

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 802**

51 Int. Cl.:
A61K 31/573 (2006.01)
C07K 1/00 (2006.01)
C07K 7/00 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04750134 .1**
96 Fecha de presentación: **15.04.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1734971**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.12.2006**

54 Título: **DISPOSITIVO DE LIBERACIÓN SOSTENIDA A BASE DE POLÍMERO.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.03.2012

73 Titular/es:
Alkermes Pharma Ireland Limited
Monksland, Athlone
County Westmeath, IE y
Amylin Pharmaceuticals, Inc.

72 Inventor/es:
WRIGHT, Steven, G.;
CHRISTENSON, Troy;
YEOH, Thean, Y.;
RICKEY, Michael, E.;
HOTZ, Joyce, M.;
KUMAR, Rajesh;
COSTANTINO, Henry, R.;
SMITH, Christine;
LOKENS GARD, David y
ONG, John

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 375 802 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

Dispositivo de liberación sostenida a base de polímero

Antecedentes de la invención

5 Numerosas proteínas y péptidos, denominados colectivamente en la presente memoria polipéptidos, presentan actividad biológica *in vivo* y son útiles como medicamentos. Muchas enfermedades o afecciones requieren la administración de un nivel sostenido de medicamento para proporcionar los efectos profilácticos y/o terapéuticos más eficaces. Los niveles sostenidos con frecuencia se consiguen mediante la administración de polipéptidos biológicamente activos por inyecciones subcutáneas frecuentes, que a menudo dan como resultado niveles fluctuantes de medicamento y un mal cumplimiento de la terapia por parte del paciente.

10 Como alternativa, puede emplearse el uso de materiales biodegradables, tales como polímeros, que encapsulan el medicamento como un sistema de liberación sostenida. El uso de polímeros biodegradables, por ejemplo, en forma de micropartículas o microsoportes, puede proporcionar una liberación sostenida del medicamento utilizando la biodegradabilidad intrínseca del polímero para controlar la liberación del medicamento y proporcionando de esta manera un nivel sostenido más uniforme de medicamento y un mejor cumplimiento de la terapia por parte del paciente.

15 Sin embargo, estos dispositivos de liberación sostenida con frecuencia pueden presentar un alto estallido inicial del medicamento y una liberación mínima posteriormente, dando como resultado niveles de fármaco en suero fuera de la ventana terapéutica y/o una baja biodisponibilidad del medicamento. Además, la presencia de polímero, las temperaturas fisiológicas y la respuesta corporal a la composición de liberación sostenida pueden hacer que el medicamento se altere (por ejemplo, se degrade o se agregue) interfiriendo de esta manera con el perfil de liberación deseado del medicamento.

20 Además, los procedimientos usados para formar composiciones de liberación sostenida pueden dar como resultado una pérdida de actividad del medicamento debido a la inestabilidad del medicamento y a los efectos degradativos de las etapas de procesamiento. Los efectos degradativos son particularmente problemáticos cuando el medicamento es un polipéptido. El documento WO 03/020245 desvela una formulación con bajas cantidades de exendina-4 y sacarosa, que comprende además también acetato.

25 Por lo tanto, existe la necesidad de un medio para administrar polipéptidos biológicamente activos de una manera sostenida, en el que la cantidad de polipéptido administrado esté a niveles terapéuticos, y conserve la actividad y potencia durante el periodo de liberación deseado. Aunque se han desarrollado muchos trabajos dirigidos a estos problemas, se requieren nuevas soluciones.

Sumario de la invención

35 La invención se refiere al descubrimiento de que pueden conseguirse perfiles de liberación superiores (tales como los caracterizados por una relación entre $C_{m\acute{a}x}$ y C_{media} de aproximadamente 3 o menor) con una formulación que contenga unos pocos componentes optimizando la relación entre aceite de silicona y polímero en el procedimiento de fabricación, consiguiéndose de esta manera un bajo volumen de poros. Esta invención se refiere a composiciones para la liberación sostenida de polipéptidos biológicamente activos. Las composiciones de liberación sostenida de la presente invención comprenden un polímero biocompatible, exendina-4, como polipéptido biológicamente activo, y sacarosa. De acuerdo con la reivindicación 1, el polipéptido y el azúcar se dispersan en el polímero. El polipéptido y el azúcar pueden dispersarse por separado o, preferentemente, juntos. La composición de liberación sostenida proporciona un perfil de liberación deseable y uniforme, caracterizado por tener una relación entre $C_{m\acute{a}x}$ y C_{media} de aproximadamente 3 o menor.

La composición tiene un volumen total de poros de aproximadamente 0,1 ml/g o menor. El volumen total de poros se determina usando porosimetría por intrusión de mercurio.

El polímero biocompatible preferentemente es un polímero de poli(lactida co-glicolida).

45 En la presente memoria también se describe un procedimiento para formar composiciones para la liberación sostenida de agentes biológicamente activos, tales como polipéptidos, que comprende formar una mezcla combinando una fase acuosa que comprende agua, un agente, tal como un polipéptido soluble en agua, y un azúcar con una fase oleosa que comprende un polímero biocompatible y un disolvente para el polímero; formar una emulsión de agua en aceite, por ejemplo, sonicando u homogeneizando la mezcla; añadir aceite de silicona a la mezcla para formar micropartículas embrionarias; transferir las micropartículas embrionarias a un disolvente de inactivación para endurecer las micropartículas; recoger las micropartículas endurecidas; y secar las micropartículas endurecidas. En una realización particular, el aceite de silicona se añade en una cantidad suficiente para conseguir una relación entre aceite de silicona y disolvente polimérico de aproximadamente 1,5:1. Además o como alternativa, el polímero está presente en la fase oleosa a aproximadamente un 10% p/v o menos.

55 La exendina-4 está presente en la composición descrita en la presente memoria a una concentración del 5% p/p con

respecto al peso total de la composición final. Además, la sacarosa está presente en una concentración del 2% p/p del peso final de la composición.

5 La composición de la presente invención puede administrarse a un ser humano, o a otro animal, por inyección, implantación (por ejemplo, por vía subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intracraneal e intradérmica), administración en membranas mucosas (por ejemplo, por vía intranasal, intravaginal, intrapulmonar o por medio de un supositorio), o administración *in situ* (por ejemplo, por medio de un enema o pulverización de aerosol).

La composición se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz para tratar a un paciente que padece diabetes mellitus, tolerancia a la glucosa alterada (TGA), obesidad, trastornos cardiovasculares (CV) o cualquier otro trastorno que pueda tratarse por la exendina-4.

10 El uso de un azúcar en las composiciones de liberación sostenida de la invención mejora la biodisponibilidad del polipéptido biológicamente activo incorporado, por ejemplo, péptidos antidiabéticos o glucorreguladores, y minimiza la pérdida de actividad debida a la inestabilidad y/o las interacciones químicas entre el polipéptido y otros componentes contenidos o usados en la formulación de la composición de liberación sostenida, manteniendo al mismo tiempo un perfil de liberación excelente.

15 Las ventajas de las formulaciones de liberación sostenida descritas en la presente memoria incluyen un mayor cumplimiento y aceptación por parte del paciente al eliminar la necesidad de la administración repetida, un mayor efecto terapéutico beneficioso al eliminar las fluctuaciones en la concentración de agente activo en los niveles sanguíneos el proporcionar un perfil de liberación deseable, y una reducción potencial de la cantidad total de polipéptidos biológicamente activos necesarios para proporcionar un efecto terapéutico beneficioso al reducirse estas fluctuaciones.

20

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es un gráfico que muestra la relación entre el diámetro medio de poros y la liberación *in vitro* para composiciones de liberación sostenida descritas en el presente documento (A.S. = sulfato amónico).

25 La FIG. 2 es un gráfico que muestra el efecto de la porosidad sobre la liberación *in vitro* de exendina-4 desde micropartículas y el impacto que tienen las condiciones de procesamiento, particularmente la relación entre aceite de silicona y cloruro de metileno, sobre la porosidad de las micropartículas formadas.

Las FIGS. 3A-3B son exploraciones de MEB criogénicas para formulaciones de micropartículas seleccionadas descritas en la presente memoria.

30 Las FIGS. 4A-4D son exploraciones de MEB criogénicas para formulaciones de micropartículas seleccionadas descritas en la presente memoria.

La FIG. 5 es un gráfico de % residual de etanol y cloruro de metileno frente a la Tg para formulaciones de micropartículas descritas en la presente memoria.

35 La FIG. 6 es una curva farmacocinética representativa (concentración, pg/ml frente al tiempo, días, mostrando los recuadros las concentraciones durante el primer día) para la Formulación 2-1 (3% de exendina-4 y 2% de sacarosa), Formulación 1 (3% de exendina-4 sola) y Formulación 4 (3% de exendina-4 y 0,5% de sulfato amónico).

La FIG. 7 es un gráfico del perfil de liberación *in vivo* para las tres Formulaciones de micropartículas 2, 2-1 y 2-2.

La FIG. 8 es un gráfico de los datos farmacocinéticos para las Formulaciones de micropartículas 5-1, 5-2 y 5-3.

La FIG. 9 es un gráfico que ilustra la relación entre parámetros de procedimiento y el tamaño de emulsión interna conseguido por el procedimiento.

Descripción detallada de la invención

40 La invención proporciona una composición para la liberación sostenida de un polipéptido biológicamente activo, que comprende un polímero biocompatible que tiene el polipéptido biológicamente activo dispersado en el mismo de tal manera que está presente a una concentración del 5% (p/p) con respecto al peso de la composición, y sacarosa dispersada en el mismo de tal forma que está presente en un 2% (p/p) del peso de la composición, en la que el polipéptido biológicamente activo es exendina-4;

45

en la que el volumen total de poros de la composición es de 0,1 ml/g o menor, determinado usando porosimetría por intrusión de mercurio; y

en la que la composición carece de tampón y sales de desplazamiento salino.

50 La exendina-4 y la sacarosa se dispersan en el polímero biocompatible por separado o, preferentemente, juntas. En particular, la composición de liberación sostenida se caracteriza por un perfil de liberación que tiene una relación

entre la concentración máxima en suero ($C_{m\acute{a}x.}$) y la concentración media en suero (C_{media}) de aproximadamente 3 o menor. Como se usa en la presente memoria, el término uno o una se refiere a uno o una o más.

El agente

el polipéptido biológicamente activo es el polipéptido antidiabético o glucorregulador exendina-4.

