

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 885 764**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00	(2006.01) C08L 89/00	(2006.01)
A61K 9/06	(2006.01) A61P 9/00	(2006.01)
A61K 47/36	(2006.01) A61P 19/02	(2006.01)
A61K 38/20	(2006.01) A61P 19/04	(2006.01)
A61K 38/22	(2006.01) A61P 19/08	(2006.01)
A61K 38/27	(2006.01) A61P 19/10	(2006.01)
A61K 38/28	(2006.01) A61P 29/00	(2006.01)
A61K 38/46	(2006.01)	
C08B 37/00	(2006.01)	
C08L 5/08	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.05.2013 PCT/IB2013/054477**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **05.12.2013 WO13179258**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2013 E 13737417 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.06.2021 EP 2854830**

54 Título: **Nuevo sistema de liberación de proteínas hidrófobas**

30 Prioridad:

31.05.2012 IT PD20120173

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.12.2021

73 Titular/es:

**FIDIA FARMACEUTICI S.P.A. (100.0%)
Via Ponte della Fabbrica 3/A
35031 Abano Terme (PD), IT**

72 Inventor/es:

**CAMPISI, MONICA;
GUARISE, CRISTIAN y
RENIER, DAVIDE**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 885 764 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

Nuevo sistema de liberación de proteínas hidrófobas

Descripción

5 La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden amidas específicas de ácido hialurónico combinadas con proteínas de naturaleza principalmente hidrófoba, que son terapéuticas y/o biológicamente activas, para la preparación de sistemas de liberación sostenida y lenta de proteínas.

Antecedentes de la invención

10 El primer medicamento obtenido por ingeniería de un sistema vivo (bacteriano) fue la insulina, aprobada por la Food and Drug Administration (FDA) en 1982. La hormona de crecimiento humana, extraída anteriormente de cadáveres, también se diseñó rápidamente. En 1986 la FDA aprobó la primera vacuna humana recombinante, contra la hepatitis B. La producción industrial de medicamentos utilizando sistemas vivos como *bioreactores* se ha generalizado desde entonces, y es ahora el procedimiento de síntesis preferido para numerosos medicamentos, especialmente debido al coste de fabricación relativamente bajo.

15 Muchas proteínas humanas diseñadas para uso terapéutico (y no terapéutico) se producen mediante tecnología de bioingeniería, incluyendo la eritropoyetina (para el tratamiento de la anemia), la interleucina 2 (para el tratamiento del carcinoma renal), la IL-1Ra (antagonista del receptor de la IL-1), el glucagón, el interferón, la enzima DNasa humana, la calcitonina y muchas otras.

20 Dichos medicamentos tienen principalmente una naturaleza proteica o polipeptídica, y se administran generalmente por vía parenteral, ya que la administración oral provocaría una rápida degradación del principio activo. Sin embargo, la administración parenteral puede causar problemas de cumplimiento por parte del paciente debido a las repetidas administraciones necesarias para garantizar la eficacia terapéutica. Estas proteínas suelen tener una semivida muy corta; por ejemplo, la hormona del crecimiento hGH (producida genéticamente) requiere inyecciones diarias. En consecuencia, para reducir el número de administraciones y aumentar el cumplimiento de los pacientes, se han llevado a cabo muchos experimentos para desarrollar sistemas de liberación de proteínas/medicamentos con una semivida aumentada.

25 Dichos sistemas de liberación deben garantizar el mantenimiento de la actividad del medicamento, por lo que deben asegurar que la estructura tridimensional de la proteína/medicamento permanezca intacta; sin embargo, las situaciones de estrés que pueden darse durante su preparación, tal como la presencia de disolvente orgánico y/o las variaciones de temperatura y pH, pueden provocar la desamidación u oxidación de la cadena proteica, lo que conlleva la desnaturalización y la pérdida de actividad terapéutica.

30 Por ejemplo, se conoce el uso de microesferas de PLGA (ácido poliláctico/glicólico) como sistema de liberación de pequeños péptidos, con excelentes resultados (Hutchinson F.G., Biochem. Soc. Trans., 1985, 13:520-523); sin embargo, su uso para formular un depósito en la liberación de hGH fue imposible, porque la desnaturalización de la proteína creó problemas inflamatorios.

35 La búsqueda continua de sistemas de liberación de proteínas/medicamentos desprovistos de toxicidad, pero con una eficacia inalterada del principio activo suministrado, ha conducido al uso de polímeros naturales para formulaciones que (debido a su combinación con el principio activo) pueden presentar una modificación en la cinética del medicamento con el que se combinan.

40 El ácido hialurónico (HA) es un heteropolisacárido compuesto por residuos alternos de ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina. Es un polímero natural de cadena recta con un peso molecular que varía entre 50.000 y 13×10^6 Da, según la fuente de la que se obtenga y los procedimientos de preparación utilizados. Está presente en la naturaleza en los geles pericelulares, en la sustancia básica del tejido conectivo de los vertebrados (del que es uno de los principales componentes), y en el líquido sinovial de las articulaciones, el humor vítreo y el cordón umbilical.

45 Por lo tanto, el HA desempeña un papel biológico importante en los organismos vivos al proporcionar un soporte mecánico a las células de muchos tejidos, tales como la piel, los tendones, los músculos y los cartílagos.

Debido a sus propiedades, el ácido hialurónico protege los tejidos contra los radicales libres, controla los procesos inflamatorios y estimula la angiogénesis, y ha demostrado ser especialmente eficaz en la modulación de todas las etapas principales de la curación de heridas (EP 1196179).

50 Es conocido el uso de dicho polisacárido como portador de diversos tipos de medicamentos, en simple combinación o salificado con ácido hialurónico, ya que sus particulares propiedades de biocompatibilidad, biodegradabilidad, no inmunogenicidad, viscosidad e hidratabilidad lo hacen especialmente adecuado como sistema de liberación de medicamentos y moléculas tanto a nivel tópico como sistémico (EP 197718, EP 445255). Dicho polisacárido también se ha estudiado como un medio de administración de fármacos para proteínas específicas, tales como la IL-1Ra (US 6,096,728), la eritropoyetina (Hahn SK. et al., Int J Pharm., 2006, 28, 322:44-51), la insulina (Nomura M. et al., J

Pharmacol, 1994, 46:768-770), la hormona del crecimiento (Kim SJ. et al., Journal of Controlled Release, 2005, 104:323-335), el interferón y la hormona estimulante del folículo (US 8,025,900).

En todos estos casos, la combinación del medicamento con el polisacárido ha conducido a una liberación "lenta" de la proteína transportada, pero no lo suficientemente lenta como para reducir el número de administraciones del medicamento.

El HA es un polisacárido completamente natural que se degrada rápidamente por las enzimas presentes en el organismo (hialuronidasa), liberando el medicamento con el que se combina con relativa rapidez. Por estas razones, los grupos carboxilo e hidroxilo del HA se han modificado químicamente para dar lugar a derivados reticulados (US 4.582.865 US 4.713.448 US 5.676.964 US 4.957.74 US 5.827.937) o derivados con otros polímeros naturales o sintéticos, o con moléculas de diversos tamaños y características fisicoquímicas (US 4,851,521); sin embargo, los procesos de preparación de dichos derivados suelen perjudicar la integridad del agente farmacológico transmitido.

Otros ejemplos se dan en el documento WO 2006/092233 que divulga derivados amidados de HA (en particular hexadecilamida con amidación 0,1-5 %) para el tratamiento de la osteoartritis; en el artículo de Borzacchiello A. et al. "Effect of hyaluronic acid amide derivative on equine synovial fluid viscoelasticity" (Journ.Biomedical Material Research, vol. 92A, no.3, (2010) page 1162-1170) que divulga la hexadecilamida de HA (amidación 2 %) como potencial agente terapéutico en la osteoartritis en el caballo y en el documento EP1095064 que divulga la preparación de amidas de HA (amidación 5-60 %) y sus posibles usos.

Descripción de la invención

El objeto de la invención son los novedoso sistemas de liberación que comprenden amidas específicas de ácido hialurónico en asociación con proteínas terapéuticas y/o biológicamente activas de naturaleza principalmente hidrófoba, para una liberación sostenida y lenta en el tiempo que aumenta la eficacia del medicamento y el cumplimiento del paciente. Más concretamente, el objeto de la presente invención es un sistema de liberación sostenida de proteínas terapéuticas y/o biológicamente activas que comprende

a) una proteína de naturaleza principalmente hidrófoba y

b) una amida de ácido hialurónico (HA) en la que la proteína de naturaleza principalmente hidrófoba tiene un índice GRAVY no inferior a -0,5 y la amida de HA se selecciona entre

- hexadecilamida de HA: Amida de HA con hexadecilamina con un porcentaje de amidación molar que varía entre el 8 y el 9 %;

- octilamida de HA: Amida de HA con octilamina, con un porcentaje de amidación molar que varía entre el 10 y el 11 %;

- dodecilamida de HA: Amida de HA con dodecilamina, con un porcentaje de amidación molar que varía entre el 10 y el 11 %;

- tert-butilamida de HA: Amida de HA con tert-butilamina, con un porcentaje de amidación molar que varía entre el 7 y el 8 %;

- bencilamida HA: Amida de HA con bencilamina, que tiene un contenido molar de amidación del 8 al 9 %;

en el que el HA utilizado para la preparación de las amidas tiene un peso molecular medio que varía entre 150 y 250 KDa o entre 500 y 730 KDa.

A continuación se enumeran ejemplos de proteínas terapéuticas y/o biológicamente activas con una naturaleza principalmente hidrófoba, según la invención:

La **insulina** es una hormona proteica con propiedades anabólicas, producida por las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas; consiste en dos cadenas unidas por dos puentes de sulfuro. Su función más conocida es la regulación de los niveles de glucosa en sangre. Por lo tanto, esta proteína se utiliza para tratar la diabetes de tipo 1 o de tipo 2 con muy poca o ninguna producción de insulina. La hormona se administra por inyección subcutánea (porque si se inyecta directamente en el torrente sanguíneo, la absorción del medicamento es demasiado rápida, lo que puede provocar una hipoglucemia). El enfoque terapéutico se basa en un número diario variable de pruebas de glucosa en sangre realizadas por el paciente, con la consiguiente administración de insulina a dosis calibradas (3 o más).

La **hormona del crecimiento (GH)** es una hormona peptídica de la pituitaria anterior que consiste en 191 aminoácidos y tiene un peso de 22.005 Da. Su función principal es estimular el desarrollo del cuerpo humano (y el de muchos otros vertebrados) al promover el crecimiento y la división mitótica de las células de casi todos los tejidos del cuerpo (en particular, promueve el crecimiento de los huesos, los cartílagos y el tejido conectivo).

Durante la infancia, la hiposecreción de GH causa enanismo hipofisario, mientras que la hipersecreción causa gigantismo hipofisario. Si la hipersecreción comienza una vez finalizado el crecimiento, generalmente debido a un

tumor, se desarrolla la acromegalia, en la que los huesos de la cara, las manos y los pies aumentan considerablemente.

Por lo tanto, se utiliza para los pacientes aún en fase de crecimiento y para los adultos que padecen tumores hipofisarios.

- 5 La GH también se utiliza para tratar trastornos no causados por un déficit de GH, tales como el síndrome de Turner, la enfermedad renal crónica, la ISS (baja estatura idiopática) y la esclerosis múltiple, y para aumentar la pérdida de peso en pacientes obesos, en la fibromialgia, en la enfermedad de Crohn y en la colitis ulcerosa.

