 mg/g. La mezcla se filtró con 0,2  $\mu$ m y se dejó con agitación lenta durante una noche. Todas las operaciones posteriores se realizaron en condiciones asépticas.

Floculación - lavado - concentración:

30 La formulación anterior se floculó por adición controlada de 377 g de  $MgCl_2$  2 M (es decir, en este estadio, una relación  $r = 7,2$ ). Después de 1 h de maduración, la suspensión se lavó con agua hasta conseguir una osmolalidad de aproximadamente 340 mOsm por microfiltración tangencial (módulo Microza de Pall con una superficie específica de 0,32  $m^2$ ) y se concentró a aproximadamente 27 mg/g de polímero PO. El pH se ajustó a 6,5 por adición se sosa 1 35 N (aproximadamente 6 g) a la suspensión. Al finalizar esta etapa, la suspensión tiene un título de insulina de aproximadamente 100 UI/g (el valor exacto se puede obtener por volumetría HPLC en columna de sílice injertada C18).

Adición de polivinilpirrolidona:

40 Se prepararon 200 g de solución madre de polivinilpirrolidona de aproximadamente 40 mg/g a partir de polvo de polivinilpirrolidona de calidad para inyección (K17 por ejemplo,) y se filtraron con una membrana para esterilización de 0,2  $\mu$ m. 120 g de la solución así filtrada se añadieron a continuación de forma estéril a 1200 g de la suspensión anterior, y la mezcla se agitó durante aproximadamente 15 min.

45 La suspensión resultante contiene aproximadamente 91 UI/g de insulina.

Liofilización:

50 La suspensión anterior se repartió en frascos individuales a razón de 100 UI por frasco (es decir, aproximadamente 1,1 g de la suspensión anterior en cada frasco): los frascos se liofilizaron de forma estéril durante un ciclo de 72 horas. Después de esta etapa, se cerraron herméticamente en espera de su utilización.

**Ejemplo 16: Reconstitución de los frascos de micropartículas / insulina obtenidos en el ejemplo 15**

55 La suspensión se reconstituyó de forma inmediata (antes de su uso) según el siguiente protocolo: se introdujo 1 ml de agua mediante una jeringa provista de aguja en un frasco que contenía 100 UI de la insulina obtenida según el ejemplo anterior.

60 El frasco se agitó manualmente durante varios segundos para obtener una suspensión homogénea (de aspecto lechoso): la suspensión se aspiró al interior de la jeringa y está lista para su inyección a través de una aguja de 30G, por ejemplo.

La suspensión así reconstituida contiene:

- 65
- 23 mg/ml de polímero PO

- 100 UI/ml de insulina (3,5 mg/ml)
- 4 mg/ml de polivinilpirrolidona
- 0,18 mmol/ml de  $Mg^{2+}$  (es decir, una relación  $r = 2,8$ )

5 La suspensión así reconstituida tiene un pH de 6,5 y una osmolalidad de 300 mOsm. La medida granulométrica del tamaño de las partículas (medida por la prueba T1) proporciona un diámetro medio D50 de 15  $\mu m$ . La densidad aparente medida en la prueba D es de 0,13. La viscosidad dinámica medida a 20 °C es de 5 mPa.s.

#### 10 Ejemplo 17: Farmacodinámica de la insulina en perros tras la inyección subcutánea de una formulación basada en poliaminoácidos anfílicos en forma de micropartículas

Dos grupos de 6 perros Beagle sanos (pesos de  $10,4 \pm 0,6$  kg) se trataron sucesivamente con una de las formulaciones siguientes durante un ensayo cruzado de 2 periodos:

15

Formulación	Número de perros	[insulina] (UI/g)	[PO] (mg/g)	Dosis (UI/kg)	Volumen de dosis ( $\mu l/kg$ )
Lantus® (lote 40N300)	12	100	0	1	10
Formulación 4	12	100	20	1	10

La referencia de este estudio, Lantus®, es un análogo de insulina modificada (insulina glargina) comercializada por Sanofi-Aventis. La modificación de dos restos de aminoácidos de la estructura principal de la insulina humana proporciona a Lantus propiedades de liberación prolongada durante un periodo de 24 h mediante una precipitación *in situ*.

20

La formulación 4 se preparó según el ejemplo 16.

La glucemia se determina por el método enzimático (hexoquinasa) en un equipo automatizado para análisis bioquímicos de la sangre (Advia 1650, Bayer Diagnostics).