- 5 La exendina-4 es un polipéptido de 39 aminoácidos. La secuencia de aminoácidos de la exendina-4 puede encontrarse en la Patente de Estados Unidos N° 5.424.286 expedida a Eng el 13 de junio de 1995. AC2993 y exenatide son sinónimos del término exendina-4. Se ha mostrado en seres humanos y en animales que la exendina-4 estimula la secreción de insulina en presencia de concentraciones elevadas de glucosa en sangre, pero no durante periodos de bajas concentraciones de glucosa en sangre (hipoglucemia). También se ha mostrado que suprime la secreción de glucagón, ralentiza el vaciado gástrico y afecta a la ingesta de alimentos y el peso corporal, además de tener otras acciones. Como tal, la exendina-4 y los análogos y agonistas de la misma pueden ser útiles en el tratamiento de la diabetes mellitus, TGA, obesidad, etc.

El azúcar

- 15 La cantidad de sacarosa presente en la composición de liberación sostenida, 2% (p/p), que proporciona excelentes perfiles de liberación.

El polímero

- 20 Los polímeros adecuados para formar la composición de liberación sostenida de la presente invención son polímeros biocompatibles que pueden ser polímeros biodegradables o no biodegradables o mezclas o copolímeros de los mismos. Un polímero es biocompatible si el polímero y cualquier producto de degradación del polímero no es tóxico para el receptor y además no posee efectos perjudiciales o indeseados significativos sobre el cuerpo del receptor, tal como una reacción inmunológica sustancial en el sitio de inyección.

- 25 Biodegradable, como se define en la presente memoria, significa que la composición se degradará o erosionará *in vivo* para formar unidades o especies químicas más pequeñas. La degradación puede producirse, por ejemplo, por procedimientos enzimáticos, químicos y físicos. Los polímeros biocompatibles y biodegradables adecuados incluyen, por ejemplo, poli(lactidas), poli(glicolidas), poli(lactida-co-glicolidas), poli(ácidos lácticos), poli(ácidos glicólicos), policarbonatos, poliesteramidas, polianhídridos, poli(aminoácidos), poliortoésteres, poli(dioxanonas), poli(alquilatos de alquileo), copolímeros o polietilenglicol y poliortoéster, poliuretano biodegradable, mezclas de los mismos y copolímeros de los mismos.

- 30 Los polímeros biocompatibles no biodegradables adecuados incluyen polímeros no biodegradables seleccionados del grupo que consiste en poliacrilatos, polímeros de etileno-acetato de vinilo y otros acetatos de celulosa acil-sustituídos, poliuretanos no degradables, poliestirenos, poli(cloruro de vinilo), poli(fluoruro de vinilo), poli(vinil imidazol), poliolefinas clorosulfonadas, poli(óxido de etileno), mezclas de los mismos y copolímeros de los mismos.

- 35 Los pesos moleculares aceptables para los polímeros usados en la presente invención pueden determinarse por un experto en la materia teniendo en cuenta factores tales como la velocidad de degradación del polímero deseada, propiedades físicas tales como resistencia mecánica, química de grupos terminales y velocidad de disolución del polímero en disolvente. Típicamente, un intervalo de pesos moleculares aceptable es de aproximadamente 2.000 Daltons a aproximadamente 2.000.000 de Daltons. En una realización preferida, el polímero es un polímero o copolímero biodegradable. En una realización más preferida, el polímero es una poli(lactida-co-glicolida) (en lo sucesivo "PLG") con una relación lactida:glicolida de aproximadamente 1:1 y un peso molecular de aproximadamente 10.000 Daltons a aproximadamente 90.000 Daltons. En una realización incluso más preferida, el peso molecular de la PLG usada en la presente invención tiene un peso molecular de aproximadamente 30.000 Daltons a aproximadamente 70.000 Daltons, tal como de aproximadamente 50.000 a aproximadamente 60.000 Daltons.

- 45 Las PLG pueden poseer grupos terminales ácidos o grupos terminales bloqueados, tales como los que pueden obtenerse por esterificación del ácido. Se obtuvieron resultados excelentes con una PLG con un grupo terminal ácido.

- 50 Los polímeros también pueden seleccionarse basándose en la viscosidad intrínseca del polímero. Las viscosidades intrínsecas adecuadas incluyen de aproximadamente 0,06 a 1,0 dl/g, tal como de aproximadamente 0,2 a 0,6 dl/g, más preferentemente entre aproximadamente 0,3 y 0,5 dl/g. Se eligen polímeros preferidos que se degradarán en 3 a 4 semanas. Pueden adquirirse polímeros adecuados en Alkermes, Inc., con el nombre comercial Medisorb®, tales como los vendidos como 5050 DL 3A o 5050 DL 4A. También pueden usarse PLG Resomer® de Boehringer Ingelheim, tales como Resomer® RG503 y 503H.

- 55 La composición de liberación sostenida de la presente invención puede conformarse en muchas formas tales como una película, un microgránulo, un cilindro, un disco o una micropartícula. Una micropartícula, como se define en la presente memoria, comprende un componente polimérico que tiene un diámetro menor de aproximadamente un

5 milímetro y que tiene un polipéptido biológicamente activo dispersado o disuelto en su interior. Una micropartícula puede tener una forma esférica, no esférica o irregular. Típicamente, la micropartícula tendrá un tamaño adecuado para la inyección. Un intervalo de tamaños típico para las micropartículas es de 1000 micrómetros o menor. En una realización particular, la micropartícula varía de aproximadamente 1 a aproximadamente 180 micrómetros de diámetro.

Excipientes adicionales

10 Aunque es posible añadir excipientes adicionales a las formulaciones de la invención reivindicada, como es bien conocido en la técnica, un descubrimiento sorprendente de la presente invención es que se puede conseguir un perfil de liberación excelente con la formulación sencilla descrita en la presente memoria. Dichos excipientes adicionales pueden aumentar o reducir la velocidad de liberación del agente. Los ingredientes que pueden aumentar sustancialmente la velocidad de liberación incluyen agentes formadores de poros y excipientes que facilitan la degradación del polímero. Por ejemplo, la velocidad de hidrólisis del polímero aumenta en un pH no neutro. Por lo tanto, puede añadirse un excipiente ácido o básico, tal como un ácido inorgánico o base inorgánica, a la solución de polímero usada para formar las micropartículas, para alterar la velocidad de erosión del polímero. Los ingredientes que pueden reducir sustancialmente la velocidad de liberación incluyen excipientes que reducen la solubilidad en agua del agente.

15 Fue un descubrimiento sorprendente que no eran necesarios agentes tamponantes tales como acetato, citrato, fosfato u otros tampones biológicamente compatibles en la fase acuosa para conseguir una formulación de liberación sostenida con exendina-4, con una biodisponibilidad de buena a excelente. También fue un descubrimiento sorprendente que eran innecesarias las sales de desplazamiento salino para controlar el estallido de la exendina-4. Como tales, las composiciones de la invención, como se describen en la presente memoria, se caracterizan en la ausencia sustancial (o completa) de tampón y/o sales de desplazamiento salino.

Administración

25 Las composiciones de la invención pueden administrarse de acuerdo con procedimientos conocidos generalmente en la técnica. La composición de la presente invención puede administrarse a un paciente (por ejemplo, un ser humano que necesita el agente) u otro animal, por inyección, implantación (por ejemplo, por vía subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intracraneal e intradérmica), administración en las membranas mucosas (por ejemplo, por vía intranasal, intravaginal, intrapulmonar o por medio de un supositorio) o administración *in situ* (por ejemplo, mediante un enema o pulverización de aerosol).

30 La composición de liberación sostenida puede administrarse usando cualquier programa de dosificación que consiga los niveles terapéuticos deseados durante el periodo de tiempo deseado. Por ejemplo, la composición de liberación sostenida puede administrarse y puede supervisarse al paciente hasta que los niveles de fármaco que se está administrando vuelvan al valor basal. Después del retorno al valor basal, puede administrarse de nuevo la composición de liberación sostenida. Como alternativa, la administración posterior de la composición de liberación sostenida puede realizarse antes de conseguir niveles basales en el paciente.

35 Por ejemplo, la composición se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz para tratar a un paciente que padece diabetes mellitus, diabetes tipo II, TGA, obesidad, trastornos cardiovasculares (CV) o cualquier otro trastorno que pueda tratarse por exendina-4.

40 La composición de liberación sostenida de la presente invención puede coadministrarse con un corticosteroide. La coadministración de la composición de liberación sostenida de la invención con un corticosteroide puede aumentar adicionalmente la biodisponibilidad del polipéptido biológicamente activo de la composición de liberación sostenida. La coadministración de un corticosteroide en combinación con composiciones de liberación sostenida se describe con detalle en la Solicitud de Patente de Estados Unidos 60/419.430 titulada, "Method of Modifying the Release Profile of Sustained Release Compositions" ("Procedimiento para modificar el perfil de liberación de composiciones de liberación sostenida") por Dasch y col.

45 Corticosteroides, como se define en la presente memoria, se refiere a agentes antiinflamatorios esteroideos también denominados glucocorticoides.

50 Los corticosteroides adecuados incluyen, pero sin limitación, 21-Acetoxipregnenolona, Alclometasona, Algestona, Amcinonida, Beclometasona, Betametasona, Budesonida, Cloroprednisona, Clobetasol, Clobetasona, Clocortolona, Cloprednol, Corticosterona, Cortisona, Cortivazol, Deflazacort, Desonida, Desoximetasona, Dexametasona, Disflorasona, Diflucortolona, Difluprednato, Enoxolona, Fluazacort, Flucloronida, Flumetasona, Flunisolida, Flucinolona Acetonida, Fluocinonida, Fluocortin Butilo, Flucortolona, Fluorometolona, Acetato de Fluperolona, Acetato de Fluprednideno, Fluprednisolona, Flurandrenolida, Propionato de Fluticasona, Formocortal, Halcinonida, Propionato de Halobetasol, Halometasona, Acetato de Halopredona, Hidrocortamato, Hidrocortisona, Loteprednol Etabonato, Mazipredona, Medrisona, Meprednisona, Metilprednisolona, Mometasona Furoato, Parametasona, Prednicarbato, Prednisolona, 25 - Dietilamino acetato de Prednisolona, Fosfato Sódico de Prednisolona, Prednisona, Prednival, Prednilideno, Rimexolona, Tixocortol, Triamcinolona (todas las formas), por ejemplo, Triamcinolona Acetonida, Éster metílico del ácido 21-oico de Triamcinolona Acetonida, Triamcinolona Benetonida, Triamcinolona

Hexacetonida, Diacetato de Triamcinolona, mezclas farmacéuticamente aceptables de los mismos y sales de los mismos y cualquier otro derivado y análogo de los mismos.