10 La administración intraarticular de hGH fue probada recientemente con excelentes resultados en el tratamiento de la osteoartritis (OA), demostrando también la eficacia de dicha hormona en la reparación del daño del cartílago causado por la OA (EP1153607 Kim SB et al., J Korean Med Sci., 2010, 25:776-80).

15 La **calcitonina (CT)** es una hormona que consiste en un polipéptido de 32 aminoácidos producido, en los seres humanos, por las células parafoliculares (también conocidas como células C) de la tiroides. La función principal de la calcitonina es reducir la concentración de calcio en la sangre contrarrestando los efectos de la hormona paratiroidea parathormona. Este mecanismo de regulación del calcio se ha encontrado en peces, reptiles, aves y mamíferos. La hormona calcitonina también actúa a nivel renal, estimulando la eliminación tubular del calcio. El sCT (CT salmón) se utiliza generalmente para tratar la osteoporosis, la hipercalcemia, las metástasis óseas y la enfermedad de Paget.

Una vez más, datos experimentales recientes han demostrado la eficacia de la calcitonina en el tratamiento de la osteoartritis: su administración ha demostrado proteger las superficies articulares contra la erosión causada por la OA (Manicourt DH et al., J Musculoskelet Neuronal Interact, 2005, 5(3):285-293).

20 La **IL1-Ra** es el antagonista del receptor de la citoquina IL-1, un potente inductor de procesos inflamatorios locales y sistémicos. La IL-1 es producida principalmente por los linfocitos B y T y los macrófagos tras el estímulo bacteriano o la estimulación por otras citoquinas; también es secretada por los macrófagos alveolares, las células endoteliales, epiteliales y del músculo liso, los fibroblastos, los osteoclastos, los sinoviocitos y muchos otros tipos de células. La IL-1 está implicada en trastornos especialmente graves como la psoriasis y el choque séptico, y en la patogénesis de algunos tipos de tumores. En combinación con otras citoquinas, la IL-1 representa uno de los principales mediadores de los procesos inflamatorios, por lo que está implicada en muchos trastornos como la osteoporosis, la artritis reumatoide (RA), la artritis psoriásica y la osteoartritis (OA): de hecho, se han encontrado grandes cantidades de IL-1 en el líquido sinovial de los pacientes que sufren artritis reumatoide y/u osteoartritis.

30 La expresión de la IL-1 es crucial para la patogénesis de la OA, ya que la IL-1 promueve la síntesis, la secreción y la activación de las metaloproteasas (MMP), enzimas proteicas producidas por los condrocitos, que son responsables de la degradación de la matriz del cartílago.

35 Todos los datos experimentales relativos al proceso de la OA apoyan firmemente el concepto de que la IL-1 y el TNF α representan el principal sistema catabólico implicado en la destrucción de los tejidos articulares; de hecho, se ha demostrado que al bloquear la producción y/o la activación de la IL-1, se previene y/o reduce la destrucción de la matriz articular (Caron J.P. et al., Arthritis Rheum, 1996, 39:1535-1544).

Actualmente se utilizan nuevos medicamentos que contienen el antagonista del receptor IL-1Ra para contrarrestar los efectos de esta citoquina, ya que el bloqueo del receptor ha demostrado ser una forma eficaz de tratar los trastornos en los que está implicada la IL-1 (Burger D. et al., Cytokine Reference, Oppenheim JJ y Feldmann M, Eds. Nueva York, Londres, Academic Press, 2000, p. 31-336 Jiang Y. et al., Arthritis Rheum, 2000, 43(5):1001-9).

40 La IL-1Ra es una proteína que actúa como inhibidor de dicha interleucina; sin embargo, los medicamentos que contienen IL-1Ra (tales como *Kineret*® basado en la *anakinra*, la forma recombinante no glicosilada de la proteína humana IL-1Ra), tienen una semivida muy corta, lo que a menudo perjudica el resultado clínico. Por lo tanto, es importante formular una composición farmacéutica novedosa que contenga IL-1Ra para administrar el medicamento de forma sostenida y lenta, garantizando una semivida más larga para asegurar resultados clínicos consolidados.

45 El **factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF)** es una glicoproteína de 174-180 aminoácidos que estimula la médula ósea para producir granulocitos y células madre que posteriormente se liberan en el torrente sanguíneo. Este factor de crecimiento ha demostrado ser activo como neurotrofina, por lo que actualmente se está estudiando para el tratamiento de la isquemia cerebral y la esclerosis lateral amiotrófica. Normalmente se utiliza en pacientes oncológicos, para contrarrestar la neutropenia asociada a la quimioterapia; por último, estudios experimentales recientes han demostrado que el tratamiento intravenoso con G-CSF favorece la regeneración de las células cardíacas dañadas.

55 El **factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)** es una proteína biológicamente activa que consiste en un dímero compuesto por dos polipéptidos unidos por un puente disulfuro, designados como A y B. Se sintetiza principalmente en los megacariocitos, y en el ser humano representa el principal agente mitógeno sérico para las células de origen mesenquimal. Se utiliza para favorecer la cicatrización de heridas/úlceras porque es un mediador de

la formación de tejido conectivo estromal y, por todo ello, actualmente también se utiliza para favorecer la formación de nuevo tejido óseo.

5 El **factor de crecimiento transformante- β (TGF β)** es un péptido que desempeña un papel crucial en la regulación del sistema inmunitario y en la regeneración de tejidos, la diferenciación celular y la embriogénesis. Se utiliza principalmente como agente cicatrizante porque aumenta la curación de las heridas/úlceras de la piel y favorece el cierre de las fracturas óseas; por estas razones también se utiliza en el tratamiento de la osteoporosis y la osteoartritis. Por último, los datos experimentales demuestran que el TGF β también posee propiedades cardioprotectoras tras un daño isquémico en el corazón.

10 El **factor de crecimiento epidérmico (EGF)** es un factor de crecimiento que desempeña un papel importante en la regulación del crecimiento y en la proliferación y diferenciación celular. El EGF humano es una proteína de 6045 Dalton, compuesta por 53 residuos de aminoácidos y tres puentes disulfuro intramoleculares. Se encuentra en las plaquetas, los macrófagos, la orina, la saliva, la leche y el plasma.

15 Es una proteína utilizada como agente gastroprotector porque estimula la proliferación de las células de la mucosa gastrointestinal; se utiliza para promover la regeneración del tejido cutáneo porque estimula la formación de nuevo tejido de granulación en el tratamiento de heridas/úlceras cutáneas, venosas y de otros tipos. Por último, las aplicaciones tópicas de EGF han dado excelentes resultados en la regeneración del tejido corneal dañado, por ejemplo después de una cirugía de córnea o en el caso de trastornos degenerativos como la queratitis.

20 El **factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF-B)** es un factor de crecimiento proteico que interviene tanto en la vasculogénesis (es decir, la génesis ex novo de un sistema circulatorio en edad embrionaria) como en la neurogénesis y la angiogénesis. También es un agente neuroprotector que protege a las neuronas contra el daño isquémico mediado por el NMDA.

La **eritropoyetina (EPO)** es una hormona glucoproteica producida en el ser humano por los riñones y, en menor medida, por el hígado y el cerebro, cuya función principal es regular la eritropoyesis (producción de glóbulos rojos por la médula ósea).

25 La EPO también se ha producido en el laboratorio y se ha utilizado como medicamento para tratar la anemia en pacientes que padecen enfermedades renales o trastornos sanguíneos, o para acelerar la recuperación tras la administración de quimioterapia a pacientes con cáncer. En estudios recientes, se ha observado que la EPO desempeña un papel neuroprotector como agente antiinflamatorio.

30 La eritropoyetina es una molécula glicoproteica que pesa aproximadamente 30000 D. Finalmente, desde 1989, la EPO está disponible como medicamento para los pacientes anémicos sometidos a diálisis. Posteriormente, su uso se extendió también a los pacientes con insuficiencia renal crónica sometidos a tratamiento conservador, contribuyendo a mejorar su calidad de vida. La producción farmacéutica de eritropoyetina se realiza por el procedimiento del ADN recombinante.

35 El **factor de crecimiento nervioso (NGF)** es una proteína secretada en el hipotálamo, por la tiroides y la hipófisis; también es producida por las células musculares lisas y los fibroblastos. La forma activa es el NGF β de 26 KDa, un homodímero con dos puentes disulfuro que une dos cadenas proteicas de 118 aminoácidos. Es responsable de la diferenciación y funcionalidad de las neuronas del NS periférico y de las neuronas colinérgicas del CNS. Por ello, se utiliza para tratar trastornos neurodegenerativos tales como la demencia; el NGF también ha demostrado ser útil para tratar el glaucoma.

40 La **transferrina** es la principal proteína transportadora de hierro en el torrente sanguíneo. La transferrina, sintetizada por el hígado y el sistema monocito-macrófago, une de forma muy estable, pero reversible, el hierro absorbido a nivel intestinal y el procedente de la degradación de los glóbulos rojos, transportándolo a los lugares de utilización (en particular la médula ósea) y de depósito (en particular el hígado).

45 Desde el punto de vista estructural es una glicoproteína formada por una cadena polipeptídica de 679 aminoácidos con un peso molecular de aproximadamente 80 KD, y posee dos sitios de unión para los iones férricos (Fe $^{3+}$) pero ninguna afinidad por los iones ferrosos (Fe $^{2+}$); su semivida es de aproximadamente 8 días.

50 La transferrina es sintetizada principalmente por el hígado, y sus valores de referencia en la sangre son de 200-360 mg/dl. Los niveles de transferrina aumentan durante el uso de la píldora anticonceptiva, durante el embarazo y en caso de deficiencia de hierro. Por el contrario, descienden en caso de síndrome nefrótico, enfermedad hepática, desnutrición, trastornos inflamatorios crónicos, tumores y tratamientos con hierro o cortisona. La reducción fisiológica puede producirse en la edad neonatal o en la vejez.

55 Los **TIMP** son proteínas que inhiben las metaloproteasas, es decir, las enzimas que participan en la degradación de la matriz del cartílago; la familia de los TIMP incluye las formas TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4 producidas por los condrocitos, los fibroblastos, los sinoviocitos, los osteoblastos, las neuronas, los macrófagos, las células musculares lisas, los hepatocitos y otros.

Por consiguiente, desempeñan un papel protector de los condrocitos y de la erosión del cartilago causada por la OA.

Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a novedosas composiciones farmacéuticas que comprenden amidas específicas de ácido hialurónico combinadas (es decir, no unidas químicamente) con proteínas de naturaleza principalmente hidrófoba, que son terapéuticas y/o biológicamente activas, para la preparación de sistemas de liberación sostenida y lenta de proteínas, es decir, a sistemas para la liberación sostenida de proteínas terapéuticas y/o biológicamente activas que comprenden

c) una proteína de naturaleza principalmente hidrófoba y

d) una amida de ácido hialurónico (HA) en la que la proteína de naturaleza principalmente hidrófoba tiene un índice GRAVY no inferior a -0,5 y la amida de HA se selecciona entre

- hexadecilamida de HA: Amida de HA con hexadecilamina con un porcentaje de amidación molar que varía entre el 8 y el 9 %;

- octilamida de HA: Amida de HA con octilamina, con un porcentaje de amidación molar que varía entre el 10 y el 11 %;

- dodecilamida de HA: Amida de HA con dodecilamina, con un porcentaje de amidación molar que varía entre el 10 y el 11 %;

- tert-butilamida de HA: Amida de HA con tert-butilamina, con un porcentaje de amidación molar que varía entre el 7 y el 8 %;

- bencilamida HA: Amida de HA con bencilamina, con un contenido molar de amidación del 8 al 9 %;

en el que el HA utilizado para la preparación de las amidas tiene un peso molecular medio que varía entre 150 y 250 KDa o entre 500 y 730 KDa.