25

El análisis de los resultados de la farmacodinámica se lleva a cabo sobre el porcentaje de la glucemia basal en función del tiempo.

Los resultados farmacodinámicos se recogen en la tabla siguiente:

Formulación	$C_{\min} \pm DE$ (%)	$APGC_{0-36h} \pm DE$ (%.h)	$APGC_{\text{formulación 4}} / APGC_{\text{Lantus}} \pm DE$ (%)	$T50\%_{APGC} \pm DE$ (h)
Lantus®	$40 \pm 6$	$1250 \pm 342$	-	$13,3 \pm 3,1$
Formulación 4	$45 \pm 4$	$1389 \pm 309$	$118 \pm 37$	$19,7 \pm 3,7$

30

donde:

- $C_{\min}$  es el porcentaje mínimo observado de la glucemia basal
- $APGC_{0-36h}$  representa la superficie entre la glucemia basal y el porcentaje de la glucemia basal con el tiempo entre 0 y 36 h después de la dosis
- $T50\%_{APGC}$  representa el tiempo necesario para obtener un 50 % de  $APGC_{0-36h}$ .

35

La administración de la referencia Lantus® conlleva una rápida disminución de la glucemia desde la primera hora. La acción hipoglucemiante de la insulina glargina se mantiene a continuación durante un periodo de tiempo comprendido entre 18 y 36 h (retorno de la glucemia a su nivel basal después de 30 horas, en promedio).

40

En comparación, la administración de la formulación 4 produjo igualmente una rápida disminución de la glucemia desde la primera hora. El porcentaje de la glucemia basal se mantuvo posteriormente en un nivel de meseta hasta 36 horas en promedio. La  $C_{\min}$  obtenida con la formulación 4 fue significativamente más elevada de la de la referencia Lantus® ( $p < 0,005$ , prueba t de Student unilateral y emparejada), lo que debería permitir reducir notablemente los episodios de hipoglucemia severa en pacientes diabéticos.

45

La duración de acción de la formulación 4 fue netamente superior al de la referencia Lantus® de acción prolongada. Esto se ilustra por un valor de  $T50\%_{APGC}$  significativamente más elevado para la formulación 4 ( $p < 0,0005$ , prueba t de Student unilateral y emparejada). No se observó ninguna pérdida de  $APGC_{0-36h}$  para la formulación 4 con respecto a la referencia Lantus®.

50

#### Ejemplo 18: Obtención de polvo liofilizado de micropartículas de polímero PO e interferón $\alpha$ -2b

Preparación de una solución que contiene 15 mg/g de polímero y 0,19 mg/g de IFN

166 g de solución de polímero PO a 16,5 mg/g se introducen en un frasco de 500 ml. Se añadieron 2,3 g de una solución de metionina 0,3 M a la solución. Una solución congelada de IFN- $\alpha$ -2b concentrada 2,4 mg/g se descongeló a 25 °C durante 1 h y 13 g de esta solución congelada se introdujeron en el frasco que contenía la solución de polímero. La mezcla se dejó durante 14 h a temperatura ambiente. La solución se filtró con un filtro de esterilización de 0,2  $\mu$ m. Todas las operaciones siguientes se realizaron en condiciones asépticas.

Floculación - lavado – concentración

129,5 g de la formulación anterior se flocularon por adición controlada de 148,5 g de MgCl<sub>2</sub> 2 M (es decir, en este estadio, una relación  $r = 7,0$ ). La suspensión se distribuyó en 4 frascos (37 g por frasco, aproximadamente) y se centrifugó durante 15 min a 3000 vueltas/min. Se extrajeron 30,5 g de sobrenadante de los frascos, teniendo cuidado de no tocar el aglomerado de la centrifugación. A continuación, los aglomerados se recuperaron por adición de 17 g de agua en cada frasco, con agua estéril. La osmolalidad en esta etapa es de aproximadamente 300 mOsm.

Liofilización

La suspensión se distribuyó en recipientes de tipo Lyoguard® (Gore™) que permiten mantener la suspensión estéril durante la liofilización: a continuación, los recipientes se liofilizaron de forma estéril durante un ciclo de 72 h en un liofilizador de sobremesa (Christ).

**Ejemplo 19: Reconstitución de una suspensión de micropartículas que contienen interferón  $\alpha$ -2b a partir del polvo liofilizado obtenido en el ejemplo 18**

Para saber la cantidad de polvo a coger para obtener de forma precisa 0,5 mg/g de interferón en la formulación, se llevó a cabo un ensayo de reconstitución, y el interferón  $\alpha$ -2b se dosificó con HPLC en columnas de sílice injertadas C18.