El corticosteroide puede co-incorporarse en la composición de liberación sostenida que comprende el polímero biocompatible y el agente polipeptídico biológicamente activo incorporado en su interior.

- 5 El corticosteroide puede incorporarse por separado en un segundo polímero biocompatible. El segundo polímero biocompatible puede ser igual o diferente del primer polímero biocompatible que tiene el agente polipeptídico biológicamente activo incorporado en su interior.

10 El corticosteroide puede estar presente en un estado no encapsulado sino mezclado con la composición de liberación sostenida. Por ejemplo, el corticosteroide puede solubilizarse en el vehículo usado para administrar la composición de liberación sostenida. Como alternativa, el corticosteroide puede estar presente como un sólido suspendido en un vehículo apropiado. Además, el corticosteroide puede estar presente como un polvo que se mezcla con la composición de liberación sostenida.

15 Se entiende que el corticosteroide está presente en una cantidad suficiente para aumentar la biodisponibilidad del polipéptido biológicamente activo desde la composición de liberación sostenida. Una mayor biodisponibilidad se refiere a un aumento en la biodisponibilidad del polipéptido biológicamente activo desde la composición de liberación sostenida cuando se coadministra con un corticosteroide en comparación con la administración en ausencia del corticosteroide durante un periodo de tiempo que empieza dos días después de la administración y termina al final del ciclo de liberación para la formulación particular.

20 Como se usa en la presente memoria, paciente se refiere a un ser humano, tal como un ser humano que necesita el agente o el procedimiento de terapia, profilaxis o diagnóstico.

25 Como se define en la presente memoria, una liberación sostenida de un polipéptido biológicamente activo es una liberación del polipéptido desde la composición de liberación sostenida de la invención que se produce durante un periodo que es mayor que el periodo durante el cual estaría disponible una cantidad biológicamente significativa del polipéptido después de la administración directa de una solución del polipéptido. Se prefiere que una liberación sostenida sea una liberación que se produce durante un periodo de al menos aproximadamente una semana, tal como al menos aproximadamente dos semanas, al menos aproximadamente tres semanas o al menos aproximadamente cuatro semanas. La liberación sostenida puede ser una liberación continua o discontinua, con velocidades de liberación relativamente constantes o variables. La continuidad de la liberación y el nivel de liberación pueden verse afectados por el tipo de composición polimérica usada (por ejemplo, relaciones de monómeros, peso molecular, composición de bloque y combinaciones variables de polímeros), carga de polipéptido y/o selección de excipientes para producir el efecto deseado.

30 Como se usa en la presente memoria, una cantidad terapéuticamente eficaz, cantidad profilácticamente eficaz o cantidad diagnósticamente eficaz es la cantidad de la composición de liberación sostenida necesaria para inducir la respuesta biológica deseada después de la administración.

35 $C_{m\acute{a}x}$, como se usa en la presente memoria, es la concentración máxima en suero de fármaco que se produce durante el periodo de liberación que se supervisa.

C_{media} , como se usa en la presente memoria, es la concentración media en suero de fármaco obtenida dividiendo el área bajo la curva (ABC) del perfil de liberación por la duración de la liberación.

40 Se prefiere que la relación entre $C_{m\acute{a}x}$ y C_{media} sea de aproximadamente 3 o menor. Este perfil es particularmente deseable para polipéptidos antidiabéticos o glucorreguladores, tales como los descritos anteriormente. Una relación de aproximadamente 3 o menos puede proporcionar un valor de C_{media} en la ventana terapéutica y evitar al mismo tiempo efectos secundarios del fármaco adversos que podrían producirse con relaciones mayores.

45 Biodisponibilidad, como se usa dicho término en la presente memoria, se refiere a la cantidad de producto terapéutico que alcanza el sistema circulatorio. La biodisponibilidad puede definirse como el Área Bajo la Curva (ABC) calculada para el perfil de liberación de un polipéptido particular durante el periodo de tiempo que empieza después de la administración y termina en un punto de tiempo predeterminado. Como se entiende en la técnica, el perfil de liberación se genera representando gráficamente los niveles en suero de un agente biológicamente activo en un sujeto (eje Y) en puntos de tiempo predeterminados (eje X). Con frecuencia se hace referencia a la biodisponibilidad en términos de % de biodisponibilidad, que es la biodisponibilidad conseguida para un polipéptido particular después de la administración de una composición de liberación sostenida dividida por la biodisponibilidad conseguida para un polipéptido particular después de la administración intravenosa de la misma dosis de fármaco, multiplicado por 100.

55 Una modificación del perfil de liberación puede confirmarse por la supervisión farmacocinética apropiada del suero del paciente con respecto a la presencia del agente polipeptídico biológicamente activo. Por ejemplo, puede usarse el ensayo basado en anticuerpos específicos (por ejemplo, ELISA e IRMA), como es bien conocido en la técnica, para determinar la concentración de ciertos agentes polipeptídicos biológicamente activos en el suero del paciente.

En la presente memoria se describe un ejemplo de dicho ensayo para exendina-4.

Puede usarse la supervisión farmacodinámica del paciente para supervisar los efectos terapéuticos del agente en el paciente, para confirmar la retención de la actividad biológica del agente liberado. Pueden seleccionarse procedimientos para supervisar los efectos farmacodinámicos basándose en el agente polipeptídico biológicamente activo que se está administrado usando técnicas ampliamente disponibles.

Fabricación

Se conocen varios procedimientos mediante los cuales pueden formarse composiciones de liberación sostenida (matrices de polímero/polipéptido biológicamente activo) de la invención, particularmente composiciones que tienen baja porosidad como se describe en la presente memoria. En los Ejemplos de Trabajo se exponen procedimientos detallados para algunos procedimientos de formación de micropartículas. En una realización preferida, el procedimiento de la invención para formar una composición para la liberación sostenida de un polipéptido biológicamente activo incluye formar una mezcla combinando una fase acuosa que comprende agua, agente, tal como un polipéptido soluble en agua, y un azúcar con una fase oleosa que comprende un polímero biocompatible y un disolvente para el polímero; formar una emulsión de agua en aceite; añadir un agente de coacervación, por ejemplo aceite de silicona, aceite vegetal o aceite mineral a la mezcla para formar micropartículas embrionarias; transferir las micropartículas embrionarias a un disolvente de inactivación para endurecer las micropartículas; recoger las micropartículas endurecidas; y secar las micropartículas endurecidas. Este procedimiento generalmente se denomina en la presente memoria procedimiento agua-aceite-aceite (W/O/O).

Preferentemente, el polímero puede estar presente en la fase oleosa en una concentración que varía de aproximadamente un 3% p/p a aproximadamente un 25% p/p, preferentemente de aproximadamente un 4% p/p a aproximadamente un 15% p/p, tal como de aproximadamente un 5% p/p a aproximadamente un 10% p/p. Se obtuvieron resultados excelentes en la presente memoria usando una concentración del 6% p/p de PLG en la fase oleosa.

El polímero generalmente se combina con un disolvente de polímero. Cuando el polímero es un PLG, tal como los preferidos en la presente memoria, el polímero se añade a un disolvente para PLG. Dichos disolventes son bien conocidos en la técnica. Un disolvente preferido es cloruro de metileno.

El agente y azúcar se añaden en la fase acuosa, preferentemente en la misma fase acuosa. La concentración de agente preferentemente es de 10 a 100 mg/g, preferentemente entre 50 y 100 mg/g. La concentración de azúcar preferentemente es de 10 a 50 mg/g y de 30 a 50 mg/g.

Las dos fases después se mezclan para formar una emulsión. Se prefiere que la emulsión se forme de tal manera que el tamaño de las gotas de emulsión interna sea menor de aproximadamente 1 micrómetro, preferentemente menor de aproximadamente 0,7 micrómetros, más preferentemente menor de aproximadamente 0,5 micrómetros, tal como de aproximadamente 0,4 micrómetros. Pueden usarse sonicadores y homogeneizadores para formar dicha emulsión.

Un agente de coacervación, como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier aceite en el que no se solubilice fácilmente la solución de polímero (polímero y disolvente) y de esta manera forme una fase distinta con la solución de polímero. Los agentes de coacervación adecuados para uso en la presente invención incluyen, pero sin limitación, aceite de silicona, aceite vegetal y aceite mineral. En una realización particular, el agente de coacervación es aceite de silicona y se añade en una cantidad suficiente para conseguir una relación entre aceite de silicona y disolvente de polímero de aproximadamente 0,75:1 a aproximadamente 2:1. En una realización particular, la relación entre aceite de silicona y polímero es de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1,5:1. En una realización preferida, la relación entre aceite de silicona y polímero es de aproximadamente 1,5:1.

La mezcla resultante se añade a un inactivador, que comprende un compuesto no disolvente para el polímero. Los compuestos no disolventes para polímeros se conocen generalmente en la técnica. Un inactivador particularmente preferido comprende un sistema disolvente de heptano/etanol.

El fármaco sólido también puede encapsularse usando una versión modificada del procedimiento descrito anteriormente. Este procedimiento modificado puede denominarse sólido/aceite/aceite (S/O/O).

Por ejemplo, se suspendió exendina-4 sólida en cloruro de metileno que contenía un 6% de PLG y se sonicó durante aproximadamente cuatro minutos en hielo. El procesamiento posterior se realizó de una manera análoga al procedimiento W/O/O.

A continuación, la invención se describirá adicionalmente y de forma específica mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Preparación de micropartículas I

Las composiciones de liberación sostenida descritas en la presente memoria se prepararon por un procedimiento de

separación de fases. A continuación se describe el procedimiento general para micropartículas que contienen exendina-4 y sacarosa para un tamaño de lote de 1 kg.

A. Formación de emulsión interna de agua en aceite

5 Se creó una emulsión de agua en aceite con la ayuda de un homogenizador. Los homogeneizadores adecuados incluyen un homogenizador Megatron en línea MT-V 3-65 F/FF/FF, Kinematica AG, Suiza. La fase de agua de la emulsión se preparó disolviendo exendina-4 y excipientes tales como sacarosa en agua. La concentración de fármaco en la solución resultante puede ser de aproximadamente 50 mg/g a aproximadamente 100 mg/g. Por ejemplo, cuando el fármaco es exendina-4, la concentración de fármaco en solución puede ser de aproximadamente 30 g a aproximadamente 60 g por 600 g de agua. En una realización particular, se disolvieron 50 g de exendina-4 y 20 g de sacarosa en 600 g de agua para irrigación (WFI). Las cantidades especificadas indicadas anteriormente representan una carga nominal sin ajuste para compensar la concentración de contenido de péptido específica para el lote de exendina-4 usado. La fase oleosa de la emulsión se preparó disolviendo polímero PLGA (por ejemplo, 930 g de PLGA DL4A 50:50 purificado (Alkermes, Inc.) en cloruro de metileno (14,6 kg o 6% p/p).