Los sistemas según la invención provocan:

- La liberación sostenida de dicha proteína, durante un periodo de tiempo prolongado (en comparación con la misma proteína administrada "tal cual"). Esta liberación continua aumenta la ventana terapéutica del medicamento, ya que no se libera en grandes cantidades en el periodo inmediatamente posterior a su administración (como suele ocurrir con los medicamentos administrados "tal cual"). La administración como sistema de liberación en combinación con amidas específicas de HA modula la cantidad liberada (en relación con el tiempo) y el periodo de liberación del medicamento (se obtiene, por tanto, un aumento gradual de la cantidad de proteína liberada a lo largo del tiempo, lo que lleva a un periodo de liberación final superior al que se produce cuando se administra "tal cual"); en conclusión, el perfil cinético de liberación de la proteína se modifica significativamente, al igual que su perfil de eficacia terapéutica.

- El novedoso sistema de liberación no es tóxico, ya que es biocompatible y biodegradable, y determina la liberación lenta de la proteína/medicamento transportado, garantizando el mantenimiento de la actividad terapéutica; se asegura así la integridad de la estructura tridimensional del principio activo, que no sufre ninguna desnaturalización.

- El sistema de liberación según la invención no provoca ninguna modificación química de la proteína transportada porque está formado por una combinación de amidas de HA particulares y las proteínas transportadas que se combinan/mezclan con ellas. Por lo tanto, no se establece ningún enlace químico covalente entre el portador y el medicamento, lo que garantiza la integridad estructural de la proteína/medicamento.

- Estas novedosas características aumentan considerablemente el cumplimiento por parte del paciente, ya que el medicamento puede administrarse según una farmacocinética novedosa y, en consecuencia, con diferentes dosis: intervalos más largos entre administraciones y cambios en la cantidad de medicamento administrado, lo que conlleva una mayor eficacia y menos efectos secundarios.

Las proteínas farmacológicamente y/o biológicamente activas que forman el objeto de la invención deben poseer principalmente características hidrófobas medidas según el índice GRAVY (Grand Average of Hydropathy); el valor GRAVY de un péptido o proteína se calcula como la suma de los valores de hidropatía de todos los aminoácidos presentes en la proteína, dividida por el número de sus residuos en la secuencia proteica. Cada aminoácido posee un índice de hidropatía determinado, que varía entre 4,5 para la isoleucina (aa. con residuo formado por un radical hidrocarburo aromático que confiere a la molécula una clara naturaleza no polar y, por tanto, hidrófoba) y -4,5 para la arginina, un aminoácido con un residuo cargado positivamente (Kyte J. et al., J. Mol. Biol., 1982, 157:105-132). Esta escala indica que cuanto mayor es el índice de hidropatía, mayor es la hidrofobicidad del aminoácido analizado (Figura 1). Para determinar fácilmente el valor GRAVY de la proteína analizada, el ProtParam (Gasteiger E. et al., Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server, JM Walker ed., The Proteomics Protocols Handbook, Humana

Press, 2005, 571-607), que proporciona diversas propiedades fisicoquímicas de las proteínas estudiadas analizando su secuencia; cuando se introduce dicha secuencia de aminoácidos, el programa calcula el valor GRAVY de la proteína cuyo grado de hidrofobicidad se quiere medir.

5 Según la invención, se entiende por "proteínas de naturaleza principalmente hidrófoba" aquellas que poseen un índice GRAVY que varía de no menos de -0,5 hasta valores positivos: una vez más, cuanto mayor sea el índice GRAVY, mayor será la hidrofobicidad de la proteína analizada.

Las proteínas terapéuticas y/o biológicamente activas según la presente invención son la insulina, la hGH, la sCT, la IL-1Ra, el G-CSF, el PDGF, preferentemente el PDGF-BB, el TGF- β , el EGF, el VEGF-B, la EPO, el NGF β , la transferrina, el TIMP-2, el TIMP-3 y el TIMP-4.

10 A continuación se enumeran ejemplos de proteínas de naturaleza principalmente hidrófoba a las que se refiere la presente invención:

- Insulina: Índice GRAVY = 0,2
- Hormona de crecimiento humano, hGH: Índice GRAVY = -0,3
- Calcitonina, sCT (CT de salmón): Índice GRAVY = -0,5
- 15 • IL-1, antagonista del receptor de IL-1Ra: Índice GRAVY = -0,4
- Factor estimulante de colonias de granulocitos, G-CSF: Índice GRAVY = 0,2
- Factor de crecimiento derivado de las plaquetas, PDGF: Índice GRAVY = -0,5, se prefiere PDGF-BB = -0,1
- Factor de crecimiento transformador TGF- β : Índice GRAVY = -0,3
- Factor de crecimiento epidérmico, EGF: Índice GRAVY = -0,5
- 20 • Factor de crecimiento endotelial vascular B, VEGF-B: Índice GRAVY = -0,2
- Eritropoyetina (humana) o EPO: Índice GRAVY = -0,03
- Factor de crecimiento nervioso o NGF β : Índice GRAVY = -0,3
- Transferrina (humana): Índice GRAVY = -0,2
- Inhibidor tisular de la metaloproteinasa-2 (humano), TIMP-2: Índice GRAVY = -0,2
- 25 • Inhibidor tisular de la metaloproteinasa 3 (humano), TIMP-3: Índice GRAVY = -0,3
- Inhibidor tisular de la metaloproteinasa-4 (humano), TIMP-4: Índice GRAVY = -0,18.

El Solicitante ha demostrado que las amidas de ácido hialurónico objeto de la invención, enumeradas a continuación, forman un sistema de liberación que determina la liberación sostenida y lenta de las proteínas de naturaleza hidrófoba contenidas en él, mientras que las proteínas de naturaleza principalmente hidrofílica, combinadas con las mismas amidas, no forman sistemas de liberación adecuados para su liberación sostenida y lenta en el tiempo.

30 Las amidas de HA que deben seleccionarse para dichos sistemas de liberación objeto de la invención son:

- hexadecilamida de HA: Amida de HA con hexadecilamina, con un porcentaje de amidación molar (determinado por 1H-RMN) que varía entre el 7 y el 14 %, preferentemente entre el 8 y el 9 %;
- 35 • octilamida de HA: La amida de HA con octilamina, con un porcentaje de amidación molar (determinado por 1H-RMN) que varía entre el 10 y el 15 %, preferentemente entre el 10 y el 11 %;
- dodecilamida de HA: Amida de HA con dodecilamina, con un porcentaje de amidación molar (determinado por 1H-RMN) que varía entre el 10 y el 15 %, preferentemente entre el 10 y el 11 %;
- tert-butilamida de HA: La amida de HA con tert-butilamina, que tiene un porcentaje de amidación molar (determinado por 1H-RMN) que varía entre el 7 y el 12 %, preferentemente entre el 7 y el 8 %;
- 40 • bencilamida HA: La amida de HA con la bencilamina, con un porcentaje de amidación molar (determinado por 1H-RMN) que varía entre el 7 y el 15 %, preferentemente entre el 8 y el 9 %.

El HA utilizado en la presente invención para la preparación de dichas amidas puede proceder de cualquier fuente, tal como la extracción de crestas de gallo (EP 138572) o de la fermentación (por ejemplo, de *Streptococcus equi* como es conocido por el experto), o mediante un proceso tecnológico (por ejemplo, de *Bacillus*, WO 2012/032154), y tienen un peso molecular promedio en peso (determinado por el número de viscosidad límite: Terbojevich et al., Carbohydrate Research, 1986, 149:363-377 method) de entre 150 y 250 KDa o entre 500 y 730 KDa.

Se prefiere la hexadecilamida de HA con un peso molecular promedio en peso entre 150 y 250 KDa o entre 500 y 730 KDa.

50 Las amidas de HA enumeradas anteriormente, que constituyen el objeto de la invención, pueden prepararse como se describe en el documento EP 1095064 en el que también se describen diferentes usos de las mismas, incluyendo la formación de sistemas de liberación de sustancias farmacológicamente activas, pero sin hacer ninguna distinción entre las especies químicas de los medicamentos utilizados y el tipo de amida seleccionada, y sobre todo, sin describir el efecto obtenido. Sin embargo, ahora se ha descubierto que determinadas amidas de HA, tales como la hexadecilamida, la octilamida, la dodecilamida, la tert-butilamida y la bencilamida, con porcentajes particulares de

amidación e intervalos de MW seleccionados, combinadas con proteínas que tienen una naturaleza principalmente hidrófoba (y por lo tanto un índice GRAVY superior a -0,5), que son terapéuticas y/o biológicamente activas, son útiles para la preparación de un novedoso sistema de liberación lenta y sostenida para dichas proteínas.

Se prefieren las siguientes proteínas:

- 5
 - Insulina
 - hGH
 - sCT
 - IL-1Ra
 - G-CSF
- 10
 - PDGF, preferentemente PDGF-BB
 - TGF- β
 - EGF
 - VEGF-B
- 15
 - EPO
 - NGF β
 - Transferrina
 - TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4.

Dichas proteínas pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante o por extracción de tejidos.

Un objeto adicional de la invención son los novedosos sistemas de liberación que comprenden:

- 20
 1. hexadecilamida de HA, octilamida, dodecilamida, tert-butilamida o bencilamida, combinada con
 2. Insulina, hGH, sCT, IL-1Ra, G-CSF, PDGF, preferentemente PDGF-BB, TGF- β , EGF VEGF-B, EPO, NGF β , transferrina, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4, posiblemente combinados con estabilizadores (cuando sea necesario) y excipientes.

En particular, el objeto de la invención es el sistema que comprende:

- 25
 1. Hexadecilamida de HA, preferentemente hexadecilamida de HA con un peso molecular promedio en peso de entre 150 y 250 KDa o entre 500 y 730KDa.
 2. hGH o sCT,
 3. posiblemente combinado con estabilizadores y excipientes.

30 Los sistemas novedosos son utilizables en la liberación lenta y sostenida de los agentes activos que contienen porque modifican la ventana terapéutica de la proteína/medicamento combinado con ellos: por lo tanto, son posibles diferentes regímenes de dosificación, lo que conduce a un mejor cumplimiento por parte del paciente.

35 Es un objeto adicional el sistema de liberación sostenida de proteínas según la presente invención para su uso en el tratamiento de daños articulares causados por la artrosis, en el tratamiento de la tendinitis, en la reparación de daños musculares cardíacos, en la reparación de fracturas/cavidades óseas o en la cicatrización de úlceras/heridas/laceraciones cutáneas por administración inyectable, intraarticular, tópica u oral.

Las proteínas presentes en el sistema de liberación determinarán el uso del sistema. Por ejemplo, el sistema de liberación que comprende la hexadecilamida de HA con hGH o sCT se utilizará preferentemente por administración intraarticular para tratar la OA, la artritis reumatoide y psoriásica, y la osteoporosis.

40 El Solicitante ha demostrado que este novedoso sistema de liberación determina la liberación continua de hGH en el líquido sinovial de la articulación tratada, lo que conlleva un mayor efecto terapéutico, pero sin permitir que el agente activo pase al plasma (reduciendo así su concentración en la articulación), evitando así los efectos secundarios sistémicos del medicamento.

El objeto de la invención es también el sistema que comprende:

- 45
 - una o más amidas de HA como las enumeradas y descritas anteriormente, con insulina; este novedoso sistema es descrito por el Solicitante como un novedoso depósito en la liberación lenta de insulina para el tratamiento de trastornos diabéticos que requieren menores administraciones de medicamento.