La suspensión se reconstituyó de forma inmediata (antes de su uso) según el siguiente protocolo: Se añadieron 13,58 g de agua a 1,22 g de polvo liofilizado, y la suspensión se homogeneizó con una barrita magnética durante 1 hora.

La suspensión resultante es homogénea (de aspecto lechoso): la suspensión se aspiró al interior de la jeringa y está lista para su inyección a través de una aguja de 30G, por ejemplo.

La suspensión así reconstituida contiene:

- 46 mg/ml de polímero PO
- 0,5 mg/ml de interferón  $\alpha$ -2b
- 0,34 mmol/ml de Mg<sup>2+</sup> (es decir, una relación  $r = 2,6$ )

La suspensión así reconstituida tiene un pH de 6,1 y una osmolalidad de 705 mOsm.

**Ejemplo 20: Farmacocinética del IFN en perros tras la inyección subcutánea de una formulación basada en poliaminoácidos anfífilicos en forma de micropartículas**

Ocho perros Beagle no expuestos antes  $\pm$  tratamiento (peso de 9 a 0,6 kg) se trataron con las formulaciones siguientes:

Formulación	Número de perros	[IFN] (mg/ml)	[PO] (mg/ml)	pH/ mOsm	Dosis ( $\mu$ g/kg)	Volumen de dosis (ml/kg)
IFN IR	4	0,5	0	6,45/ 354	60	0,12
Formulación 5	4	0,5	46	6,1/ 705	60	0,12

El IFN IR corresponde a una solución de interferón humano recombinante (PCGen, lote IB05.0516) ajustada según concentración, pH y osmolaridad ([IFN] = 0,5 mg/ml, pH = 6,45, y 354 mOsm).

La formulación 5 se preparó según el ejemplo 19, a partir del mismo lote (PCGen).

Los resultados farmacocinéticos se recogen en la tabla siguiente:

<b>Formulación</b>	<b>C<sub>máx</sub> ± DE (ng/ml)</b>	<b>T &gt; 50 pg/ml ± DE (h)</b>	<b>ABC<sub>0-all</sub> ± ED (ng.h/ml)</b>	<b>RBA (%)</b>	<b>T<sub>50%abc</sub> ± DE (h)</b>
IFN IR	25,2 ± 0,4	22,6 ± 0,6	162,5 ± 27,2	100	5,1 ± 0,7
Formulación 5	0,9 ± 0,6	219,8 ± 29,8	95,5 ± 47,5	> 59	96,7 ± 31,7

donde:

- 5 - C<sub>máx</sub> es la concentración sérica máxima de IFN;  
 - T > 50 pg/ml es el tiempo en el que la concentración sérica de IFN es superior a 50 pg/ml;  
 - ABC representa el área bajo la curva de concentración sérica de IFN frente al tiempo;  
 - RBA representa la biodisponibilidad con respecto a una formulación de liberación inmediata;  
 - T<sub>50%abc</sub> representa el tiempo necesario para liberar el 50 % de la IFN en total.

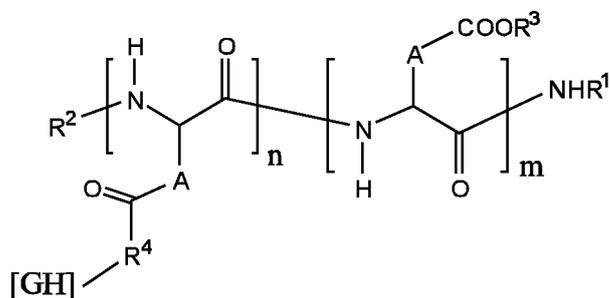
10 El IFN IR presenta un perfil de liberación rápida con una concentración sérica máxima de 25,2 ± 0,4 ng/ml alcanzada después de un tiempo medio de 5 horas (extensión: 3 - 5 h). El IFN circulante ya no se puede cuantificar transcurridas 24 h.

15 La formulación 1 presenta una modificación importante del perfil farmacocinético del IFN, con una liberación muy lenta, y una concentración sérica máxima de 0,9 ± 0,6 ng/ml (28 veces inferior a la del IR), alcanzada después de un tiempo medio de 108 h (extensión: 66 - 144 h). El aspecto general de la farmacocinética es un perfil plano en pseudomeseta. El nivel de IFN circulante vuelve a una concentración no cuantificable entre 168 h y más de 240 h (7 y más de 10 días). Esta formulación presenta una ABC más baja: pérdida de biodisponibilidad relativa del 41 % (RBA = 59 %). El T<sub>50%abc</sub> es aproximadamente 19 veces superior al del IFN IR.