15 Después se añadió la fase acuosa a la fase oleosa para formar una emulsión gruesa con un mezclador superior durante aproximadamente tres minutos. Después, la emulsión gruesa se homogenizó a aproximadamente 10.000 rpm a temperatura ambiente. Esto dio como resultado un tamaño de gotas de emulsión interna menor de 1 micrómetro. Se entiende que la formación de la emulsión interna puede conseguirse usando cualquier medio adecuado. Los medios adecuados de formación de emulsiones incluyen, pero sin limitación, homogeneización, como se ha descrito anteriormente, y sonicación.

20 B. Formación del coacervado

Después se realizó una etapa de coacervación añadiendo aceite de silicona (21,8 kg de Dimeticona, NF, 350 cs) durante un periodo de tiempo de aproximadamente cinco minutos a la emulsión interna. Esto es equivalente a una relación de 1,5:1 entre aceite de silicona y cloruro de metileno. El cloruro de metileno de la solución de polímero se reparte en el aceite de silicona y empieza a precipitar el polímero alrededor de la fase acuosa que contiene exendina-4, lo que conduce a la microencapsulación. Las microesferas embrionarias formadas de esta manera son blandas y requieren endurecimiento. Con frecuencia, las microesferas embrionarias se dejan en reposo durante un corto periodo de tiempo, por ejemplo, de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 5 minutos, antes de proceder a la etapa de endurecimiento de las microesferas.

C. Endurecimiento de microesferas y aclarado

30 Las microesferas embrionarias se transfirieron inmediatamente a una mezcla disolvente de heptano/etanol. El volumen necesario de mezcla de heptano/etanol puede determinarse basándose en el tamaño de lote de microesferas, típicamente una relación entre cloruro de metileno y disolvente de heptano/etanol de 16:1. En el presente ejemplo se usaron aproximadamente 210 kg de heptano y 23 kg de etanol en un depósito agitado y enfriado a 3°C. Esta mezcla de disolventes endureció la microesferas por extracción de cloruro de metileno adicional de las microesferas. La etapa de endurecimiento también puede denominarse inactivación. Después de inactivarse durante 1 hora a 3°C, la mezcla de disolvente se decanta, se añade más heptano (13 kg) a 3°C y se mantiene durante 1 hora para retirar por aclarado el aceite de silicona residual, etanol y cloruro de metileno de la superficie de las microesferas o éstas se bombean directamente a la etapa de recogida.

D. Secado y recogida de microesferas

40 Al final de la etapa de inactivación o decantación/lavado, las microesferas se transfirieron y se recogieron en un Filtro/Secador Sweco Pharmasep de 12" Modelo PH12Y6. El filtro/secador usa una criba de recogida de múltiples capas de 20 micrómetros y está conectado a un motor que hace vibrar la criba durante la recogida y el secado. Se realizó un aclarado final con heptano (6 kg a 3°C) para asegurar la máxima transferencia en línea y para retirar cualquier exceso de aceite de silicona. Las microesferas después se secaron al vacío con una purga constante de gas nitrógeno a una velocidad controlada de acuerdo con el siguiente programa: 6 horas a 3°C; 6 horas de elevación hasta 41°C; y 84 horas a 41°C.

Después de finalizar el secado, las microesferas se descargaron en un recipiente de recogida, se tamizaron a través de un tamiz de 150 µm y se almacenaron a aproximadamente -20°C hasta el relleno.

50 Para todas las formulaciones de micropartículas que se prepararon en la presente memoria, la cantidad de polipéptido, por ejemplo, exendina-4, y de excipientes presentes en las formulaciones preparadas se expresa como un % (p/p) basado en el peso final de la composición de liberación sostenida. El % (p/p) es un porcentaje nominal, excepto cuando se indica.

Preparación de micropartículas II

A. Formación de emulsión interna de agua en aceite

Se creó una emulsión de agua en aceite con la ayuda de un sonicador. Los sonicadores adecuados incluyen Vibracell VCX 750 con una cabeza de sonda modelo CV33, Sonics and Materials Inc., Newtown, CT. La fase acuosa de la emulsión se preparó disolviendo exendina-4 y excipientes tales como sacarosa en agua. La concentración de fármaco en la solución resultante puede ser de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml. Por ejemplo, cuando el fármaco es exendina-4, la concentración de fármaco en solución puede ser de aproximadamente 3,28 g a aproximadamente 6,55 g por 65,5 g de agua. En una realización particular, se disolvieron 5,46 g de exendina-4 y 2,18 g de sacarosa en 65,5 g de agua para irrigación o WFI. Las cantidades específicas indicadas anteriormente representan un exceso del 4% con respecto a la carga diana para compensar las pérdidas tras la esterilización en filtro de los componentes. La fase oleosa de la emulsión se preparó disolviendo polímero PLGA (por ejemplo, 97,7 g de PLGA DL4A 50:50 (Alkermes, Inc.) en cloruro de metileno (1539 g o 6% p/v).

Después se añadió la fase acuosa a la fase oleosa durante un periodo de aproximadamente tres minutos mientras se sonicaba a una amplitud del 100% a temperatura ambiente. La fase acuosa se bombeó a través de un tubo de acero inoxidable de 0,64 cm con un extremo de tubo de HPLC de 2,54 cm (DI = 0,05 cm) a 5 psig, y se añadió por debajo de la sonda de sonicación hasta el interior de la zona de sonicación. Después, el reactor se agitó a 1400-1600 rpm, con sonicación adicional a una amplitud del 100% durante 2 minutos, seguido de un mantenimiento de 30 segundos, y después 1 minuto más de sonicación. Esto dio como resultado un tamaño de gotas de emulsión interna menor de 0,5 micrómetros. Se entiende que la formación de la emulsión interna puede conseguirse usando cualquier medio adecuado. Los medios adecuados de formación de emulsiones incluyen, pero sin limitación, sonicación como se ha descrito anteriormente y homogeneización.

20 B. Formación de coacervados

Después se realizó una etapa de coacervación añadiendo aceite de silicona (2294 g de Dimeticona, NF, 350 cs) durante un periodo de tiempo de aproximadamente tres a cinco minutos a la emulsión interna. Esto es equivalente a una relación entre aceite de silicona y cloruro de metileno de 1,5:1. El cloruro de metileno de la solución de polímero se reparte en el aceite de silicona y empieza a precipitar el polímero alrededor de la fase acuosa que contiene exendina-4, lo cual conduce a la microencapsulación. Las microesferas embrionarias formadas de esta manera son blandas y requieren endurecimiento. Frecuentemente, se deja que las microesferas embrionarias permanezcan en reposo durante un corto periodo de tiempo, por ejemplo, de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 5 minutos antes de proceder a la etapa de endurecimiento de microesferas.

25 C. Endurecimiento y aclarado de microesferas

Las microesferas embrionarias después se transfirieron inmediatamente a una mezcla disolvente de heptano/etanol. El volumen necesario de mezcla de heptano/etanol puede determinarse basándose en el tamaño de lote de microesferas. En el presente ejemplo, se usaron aproximadamente 22 kg de heptano y 2448 g de etanol en un depósito agitado y enfriado a 3°C (de 350 a 450 rpm). Esta mezcla disolvente endureció las microesferas extrayendo el cloruro de metileno adicional de las microesferas. Esta etapa de endurecimiento también puede denominarse inactivación. Después de inactivarse durante 1 hora a 3°C, la mezcla disolvente se decantó y se añadió más heptano (13 kg) a 3°C y se mantuvo durante 1 hora para retirar por aclarado el aceite de silicona residual, etanol, y cloruro de metileno sobre la superficie de las microesferas.

30 D. Secado y recogida de microesferas

Al final de la etapa de aclarado, las microesferas se transfirieron y recogieron en una criba multicapa de 20 micrómetros, de 15,24 cm de diámetro dentro de la cámara de secado con forma de cono que actuó como filtro de extremo ciego. Se realizó un aclarado final con heptano (6 kg a 4°C) para asegurar la transferencia máxima en línea. Las microesferas después se secaron con una purga constante de gas nitrógeno a una velocidad controlada de acuerdo con el siguiente programa: 18 horas a 3°C; 24 horas a 25°C; 6 horas a 35°C; y 42 horas a 38°C.

Después de finalizar el secado, las microesferas se descargan en un recipiente de recogida esterilizado de teflón/acero inoxidable acoplado al cono de secado. El recipiente de recogida se sella, se retira del cono de secado y se almacena a $-20 \pm 5^\circ\text{C}$ hasta el relleno. El material que queda en el cono después del desmontaje para la limpieza se recoge para el análisis del contenido de fármaco. El rendimiento fue de aproximadamente 100 gramos de microesferas.

Para todas las formulaciones de micropartículas que se prepararon en la presente memoria, la cantidad de polipéptido, por ejemplo, exendina-4 y excipientes presentes en las formulaciones preparadas se expresa como un % (p/p) basado en el peso final de la composición de liberación sostenida. El % (p/p) es un porcentaje nominal, excepto cuando se indica.

Polímero:

A continuación se indican ejemplos de polímeros PLG específicos adecuados para su uso. Todos los polímeros empleados en los siguientes ejemplos se exponen en la lista y todos los polímeros presentados en la lista se obtuvieron en Alkermes, Inc. of Cincinnati, OH y pueden describirse como se indica a continuación:

Polímero 2A: Poli(lactida-co-glicolida); relación de lactida:glicolida 50:50; Peso molecular 12,3 kD; IV = 0,15 (dl/g).

Polímero 4A: Poli(lactida-co-glicolida); relación de lactida:glicolida 50:50; Peso molecular 45-64 kD; IV = 0,45-0,47 (dl/g).