El objeto de la invención es también el sistema que comprende:

- 50
 - una o más amidas de HA previamente enumeradas y descritas; preferentemente hexadecilamida, combinada con proteínas como PDGF (preferentemente PDGF-BB), TGF- β , EGF o VEGF-B, para uso inyectable, intraarticular o tópico o para administración oral.

Los factores proteicos descritos anteriormente (PDGF, TGF- β , EGF y VEGF-B) son factores de crecimiento cuya presencia es conocida, y están particularmente concentrados en el plasma humano rico en plaquetas (PRP). El novedoso sistema de liberación que los contiene será preferentemente utilizable para tratar los daños articulares causados por la OA, en la tendinitis, para reparar daños musculares cardíacos, para reparar laceraciones/fracturas/cavidades óseas para promover la formación de nuevo tejido óseo, y finalmente, en la curación de úlceras/heridas/laceraciones de la piel para promover la formación de nuevo tejido conectivo.

Otro objeto de la invención es el sistema que comprende:

- una o más amidas de HA previamente enumeradas y descritas, preferentemente la hexadecilamida, en combinación con los inhibidores de metaloproteasas TIMP-2, TIMP-3 o TIMP-4, para uso inyectable, preferentemente intraarticular.

El novedoso sistema de liberación será preferiblemente utilizable para tratar el daño del cartílago articular causado por la OA y reparar las erosiones osteocondrales.

A continuación se describen los ejemplos de preparación de los novedosos sistemas de liberación y los experimentos realizados por el Solicitante para demostrar la eficacia de dichos sistemas según la invención.

EJEMPLO 1: Síntesis del derivado hexadecimial del HA con un MW promedio en peso de entre 500 y 730 kDa, Hyadd4, con un porcentaje de amidación molar de entre el 8 y el 9 %

Se disuelven 5,00 g de sal sódica de ácido hialurónico de origen fermentativo con un MW de entre 500 y 730k Da en 250 ml de agua, y la solución resultante se percola a través de una columna de vidrio preembalada con 100 ml de resina Dowex en forma de tetrabutilamonio. La solución de HA, en forma de sal de TBA, se eluye, se recoge y se seca por congelación.

Se disuelven 2 g del producto así obtenido en 200 ml de dimetilsulfóxido (DMSO), y se añaden 64 μ l de ácido metanosulfónico; se añaden 53 mg de 1,1'-carbonildiimidazol, y se deja la mezcla bajo agitación suave durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación se añaden 998 mg de hexadecilamina y la reacción de amidación se lleva a cabo a 42 °C durante 24 horas.

La reacción se detiene añadiendo 5 ml de una solución acuosa saturada de NaCl, y 30 minutos después se añaden 1,5 volúmenes de etanol absoluto para aislar el derivado obtenido. El precipitado se lava en etanol/H₂O 80:20 y, finalmente, en etanol absoluto, y se seca bajo alto vacío a 40 °C.

Se obtienen 1,3 g de derivado y se determina su grado de amidación por 1H-RMN.

EJEMPLO 2: Síntesis del derivado octilamídico del HA con un MW promedio en peso de entre 500 y 730 kDa, Hyadd2, con un porcentaje de amidación molar de entre el 10 y el 11 %

Se disuelven 5,00 g de sal sódica de ácido hialurónico de origen fermentativo con un MW de entre 500 y 730k Da en 250 ml de agua, y la solución resultante se percola a través de una columna de vidrio preembalada con 100 ml de resina Dowex en forma de tetrabutilamonio. La solución de HA, en forma de sal de TBA, se eluye, se recoge y se seca por congelación.

Se disuelven 2 g del producto así obtenido en 200 ml de dimetilsulfóxido (DMSO), y se añaden 64 μ l de ácido metanosulfónico; se añaden 61,4 mg de 1,1'-carbonildiimidazol, y se deja la mezcla bajo agitación suave durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación se añaden 330 mg de octilamina y la reacción de amidación se lleva a cabo a 42 °C durante 24 horas.

La reacción se detiene añadiendo 5 ml de una solución acuosa saturada de NaCl, y 30 minutos después se añaden 1,5 volúmenes de etanol absoluto para aislar el derivado obtenido. El precipitado se lava en etanol/H₂O 80:20 y, finalmente, en etanol absoluto, y se seca bajo alto vacío a 40 °C.

Se obtienen 1,2 g de derivado y se determina su grado de amidación por 1H-RMN.

EJEMPLO 3: Síntesis del derivado dodecilamídico del HA con un MW promedio en peso entre 500 y 730 kDa, Hyadd3, con un porcentaje de amidación molar de entre el 10 y el 11 %

Se disuelven 5,00 g de sal sódica de ácido hialurónico de origen fermentativo con un MW de entre 500 y 730k Da en 250 ml de agua, y la solución resultante se percola a través de una columna de vidrio preembalada con 100 ml de resina Dowex en forma de tetrabutilamonio. La solución de HA, en forma de sal de TBA, se eluye, se recoge y se seca por congelación.

Se disuelven 2 g del producto así obtenido en 200 ml de dimetilsulfóxido (DMSO), y se añaden 64 μ l de ácido metanosulfónico; se añaden 54,2 mg de 1,1'-carbonildiimidazol, y se deja la mezcla bajo agitación suave durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación se añaden 448 mg de dodecilamina y la reacción de amidación se lleva a cabo a 42 °C durante 24 horas.

La reacción se detiene añadiendo 5 ml de una solución acuosa saturada de NaCl, y 30 minutos después se añaden 1,5 volúmenes de etanol absoluto para aislar el derivado obtenido. El precipitado se lava en etanol/H₂O 80:20 y, finalmente, en etanol absoluto, y se seca bajo alto vacío a 40 °C.

Se obtienen 1,25 g de derivado y se determina su grado de amidación por 1H-RMN.

5 **EJEMPLO 4: Síntesis del derivado tert-butilamida del HA con un MW promedio en peso de entre 500 y 730 kDa, Hyadd6, con un porcentaje de amidación molar de entre 7 y 8 %**

10 Se disuelven 5,00 g de sal sódica de ácido hialurónico de origen fermentativo con MW entre 500 y 730k Da en 250 ml de agua, y la solución resultante se percola a través de una columna de vidrio preembalada con 100 ml de resina Dowex en forma de tetrabutilamonio. La solución de HA, en forma de sal de TBA, se eluye, se recoge y se seca por congelación.

Se disuelven 2 g del producto así obtenido en 200 ml de dimetilsulfóxido (DMSO), y se añaden 64 µl de ácido metanosulfónico; se añaden 53 mg de 1,1'-carbonildiimidazol, y se deja la mezcla bajo agitación suave durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación se añaden 178 mg de tert-butilamina y la reacción de amidación se lleva a cabo a 42 °C durante 24 horas.

15 La reacción se detiene añadiendo 5 ml de una solución acuosa saturada de NaCl, y 30 minutos después se añaden 1,5 volúmenes de etanol absoluto para aislar el derivado obtenido. El precipitado se lava en etanol/H₂O 80:20 y, finalmente, en etanol absoluto, y se seca bajo alto vacío a 40 °C.

Se obtienen 1,25 g de derivado y se determina su grado de amidación por 1H-RMN.

20 **EJEMPLO 5: Síntesis del derivado bencilamídico del HA con un MW promedio en peso de entre 500 y 730 kDa, Hyadd1, con un porcentaje de amidación molar de entre 8 y 9 %**

Se disuelven 5,00 g de sal sódica de ácido hialurónico de origen fermentativo con MW entre 500 y 730k Da en 250 ml de agua, y la solución resultante se percola a través de una columna de vidrio preembalada con 100 ml de resina Dowex en forma de tetrabutilamonio. La solución de HA, en forma de sal de TBA, se eluye, se recoge y se seca por congelación.

25 Se disuelven 2 g del producto así obtenido en 200 ml de dimetilsulfóxido (DMSO), y se añaden 64 µl de ácido metanosulfónico; se añaden 54,0 mg de 1,1'-carbonildiimidazol, y se deja la mezcla bajo agitación suave durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación se añaden 260 mg de bencilamina y la reacción de amidación se lleva a cabo a 42 °C durante 24 horas.

30 La reacción se detiene añadiendo 5 ml de una solución acuosa saturada de NaCl, y 30 minutos después se añaden 1,5 volúmenes de etanol absoluto para aislar el derivado obtenido. El precipitado se lava en etanol/H₂O 80:20 y, finalmente, en etanol absoluto, y se seca bajo alto vacío a 40 °C.

Se obtienen 1,25 g de derivado y se determina su grado de amidación por 1H-RMN.

EJEMPLO 6: preparación de formulaciones que contienen HA y hGH en las relaciones de 10:1 y 20:1 p/p

35 Se disuelven 8 mg de sal sódica de ácido hialurónico de origen fermentativo con un MW entre 150 y 250 KDa (LMW) y entre 500 y 730 kDa (MMW) en 1 ml de tampón fosfato a pH=7,4. Una vez completada la disolución, se añaden 0,8 mg de hGH para obtener una relación de peso polisacárido/proteína de 10:1, y 0,4 mg de hGH para obtener una relación de peso polisacárido/proteína de 20:1. Los dos ingredientes se mezclan adecuadamente para que la composición sea uniforme. La carga se calcula diluyendo la mezcla 1:10 en tampón y midiendo la absorbancia UV a 280 nm que, con el uso de una curva de calibración, proporciona el valor de la concentración de GH.

40 **EJEMPLO 7: preparación de la formulación que contiene el sistema de liberación formado por hexadecilamida de HA y hGH en la relación de 10:1 p/p**

45 Se disuelven 8 mg de un derivado de hexadecilamida de HA, **Hyadd4**, preparado como se describe en el Ejemplo 1, en 1 ml de tampón fosfato a pH=6,9. Una vez completada la disolución, se añaden 0,8 mg de hGH, previamente disueltos en una solución acuosa, y se mezclan convenientemente para que la composición sea uniforme y la proteína quede atrapada en el gel. La carga del gel se calcula diluyéndolo 1:10 en tampón y midiendo la absorbancia UV a 280 nm que, con el uso de una curva de calibración, proporciona el valor de la concentración de GH.

EJEMPLO 8: preparación de la formulación que contiene el sistema de liberación formado por tert-butilamida de HA y hGH , 10:1 p/p

50 Se disuelven 8 mg de **Hyadd6**, preparados como se describe en el Ejemplo 4, en 1 ml de tampón fosfato a pH=6,9 (8 mg/ml). Una vez completada la disolución, se añaden 0,8 mg de hGH, previamente disueltos en una solución acuosa, y se mezclan convenientemente para que la composición sea uniforme y la proteína quede atrapada en el gel. La

carga del gel se calcula diluyéndolo 1:10 en tampón y midiendo la absorbancia UV a 280 nm que, con el uso de una curva de calibración, proporciona el valor de la concentración de GH.

EJEMPLO 9: preparación de la formulación que contiene el sistema de liberación formado por octilamida de HA y hGH, 10:1 p/p

5 Se disuelven 8 mg de **Hyadd2**, preparados como se describe en el ejemplo 2, en 1 ml de tampón fosfato a pH=6,9 (8 mg/ml). Una vez completada la disolución, se añaden 0,8 mg de hGH, previamente disueltos en una solución acuosa, y se mezclan convenientemente para que la composición sea uniforme y la proteína quede atrapada en el gel. La carga del gel se calcula diluyéndolo 1:10 en tampón y midiendo la absorbancia UV a 280 nm que, con el uso de una curva de calibración, proporciona el valor de la concentración de GH.