20

## REIVINDICACIONES

1. Formulación farmacéutica líquida para la liberación prolongada de PA que comprende una suspensión coloidal, acuosa, de viscosidad dinámica a 20 °C menor o igual de 1000 mPa.s, basada en partículas micrométricas, que tienen un tamaño comprendido entre 1 y 70  $\mu\text{m}$  medido en una prueba T, compuestas de polímero (PO) y de iones multivalentes de polaridad opuesta a la del polímero PO, en la que el polímero PO
- es un copolímero anfifílico, biodegradable, hidrosoluble, donde dicho copolímero es un poliaminoácido cuya cadena principal está formada por restos de aspártico o de restos de glutámico, siendo al menos una parte de estos restos portadores de grupos hidrófobos (GH) y de grupos hidrófilos ionizables (GI), al menos en parte ionizados,
  - y forma espontáneamente una suspensión coloidal de nanopartículas en el agua, a pH = 7,0, en condiciones isotónicas,
- siendo dichas nanopartículas adecuadas para asociarse espontáneamente de manera no covalente con al menos un principio activo (PA), a pH = 7,0, en condiciones isotónicas;
- los iones multivalentes de dicha formulación son:
    - de valencia menor o igual a 4, preferentemente iones divalentes, iones trivalentes, o sus combinaciones,
    - de polaridad opuesta a la de los grupos ionizables GI del polímero PO,
    - en una cantidad tal que la relación r, medida en una prueba M, está comprendida entre 0,3 y 10, preferentemente entre 0,6 y 5,0 y, más preferentemente aún, entre 0,8 y 3,0, correspondiendo dicha relación r a la fórmula  $r = n \times \frac{[IM]}{[GI]}$ , donde
  - n es la valencia de dichos iones multivalentes,
  - [IM] es la concentración molar de iones multivalentes,
  - [GI] es la concentración molar de grupos ionizables GI.
2. Formulación de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** las partículas micrométricas tienen una densidad aparente  $d_{ap}$  de polímero, medida en una prueba D, comprendida entre 0,05 y 1,0, preferentemente entre 0,07 y 0,7, preferentemente entre 0,1 y 0,5.
3. Formulación de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por** un aumento en la duración  $T_r$  de liberación de un PA dado, tal como se mide en una prueba L, con respecto a la duración  $t_r$  de liberación medida en la misma prueba L, de una formulación idéntica inyectable que no contenga iones multivalentes, siendo este aumento tal que  $T_r$  es superior o igual a  $1,1 \times t_r$ , y, preferentemente, tal que  $T_r$  es superior o igual a  $1,5 \times t_r$ .
4. Formulación de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** comprende al menos un PA asociado a las micropartículas de PO.
5. Formulación de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** el polímero modificado hidrófobo PO se define por la fórmula general (I) siguiente:

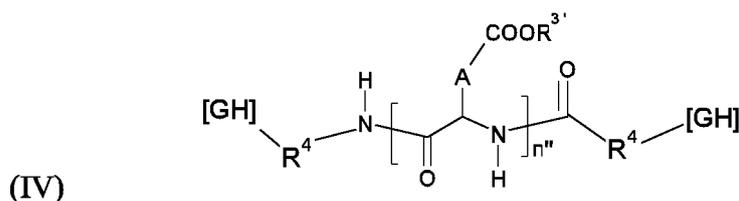
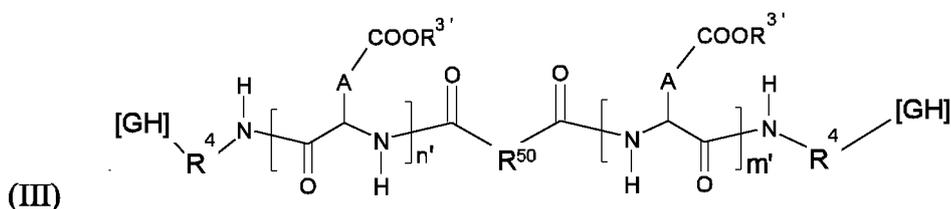
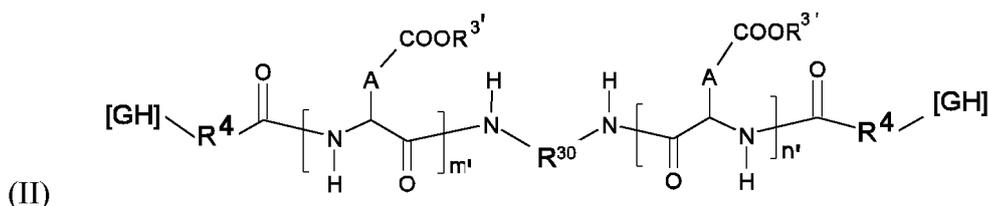


