



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 318 860**

51 Int. Cl.:
A61K 9/10 (2006.01)
A61K 47/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **97935238 .2**
96 Fecha de presentación : **11.07.1997**
97 Número de publicación de la solicitud: **0910342**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.04.1999**

54 Título: **Gel sensible a la temperatura para el aporte sostenido de fármacos a base de proteínas.**

30 Prioridad: **12.07.1996 US 679199**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2009

73 Titular/es:
The Regents of the University of Colorado
201 Regents Administrative Center, 3 SYS
Boulder, Colorado 80309, US

72 Inventor/es: **Stratton, Lewis, P.;**
Carpenter, John, F. y
Manning, Mark, C.

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 318 860 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

Gel sensible a la temperatura para el aporte sostenido de fármacos a base de proteínas.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a polímeros sensibles a la temperatura para el suministro sostenido de agentes farmacológicos y, más particularmente, a poloxámeros que comprenden suspensiones de agentes polipeptidos macromoleculares naturales.

10 **Antecedentes de la técnica**

Los últimos años han visto importantes avances en técnicas de ADN recombinante y consecuentemente la proliferación de muchos productos farmacéuticos de proteínas disponibles para una diversidad de necesidades terapéuticas. Realmente, las proteínas o polipéptidos constituyen la clase más extensa de fármacos que actualmente están siendo considerados para aprobación por la FDA. Sin embargo, el potencial terapéutico y comercial de los fármacos polipéptidos se alcanzará solamente si estos avances están acompañados por diseños de formulaciones que conduzcan a una administración y estabilidad eficaz.

Las proteínas son moléculas orgánicas grandes o macromoléculas formadas por restos de aminoácidos ligados covalentemente entre sí mediante enlaces péptidos dentro una cadena polipéptida no ramificada, lineal, con una masa molecular relativa que varía desde unos pocos miles hasta millones. Las propiedades útiles de las proteínas como fármacos dependen de la cadena polipéptida que adopta una única conformación plegada tridimensional, es decir, la estructura terciaria de la proteína. Es este único plegamiento el responsable de que la proteína por ser altamente selectiva en las moléculas será reconocida. Sin embargo, la capacidad para mantener una única estructura tridimensional es precisamente uno de los obstáculos que hace que el uso de polipéptidos en enfermedades humanas y animales esté cargado de problemas.

Tradicionalmente, el procedimiento el más ampliamente usado de administración de agentes terapéuticos es mediante la vía oral. Sin embargo, dicho suministro no es factible, en el caso de fármacos macromoleculares, ya que son rápidamente degradados y desactivados por enzimas hidrolíticas presentes en el tracto alimentario. Incluso sin son estables a la digestión enzimática, sus pesos moleculares son demasiado elevados para absorción a través de la pared intestinal. En consecuencia, usualmente se administran parenteralmente; pero, puesto que dichos fármacos frecuentemente tienen vidas medias cortas *in vivo*, se requieren frecuentes inyecciones para producir una terapia eficaz. Desgraciadamente, aunque la vía parenteral es el medio el más eficaz de introducción de fármacos, esta vía tiene severos inconvenientes dado que las inyecciones son dolorosas; pueden dar lugar a infección; y pueden dar lugar a severos problemas vasculares como un resultado de repetidas inyecciones intravenosas.

Por estas razones, las matrices polímeras biodegradables han sido consideradas como sistemas de suministro de liberación sostenida para una diversidad de agentes o fármacos activos. Una vez implantada, la matriz se disuelve o erosiona lentamente, liberando el fármaco. Una vía alternativa es usar pequeñas bombas implantables, las cuales extruyen lentamente los componentes del fármaco y la matriz, los cuales se disuelven después de entrar en contacto con los fluidos corporales. Con ambos sistemas es crucial que el fármaco se mantenga distribuido de manera uniforme a través de la matriz puesto que la distribución heterogénea del fármaco (por ejemplo, formación de grandes grumos y huecos) podría conducir a una dosificación errática. Además, ambos sistemas requieren polímeros que se mantengan algo fluidos de manera que puedan ser fácilmente manipulados antes de su implantación o carga dentro de un dispositivo. El Documento de EE.UU. 4.962031 describe un sistema de suministro para agentes activos. El Documento EP 539751A1 describe una composición polímera biodegradable.

El uso de polímeros como implantes sólidos y para uso en pequeñas bombas implantables para el suministro de diversos agentes terapéuticos ha sido descrito en publicaciones científicas y en la literatura de patentes. Véanse, por ejemplo, Kent, y otros, “*in vivo* controlled release of an LHRH analog from injected polymeric microcapsules”, *Contracep. Deliv. Syst.*, vol. 3, pág. 58, (1982); Sanders, y otros, “Controlled release of a luteinizing hormone releasing hormone analogue from poly(d,l-lactide-co-glycolide)-microspheres”, *J. Pharmaceut. Sci.*, vol. 73, págs. 1294-1297, (1984); Johnston, T.P., y otros, “Sustained delivery of Interleukin-2 from a poloxamer 407 gel matrix following intraperitoneal injection in mice”, *Pharmaceut. Res.*, vol. 9, (no. 3), págs. 425-434, (1992); Yolks, y otros, “Timed release depot for anti-cancer agents II”, *Acta Pharm. Svec.*, vol. 15, págs. 382-388, (1978); Krezanoski, “Clear, water-miscible, liquid pharmaceutical vehicles and compositions which gel at body temperature for drug delivery to mucous membranes”, Patente de EE.UU. No. 4.474.752. Sin embargo, los polímeros que tienen el potencial el más alto para uso en el suministro de fármacos de proteínas deberían mostrar gelificación térmica reversible y tener buenas características de liberación de fármacos.