10 **EJEMPLO 10: preparación de la formulación que contiene el sistema de liberación formado por dodecilamida de HA y hGH, 10:1 p/p**

15 Se disuelven 8 mg de **Hyadd3**, preparados como se describe en el Ejemplo 3, en 1 ml de tampón fosfato a pH=6,9 (8 mg/ml). Una vez completada la disolución, se añaden 0,8 mg de hGH, previamente disueltos en una solución acuosa, y se mezclan convenientemente para que la composición sea uniforme y la proteína quede atrapada en el gel. La carga del gel se calcula diluyéndolo 1:10 en tampón y midiendo la absorbancia UV a 280 nm que, con el uso de una curva de calibración, proporciona el valor de la concentración de GH.

EJEMPLO 11: preparación de la formulación que contiene el sistema de liberación formado por bencilamida de HA y hGH, 10:1 p/p

20 Se disuelven 8 mg de **Hyadd1**, preparados como se describe en el Ejemplo 5, en 1 ml de tampón fosfato a pH=6,9 (8 mg/ml). Una vez completada la disolución, se añaden 0,8 mg de hGH, previamente disueltos en una solución acuosa, y se mezclan convenientemente para que la composición sea uniforme y la proteína quede atrapada en el gel. La carga del gel se calcula diluyéndolo 1:10 en tampón y midiendo la absorbancia UV a 280 nm que, con el uso de una curva de calibración, proporciona el valor de la concentración de GH.

25 **EJEMPLO 12: preparación de la formulación que contiene el sistema de liberación formado por hexadecilamida de HA y sCT en la relación de 10:1 p/p**

30 Se disuelven 8 mg de **Hyadd4**, preparados como se describe en el Ejemplo 1, en 1 ml de tampón fosfato a pH=6,9. Una vez completada la disolución, se añaden 0,8 mg de calcitonina de salmón (sCT), previamente disueltos en tampón fosfato, para obtener una relación p/p de 10:1, y se mezclan convenientemente para que la composición sea uniforme y la proteína quede atrapada en el gel. La carga del gel se calcula diluyéndolo 1:10 en tampón y midiendo la absorbancia UV a 280 nm que, con el uso de una curva de calibración, proporciona el valor de la concentración de calcitonina.

EJEMPLO 13: preparación de la formulación que contiene el sistema de liberación formado por hexadecilamida de HA e IL-IRa , 10:1 p/p

35 Se disuelven 8 mg de **Hyadd4**, preparados como se describe en el Ejemplo 1, en 1 ml de tampón fosfato a pH=6,9. Una vez completada la disolución, se añaden 0,8 mg de IL-IRa, previamente disueltos en una solución acuosa, y se mezclan convenientemente para que la composición sea uniforme y la proteína quede atrapada en el gel. La carga del gel se calcula diluyéndolo 1:10 en tampón y midiendo la absorbancia UV a 280 nm que, con el uso de una curva de calibración, proporciona el valor de la concentración de IL-IRa.

EJEMPLO 14: preparación de una formulación a base de hexadecilamida de HA y RNasa, 10/1 p/p

40 Se disuelven 8 mg de **Hyadd4**, preparados como se describe en el Ejemplo 1, en 1 ml de tampón fosfato a pH=6,9. Una vez completada la disolución, se añaden 0,8 mg de RNasa, previamente disuelta en tampón fosfato, y se mezclan convenientemente para que la proteína quede atrapada en el gel. La carga del gel se calcula diluyéndolo 1:10 en tampón y midiendo la absorbancia UV a 280 nm que, con el uso de una curva de calibración, proporciona el valor de la concentración de ARNse.

45 **EJEMPLO 15: preparación de la formulación que contiene el sistema de liberación formado por hexadecilamida de HA e insulina , 10:1 p/p**

50 Se disuelven 8 mg de **Hyadd4**, preparados como se describe en el Ejemplo 1, en 1 ml de tampón fosfato a pH=6,9. Una vez completada la disolución, se añaden 0,8 mg de insulina, previamente disueltos en tampón fosfato, y se mezclan convenientemente para que la proteína quede atrapada en el gel. La carga del gel se calcula diluyéndolo 1:10 en tampón y midiendo la absorbancia UV a 280 nm que, con el uso de una curva de calibración, proporciona el valor de la concentración de insulina.

EJEMPLO 16: Estudio de la liberación de hGH formulada con HA o amidas de HA

Las formulaciones, preparadas como se describe en los Ejemplos 6-11, se introducen en tubos de diálisis con un corte de 100 kDa y se sumergen en tampón fosfato a pH 7 bajo agitación suave para controlar su liberación del compartimento donante. A efectos de comparación, se mezclan 0,8 mg de hGH con 1 ml de tampón fosfato (PBS) y se introduce la formulación en un tubo de diálisis.

- 5 Las condiciones de hundimiento se mantienen a lo largo de todos los experimentos. En momentos preestablecidos, se toman alícuotas de 50 µl del compartimento donante y se diluyen 1:10 para determinar el contenido de proteínas a lo largo del tiempo. El análisis se realiza paralelamente mediante lectura UV a 280 nm y RP-HPLC a 220 nm para determinar la cantidad de proteína restante y su degradación, si la hubiera. También se realizan mediciones de dispersión para estudiar la agregación de la proteína formulada. Por último, se toman muestras del compartimento receptor para comprobar que la cantidad de proteína liberada se corresponde con la que desaparece del compartimento donante, y se realizan mediciones de espectrometría de masas (Esi-Tof) para confirmar que la GH liberada no ha sufrido ninguna degradación estructural. Las curvas de liberación se construyen mostrando el porcentaje de proteína liberada en el tiempo. Figuras 2, 3, 4 y 5.

RESULTADOS

- 15 La figura 2 muestra el perfil de liberación de hGH determinado por el sistema formado por Hyadd4 y hGH frente al control representado por la misma proteína preparada en PBS.

La figura 3 muestra los perfiles de liberación de la proteína hGH formulada en combinación con LMW-HA y MMW-HA: en ambos casos se probaron dos relaciones de peso diferentes de HA con hGH (10:1 y 20:1) porque, con este experimento, el Solicitante pretende demostrar que la combinación de proteínas con naturaleza hidrófoba, incluso con grandes cantidades de HA que tienen diferentes MW, no provoca ningún cambio en el perfil de liberación de la proteína frente al perfil obtenido al prepararla en PBS, es decir, en disolvente acuoso.

La figura 4 compara los perfiles de liberación de hGH a partir de los sistemas de liberación formados por las amidas según la presente invención y la hGH con el control representado por la hGH en PBS.

25 La figura 5 muestra el tiempo de liberación del 50 % de hGH a partir de los sistemas de liberación formados por las amidas según la presente invención, de nuevo frente al control como se ha indicado anteriormente.

Si se compara la Figura 3 con las Figuras 2 y 4, se verá que los sistemas de liberación formados por amidas de HA (descritas y reivindicadas anteriormente) con proteínas de naturaleza principalmente hidrófoba (en este caso la hGH), provocan la liberación sostenida y lenta en el tiempo de la proteína de forma claramente significativa, frente al control representado por las proteínas analizadas en PBS, y frente a la proteína formulada en HA con un MW y una relación de peso diferentes. Por lo tanto, no es la concentración y/o el MW del polisacárido lo que determina una modificación en el perfil de liberación de la proteína hidrófoba estudiada, sino la naturaleza química del polímero. Todo esto es aún más evidente en la Figura 5, que compara los tiempos de liberación del 50 % de la hGH: la figura muestra que los novedosos sistemas de liberación a los que se refiere la presente invención aumentan los tiempos de liberación hasta tres veces frente al control (hGH en PBS).

EJEMPLO 17: Estudio de la liberación de sCT, IL1-Ra e insulina frente al perfil de liberación de la proteína hidrofílica RNasa A

Cada una de las formulaciones preparadas como se describe en los Ejemplos 12-15 se introduce en un tubo de diálisis con un corte de 100 kDa y se sumerge en tampón fosfato a pH 7 bajo agitación suave. A modo de comparación, se mezclan 0,8 mg de calcitonina, IL-IRa, insulina o RNasa con 1 ml de tampón fosfato y se introducen las formulaciones en un tubo de diálisis para controlar su liberación del compartimento donante a lo largo del tiempo.

Las condiciones de hundimiento se mantienen a lo largo de todos los experimentos. En momentos preestablecidos, se toman alícuotas de 10 µl del compartimento donante y se diluyen 1:10 para determinar el contenido de proteínas a lo largo del tiempo. El análisis se realiza paralelamente mediante la lectura de UV a 280 nm para determinar la cantidad de proteína restante. También se realizan mediciones de dispersión para estudiar la agregación de la proteína formulada. Por último, se toman muestras del compartimento receptor para comprobar que la cantidad de proteína liberada se corresponde con la que desaparece del compartimento donante. Se construyen las curvas de liberación, mostrando el porcentaje de proteína liberada en el tiempo frente a su control.

La proteína RNasa A posee un índice GRAVY = -0,67 y por lo tanto no puede ser clasificada como una proteína principalmente hidrófoba, sino como una proteína hidrofílica. Se describe a continuación para comparar su perfil de liberación con el resultante del sistema de liberación Hyadd combinado con proteínas de naturaleza principalmente hidrófoba, a fin de demostrar las diferencias.

RESULTADOS

Las figuras 6-8 muestran los perfiles de liberación de las 3 proteínas de naturaleza principalmente hidrófoba analizadas: en los tres casos el sistema formado por la hexadecilamida de HA, combinada con dichas proteínas, determina su liberación sostenida y lenta durante tiempos mucho más largos que el control.

Por el contrario, la Figura 9 demuestra que la combinación de la misma hexadecilamida en una relación de peso idéntica (10:1 p/p) con la proteína RNasa, que tiene una naturaleza principalmente hidrofílica y un índice GRAVY = -0,67, determina un perfil de liberación idéntico al producido por la misma proteína cuando se formula en PBS.

EJEMPLO 18: Estudio de la liberación de hGH en el líquido sinovial humano (LS) procedente de pacientes con artrosis

La hormona hGH se une primero covalentemente a una sonda fluorescente (Cy5.5) para que pueda ser reconocida inequívocamente en presencia de otras proteínas sinoviales. Para ello se disuelven 1,5 mg de hGH en 2 ml de tampón de borato a pH 8, a los que se añaden 2 mg de Cy5.5 previamente disueltos en 60 µl de DMSO. La reacción de marcación se lleva a cabo a la sombra de la luz, bajo agitación suave, durante 18h. La purificación se lleva a cabo mediante diálisis contra tampón fosfato durante 4 días y contra agua MilliQ durante 1 día. A continuación, la proteína marcada se analiza por filtración en gel para verificar su pureza.

Una formulación basada en **Hyadd4** y hGH-Cy5.5 se prepara como se describe en el ejemplo 7 con una relación en peso de 10:1. Los dos ingredientes se mezclan adecuadamente para que la composición sea uniforme y la proteína quede atrapada en el gel. El gel así obtenido se introduce en un tubo de diálisis con un corte de 100 kDa, se sumerge en un medio compuesto por PBS y líquido sinovial procedente de pacientes con artrosis (v/v 1:1), y se mantiene bajo agitación suave.

La cantidad de proteína liberada a lo largo del tiempo en el compartimento receptor se determina en tiempos preestablecidos. Los análisis se realizan mediante RP-HPLC con detector de fluorescencia, no sólo para determinar el contenido de hGH sino también para comprobar que la proteína no ha sufrido degradación. Se construye la curva de liberación, mostrando el porcentaje de proteína liberada en el tiempo hasta las 48h.