45 en la que:

- $R^1$  representa un H, un alquilo lineal C2 a C10 o ramificado C3 a C10, un radical bencilo, un resto aminoácido del extremo, o  $-R^4-[GH]$ ;
- $R^2$  representa un H, un grupo acilo lineal C2 a C10 o ramificado C3 a C10, un piroglutamato o  $-R^4-[GH]$ ;
- $R^3$  es un H o un catión metálico seleccionado entre sodio o potasio;
- $R^4$  representa un enlace directo o un separador basado en de 1 a 4 restos aminoácidos;

- A representa independientemente un radical -CH<sub>2</sub>- (resto aspártico) o -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- (resto glutámico);
- n/(n+m) se define como el índice de injerto molar, y su valor es lo suficientemente bajo como para que el PO se disuelva en agua a pH = 7 y a 25 °C forma una suspensión coloidal de partículas submicrométricas de PO, preferentemente n/(n + m) está comprendido entre 1 y 25 % molar y aún mejor entre 1 y 15 % molar;
- n + m está comprendido de 10 a 1000, preferentemente entre 50 y 300;
- GH representa un grupo hidrófobo.

6. Formulación de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** el (o los) PO responde(n) a una de las fórmulas generales (II), (III) y (IV) siguientes:



en las que:

- GH representa un grupo hidrófobo;
- R<sup>30</sup> es un grupo alquilo lineal C2 a C6;
- R<sup>3'</sup> es un H o un catión metálico seleccionado entre sodio o potasio;
- R<sup>50</sup> es un grupo alquilo, dialcoxi o diamina C2 a C6;
- R<sup>4</sup> representa un enlace directo o un separador basado en de 1 a 4 restos aminoácidos;
- A representa independientemente un radical -CH<sub>2</sub>- (resto aspártico) o -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- (resto glutámico);
- (n' + m') o n'' se define como el grado de polimerización, y varía de 10 a 1000, preferentemente entre 50 y 300.

7. Formulación de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** PO tiene grupos GI aniónicos y **por que** los iones multivalentes son cationes multivalentes, preferentemente cationes divalentes, más preferentemente aún seleccionados entre el grupo que comprende: Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, o sus mezclas, o cationes trivalentes, más preferentemente aún seleccionados entre el grupo que comprende: Al<sup>3+</sup>, Fe<sup>3+</sup> o sus mezclas.

8. Formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, **caracterizada por que** el PA es la hormona del crecimiento humano hGH recombinante.

9. Formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, **caracterizada por que** el PA es insulina.

10. Formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, **caracterizada por que** el PA es interferón α-2b.

11. Procedimiento de preparación de la formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** consiste esencialmente en:

- a. aplicar o preparar una suspensión coloidal de nanopartículas de al menos un PO;
- b. opcionalmente, mezclar esta suspensión coloidal de nanopartículas de PO con al menos un PA,

preferentemente en solución acuosa;

c. opcionalmente, filtrar la suspensión así obtenida;

d. añadir iones multivalentes (preferentemente en forma de una o varias sales) de polaridad opuesta a la de los grupos GI del polímero PO, añadiéndose dichos iones multivalentes en una cantidad tal que la relación r, según

5 la fórmula  $r = n \times \frac{[IM]}{[GI]}$ , donde

- n es la valencia de dichos iones multivalentes,
- [IM] es la concentración molar de iones multivalentes,
- [GI] es la concentración molar de grupos ionizables GI,

10 está comprendida entre 0,3 y 10, preferentemente entre 0,6 y 5,0 y, más preferentemente aún, entre 0,8 y 3,0; e. según necesidad, ajustar el pH o la osmolaridad.

12. Procedimiento de preparación de un producto derivado de la formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o de la formulación obtenida mediante el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, **caracterizado por que** consiste esencialmente en secar la suspensión de partículas micrométricas, de forma que se obtenga una forma sólida, preferentemente un polvo de partículas micrométricas, adecuado para almacenarse o administrarse.