- 5 Purificación de PLG: Se conoce en la técnica (véase, por ejemplo, Peptide Acylation by Poly(α -Hydroxy Esters) (Acilación de péptidos por poli(α -hidroxi ésteres)) por Lucke y col, Pharmaceutical Research, Vol. 19, N° 2, págs. 175-181, febrero de 2002) que las proteínas y péptidos que se incorporan en matrices de PLG pueden alterarse de forma indeseable (por ejemplo, degradarse o modificarse químicamente) como resultado de la interacción con productos de degradación del PLG o impurezas que quedan después de la preparación del polímero. Como tales, los polímeros de PLG usados en la preparación de la mayoría de las formulaciones de micropartículas descritas en la presente memoria se purificaron antes de la preparación de las composiciones de liberación sostenida usando procedimientos de purificación reconocidos en la técnica.

Procedimientos de caracterización:

- 15 Se ha determinado que los siguientes procedimientos de caracterización son adecuados para identificar micropartículas que proporcionarán un perfil de liberación deseable de agente activo.

MEB

- 20 Se usó MEB para evaluar el tamaño de partículas, la forma y las características superficiales de las micropartículas. La formación de imágenes de MEB se realizó en un sistema SEM® Personal (ASPEX™, LLC). Todas las muestras se depositaron mediante una espátula en portamuestras de MEB convencionales cubiertos con una cinta adhesiva de doble capa de carbono. Las muestras se recubrieron por pulverización catódica ("sputtering") con Au durante aproximadamente 90 segundos a una corriente de emisión de 18 mA usando un aparato de recubrimiento por pulverización catódica "Mini" Modelo SC 7620 (Energy Beam Sciences). Todas las imágenes de MEB se realizaron utilizando un haz de electrones de 20 KeV en un intervalo de ampliación de aproximadamente 250 a 2500 aumentos.

MEB criogénica

- 25 La sección transversal de las micropartículas se estudió usando MEB criogénica. La muestra de micropartículas se mezcló con solución HISTO PREP® (Fischer) y se mantuvo en un criostato a -20°C durante una noche. Las micropartículas endurecidas se montaron en un cubreobjetos de vidrio y después se seccionaron usando una cuchilla metálica. Las partículas seccionadas se montaron en portamuestras de aluminio, se recubrieron por pulverización catódica con platino y paladio y se observaron con un microscopio electrónico de barrido (Phillips 525 M). La observación visual de las secciones proporciona un procedimiento para determinar el grado de porosidad de las micropartículas.

Medición de la porosidad - intrusión de mercurio

- 35 La distribución del volumen de poros en las micropartículas se determinó usando un porosímetro por intrusión de mercurio Modelo SutoPor IV 9500 Moden (Micromeritics, Norcross, GA). En resumen, se introdujo de forma forzada mercurio en una cantidad conocida de micropartículas en un penetrómetro aplicando presión por etapas hasta una presión máxima de 413,57 MPa. Se midió el volumen de mercurio introducido en los poros a diversas presiones. Este procedimiento cuantifica la distribución de poros en las micropartículas. Es decir, el tamaño de los poros en los que se ha introducido mercurio está relacionado inversamente con la presión aplicada. El equilibrio de las fuerzas internas y externas en el sistema de líquido-sólido-vapor puede describirse por la ecuación de Washburn. La relación entre la presión aplicada y el tamaño de poros en el que se introduce mercurio de forma forzada se describe por:

$$D = \frac{4\gamma \cos\theta}{P}$$

en la que: D = diámetro de poros

γ = tensión superficial (constante)

θ = ángulo de contacto (constante)

- 45 P = presión

Por lo tanto, el tamaño del poro en el que se introducirá mercurio es inversamente proporcional a la presión aplicada. Suponiendo que todos los poros son cilindros estrechos, el diámetro medio de los poros ($D = 4V/A$) puede calcularse dividiendo el volumen de poros ($V = \pi D^2 h/4$) por el área del poro ($A = \pi Dh$).

Disolventes residuales

Se usó un solo procedimiento para la cuantificación del heptano, etanol y cloruro de metileno, El equipo consistía en un cromatógrafo de gases HP 5890 Serie 2 con una columna Rtx 1301, 30 cm x 0,53 mm. Se disolvieron aproximadamente 130 mg de micropartículas en 10 ml de N,N-dimetilformamida. Como patrón interno se usó acetato de propilo. La preparación de la muestra se ajustó de forma que pudieran cuantificarse concentraciones de cloruro de metileno tan bajas como del 0,03%.

Preparación de micropartículas

Los lotes de micropartículas expuestos en la Tabla 1 se prepararon como se ha descrito anteriormente a la escala de 100 gramos usando el polímero 4A y una relación entre aceite de silicona y cloruro de metileno de 1,5:1 o 1:1 y el aceite de silicona tenía una viscosidad de 350 cs. En la Tabla 1 también se expone la cantidad de exendina-4 y los excipientes usados en la formulación.

TABLA 1

Nº de Lote	Formulación	Estallido <i>in vitro</i> (%)	Observaciones
02-019-147 (Nº 1) **	0% de sacarosa, 0% de AS	0,40	Aceite de Si: MeCl ₂ 1,5:1
02-019-167 (Nº 2) **	2% de sacarosa (F16)	0,40	Aceite de Si: MeCl ₂ 1,5:1
02-019-160 (Nº 2-1)**	2% de sacarosa (F16)	0,44	Aceite de Si: MeCl ₂ 1,5:1
02-019-164 (Nº 2-2)**	2% de sacarosa (F16)	0,45	Aceite de Si: MeCl ₂ 1,5:1
02-030-08 (Nº 2-3)**	2% de sacarosa (F16)	0,80	Aceite de Si: MeCl ₂ 1:1
02-030-01 (Nº 2-4)**	2% de sacarosa (F16)	1,0	Aceite de Si: MeCl ₂ 1:1
02-030-04 (Nº 2-5)**	2% de sacarosa (F16)	1,1	Aceite de Si: MeCl ₂ 1:1
02-019-136 (Nº 3-1)**	2% de sacarosa, 0,5% AS (F14)	1,3	Inactivador 50:50
02-019-115 (Nº 3-2)**	2% de sacarosa, 0,5% AS (F14)	2,2	Aceite de Si: MeCl ₂ 1,5:1
02-019-170 (Nº 4)**	0% de sacarosa, 0,5% AS	3,8	Aceite de Si: MeCl ₂ 1,5:1
02-019-133A (Nº 3-3) **	2% de sacarosa, 0,5% AS (F14)	12,7	Inactivador heptano al 100%
02-019-185 (Nº 5) (carga de fármaco del 5%)	2% de sacarosa (F17)	0,5	Carga de fármaco 5% Aceite de Si: MeCl ₂ 1,5:1
02-019-64 (Nº 3-4)**	2% de sacarosa, 0,5% AS (F14)	0,5	Aceite de Si: MeCl ₂ 1,5:1
02-019-10 (Nº 3-5)**	2% de sacarosa, 0,5% AS (F14)	1,30	Aceite de Si: MeCl ₂ 1:1
02-001-196 (Nº 3-6)**	2% de sacarosa, 0,5% AS (F14)	2,70	Aceite de Si: MeCl ₂ 1:1
02-019-24 (Nº 3-7)**	2% de sacarosa, 0,5% AS (F14)	6,70	Aceite de Si: MeCl ₂ 1:1
* TODAS LAS FORMULACIONES TENÍAN UNA CARGA DE FÁRMACO DEL 3% CON LA EXCEPCIÓN DE POROSIDAD Nº 5			
** Ejemplo de referencia			

En la TABLA 2 se proporcionan el volumen de intrusión total obtenido a partir de la porosimetría por intrusión de mercurio y los diámetros medios de poros calculados. La relación entre el diámetro medio de poros y la liberación *in vitro* se muestra en la FIG 1.

TABLA 2

Nº de Lote	Volumen total de poros (ml/g)	Estallido <i>in vitro</i> (%)	Diámetro medio de poros (µm)
02-019-147 (Nº 1)*	0,033	0,40	0,0068
02-019-167 (Nº 2)*	0,035	0,40	0,0069
02-019-160 (Nº 2-1)*	0,037	0,44	0,0070
02-019-164 (Nº 2-2)*	0,035	0,45	0,0070
02-030-08 (Nº 2-3)*	0,036	0,80	0,0070
02-030-01 (Nº 2-4)*	0,038	1,0	0,0073
02-030-04 (Nº 2-5)*	0,039	1,1	0,0074
02-019-136 (Nº 3-1)*	0,041	1,3	0,0073
02-019-115 (Nº 3-2)*	0,039	2,2	0,0078
02-019-170 (Nº 4)*	0,067	3,8	0,0125
02-019-133A (Nº 3-3) *	0,513	12,7	0,0277
02-019-64 (Nº 3-4)*	0,030	0,5	0,0060
02-019-10 (Nº 3-5)*	0,060	1,30	0,0090
02-001-196 (Nº 3-6)*	0,060	2,70	0,0100
02-019-24 (Nº 3-7)*	0,180	6,70	0,0170
* Ejemplo de referencia			

La FIG. 1 muestra el efecto de sulfato amónico sobre la liberación inicial *in vitro*. Los datos indican que la liberación inicial *in vitro* está correlacionada con el diámetro de poros de las micropartículas. Las formulaciones realizadas con sulfato amónico mostraron niveles variables de liberación *in vitro* y porosidad variable, a diferencia de las formulaciones sin sulfato amónico que presentaron una porosidad y liberación uniformes. Durante la fabricación de las micropartículas, la presencia de sulfato amónico en la fase acuosa puede precipitar por desplazamiento salino la sustancia farmacéutica durante la preparación de la emulsión interna. Las diferencias en el microentorno de los precipitados pueden contribuir a las diferencias en porosidad y, por lo tanto, la variación en la liberación inicial. El efecto no se observó en formulaciones preparadas sin sulfato amónico. Las formulaciones con sacarosa y exendina-4 muestran un nivel más deseable y uniforme de liberación inicial en comparación con formulaciones que tenían exendina-4, sacarosa y sulfato amónico.

La FIG. 2 demuestra adicionalmente el efecto de la porosidad sobre la liberación *in vitro* y el impacto que las condiciones de procesamiento, particularmente la relación entre aceite de silicona y cloruro de metileno, tiene sobre la porosidad de las micropartículas formadas. En resumen, las formulaciones de micropartículas preparadas usando una relación entre aceite de silicona y cloruro de metileno de 1:1 (formulaciones 2-4 y 2-5 de la Tabla 1) tienen una mayor liberación inicial que las mismas formulaciones preparadas usando una relación entre silicona y cloruro de metileno de 1,5:1 (formulaciones 2, 2-1 y 2-2 de la Tabla 1). La FIG. 2 sugiere que una mayor relación entre aceite de silicona y cloruro de metileno tiene como resultado una menor porosidad que da como resultado una menor liberación inicial.

