

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 636**

51 Int. Cl.:  
**A61K 47/48** (2006.01)

12

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **01992587 .4**
- 96 Fecha de presentación: **31.10.2001**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1353701**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.10.2003**

54 Título: **Método para producir composiciones para la administración mejorada de moléculas bioactivas**

30 Prioridad:  
**31.10.2000 US 244499 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**12.06.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**12.06.2012**

73 Titular/es:  
**Surmodics Pharmaceuticals, Inc.  
756 Tom Martin Drive  
Birmingham, AL 35211, US**

72 Inventor/es:  
**LEWIS, Danny;  
SCHMIDT, Paul y  
HINDS, Kenneth**

74 Agente/Representante:  
**Izquierdo Faces, José**

**ES 2 382 636 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**

Metodo para producir composiciones para la administracion mejorada de moleculas bioactivas

**5 Antecedentes de la invención**

5 [0001] La encapsulación de farmacéuticas en microesferas y nanoesferas de polímero biodegradables puede prolongar el mantenimiento de los niveles de fármaco terapéuticos en relación a la administración del mismo fármaco. La liberación extendida se puede extender hasta varios meses dependiendo de la formulación y de la  
10 molécula activa encapsulada. Sin embargo muchas moléculas bioactivas, y especialmente las proteínas, se dañan o se vuelven inestables por los procesos requeridos para encapsularlas en los portadores poliméricos. Además, la naturaleza plora, cargada de muchas proteínas puede limitar el grado de encapsulación en los portadores de fármacos de polímero y puede llevar a una pérdida rápida de una fracción de la molécula bioactiva encapsulada cuando se administra por primera vez (“estallido”).

15 [0002] La encapsulación de moléculas bioactivas en sistemas de administración de polímero biodegradables ha sido usada para estimular una respuesta inmune cuando se administran a un paciente (ver Patente U.S. No. 5.942.253 de Gombotz y otros). Mientras esto es un resultado deseado en algunos casos, no es deseable cuando el propósito es la administración de la molécula bioactiva para propósitos terapéuticos. Así, el reconocimiento disminuido por el sistema inmunológico de las moléculas bioactivas administradas usando polímeros biodegradables será beneficioso en un contexto terapéutico.

25 [0003] Las moléculas bioactivas, especialmente las proteínas terapéuticas (fármacos), pueden ser modificadas con polímeros hidrofílicos (un proceso generalmente conocido como “pegilación”), como el glicol de polietileno, unido covalentemente a una o más cadenas laterales de aminoácidos (ver, por ejemplo, la Patente U.S. N° 4.179.337 de Davis y otros; la Patente U.S. N° 5.446.090 de Harris, la Patente U.S. N° 5.880.255 de Delgado y otros). Mientras en la técnica es conocido que dicha unión puede llevar a un aumento aparente en la masa molecular y a una tasa de aclaración de la sangre disminuida para la proteína terapéutica modificada (ver por ejemplo, la Patente U.S. N° 5.320.840 de Camble y otros), el estado de la técnica no enseña que se pueda conseguir inmunogenicidad  
30 disminuida o que la duración de la liberación de los sistemas de administración de fármacos de polímero biodegradables pueda ser extendida usando proteínas pegiladas. El estado de la técnica no enseña que la pegilación pueda aumentar la carga de fármaco obtenible en un sistema de administración de fármaco biodegradable en relación a un fármaco no pegilado, ni tampoco enseña que el estallido reducido del fármaco es obtenible para la fracción pegilada en relación al fármaco no pegilado.

35 [0004] La WO 98/46212 se refiere a micropartículas biodegradables para la administración sostenida de fármacos terapéuticos. El documento divulga métodos mejorados para la fabricación de micropartículas poliméricas que contienen una variedad de ingredientes activos. La divulgación se refiere a la liofilización directa de una emulsión o una suspensión. A este respecto, un ingrediente activo y un polímero son dispersados dentro de una fase continua, la dispersión resultante es congelada, y el agua y los solventes orgánicos son retirados de la dispersión pro liofilización.

**Resumen de la invención**

45 [0005] La presente invención proporciona métodos nuevos para producir formulaciones para la liberación controlada, prolongada de moléculas bioactivas de acuerdo a la reivindicación 1. Las formulaciones se basan en micropartículas o nanopartículas formadas de la combinación de copolímeros poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) biodegradables. Las moléculas bioactivas son acopladas al glicol de polietileno y después formuladas con las micropartículas o nanopartículas sólidas para proporcionar la liberación controlada. Las formulaciones de liberación controlada pueden ser administradas por inyección, por inhalación, nasalmente, u oralmente.

50 [0006] Por consiguiente, se divulga que la unión de polímeros hidrofílicos a moléculas bioactivas, como fármacos y proteínas terapéuticas, tiene varios efectos beneficiosos, incluyendo el proporcionar protección de la degradación y la desnaturalización bajo las condiciones de encapsulación en los portadores de fármaco. Adicionalmente la cantidad de proteína modificada que puede ser encapsulada se aumenta en relación a la proteína no modificada, proporcionando así una dosis total más baja de material, beneficiando tanto al paciente como al productor.

55 [0007] Además, la presente invención además divulga que la inmunogenicidad de las moléculas bioactivas pegiladas encapsuladas en portadores de administración de fármacos de polímero biodegradables disminuye en relación a las moléculas bioactivas no pegiladas en los portadores, particularmente cuando se administran por inyección subcutánea o intramuscular o por inhalación o administración mucosal (por ejemplo, administración nasal u oral). Dicha inmunogenicidad disminuida es particularmente ventajosa cuando los polímeros biodegradables son usados para la administración oral, ya que este es un método típico para la vacunación mucosal.