Existe una clase de copolímeros de bloque que pueden clasificarse genéricamente como condensados de polioxietileno-polioxipropileno, fundamentalmente polioles Pluronic, o poloxámeros. Están formados por la condensación de óxido de propileno dentro de un núcleo de propileno glicol seguido de la condensación de óxido de etileno dentro de ambos extremos de la base de polioxipropileno. Los grupos hidrófilos de polioxietileno sobre los extremos de la molécula se controlan en longitud de manera que constituyan en cualquier caso desde 10 por ciento hasta 80 por ciento en peso de la molécula final.

ES 2 318 860 T3

Los poloxámeros los cuales tienen la capacidad de gelificar en función de la temperatura y de la concentración de polímero, pueden representarse empíricamente por la fórmula:



en la que a y b son números enteros de manera tal que la base hidrófoba representada por $(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_a$ tiene un peso molecular que varía desde aproximadamente 900 hasta 4.000, determinado por el índice de hidroxilo; y la cadena de polioxietileno está constituida por al menos 60 por ciento hasta 70 por ciento en peso del copolímero; y el copolímero tiene un peso molecular promedio total que varía desde aproximadamente 4.000 hasta 15.000. La Tabla 1, a continuación, hace referencia a las concentraciones mínimas de diversos poloxámeros necesarias para formar un gel en agua a temperatura ambiente.

TABLA 1

Poloxámero*	Peso molecular	Concentración mínima
Pluronic® F-68	8.400	50% - 60%
Pluronic® F-88	11.400	40%
Pluronic® F-108	14.600	30%
Pluronic® F-127	12.600	20%

*Los poloxámeros se encuentran comercialmente disponibles bajo las marcas comerciales referenciadas a través de BASF Corporation, Parsippany, N.J.

Los poloxámeros de bajo peso molecular, es decir, por debajo de un peso molecular de 10.000, no forman geles a ninguna concentración en agua.

Aunque los poloxámeros, y más específicamente Pluronic® F-127 o Poloxamer 407, se han usado para suministrar fármacos no péptidos así como proteínas biológicamente activas, véanse las Patentes de EE.UU. Nos. 4.100.271 y 5.457.093, respectivamente, el suministro sostenido de macromoléculas biológicamente activas durante semanas o meses no ha sido posible por una doble razón. En primer lugar, las referencias anteriores que describen la incorporación de proteínas en una matriz Pluronic® únicamente describe soluciones de una proteína, con concentraciones menores de aproximadamente 2 mg/ml y, en segundo lugar, las vías de formulación usadas para incorporar proteínas dentro de sistemas polímeros dan como resultado, frecuentemente, una inactivación irreversible de las proteínas debido a la presencia de disolventes orgánicos, cambios de pH, y efectos térmicos. En consecuencia, las referencias anteriores que exponen el uso de poloxámeros como vehículos farmacéuticos para el suministro de proteínas han sufrido dos serias limitaciones: (i) se han usado a bajas concentraciones iniciales de proteína, y (ii) un porcentaje inaceptable de la proteína pierde su actividad biológica durante el uso o almacenamiento. Estas dos limitaciones tienen un impacto directo sobre la capacidad para producir un sistema de suministro de fármacos polipéptidos que puedan ser almacenados durante largos períodos de tiempo antes de su uso y administrar dosificaciones controladas de proteína durante un período de semanas o más preferiblemente de meses. Además, las proteínas degradadas pueden tener eficacia reducida como un fármaco, y pueden igualmente provocar reacciones adversas, tales como sensibilización y respuesta inmune adversa. El Documento WO 94/03157 describe una composición farmacéutica para el suministro transmucosal.

De acuerdo con ello, existe aún una necesidad de un dispositivo o composición de suministro de fármaco polipéptido que tenga altas concentraciones de polipéptidos macromoleculares totalmente naturales que puedan ser regularmente liberados durante un largo período de tiempo.

Descripción de la invención

De acuerdo con ello, es un objeto de esta invención el proporcionar un sistema de suministro de fármaco polipéptido.

Es otro objeto de esta invención el proporcionar un dispositivo o composición de suministro de fármaco polipéptido que tiene concentraciones de proteína o péptido superiores a 5 mg/ml.

Es un objeto adicional de la presente invención el incorporar estabilizadores de proteína dentro del dispositivo de suministro de fármaco. La presente invención, de acuerdo con ello, proporciona la composición y el procedimiento para la preparación del mismo tal como se define en las reivindicaciones 1 a 17.

Los objetos, ventajas y nuevas características adicionales de esta invención se establecerán en parte en la descripción que sigue, y en parte resultarán evidentes para los expertos en la técnica tras el examen de la memoria descriptiva siguiente o pueden aprenderse mediante la práctica de la invención. Los objetos y ventajas de la invención pueden alcanzarse y lograrse mediante la instrumentación, combinaciones, composiciones, y procedimientos particularmente señalados en las reivindicaciones adjuntas.

Para lograr los anteriores y otros objetos y de acuerdo con los fines de la presente invención, la composición de la presente invención comprende una matriz polímera que tiene propiedades de gelificación térmica en la cual se incorpora una suspensión de al menos un polipéptido macromolecular biológicamente activo que tiene una concentración de 0,5 por ciento o superior en peso de la composición, tal como se define en la reivindicación 1.

Breve descripción de los dibujos

El dibujo adjunto, el cual se incorpora y forma una parte de la memoria descriptiva, ilustra las realizaciones preparadas de la presente invención, y conjuntamente con la descripción sirve para explicar los principios de la invención.

En el dibujo

La Figura 1 es una representación gráfica de los efectos que diversos aditivos tienen sobre la temperatura de transición solución-gel (sol-gel) de la presente invención, en la que cada aditivo está representado por los siguientes símbolos:

- ♦- PEG 800 al 0,1%, -x- Sacarosa 0,5 M, -■- PEG 800 al 1,0%,
- *- Sacarosa 1,0 M, -Δ- Pluronic® F-127, -●- Sacarosa 1,5 M.