13. Procedimiento de preparación de la formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado por que** consiste esencialmente en:

- aplicar al menos un producto derivado cargado o no con un PA obtenido mediante el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11,
- y mezclar este producto derivado con agua o una solución acuosa S de reconstitución.

14. Producto derivado de la formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 **caracterizado por que** está en forma no líquida y **por que** comprende partículas micrométricas de polímero (PO), que tienen un tamaño comprendido entre 1 y 70  $\mu\text{m}$  medido en una prueba T,

i. el polímero PO

- siendo un copolímero anfifílico, biodegradable, hidrosoluble, donde dicho copolímero es un poliaminoácido cuya cadena principal está formada por restos de aspártico o de restos de glutámico, siendo al menos una parte de estos restos portadores de grupos hidrófobos (GH) y de grupos hidrófilos ionizables (GI),
- y formando espontáneamente una suspensión coloidal de nanopartículas en el agua, a pH = 7,0, en condiciones isotónicas,

ii. siendo dichas partículas adecuadas para asociarse espontáneamente de manera no covalente con al menos un principio activo (PA), a pH = 7,0, en condiciones isotónicas;

y **en el que** dicho producto contiene derivados de iones multivalentes, preferentemente de iones divalentes, de polaridad opuesta a la de los grupos GI del polímero, estando la relación r comprendida entre 0,3 y 10, preferentemente entre 0,6 y 5,0 y, más preferentemente aún entre 0,8 y 3,0,

y según la fórmula  $r = n \times \frac{[IM]}{[GI]}$ , donde

- n es la valencia de dichos iones multivalentes,
- [IM] es la concentración molar de iones multivalentes,
- [GI] es la concentración molar de grupos ionizables GI.

15. Procedimiento de preparación de medicamentos, especialmente para administración parenteral, mucosa, subcutánea, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, intracerebral o en un tumor, incluso por vía oral, nasal, pulmonar, vaginal u ocular, **caracterizado por que** consiste esencialmente en aplicar al menos una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y/o una formulación obtenida mediante el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11 o 12 y/o cualquier producto derivado y/o cualquier precursor de dicha formulación.

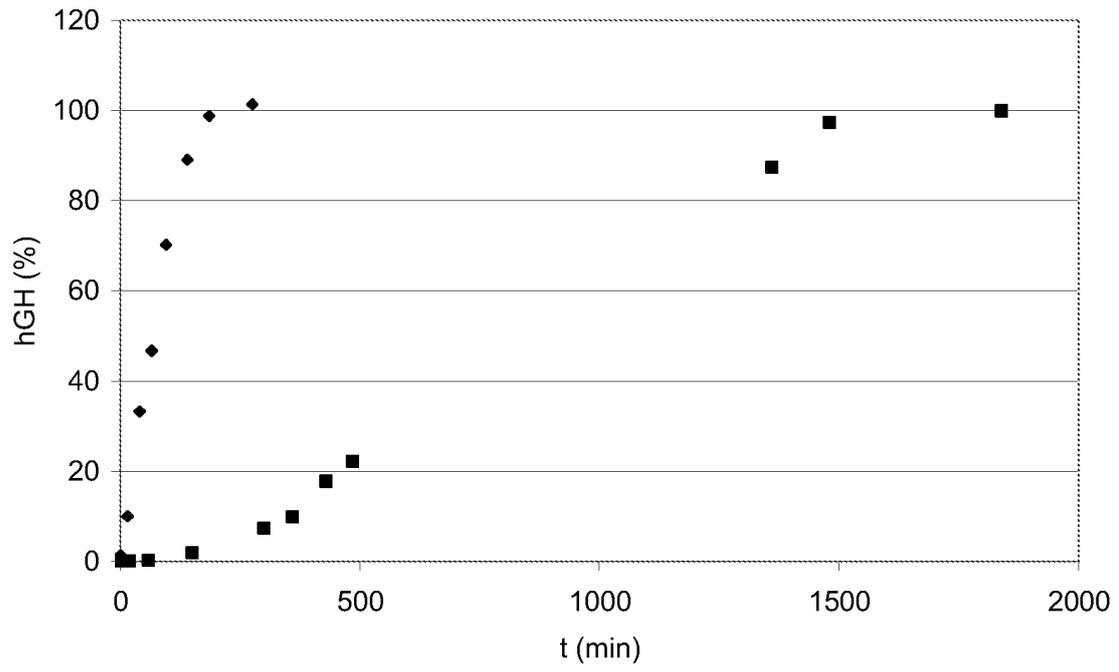


FIGURA ÚNICA