RESULTADOS

La figura 10 muestra el resultado obtenido: la liberación en LS de hGH del sistema formado por Hyadd4 en combinación con la proteína estudiada demuestra que el perfil de liberación lenta y sostenida demostrado previamente en la figura 2 se mantiene sin cambios. Por lo tanto, se puede afirmar que la proteína/medicamento incluida en el sistema Hyadd está protegida y no está sujeta a la degradación en un medio de liberación enriquecido con enzimas, proteínas, algunas de naturaleza desconocida, y moléculas proinflamatorias, tales como el líquido sinovial de los pacientes con OA.

EJEMPLO 19: Estudio de la farmacocinética del sistema formado por Hyadd4 y hGH, tras su administración intraarticular a la rata

8 mg de **Hyadd4**, preparados como se describe en el ejemplo 1, se disuelven en 1 ml de tampón fosfato a pH=6,9 y se esterilizan con calor húmedo a 121 °C. Posteriormente, se añaden 0,8 mg de hGH, previamente disueltos en una solución acuosa y esterilizados por filtración a través de filtros de celulosa regenerada de 0,2 micras, en un entorno aséptico y se mezclan adecuadamente para que la composición sea uniforme y la proteína quede atrapada en el gel.

Para el estudio *in vivo*, se inyecta en la rodilla de la rata una cantidad de formulación equivalente a 100 µg de proteína/animal. A tiempos preestablecidos (0,15, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 24 y 48 h), se toman muestras de plasma y se someten a la prueba ELISA para evaluar la concentración de hGH que pasó al plasma tras la administración i.a. El experimento se realiza por triplicado.

Para fines de comparación, un grupo de animales es tratado con una cantidad equivalente de hGH libre (100 µg), nuevamente por administración intra-articular. Las curvas farmacocinéticas se obtuvieron trazando la concentración de hGH en ng/ml encontrada en el plasma en función del tiempo, hasta 48 h.

RESULTADOS

Como se muestra en la Figura 11, la proteína inyectada puede encontrarse en el plasma inmediatamente después de la inyección intra-articular.

Sin embargo, debido a la liberación sostenida de la proteína inducida por el sistema Hyadd, ésta permanece *in situ*, es decir, en la cavidad articular, y no pasa al torrente sanguíneo, por lo que la totalidad de su efecto tiene lugar en el lugar de la inyección.

REIVINDICACIONES

1. Sistema de liberación sostenida de proteínas terapéuticas y/o biológicamente activas que comprende
- 5 a) una proteína de naturaleza principalmente hidrófoba y
b) una amida de ácido hialurónico (HA) en la que la proteína de naturaleza principalmente hidrófoba tiene un índice GRAVY no inferior a -0,5 y la amida de HA se selecciona entre
- hexadecilamida de HA: Amida de HA con hexadecilamina con un porcentaje de amidación molar que varía entre el 8 y el 9 %;
 - octilamida de HA: Amida de HA con octilamina, con un porcentaje de amidación molar que varía entre el 10 y el 11 %;
 - 10 • dodecilamida de HA: Amida de HA con dodecilamina, con un porcentaje de amidación molar que varía entre el 10 y el 11 %;
 - tert-butilamida de HA: Amida de HA con tert-butilamina, con un porcentaje de amidación molar que varía entre el 7 y el 8 %;
 - bencilamida HA: Amida de HA con bencilamina, con un contenido molar de amidación del 8 al 9 %;
- 15 en el que el HA utilizado para la preparación de las amidas tiene un peso molecular promedio en peso que varía entre 150 y 250 KDa o entre 500 y 730 KDa.
2. Sistema para la liberación sostenida de proteínas como se reivindica en la reivindicación 1, en el que las proteínas terapéuticas y/o biológicamente activas de naturaleza principalmente hidrófoba son la insulina, la hGH, la sCT, la IL-IRa, el G-CSF, el PDGF, preferentemente el PDGF-BB, el TGF- β , el EGF, el VEGF-B, la EPO, el NGF β , la transferrina, el TIMP-2, el TIMP-3 y el TIMP-4.
- 20 3. Sistema para la liberación sostenida de proteínas como se reivindica en las reivindicaciones 1-2, en el que la amida de HA es la hexadecilamida.
4. Sistema de liberación sostenida de proteínas como se reivindica en la reivindicación 3, en el que la proteína terapéutica y/o biológicamente activa es hGH o sCT, opcionalmente combinada con estabilizadores y excipientes.
- 25 5. Sistema de liberación sostenida de proteínas como se reivindica en la reivindicación 2, en el que la proteína terapéutica y/o biológicamente activa es la insulina, opcionalmente combinada con estabilizadores y excipientes.
6. Sistema para la liberación sostenida de proteínas como se reivindica en la reivindicación 3, en el que la proteína terapéutica y/o biológicamente activa es el PDGF, preferentemente el PDGF-BB, el TGF- β , el EGF o el VEGF-B, opcionalmente combinado con estabilizadores y excipientes.
- 30 7. Sistema para la liberación sostenida de proteínas como se reivindica en la reivindicación 3, en el que la proteína terapéutica y/o biológicamente activa es el inhibidor de metaloproteasas TIMP-2, TIMP-3 o TIMP-4, opcionalmente combinado con estabilizadores y excipientes.
8. Sistema para la liberación sostenida de proteínas como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, para su uso en el tratamiento de daños articulares causados por la artrosis, en el tratamiento de la tendinitis, en la reparación de daños musculares cardíacos, en la reparación de fracturas/cavidades óseas o en la cicatrización de úlceras/heridas/laceraciones cutáneas por administración inyectable, intraarticular, tópica u oral.
- 35 9. Sistema para la liberación sostenida de proteínas como se reivindica en la reivindicación 4, para su uso en el tratamiento de la artrosis, la artritis reumatoide o psoriásica y/o la osteoporosis por administración intraarticular.
10. Sistema para la liberación sostenida de proteínas para su uso como se reivindica en la reivindicación 8, en el que las proteínas se seleccionan entre insulina, hGH, sCT, IL-IRa, G-CSF, PDGF, preferentemente PDGF-BB, TGF- β , EGF, VEGF-B, EPO, NGF β , transferrina, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4.
- 40 11. Sistema de liberación sostenida de proteínas para su uso como se reivindica en la reivindicación 8, en el que la proteína es PDGF, preferentemente PDGF-BB, TGF- β , EGF o VEGF-B, opcionalmente combinado con estabilizadores y excipientes.
- 45 12. Sistema de liberación sostenida de proteínas para su uso como se reivindica en la reivindicación 8, en el que la amida de ácido hialurónico es la hexadecilamida y la proteína es el inhibidor de metaloproteasas TIMP-2, TIMP-3 o TIMP-4, opcionalmente combinado con estabilizadores y excipientes, en el tratamiento de daños en el cartílago articular causados por la artrosis y/o en la reparación de erosiones osteocondrales por administración inyectable o intraarticular.

Valores de hidropaticidad a escala de aminoácidos:

Ile: 4.500

Val: 4.200

Leu: 3.800

Phe: 2.800

Cys: 2.500

Met: 1.900

Ala: 1.800

Gly: -0.400

Asn: -3.500

Thr: -0.700

Trp: -0.900

Ser: -0.800

Tyr: -1.300

Pro: -1.600

His: -3.200

Glu: -3.500

Asp: -3.500

Gln: -3.500

Lys: -3.900

Arg: -4.500

FIGURA 1

Perfil de liberación de hGH en el sistema Hyadd4

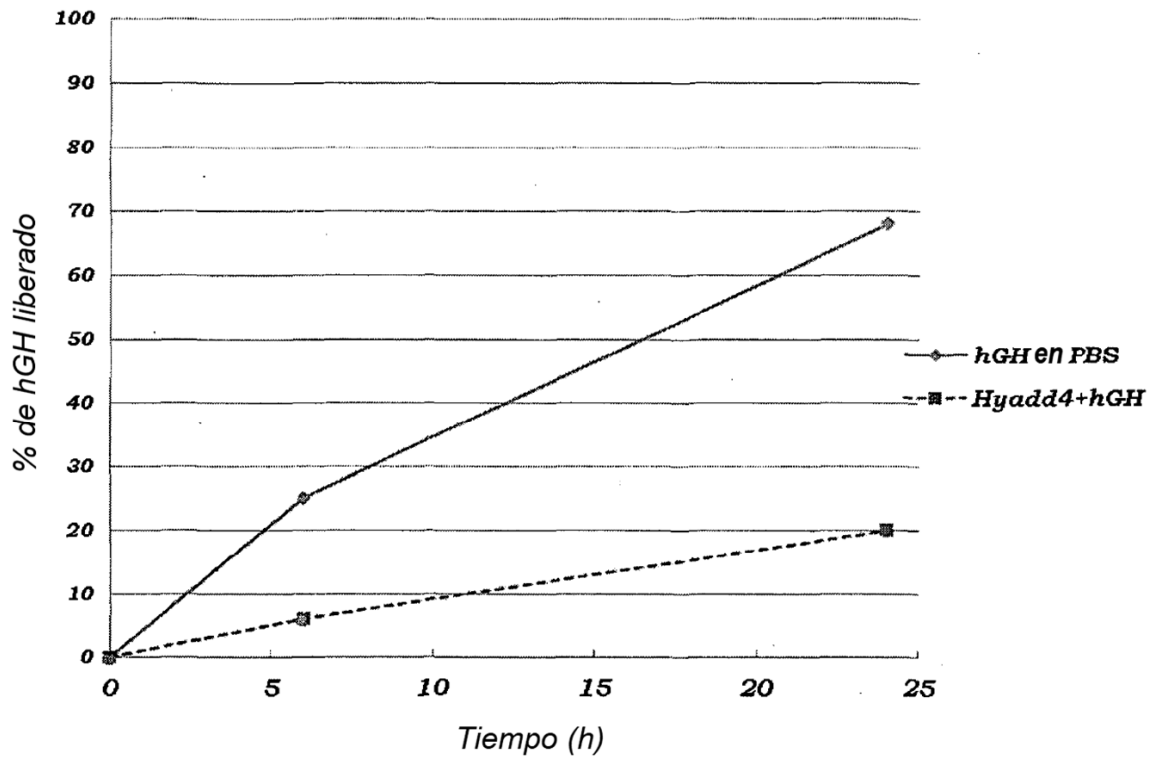


FIGURA 2

Perfil de liberación de hGH en LMW HA y MMW HA

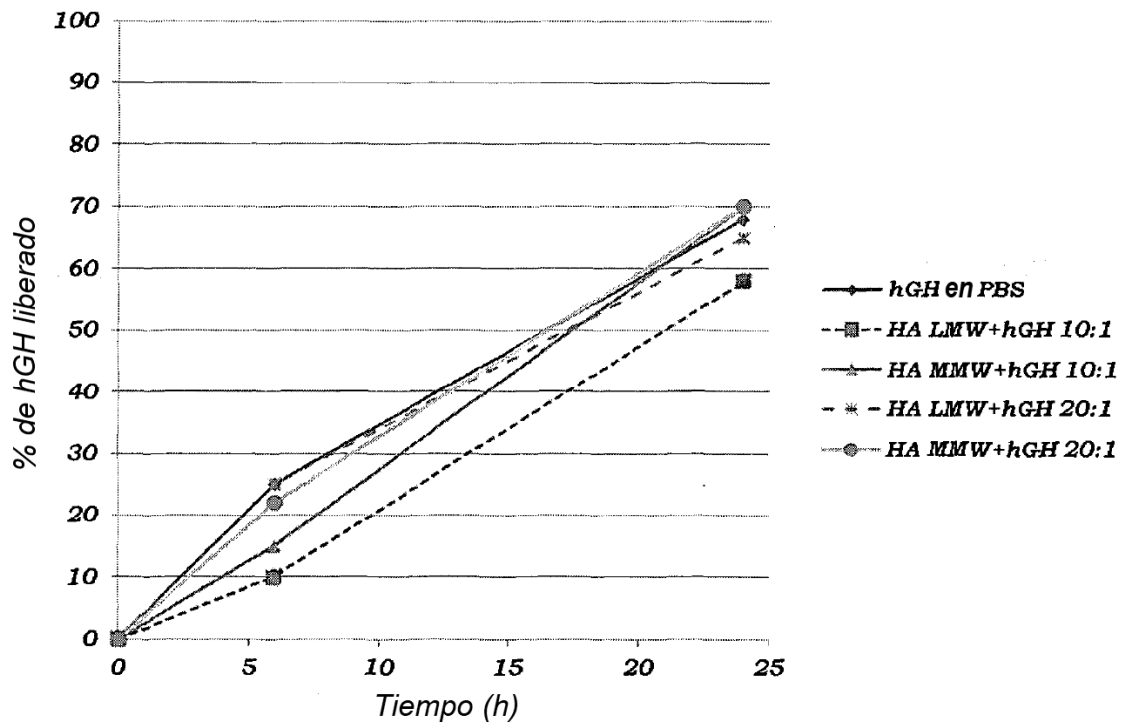


FIGURA 3