Mejor modo de realizar la invención

La composición farmacéutica de la presente invención proporciona un sistema de suministro para la administración controlada y sostenida de polipéptidos macromoleculares totalmente naturales o agentes terapéuticos a un humano o animal. La matriz biocompatible, biodegradable, para el suministro de fármaco está formada por la suspensión de partículas solubles e insolubles de polipéptidos macromoleculares totalmente naturales que tienen una concentración de 5 mg/ml o superior, y otros componentes estabilizantes de proteína distribuidos de manera uniforme y discreta a lo largo de un vehículo farmacéutico o matriz polímera que muestra características de gelificación térmica reversible. Al igual que con los sistemas previamente conocidos, las partículas suspendidas y otros componentes se liberan a través de una combinación de mecanismos de difusión y disolución conforme el dispositivo se hidrata y posteriormente se erosiona o disuelve. Sin embargo, a diferencia de los sistemas de matriz polímera conocidos que suministran macromoléculas, la composición de esta invención comprende una suspensión en lugar de una solución de polipéptido(s) natural. En consecuencia, se alcanzan altas concentraciones de polipéptido como un resultado de la suspensión, lográndose, de esta forma, la capacidad de una administración sostenida del agente terapéutico durante un período de tiempo de días, semanas o meses en lugar de horas. Además, pueden incorporarse agentes estabilizantes dentro de la composición de la presente invención, minimizándose además, con ello, la degradación de estos fármacos, lo cual tiene un impacto directo sobre la eficacia del fármaco y la capacidad de almacenar o transportar el dispositivo a los mercados de todo el mundo.

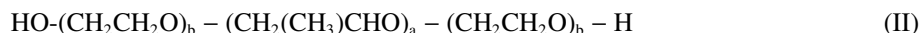
La composición farmacéutica de la presente invención es un descubrimiento casual que se ha hecho durante un proyecto de investigación, cuyo objetivo fue sencillamente el identificar un sistema de suministro de fármaco que fuera adecuado al estudio del efecto de matrices polímeras sobre la estructura de proteínas. En dicho estudio, se usó la espectroscopia infrarroja de transformación por Fourier, ya que esta puede usarse para analizar la estructura secundaria de proteínas en soluciones, suspensiones, y sólidas. De las diversas matrices de suministro de fármacos de proteínas descritas en la literatura, las que usan el detergente polímero, Pluronic® F-127, el cual forma un gel sensible a la temperatura, fueron las más atractivas para los estudios de espectroscopia infrarroja, ya que no parecía (en base a las estructuras del poloxámero) que los poloxámeros tuvieran una absorbencia infrarroja que pudiera interferir con la señal de absorbencia de la proteína, que es necesaria para la evaluación de la estructura. Además, previamente se había establecido que los poloxámeros, a concentraciones suficientes, tienen las características de ser líquidos a temperaturas por debajo de la temperatura ambiente pero se transforman en gel cuando están calientes. De acuerdo con ello, un objetivo adicional del estudio fue determinar qué efecto tendría esta transición de líquido a gel del poloxámero sobre la estructura de la proteína. Con el fin de estudiar la estructura de la proteína con espectroscopia infrarroja, es necesario tener concentraciones de proteína de al menos 15-20 mg/ml; por lo tanto, se preparó una concentración de 20 mg/ml en la presencia de poloxámero suficiente para permitir la gelificación durante el calentamiento. La solución de proteína resultante formó una suspensión lechosa, fina, la cual inicialmente fue muy frustrante, ya que la formación de dichas suspensiones indica frecuentemente que un componente de la solución (por ejemplo, el detergente polímero) da lugar a la desnaturalización de la proteína y a la formación de agregados de proteína no natural o inactiva, lo cual, indica el fallo del ensayo. Sin embargo, la espectroscopia infrarroja puede usarse, afortunadamente, para analizar estructuras de proteínas en suspensión, de manera que de cualquier modo se analizó la suspensión. De manera sorprendente, cuando se analizó la suspensión de proteína con la espectroscopia infrarroja de transformación por Fourier, en lugar del hallazgo de agregados de proteína no natural o inactiva, se encontró de manera inesperada que era completamente natural.

ES 2 318 860 T3

De acuerdo con la presente invención, la composición farmacéutica de la presente invención comprende un polímero, fundamentalmente un copolímero de bloque de polioxialquileno, el cual preferiblemente tiene la fórmula siguiente:



que tiene la característica única, en la realización preferida, de ser líquido a temperatura ambiente o menores y que existe en forma de gel semi-sólido a las temperaturas corporales de los mamíferos, en donde a y b son números enteros dentro del intervalo de 20 hasta 80 y 15 hasta 60, respectivamente. Un copolímero de bloque de polioxialquileno preferido para uso como el vehículo farmacéutico de esta invención es un copolímero de bloque de polioxietileno-polioxipropileno que tiene la fórmula siguiente:



en la que a y b son números enteros de manera tal que la base hidrófoba representada por $(\text{CH}_2(\text{CH}_3)\text{CHO})_a$ tiene un peso molecular de al menos aproximadamente 4.000, determinado por el índice de hidroxilo; la cadena de polioxietileno constituye aproximadamente 70 por ciento del número total de unidades monómeras en la molécula y en donde el copolímero tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 12.600. El Pluronic® F-127, también conocido como Poloxamer 407, es un material de este tipo.

Los procedimientos usados para preparar soluciones acuosas que forman geles de copolímero de bloque de polioxialquileno son bien conocidos. Por ejemplo, puede usarse o bien un procedimiento en caliente o bien en frío para la formación de las soluciones. La técnica en frío implica la etapas de disolución del copolímero de bloque de polioxialquileno a temperatura de aproximadamente 5°C hasta 10°C en agua o en un tampón, tal como tampón de fosfato. El agua, si se usa en la formación de la solución acuosa, está preferiblemente purificada, tal como mediante destilación, filtración, intercambio de iones o similar. Cuando la solución se ha completado, se lleva a temperatura ambiente, después de lo cual, forma un gel. Si se usa el procedimiento en caliente de formación del gel, el polímero se agrega al agua o a un tampón y se calienta hasta una temperatura de aproximadamente 75°C hasta 85°C con lenta agitación hasta que se obtiene una solución homogénea transparente, y tras enfriamiento forma un gel transparente.