MEB Criogénica

El análisis de MEB criogénica se realizó como se ha descrito anteriormente en Formulaciones de los tipos 2, 3 y 5 de la Tabla 1. Las FIGS. 3A-3B son exploraciones de micrografías para formulaciones seleccionadas de Tipo 2 (Formulación 2-2, FIG. 3A) y de Tipo 5 (5% de exendina-4, 2% de sacarosa, FIG. 3B). Las FIGS. 4A-D son exploraciones de micrografías para las formulaciones 3-4, 3-5, 3-6 y 3-7, respectivamente, de la Tabla 1. De nuevo, la variación en la porosidad presentada con el uso de sulfato amónico que puede contribuir a la variabilidad en la liberación inicial, puede verse en las secciones transversales de MEB criogénica de las FIGS. 4A-D.

Niveles de disolventes residuales

El nivel de disolventes residuales en una formulación dada puede afectar a la Tg de la formulación. Se determinaron los niveles de disolvente residual para formulaciones de micropartículas de los Tipos 2 y 5 de la Tabla 1. Se usó un solo procedimiento para la cuantificación de heptano, etanol y cloruro de metileno. El equipo consistía en un cromatógrafo de gases HP 5890 Serie 2 con una columna Rtx 1301, 30 m x 0,53 mm. Se disolvieron aproximadamente 130 mg de micropartículas en 10 ml de N,N-dimetilformamida. Como patrón interno se usó acetato de propilo. La preparación de la muestra se ajustó de forma que pudieran cuantificarse concentraciones de cloruro de metileno tan bajas como del 0,03%.

La FIG. 5 es un gráfico de % de etanol residual y cloruro de metileno para formulaciones de los Tipos 2 y 5 de la Tabla 1 (3 ó 5% de exendina-4, 2% en sacarosa). La FIG. 5 muestra que la Tg se reduce según aumenta la cantidad de disolvente residual.

Preparación de micropartículas que tienen un 3% de exendina-4 y un 2% de sacarosa

En vista de la variación en la porosidad introducida por la presencia de sulfato amónico en las formulaciones de micropartículas y la identificación de la porosidad como una característica que afecta significativamente a la liberación inicial, no se investigó el sulfato amónico en los descubrimientos adicionales.

Impacto del tamaño de gotas de la emulsión interna

El siguiente estudio se realizó para determinar el impacto de parámetros del proceso sobre la formación de la emulsión interna así como la estabilidad de la emulsión resultante y la liberación *in vitro* de 24 horas resultante de microesferas producidas usando los diferentes parámetros del procedimiento. Se formaron emulsiones internas de la fase acuosa y la fase de disolvente por sonicación como se ha descrito anteriormente para la escala de 100 g u homogeneización usando un homogenizador MT5000 con un generador 36/4 (Kinematica AG, Suiza) a baja velocidad (10.800 rpm) o alta velocidad (21.300 rpm). Después de la formación de la emulsión interna por las diferentes técnicas, las emulsiones se mantuvieron en el reactor con agitación suave con un agitador superior durante 5, 15 ó 60 minutos antes de extraer una alícuota. Después de los tiempos de mantenimiento designados, la emulsión interna se procesó adicionalmente como se ha descrito anteriormente en micropartículas y después se determinó la liberación *in vitro* de 24 horas para cada lote como se describe más adelante.

La caracterización del tamaño de gotas de emulsión interna puede determinarse usando un analizador del tamaño de partículas Horiba

Se extrajo una alícuota de la emulsión interna del reactor usando una pipeta de vidrio. Usando una pipeta de transferencia, se añadieron ~ 30 gotas de la emulsión interna a ~ 10 ml de la solución de polímero PLG 4A 50:50 Medisorb® al 6% en un vial de centelleo tapado a rosca de 20 cm³ seguido de mezcla. La solución de polímero PLG 4A 50:50 Medisorb® al 6% también sirvió como solución blanco de referencia. Después se transfirieron aproximadamente 9 ml de esta muestra de emulsión diluida a un soporte de muestra Horiba limpio de 10 ml. Se puso una cubierta sobre el soporte de muestra para impedir la evaporación rápida del disolvente del polímero. La muestra preparada estaba dentro del intervalo de lectura del % de transmisión aceptable del 0,65% - 0,90% según la barra azul (lámpara). Se seleccionó un índice de refracción relativo de 0,94-0,00i en la preparación del programa. La muestra después se midió por un analizador del tamaño de partículas Horiba tal como el modelo LA 910 para el tamaño de gotas. En la Figura 9 se muestran los datos que correlacionan los parámetros del procedimiento y el tamaño de emulsión interna conseguido durante los tiempos de mantenimiento de 5, 15 y 60 minutos, así como los resultados de liberación *in vitro* de 24 horas resultantes (entre paréntesis).

Caracterización de las microesferas

Las microesferas de exendina-4 se caracterizaron rutinariamente con respecto al contenido de fármaco, tamaño de partículas, disolventes residuales, liberación inicial *in vitro* y características PK en ratas. El fármaco se extrajo para obtener una evaluación preliminar de pureza de exendina-4 después de la encapsulación en lotes seleccionados.

45 Liberación inicial *in vitro*

La liberación inicial de exendina-4 se determinó midiendo la concentración de exendina-4 después de 1 hora en tampón de liberación (HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4). Se pusieron 150 ± 5 mg de microesferas en 5,0 ml de tampón HEPES 10 mM, NaCl 100 mM pH 7,4 a temperatura ambiente, se agitaron vorticialmente durante aproximadamente 30 segundos para suspender la solución y después se pusieron en una cámara de aire a 37°C durante 1 hora. Después de 1 hora, las muestras se retiraron de la cámara y se invirtieron varias veces para mezclarse, seguido de centrifugación a 3500 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se retiró y se analizó inmediatamente por HPLC usando las siguientes condiciones: columna: TSK-GEL® 7,8 mm x 30 cm, 5 m (TSOH BIOSEP PART N° 08540); temperatura de horno de la columna: ambiente; temperatura del automuestreador: 6°C; caudal: 0,8 ml/minuto; detección: 280 nm; volumen de inyección: 10 l; fase móvil: 35% de acetonitrilo/65% de agua con 0,1% de TFA/litro (v/v); tiempo de proceso: aproximadamente 20 minutos. Como patrón se usó la sustancia farmacéutica a granel exendina-4, 0,2 mg/ml preparada en tampón acetato 30 mM, pH 4,5.

Estudios en animales

Todos los estudios farmacocinéticos (PK) descritos en la presente memoria se realizaron en ratas Sprague-Dawley macho adultas que pesaban aproximadamente 500 ± 50 g.

5 Para la caracterización PK de las formulaciones de micropartículas, cada animal recibió una inyección subcutánea de micropartículas suspendidas en diluyente (3% de carboximetilcelulosa, NaCl al 0,9%, Tween 20 al 0,1%) en la región inter-escapular. En general, la dosis fue de aproximadamente 1,0 mg de exendina-4 por rata en un volumen de inyección de 0,75 ml. Las muestras de sangre se recogieron a través de la vena lateral de la cola a 0,5, 2, 4, 6, 10 y 24 horas, y 2, 4, 7, 10, 14, 17, 21, 24 y 28 días después de la dosis. Las muestras de sangre se pusieron inmediatamente en tubos MICROTAINER® que contenían EDTA y se centrifugaron a aproximadamente $14.000 \times g$ durante aproximadamente dos minutos. Después se transfirió plasma a tubos MICROTAINER® sin aditivo y se almacenaron a -70°C hasta el momento del ensayo. Se usó IRMA para determinar las concentraciones de exendina en plasma.

Liberación de IRMA *in vivo*

15 El método para cuantificar la exendina-4 en plasma es un inmunoensayo de tipo sándwich, con el analito capturado por un anticuerpo monoclonal EXE 4:2-8.4 en fase sólida y detectado por el anticuerpo monoclonal radioyodado GLP-1:3-3. La cantidad de cuentas se cuantifica a partir de una curva de calibración patrón. Este ensayo es específico para una exendina-4 de longitud completa o intacta y no detecta exendina-4 (3-39). Un intervalo de curva patrón típico es de 30 pg/ml a 2000 pg/ml dependiendo de la edad del anticuerpo indicador.

Liberación *in vitro* e *in vivo*

20 Las formulaciones 2, 2-1 y 2-2 (3% de exendina-4 y 2% de sacarosa) se ensayaron con respecto a la liberación inicial *in vitro* como se ha descrito anteriormente. La liberación *in vitro* fue del 0,4%, 0,4% y 0,5%, respectivamente. Los tres lotes también tenían una liberación inicial relativamente baja *in vivo* en el intervalo de 1154 a 1555 pg/ml para $C_{\text{máx}}$ 0-1 día. La FIG. 6 es una curva farmacocinética representativa de las formulaciones que tienen un 3% de exendina-4 y un 2% de sacarosa (2-1) y también para las que tienen un 3% de exendina-4 sola (1) y un 3% de exendina-4 y un 0,5% de sulfato amónico (4). Se usó una relación entre aceite de silicona y cloruro de metileno de 1,5:1 y la viscosidad del aceite de silicona fue de 350 cs.

25 A partir de la FIG. 6 puede verse que las formulaciones que no contienen sulfato amónico presentan una menor liberación inicial. Aunque la formulación que tenía exendina-4 sola mostró una liberación inicial adecuada, la pureza del fármaco después de la encapsulación se redujo en comparación con la formulación que tenía la exendina-4 en combinación con la sacarosa. La adición de azúcar en las formulaciones reduce la degradación del agente.

30 En la FIG. 7 se muestra el perfil de liberación *in vivo* para las tres formulaciones 2, 2-1 y 2-2 comparadas anteriormente. Los tres lotes presentaron una liberación inicial relativamente baja seguida de un "valle" (niveles bajos en suero entre aproximadamente el día 4 y el día 17), seguida de una liberación sostenida durante aproximadamente el día 21 al día 28. La baja liberación inicial y la forma del perfil de liberación fueron uniformes para las tres formulaciones.