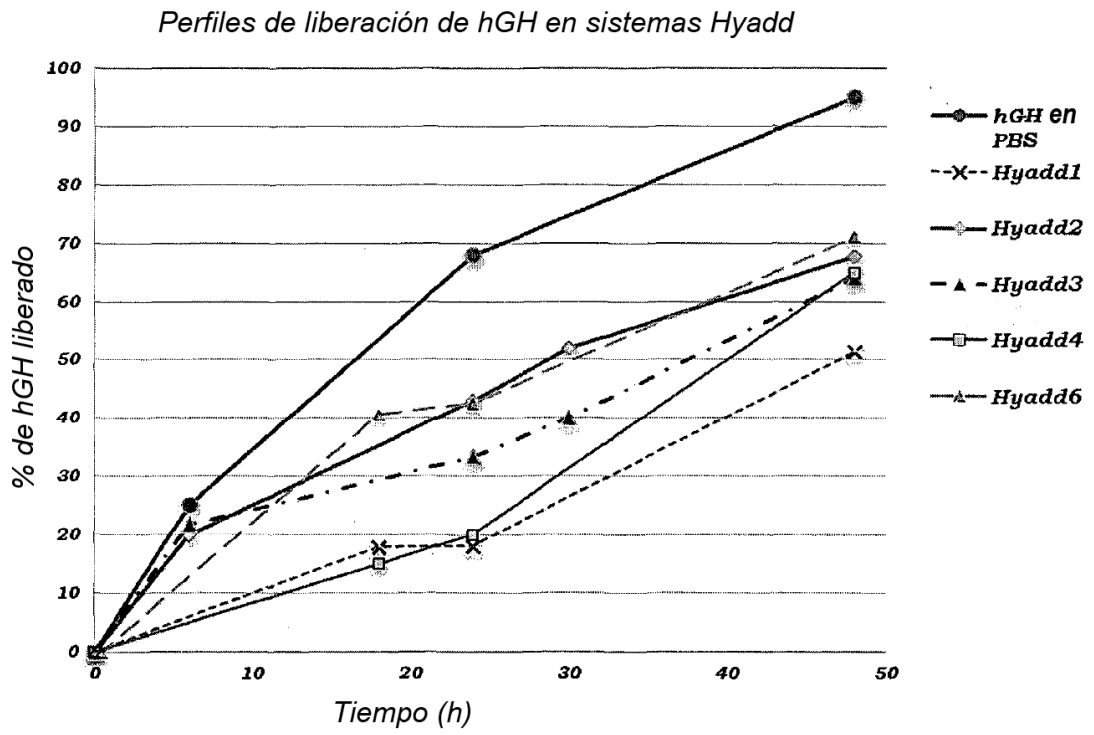


FIGURA 4

Tiempo de liberación de 50% de hGH

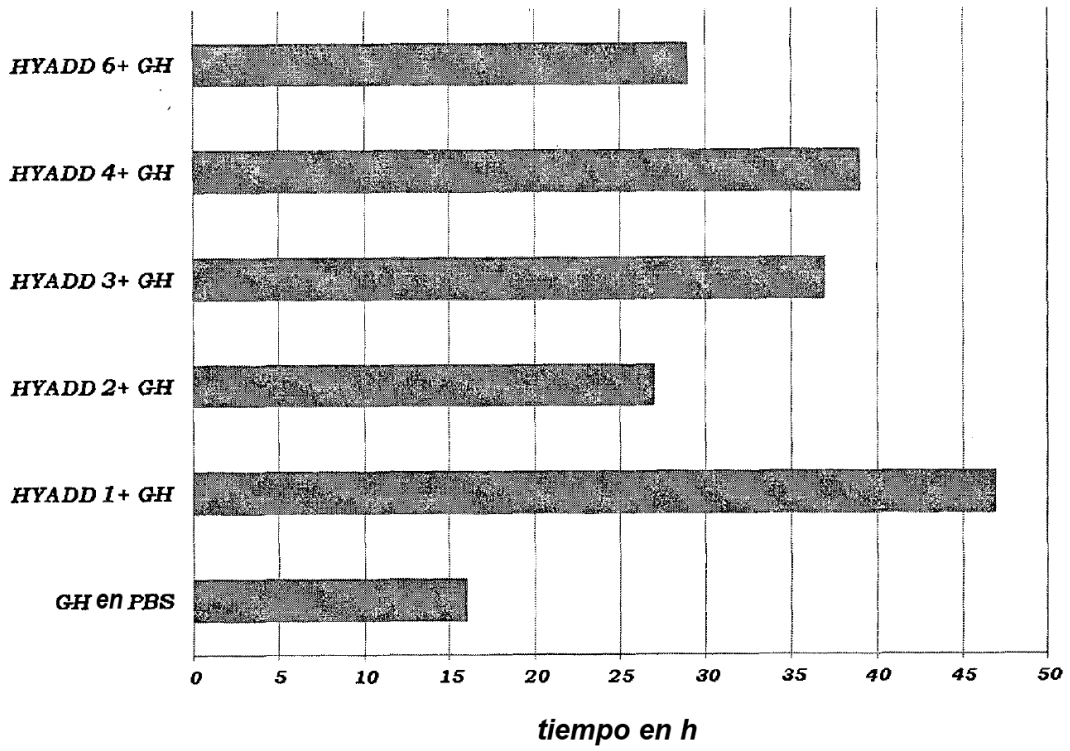


FIGURA 5

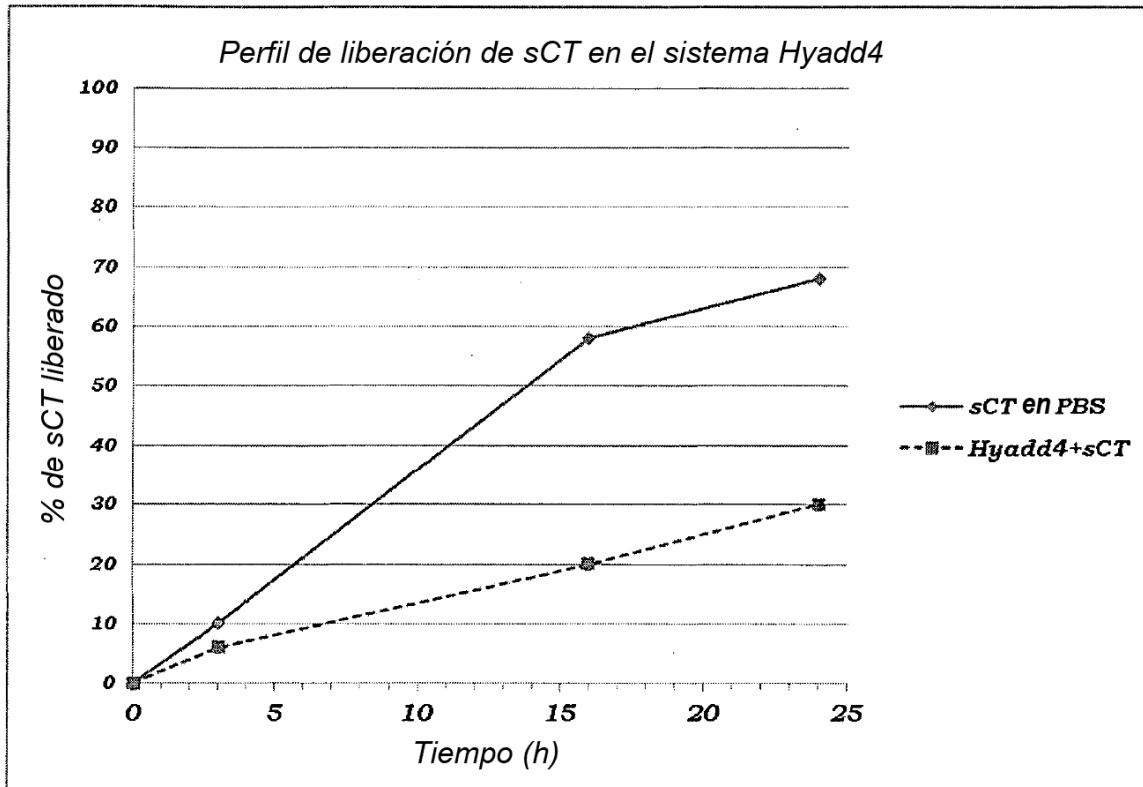


FIGURA 6

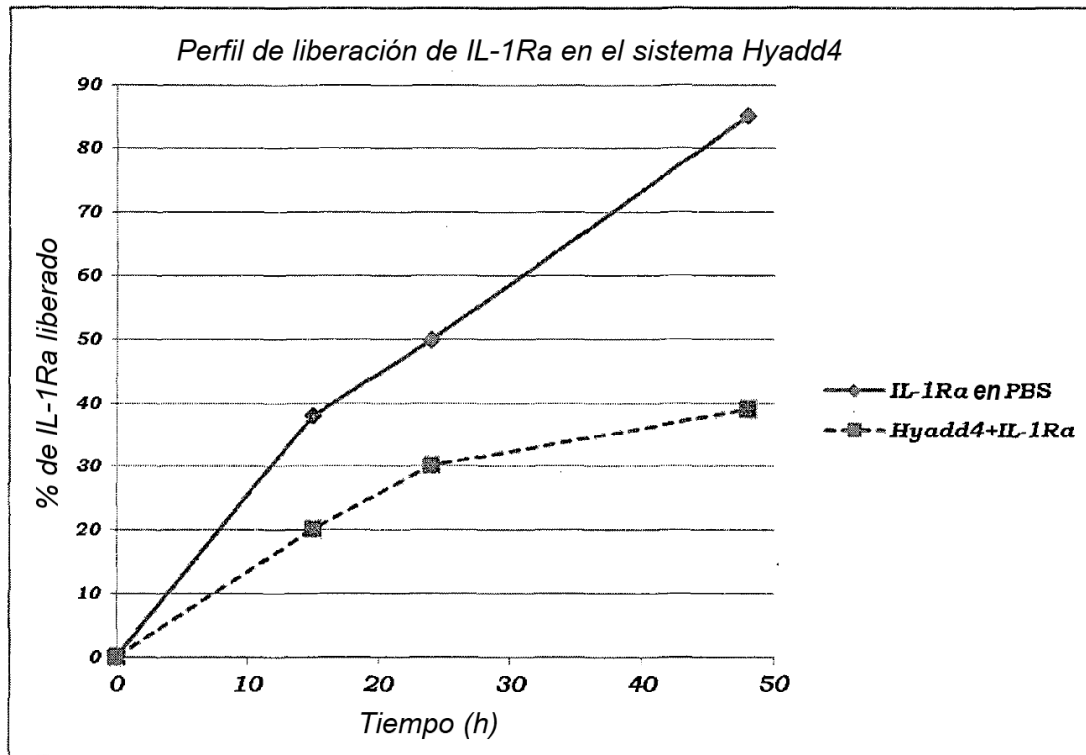


FIGURA 7

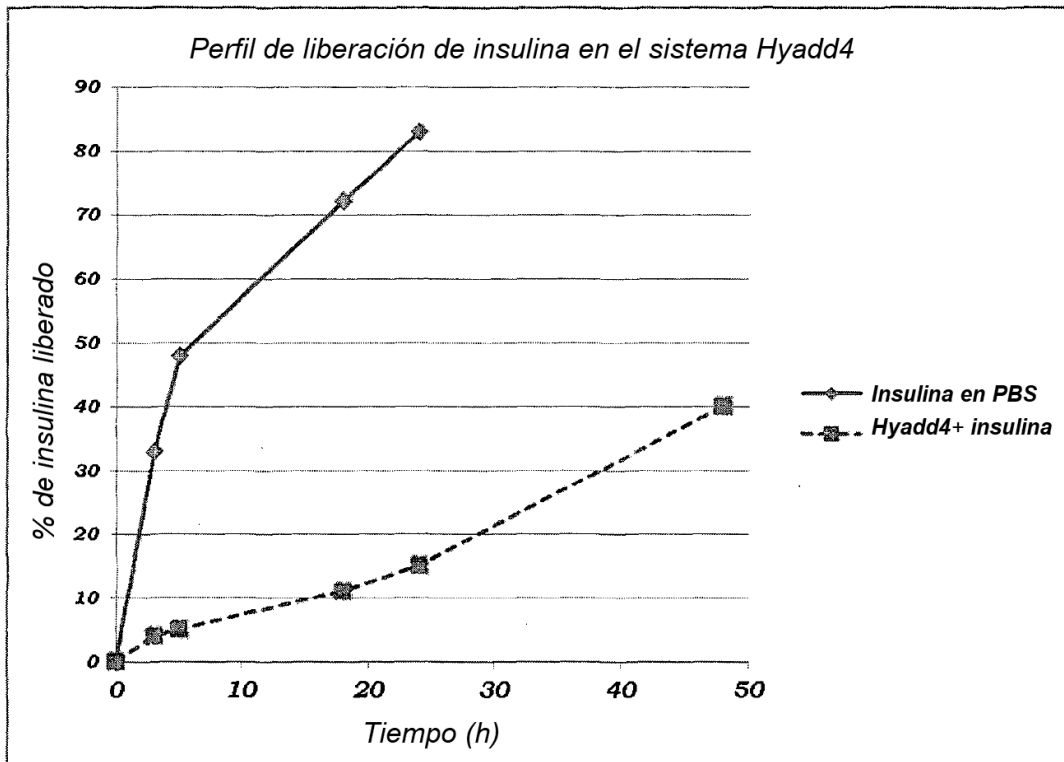


FIGURA 8

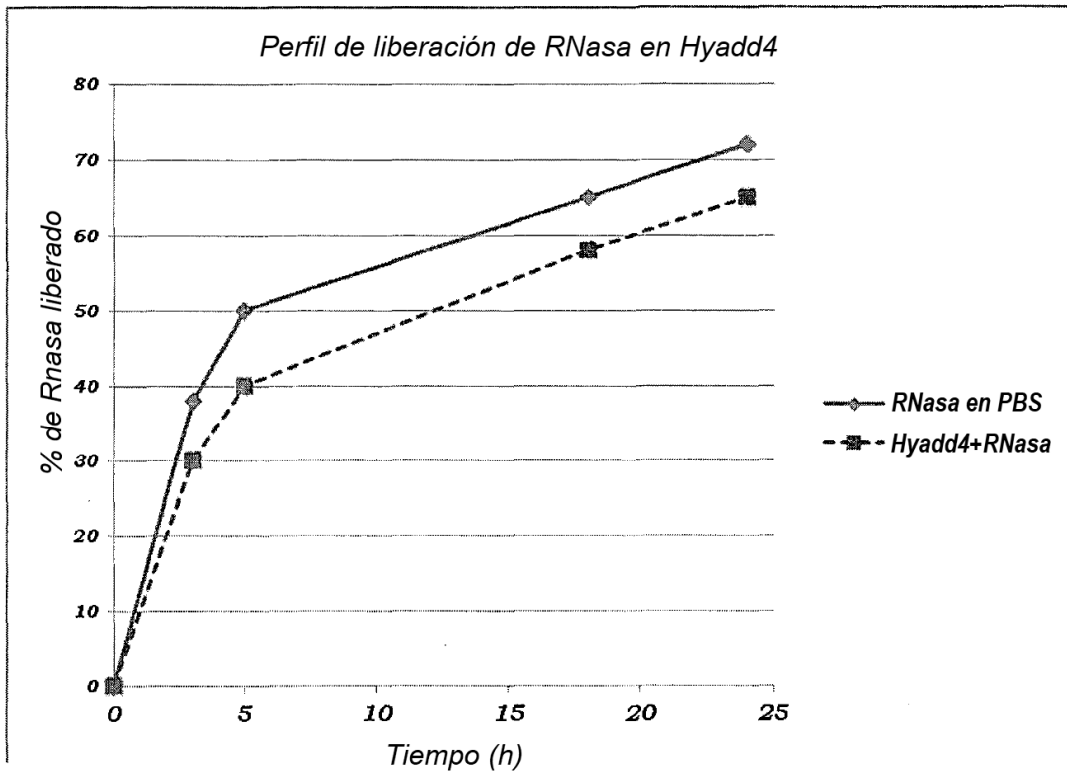


FIGURA 9

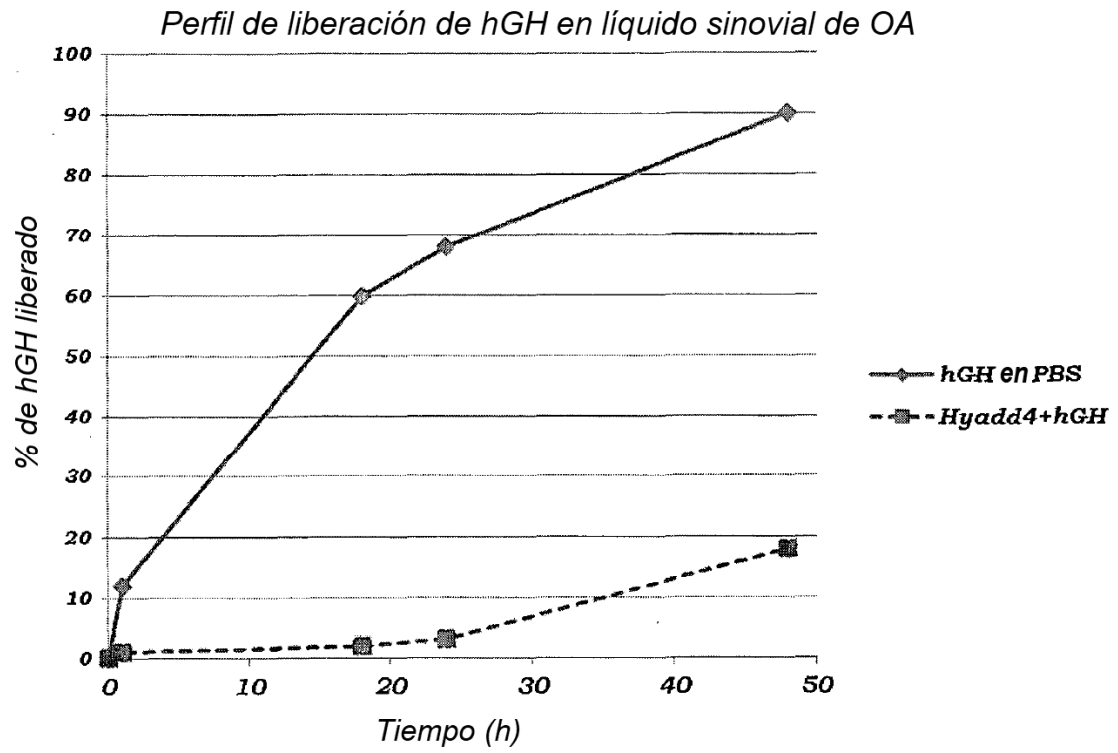


FIGURA 10

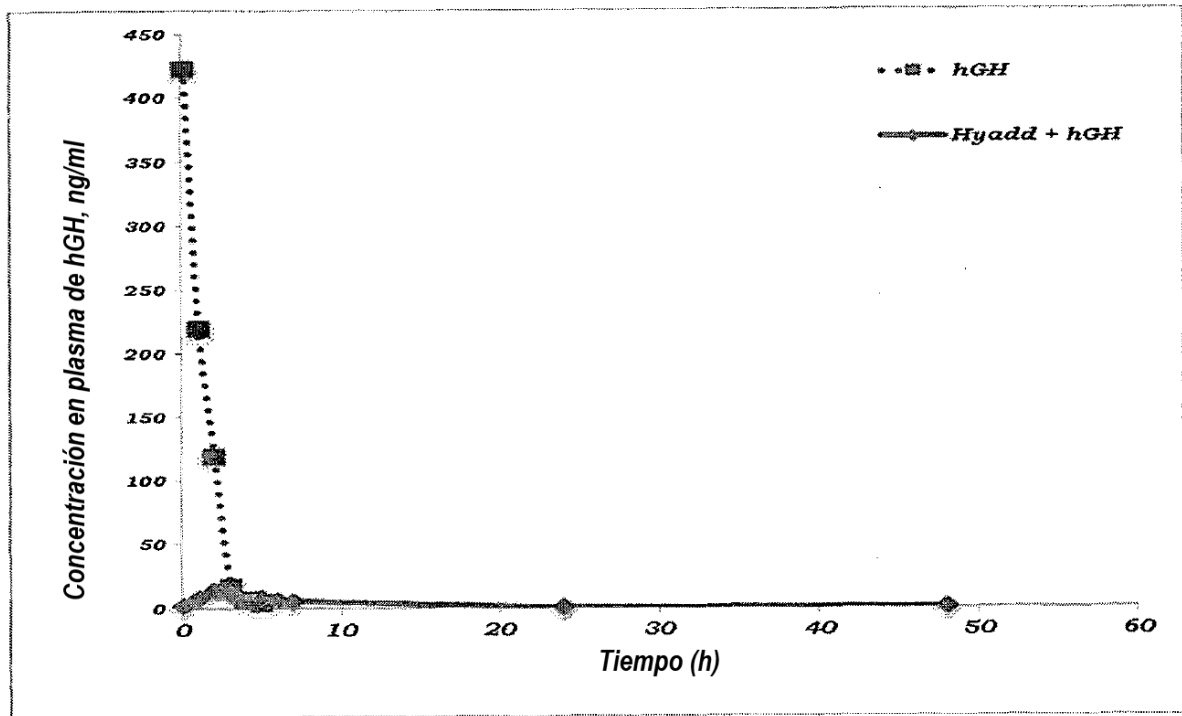


FIGURA 11