Cualquier polipéptido macromolecular puede mezclarse con el vehículo farmacéutico para formar la composición farmacéutica de esta invención en el que la concentración del polipéptido macromolecular esté dentro del intervalo de 0,5 hasta 50 por ciento en peso de la composición. La elección de los polipéptidos que pueden suministrarse de acuerdo con la práctica de esta invención está limitada únicamente por la exigencia de que deben ser al menos muy ligeramente solubles en un medio fisiológico acuoso tal como plasma, fluido intersticial, y los fluidos intra y extracelulares del espacio subcutáneo y tejidos mucosales.

Los ejemplos de clases de polipéptidos incluyen, entre otros, proteínas, enzimas, nucleoproteínas, glucoproteínas, lipoproteínas, polipéptidos hormonalmente activos, y análogos sintéticos incluyendo agonistas y antagonistas de estas moléculas.

Los ejemplos específicos de polipeptidos adecuados para incorporación en el sistema de suministro de la presente invención incluyen las siguientes macromoléculas biológicamente activas: interferones, interleuquinas, insulina, inhibidores de enzimas, factores estimulantes de colonias, activadores de plasminógeno, factores de crecimiento y hormonas polipéptidas.

La lista de polipéptidos macromoleculares citados anteriormente se proporciona únicamente para ilustrar los tipos de agentes activos que son adecuados para uso en la práctica de la presente invención.

La composición farmacéutica de la presente invención puede prepararse fácilmente usando cualquier técnica de formación de soluciones que alcance la concentración copolímero de bloque de polioxialquileno necesaria para la gelificación. Preferiblemente, el vehículo farmacéutico y la mezcla de polipéptidos se preparan por separado y la mezcla de polipéptidos que tiene una concentración de 5 mg/ml o superior se agrega a él a una temperatura de aproximadamente 0°C hasta 10°C. Cuando se combinan, la proteína forma una suspensión homogénea de finas partículas en la solución del polímero, el cual, a continuación, tiene un aspecto "lechoso". Observadas mediante microscopia con iluminación las partículas son aproximadamente de 5-10 micrómetros de diámetro. Al aumentar la temperatura de la muestra por encima del punto de gel del poloxámero, se alcanza una distribución uniforme de las partículas de proteína a través del gel polímero. Debido a la alta viscosidad de la matriz del gel, las partículas permanecen distribuidas de manera homogénea y no "sedimentan". La transición líquido a gel es completamente reversible tras enfriamiento. Además, cuando el gel se expone a una solución acuosa, la matriz del gel y las partículas de proteínas se disuelven, liberando la proteína totalmente natural que retiene más del 90 por ciento de su actividad biológica.

La composición farmacéutica de la presente invención puede implantarse directamente dentro del cuerpo inyectándola como un líquido, tras lo cual, la composición farmacéutica gelificará una vez dentro del cuerpo. En la alternativa, la composición farmacéutica puede introducirse dentro de una pequeña bomba implantable, la cual, a continuación, se introduce dentro del cuerpo.

En otra realización, los solutos estabilizantes de la proteína, pueden incorporarse dentro del dispositivo farmacéutico de la presente invención descrito anteriormente. Inicialmente, se agregaron estabilizadores al dispositivo farmacéutico de la presente invención para incrementar la estabilidad de los polipéptidos macromoleculares puesto que dicha estabilización sería crucial para el uso de la presente invención para el suministro sostenido de proteína en el cuerpo. Sin embargo, al hacerlo así, se describió que los solutos estabilizantes de la proteína, tal como sacarosa, no solamente ayudan a la protección y la estabilización de la proteína, sino que además permiten que el poloxámero forme geles adecuados a concentraciones más bajas que las necesarias en agua o tampón solamente. De acuerdo con ello, puede ampliarse el intervalo de trabajo de la concentración de polímero. Tal como se ha expuesto anteriormente, la concentración del copolímero de bloque de polioxialqueno es un parámetro importante. Es sabido que no se formará un gel cuando la concentración del copolímero de bloque de polioxietileno-polioxipropileno en agua o tampón diluido esté fuera del intervalo de aproximadamente 20 hasta 30 por ciento en peso, tal como se muestra en la Figura 1 y se ejemplifica por la línea que tiene triángulos en blanco. Sin embargo, mediante la introducción de solutos estabilizantes de la proteína al dispositivo farmacéutico de la presente invención, puede manipularse la temperatura de transición gel-sol, al mismo tiempo que se reduce igualmente la concentración de copolímero de bloque de polioxietileno-polioxipropileno que es necesaria para formar un gel.

En una tercera realización, las concentraciones de polipéptido en el extremo alto del intervalo de 0,5 hasta 50 por ciento en peso puede lograrse centrifugando la composición farmacéutica de la presente invención a bajas temperaturas dentro del intervalo de -10°C hasta 10°C, y preferiblemente 0-4°C durante un periodo de tiempo suficiente para sedimentar las partículas de proteína. Por ejemplo, una muestra de la composición farmacéutica descrita previamente que comprende 20 mg/ml de proteína puede centrifugarse a 4°C de manera tal que sedimenten las partículas de proteína insolubles. A continuación, el sobrenadante equivalente a la mitad del volumen podría eliminarse y el sedimento resuspenderse en el líquido remanente. Esto daría como resultado una suspensión conteniendo al menos 40 mg/ml.