Formulación que usa una relación 1:1 entre aceite de silicona y cloruro de metileno

35 Las formulaciones 2-3, 2-4 y 2-5 de la Tabla 1 (3% de exendina-4, 2% de sacarosa) se prepararon usando una relación 1:1 entre aceite de silicona y cloruro de metileno. La liberación inicial fue superior para estas formulaciones que para las formulaciones 2, 2-1 y 2-2 de la Tabla 1 (3% de exendina-4, 2% de sacarosa con una relación entre silicona y cloruro de metileno de 1,5:1). Específicamente, las formulaciones de relación 1,5:1 proporcionaron una liberación inicial media de aproximadamente un 0,4%, mientras que las formulaciones de relación 1:1 proporcionaron una liberación inicial media de aproximadamente 1,0%. Se observó la misma tendencia *in vivo* con $C_{\text{máx}}$ 0-1 días en ratas de 2288 ± 520 pg/ml para una relación 1:1, mientras que la $C_{\text{máx}}$ 0-1 día en ratas fue de 1300 ± 221 pg/ml para la relación 1,5:1.

45 Aumento de carga de fármaco

El aumento de la carga de exendina-4 al 4% mientras se mantenía la sacarosa al 2% dio como resultado una liberación inicial *in vitro* e *in vivo* en el mismo intervalo que para la carga del 3%.

50 Se prepararon tres formulaciones de Tipo 5 de la Tabla 1 (carga de fármaco del 5%, 2% de sacarosa, relación entre aceite de silicona y cloruro de metileno 1,5:1). Los tres lotes, 5-1, 5-2 y 5-3 presentaron una baja liberación inicial *in vitro* que variaba del 0,2 al 0,5%. De forma similar, la $C_{\text{máx}}$ *in vivo* de las formulaciones fue sistemáticamente baja variando de 467 pg/ml a 1267 pg/ml. La FIG. 8 muestra un gráfico de los datos farmacocinéticos para los tres lotes ensayados. En comparación con el comportamiento de la formulación de un 3% de exendina-4 que tenía un 2% de sacarosa, las formulaciones del 5% presentaban mayores niveles en suero de fármaco durante aproximadamente el día 1 y el día 2. El resto del perfil para las formulaciones del 5% era similar al de las formulaciones del 3% que tenían un valle seguido de la liberación de fármaco principalmente durante el día 21 al día 28.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición para la liberación sostenida de un polipéptido biológicamente activo, que comprende un polímero biocompatible que tiene el polipéptido biológicamente activo disperso en el mismo de forma que esté presente en un 5% (p/p) del peso de la composición, y sacarosa dispersada en el mismo de forma que está presente en un 2% (p/p) del peso de la composición, en la que el polipéptido biológicamente activo es exendina-4;
- en la que el volumen total de poros de la composición es de 0,1 ml/g o menor, como se determina usando porosimetría por intrusión de mercurio; y
- en la que la composición carece de tampón y sales de desplazamiento salino.
- 10 2. La composición de liberación sostenida de la reivindicación 1, en la que el polímero biocompatible se selecciona del grupo que consiste en poli(lactidas), poli(glicolidas), poli(lactida-co-glicolida), poli(ácidos lácticos), poli(ácidos glicólicos), policarbonatos, poliésteramidas, polianhídridos, poli(aminoácidos), poliortoésteres, poli(dioxanonas), poliuretanos biodegradables, mezclas de los mismos y copolímeros de los mismos.
- 15 3. La composición de liberación sostenida de la reivindicación 1, en la que el polímero biocompatible se selecciona entre poli(lactidas), poli(glicolidas), poli(lactida-co-glicolidas), poli(ácidos lácticos), poli(ácidos glicólicos) y mezclas y copolímeros de los mismos.
4. La composición de liberación sostenida de la reivindicación 1, en la que el polímero biocompatible comprende poli(lactida-co-glicolida).
5. La composición de liberación sostenida de la reivindicación 4, en la que el polímero biocompatible es poli(lactida-co-glicolida) 50:50 purificada.
- 20 6. La composición de liberación sostenida de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que está en forma de micropartículas.
7. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso en el tratamiento de la diabetes de tipo 2.