En los Ejemplos que siguen, la composición farmacéutica de la presente invención se preparó de acuerdo con el procedimiento de preparación siguiente. Puesto que los polioxialquenos se disuelven más completamente a temperaturas reducidas, los procedimientos preferidos de solubilización son agregar la cantidad requerida de copolímero a la cantidad de agua o tampón a usar. Generalmente, después de la humectación del copolímero mediante sacudidas, la mezcla se terminó y se introdujo en una cámara fría o en un recipiente termostático a aproximadamente 0°C hasta 10°C con el fin de disolver el copolímero. La mezcla puede agitarse o sacudirse para llevar a cabo una solución más rápida del polímero. A continuación, los polipéptidos y diversos aditivos tales como estabilizadores pueden agregarse y disolverse para formar una suspensión.

Los Ejemplos siguientes proporcionan procedimientos para la preparación de polímeros sensibles a la temperatura para el suministro sostenido de agentes farmacéuticos que comprenden altas concentraciones de agentes polipéptidos macromoleculares totalmente naturales. Todos los términos científicos y técnicos tienen los significados tal como son entendidos por un experto normal en la técnica. Los Ejemplos específicos que siguen ilustran polipéptidos representativos y concentraciones capaces de ser logradas mediante la presente invención. Los procedimientos pueden adaptarse a variaciones con el fin de producir composiciones o dispositivos abarcados por esta invención pero no específicamente descritos. Otras variaciones de los procedimientos para producir las mismas composiciones en una forma algo diferente resultarán evidentes para un experto en la técnica.

Se entiende que todas las temperaturas son en Centígrados (°C), cuando no se especifiquen. La descripción del espectro infrarrojo (IR) se midió sobre un espectrómetro Nicolet Magna-IR 550. Se usaron productos químicos comercialmente disponibles sin purificación.

En los Ejemplos que siguen, la solución al 27,5 por ciento (p/p) de Pluronic® F-127 se preparó de la manera siguiente. 7,59 gramos de Pluronic® F-127 seco se agregaron un tubo estéril que contenía 20 gramos de un tampón de fosfato enfriado en hielo (pH 7,4, 30 mM). El tubo se cerró y la mezcla se sacudió bien antes de almacenarla durante una noche a 4°C.

Ejemplo 1

Preparación y caracterización de una suspensión de quimotripsina en Pluronic® F-127

a) Preparación de la suspensión

Cuando se mezclaron 50 µl de una suspensión de 100 mg/ml de quimotripsina en tampón de fosfato 30 mM a pH 7,4 con 200 µl de una solución al 27,5 por ciento (p/p) de Pluronic® F-127 a 4°C se formó inmediatamente una suspensión lechosa, uniforme, blanca. La suspensión contenía 20 mg/ml de proteína y 22 por ciento (p/p) de Pluronic® F-127 y era un líquido viscoso por debajo de aproximadamente 18°C y un gel sólido, blando, por encima de aproximadamente 20°C. La parte cristalina de la suspensión líquida se separó por sedimentación de la solución cuando se dejó reposar durante un día o dos a 4°C o cuando se centrifugó en frío, pero pudo fácilmente resuspenderse mediante mezclado aunque estuviera fría. El hecho de que el material suspendido pueda separarse por sedimentación y resuspenderse en un volumen más pequeño que la suspensión original permite la formación de suspensiones de concentraciones significativamente más altas, tal como se ha expuesto previamente.

ES 2 318 860 T3

Con el fin de determinar la solubilidad de quimotripsina en la fase líquida de la suspensión, se ensayaron espectrofotométricamente para determinar su actividad partes alícuotas de la suspensión total y de los sobrenadantes después de centrifugación a 1000-5000 rpm durante 5 minutos a 4°C. En la Tabla 2 que figura a continuación, se muestra la concentración de quimotripsina que se mantiene soluble en el Pluronic® F-127.

TABLA 2

Enzima	Solubilidad (mg/ml) ¹	Desviación estándar
Quimotripsina	0,13 ²	0,06 ³

¹Determinada dividiendo la actividad medida en el sobrenadante por la actividad calculada por mg de proteína en la suspensión total.

²n=3.

b) La enzima suspendida muestra estructura secundaria tipo natural medida mediante FTIR

Los espectros de infrarrojos obtenidos usando un espectrofotómetro Nicolet Magna-IR 550 en una célula de una longitud de paso de 6 μ M, a temperatura regulada, se usaron para examinar y comparar la estructura de quimotripsina en tampón de fosfato (30 mM, pH 7,4) y en Pluronic® F-127 al 22 por ciento (p/p) en el mismo tampón. La concentración de proteína en estos estudios fue de 20 mg/ml. El examen cuidadoso de los espectros mostró que la estructura secundaria de la quimotripsina no resultó alterada debido a la suspensión de la proteína en el Pluronic® F-127. Los exámenes espectroscópicos adicionales mediante FTIR de la estructura de quimotripsina en Pluronic® F-127 a temperaturas por debajo y por encima de la transición del gel (aproximadamente 15°C hasta 18°C) mostró que la formación del gel no altera la estructura.

c) La enzima suspendida mantiene la actividad biológica

Para este experimento, se preparó una suspensión de quimotripsina en Pluronic® F-127 al 22 por ciento tal como se ha descrito anteriormente, pero a dos concentraciones diferentes, 20 mg/ml y 2 mg/ml. Se prepararon soluciones con las mismas concentraciones de proteína usando tampón de fosfato (30 mM, pH 7,4) sin Pluronic® F-127. Se diluyeron partes alícuotas de cada una de estas según fue necesario y se ensayaron para determinar la actividad enzimática tal como se ha descrito anteriormente. Tal como puede observarse a partir de la Tabla 3, a continuación, la enzima incorporada dentro de los geles podía recuperarse cuantitativamente y sin pérdida de actividad después de disolver los geles en tampón.

TABLA 3

Ambiente	Concentración (mg/ml)	Dilución antes del ensayo	Actividad observada	Desviación estándar	Por ciento actividad en tampón
Tampón ¹	20	5000	21,2 ^{3,4}	1,1 ^{3,4}	102
Pluronic ²	20	5000	21,6	3,4	
Tampón	2	500	21,0	0,8	123
Pluronic	2	500	25,8	1,4	

¹Fosfato, 30 mM, pH 7,4.