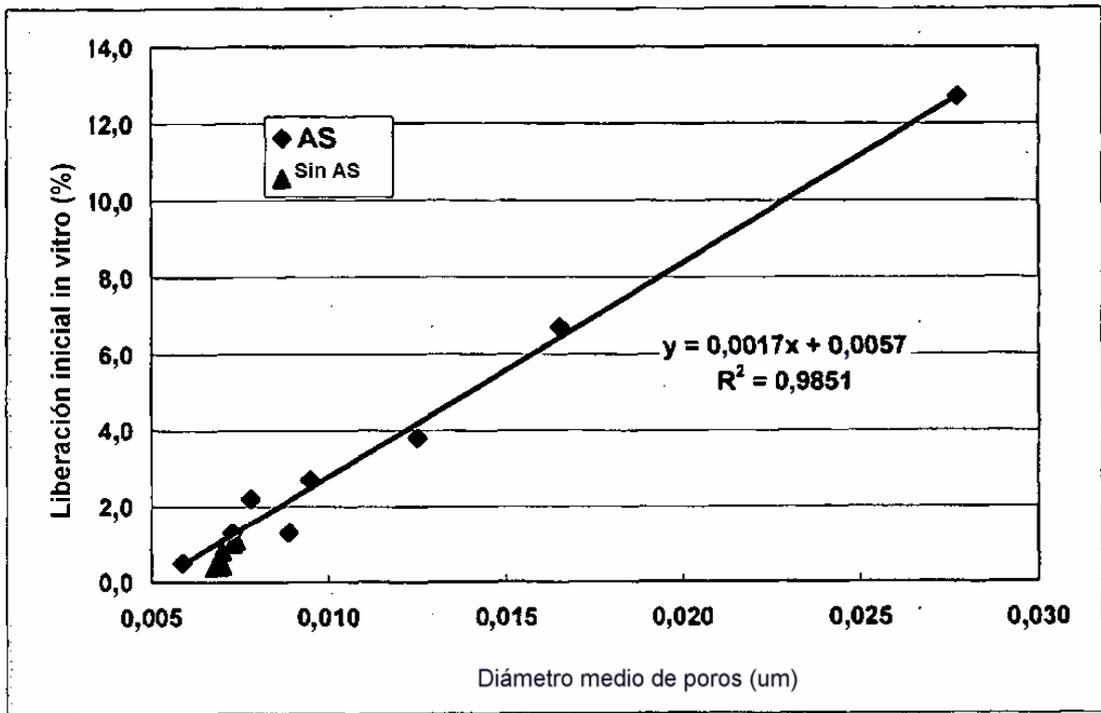


FIG. 1

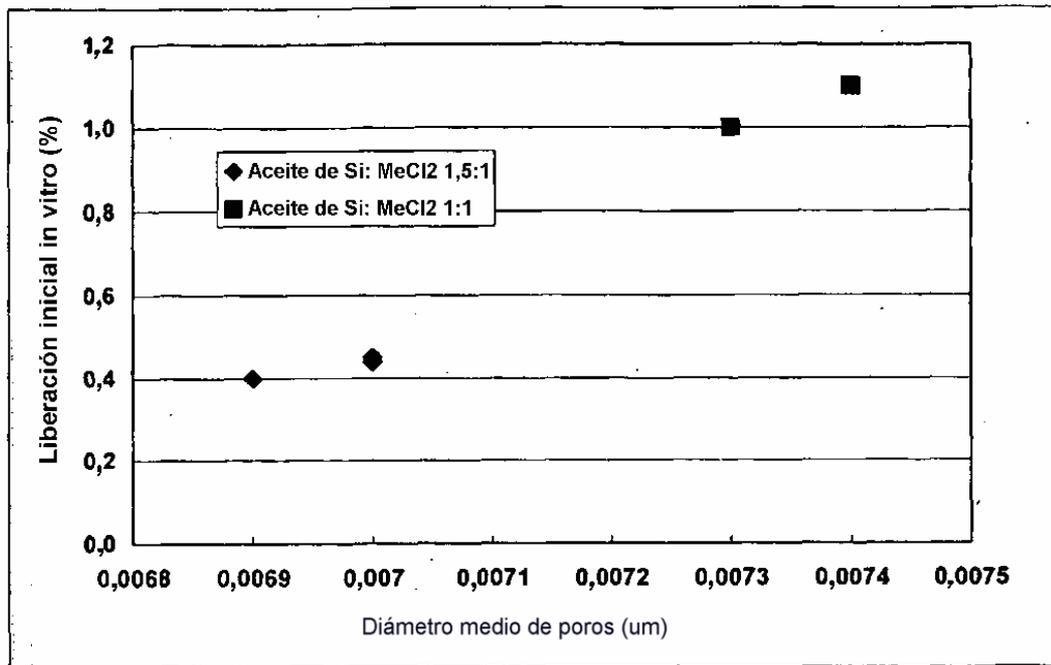


FIG. 2



FIG. 3A

FIG. 3B



FIG. 4A

FIG. 4B

FIG. 4C

FIG. 4D

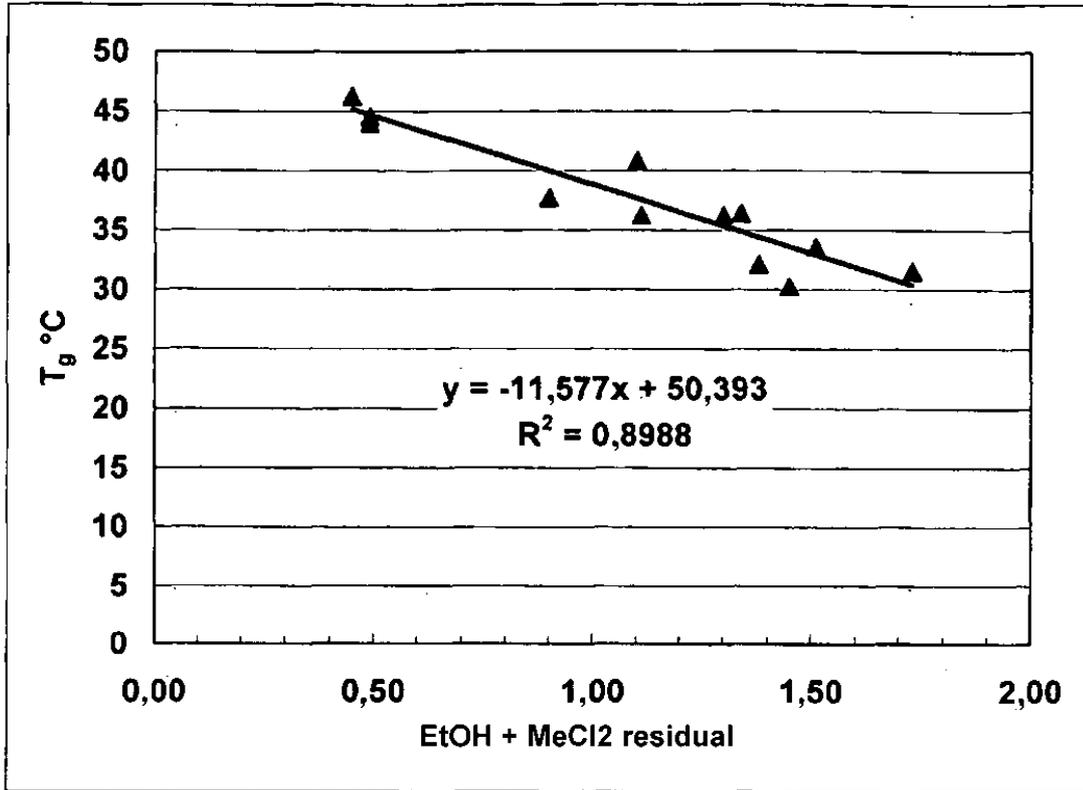


FIG. 5

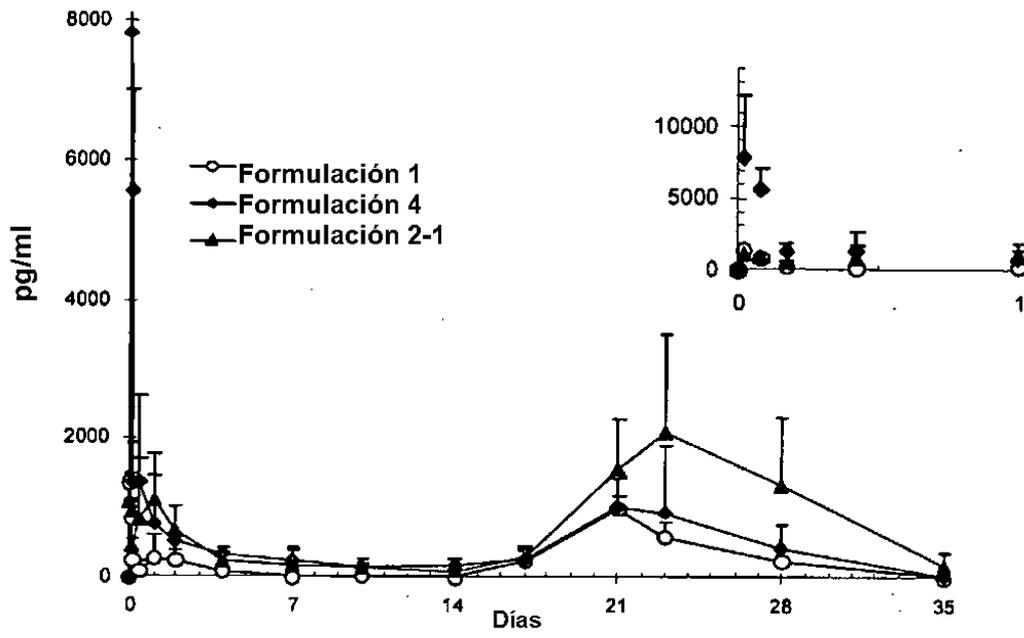


FIG. 6

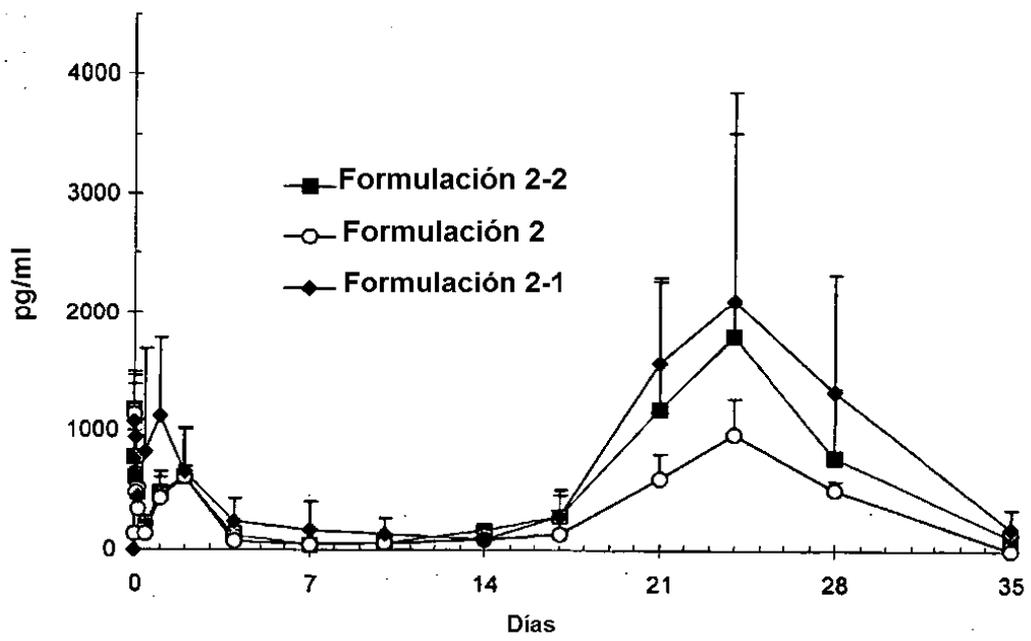


FIG. 7

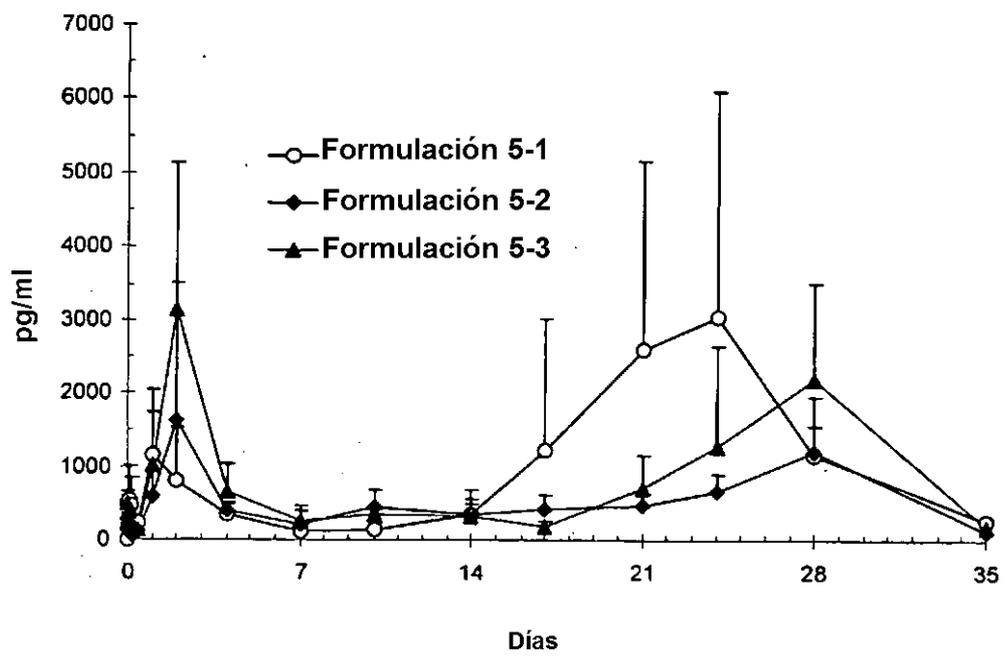


FIG. 8

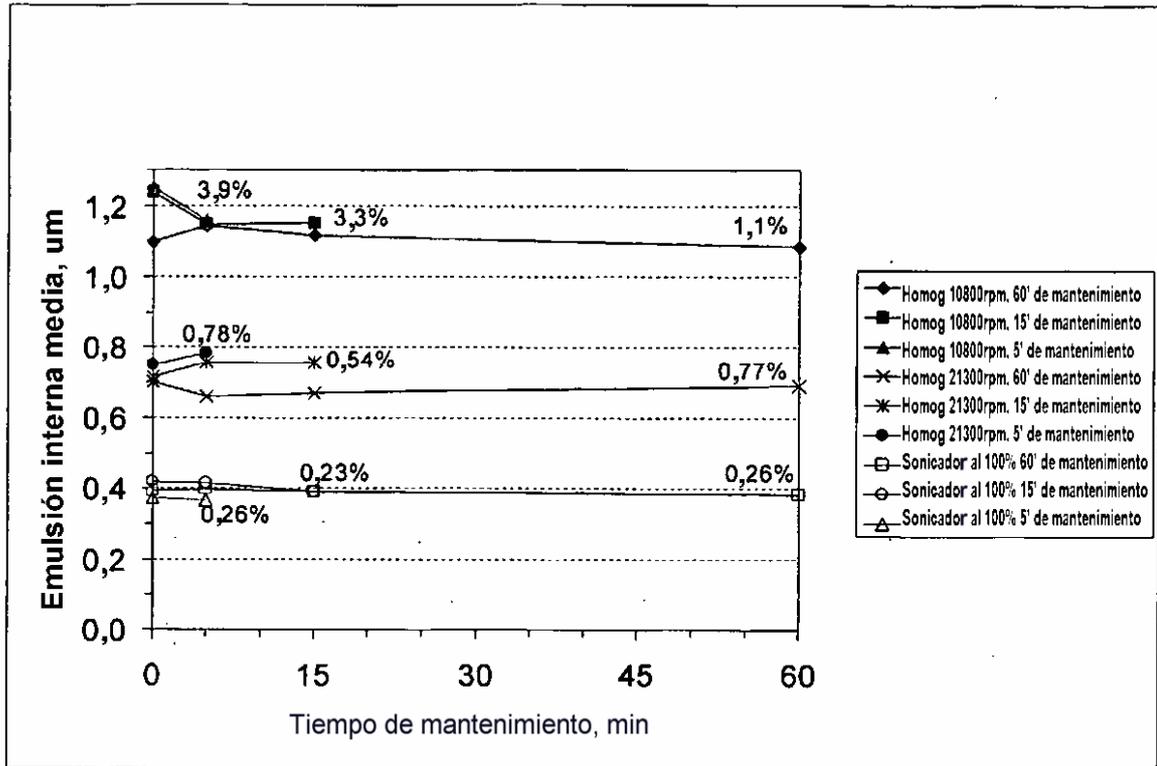


FIG. 9