²22% (p/p) en tampón de fosfato 30 mM, pH 7,4.

³Expresado como mAU/min a 410 nm.

⁴n=9.

La actividad biológica de quimotripsina no resultó dañada por la inclusión en el Pluronic® F-127. Se observó una ligera potenciación de actividad cuando estuvieron presentes bajos niveles del detergente en las mezclas de ensayo de enzima. Es posible que la diferencia en el por ciento de recuperación observada entre las muestras de 2 mg/ml y 20 mg/ml mostrada en la Tabla 3 sea debida a la mayor dilución del gel en la muestra de 20 mg/ml y, en consecuencia, niveles superiores de Pluronic® F-127 en las muestras de 2 mg/ml.

ES 2 318 860 T3

d) La enzima suspendida muestra estabilidad al almacenamiento incrementada

Con el fin de demostrar que la suspensión de proteínas en Pluronic® F-127 al 22 por ciento tiene una acción estabilizante, se preparó 20 mg/ml de quimotripsina o bien en tampón de fosfato 30 mM, pH 7,4 o bien Pluronic® F-127 al 22 por ciento en este tampón tal como se ha descrito anteriormente. Estas suspensiones se diluyeron según fue necesario y se ensayó la actividad de la enzima. Los resultados mostrados en la Tabla 4 a continuación, demuestran que la enzima incubada en la presencia de Pluronic® F-127 retuvo más actividad que la enzima incubada en la presencia de tampón de fosfato solamente.

TABLA 4

Tiempo (hr.)	Tampón ¹ 8 grados	Pluronic ² 8 grados	Tampón 25 grados	Pluronic 25 grados	Tampón 37 grados	Pluronic 37 grados
1	100 ³	100	100	100	100	100
24	104	79	104	84	nd ⁴	59
48	94	98	86	82	15	46
94	105	96	7	65	2	7

¹Fosfato.

²22% (p/p) en tapón de fosfato, 30 mM, pH 7,4.

³Expresado como un porcentaje del valor de 1 hora.

⁴Valor no disponible.

De acuerdo con ello, el Pluronic® F-127 proporciona un ambiente estabilizante, lo cual es más evidente a tiempos prolongados y temperaturas elevadas, en donde los fármacos que contienen péptido y proteína pueden suspenderse antes y durante el suministro. Adicionalmente, pueden agregarse a la formulación otros agentes estabilizantes de proteína, tal como se describe con más detalle en el Ejemplo 6 más adelante.

Ejemplo 2

Preparación y caracterización de una suspensión de subtilisina en Pluronic® F-127

a) Preparación de la suspensión

Se preparó una suspensión de subtilisina mediante el mismo procedimiento descrito en detalle anteriormente para quimotripsina. Las propiedades físicas fueron las mismas en términos de formación y comportamiento de la suspensión blanca lechosa y la temperatura de transición gel-sol. La solubilidad de subtilisina en la fase líquida de la suspensión se examinó usando el procedimiento descrito anteriormente y se encontró que era diferente tal como podía esperarse para una proteína diferente. Los resultados están representados en la Tabla 5 a continuación.

TABLA 5

Enzima	Solubilidad (mg/ml) ¹	Desviación estándar
Subtilisina	6,48 ²	1,11 ³

¹Determinada dividiendo la actividad medida en el sobrenadante por la actividad calculada por mg de proteína en la suspensión total.

²n=2.

b) La enzima suspendida muestra estructura secundaria tipo natural medida mediante FTIR

Las suspensiones de subtilisina, al igual que las de quimotripsina descritas anteriormente, se examinaron mediante espectroscopia por FTIR con el fin de determinar si la inclusión en el gel tenía algún efecto sobre la estructura y si la estructura influyó la transición gel-sol. Al igual que en el caso de la quimotripsina, no tuvo efecto sobre la estructura.

c) *La enzima suspendida mantiene la actividad biológica*

En experimentos similares a los descritos anteriormente para quimotripsina, se prepararon suspensiones de subtilisina tanto en tampón de fosfato como en Pluronic® F-127 al 22 por ciento en tampón de fosfato y, a continuación, se disolvieron mediante dilución con tampón. En estos casos, al igual que en el caso de quimotripsina, se recuperó el 100 por ciento de actividad de la enzima, lo que muestra que la actividad biológica fue estable aunque se incorporó dentro de la suspensión de gel.

d) *La enzima suspendida muestra estabilidad al almacenamiento incrementada*

Con el fin de demostrar que la suspensión de subtilisina en Pluronic® F-127 al 22 por ciento tiene una acción estabilizante similar a la demostrada por quimotripsina, se preparó 20 mg/ml de subtilisina o bien en tampón de fosfato 30 mM, pH 7,4 o bien Pluronic® F-127 al 22 por ciento en tampón fosfato tal como se ha descrito anteriormente. Estas suspensiones se incubaron a temperaturas de 8, 25 y 37°C durante tiempos de hasta 118 horas, los geles o suspensiones se diluyeron según fue necesario y se ensayó la actividad de la enzima. Los resultados, mostrados en la Tabla 6 a continuación, demuestran que incluso teniendo en cuenta que la subtilisina es autocatalítica y pierde actividad más rápidamente que la quimotripsina, retuvo aún más actividad cuando se incubó en la presencia de Pluronic® F-127 que cuando se incubó en la presencia de tampón de fosfato solamente.

TABLA 6

Tiempo (hr.)	Tampón ¹ 8 grados	Pluronic ² 8 grados	Tampón 25 grados	Pluronic 25 grados	Tampón 37 grados	Pluronic 37 grados
0,5	100 ³	100	100	100	100	100
24	55	54	32	45	14	23
48	62	72	35	40	8	15
118	57	80	14	25	2	4

¹Fosfato, 30 mM, pH 7,4.

²22% (p/p) en tapón de fosfato, 30 mM, pH 7,4.

³Expresado como un porcentaje del valor de 0,5 horas.

Ejemplo 3

Preparación y caracterización de una suspensión de lactato deshidrogenasa en Pluronic® F-127

a) *Preparación de la suspensión*

Se preparó una suspensión de lactato deshidrogenasa mediante el mismo procedimiento descrito en detalle anteriormente para quimotripsina. Las observaciones individuales indicaron que las propiedades físicas fueron las mismas en términos de formación y comportamiento de la suspensión blanca lechosa y la temperatura de transición gel-sol.

b) *La enzima suspendida mantiene la actividad biológica*

En experimentos similares a los descritos anteriormente para quimotripsina, se prepararon suspensiones de lactato deshidrogenasa tanto en tampón de fosfato como en Pluronic® F-127 al 22 por ciento en tampón de fosfato y, a continuación, se disolvieron mediante dilución con tampón. En estos casos, al igual que en el caso de quimotripsina, se recuperó el 100 por ciento de actividad de la enzima, lo que muestra que la actividad biológica fue estable aunque se incorporó dentro de la suspensión de gel.

c) *La enzima suspendida muestra estabilidad al almacenamiento incrementada*

Se realizaron experimentos similares a los llevados a cabo con quimotripsina para ilustrar el efecto de Pluronic® F-127 en la estabilización de la acción de la enzima de lactato deshidrogenasa durante almacenamiento a temperaturas elevadas. En este caso, se incluyó sacarosa 0,5 M en algunas muestras y, por ello, fue necesario reducir la concentración de Pluronic® F-127 al 18 por ciento para mantener la misma temperatura de transición gel-sol. La Tabla 7 a continuación, muestra los resultados obtenidos cuando la lactato deshidrogenasa se almacenó durante 48 horas a 37°C.

TABLA 7

Composición de la muestra ¹	Actividad de la enzima ²	Desviación estándar (n=3)
Pluronic al 18%	59,3	1,7
Pluronic al 1% + sacarosa 0,5 M	46,1	2,7
Sacarosa 0,5 M	39,1	3,3
Tampón solamente	40,0	1,7

¹El tampón usado fue siempre Tris:HCl 50 mM, pH 5,35 con NaN₃ al 0,1%.

²Expresada en unidades arbitrarias.

20 Ejemplo 4

Preparación y caracterización de una suspensión de albúmina de suero bovino en Pluronic® F-127

25 a) Preparación de la suspensión

Se prepararon diversas mezclas de Pluronic® F-127 y albúmina de suero bovino en un intento de hallar una combinación que fuera un gel transparente con una concentración de proteína de 15 mg/ml o superior a temperatura ambiente. Las concentraciones de Pluronic® F-127 por debajo de 20 por ciento (p/p) no gelificaron a 25°C o menos y las concentraciones de 20 por ciento y superiores dieron como resultado una suspensión blanca, lechosa, cuando se agregó albúmina de suero bovino a concentraciones de 14 mg/ml y superiores. De acuerdo con ello, no se encontraron combinaciones que pudieran proporcionar las propiedades deseadas. Los estudios posteriores de estructura y estabilidad sobre diversas proteínas demostraron que no fue necesario tener un gel transparente para tener una formulación de suministro de fármaco de proteína satisfactoria con Pluronic® F-127.

35 b) La proteína suspendida muestra estructura secundaria tipo natural medida mediante FTIR

El examen mediante espectroscopia por FTIR de la estructura de una suspensión de 20 mg/ml de albúmina de suero bovino en Pluronic® F-127 al 22 por ciento no mostró diferencias con respecto a una suspensión similar de la proteína en tampón solamente. Este resultado fue similar a los resultados a partir de exámenes más extensos de las estructuras de quimotripsina y subtilisina suspendidas en el gel.

Ejemplo 5

45 *Preparación y caracterización de una suspensión de insulina en Pluronic® F-127*

a) Preparación de la suspensión

Se preparó una suspensión de insulina mediante el mismo procedimiento descrito en detalle anteriormente para quimotripsina. La observación visual indicó que las propiedades físicas fueron las mismas en términos de formación y comportamiento de la suspensión blanca lechosa y la temperatura de transición gel-sol.

b) La proteína suspendida muestra estructura secundaria tipo natural medida mediante FTIR

55 Las suspensiones de insulina, al igual que las de quimotripsina descritas anteriormente, se examinaron mediante espectroscopia por FTIR con el fin de determinar si la inclusión en el gel tenía algún efecto sobre la estructura y si la estructura influyó la transición gel-sol. Al igual que en el caso de la quimotripsina, no tuvo efecto sobre la estructura.

60 Ejemplo 6

Preparación de agentes estabilizantes usados para manipular las propiedades del gel

Se incorporaron diversas concentraciones de sacarosa en soluciones de Pluronic® F-127 como un ejemplo del uso de agentes estabilizantes de proteína conocidos para manipular las propiedades de los geles. En la Tabla 8 a continuación, se muestran los resultados típicos para la temperatura de transición gel-sol.

ES 2 318 860 T3

TABLA 8

% Pluronic ¹	Sacarosa 0 M	Sacarosa 0,5 M	Sacarosa 1,0 M	Sacarosa 1,5 M
16		25	20	0,2
17		20	14	-3
18		16	10	
20	22	14		
22	18			
30	9			

¹p/p, en fosfato 30 mM, pH 7,4.

Resulta evidente a partir de la Tabla 8 que la temperatura de transición gel-sol puede manipularse dentro del intervalo de desde por debajo de 0°C hasta aproximadamente 25°C tal como se requiere por la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para la administración controlada y sostenida de polipéptidos macromoleculares biológicamente activos, que comprende una matriz polímera que tiene propiedades de gelificación térmica en la que las partículas solubles acuosas de al menos un polipéptido macromolecular biológicamente activo a una concentración suficiente para formar una suspensión cuando se incorporan dentro de dicha matriz polímera están incorporadas dentro de dicha matriz polímera,

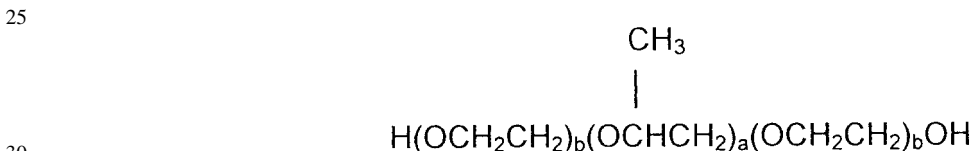
en la que dicha matriz polímera es un copolímero de bloque de polioxialquileo.

2. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho copolímero de bloque de polioxialquileo tiene la fórmula:



en la que la parte polioxietileno constituye al menos 70% en peso de dicho copolímero de bloque de polioxialquileo, en la que a y b son números enteros de manera tal que la base hidrófoba representada por $(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_a$ tiene un peso molecular de al menos 4.000 y en la que dicho copolímero tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 12.600.

3. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho copolímero de bloque de polioxialquileo tiene la fórmula:



en la que a es 20 hasta 80 y b es 15 hasta 60.

4. La composición de la reivindicación 3, en la que a es 67 y b es 49.

5. La composición de la reivindicación 1, en la que dichas partículas de polipéptidos macromoleculares constituyen más del 0,5% en peso de la composición.

6. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho polipéptido macromolecular incorporado retiene más del 90% de la actividad biológica que dicho polipéptido macromolecular posee antes de ser incorporado.

7. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 para la administración controlada y sostenida de un polipéptido macromolecular biológicamente activo, que comprende dicha matriz polímera en la cual se incorpora una suspensión de las partículas del polipéptido macromolecular soluble acuoso, en la que dichas partículas de péptidos macromolecular constituyen más del 0,5% en peso de la composición.

8. La composición de la reivindicación 7, en la que dicho polipéptido retiene más del 90% de la actividad biológica que dicho polipéptido posee antes de ser incorporado dentro de dicha matriz polímera.

9. La composición de la reivindicación 7, en la que dicha matriz polímera es un copolímero de bloque de polioxietileno-polioxipropileno.

10. Un procedimiento para la preparación de la composición farmacéutica de la reivindicación 1, que comprende: la preparación de una mezcla de una matriz polímera que tiene propiedades de gelificación térmica; y

la adición a dicha mezcla de al menos un polipéptido macromolecular biológicamente activo soluble acuoso, en una concentración suficiente para formar una suspensión,

en la que dicha matriz polímera es un copolímero de bloque de polioxialquileo.

11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que dicho copolímero de bloque de polioxialquileo tiene la fórmula:



en la que a es 20 hasta 80 y b es 15 hasta 60.

ES 2 318 860 T3

12. El procedimiento de la reivindicación 10, que comprende además la adición de sacarosa.

13. El procedimiento de la reivindicación 10, que comprende además la adición de polietileno glicol.

5 14. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además un soluto estabilizante de proteína.

15. La composición de la reivindicación 14, en la que dicho soluto estabilizante de proteína es sacarosa.

10 16. La composición de la reivindicación 15, en la que dicha sacarosa tiene una concentración molar de desde 0,5 hasta 1,5.

17. La composición de la reivindicación 14, en la que dicho soluto estabilizante de proteína es polietileno glicol.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

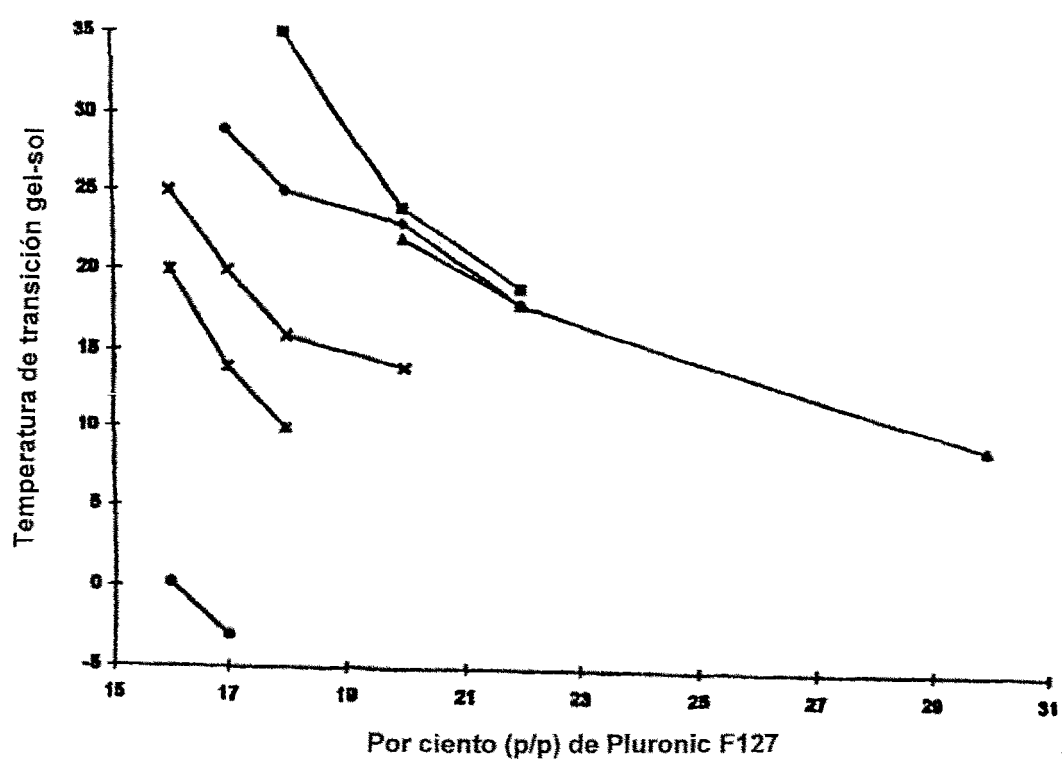


FIGURA 1