60 [0008] La presente invención divulga que las proteínas, péptidos, oligosacáridos y oligonucleótidos pegilados, que normalmente no son absorbidos del tracto gastrointestinal, se vuelven biodisponibles por la administración en

sistemas de polímeros biodegradables, particularmente nanoesferas. El término “biodisponible”, como se usa en la presente, se refiere a la fracción de molécula bioactiva que entra en el flujo sanguíneo tras la administración a un sujeto. Las formulaciones de liberación controlada producidas de acuerdo a la invención aumentan la biodisponibilidad de las moléculas bioactivas, y en particular, las formulaciones de nanoesfera descritas en la presenta cuando se administran oralmente. Por ejemplo, los niveles de sangre pueden ser mantenidos hasta varios días tras una única administración oral de molécula bioactiva pegilada encapsulada en nanoesfera. Adicionalmente las cadenas de glicol de polietileno protegen las moléculas bioactivas de la degradación y la desnaturalización en el proceso de la formación de las nanoesferas, contribuyen al atrapamiento de material activo, y disminuyen el efecto “estallido”.

**[0009]** Así, la invención proporciona un método para producir una composición para la liberación controlada de una molécula bioactiva, el método comprende

A)

- (i) disolver (a) un PLGA y (b) un conjugado de PEG-leu-encefalina en un solvente de cloruro de metileno para formar una monofase; o
- (ii) disolver (a) un PLGA y (b) un conjugado de PEG-bifalina en un solvente de cloruro de metileno para formar una monofase; o
- (iii) disolver (a) un PLGA y (b) un conjugado de PEG-insulina en un solvente de cloruro de metileno para formar una monofase;

B) formar una emulsión por agitación por vortex de la monofase con el PVA; y

C) formar micropartículas o nanopartículas que comprenden el PLGA que encapsula el conjugado.

En una realización particularmente preferida, la composición se administra oralmente.

**[0010]** Las composiciones producidas de acuerdo a la reivindicación 1 pueden ser usadas para mejorar la administración *in vitro* de las moléculas bioactivas terapéuticas como se define en la reivindicación 1 en varios aspectos. En particular, la invención proporciona las ventajas de inmunogenicidad disminuida, biodisponibilidad aumentada, duración aumentada, estabilidad aumentada, estallido disminuido y liberación controlada y sostenida de moléculas bioactivas *in vivo*.

## Descripción Detallada de la Invención

### I. Moléculas Bioactivas

**[0011]** El término “molécula bioactiva”, como se usa en la presente, se refiere a cualquier proteína, péptido, polisacárido, ácido nucleico u otro compuesto biológicamente activo terapéutico para la administración a un sujeto, como un humano u otro mamífero.

**[0012]** Las proteínas terapéuticas incluyen, pero no están limitadas a, alfa-interferones, beta-interferones, gamma-interferones, eritropoetinas, el factor estimulante de las colonias de granulocitos, el factor estimulante de las colonias de macrófagos de granulocitos (GM-CSF), interleucina 1, interleucina 2, interleucina 3, interleucina 12, asparaginasa, adenosina deaminasa e insulina.

**[0013]** Los péptidos terapéuticos también incluyen hormonas, como la ACTH, el glucagón, la somatostatina, la somatotropina, timosina, la hormona paratiroidea, hormonas de pigmentación, la somatomedina, la hormona luteinizante, la gonadotropina coriónica, factores de liberación del hipotálamo, hormonas antidiuréticas, la hormona estimulante del tiroides, endorfinas, encefalinas, la bifalina y la prolactina.

**[0014]** Otras proteínas terapéuticas incluyen los anticuerpos monoclonales y policlonales, anticuerpos de una única cadena, otros fragmentos, análogos y derivados de anticuerpo. También pueden ser administrados polinucleótidos terapéuticos, incluyendo oligonucleótidos antisentido, aptámeros y genes terapéuticos.

**[0015]** También pueden ser administrados terapéuticos anticoagulantes, como la heparina y la heparina de bajo peso molecular.

**[0016]** Otras proteínas terapéuticas incluyen moléculas bioactivas pequeñas, como fármacos contra el cáncer, por ejemplo, el paclitaxel, el taxotere, la doxorubicin y la daunorubicina, la vincristina, el cisplatino, el carboplatino, la camptotecina y los análogos de la camptotecina, antibióticos, antipsicóticos, antidepresivos, fármacos de molécula pequeña para la diabetes y enfermedades cardiovasculares.

## II. Conjugación de las Moléculas Bioactivas a Polímeros Hidrofílicos

5 [0017] El término “polímero hidrofílico” se refiere a cualquier polímero lineal o ramificado soluble al agua incluyendo, pro no limitado a, glicol de polietileno y glicol de polipropileno y polímeros lineales y ramificados similares. Preferiblemente, el peso molecular del polímero varía de alrededor de 500 daltons a alrededor de 50.000 daltons. Los polímeros hidrofílicos típicamente tienen un grupo reactivo incorporado para la unión a la molécula bioactiva de interés a través de las funciones amino, carboxilo, sulfhidrilo, fosfato o hidroxilo.

10 [0018] El glicol de polietileno puede ser preparado de acuerdo a los protocolos estándar con un extremo sellado como con un grupo metoxi y el otro extremo activado para la conjugación fácil a los grupos activos en las moléculas bioactivas. Por ejemplo, la Patente U.S. N° 6.113.906 describe el uso de los grupos reactivos del succinato o carbamato de succinimidil en el glicol de polietileno para reaccionar con los grupos amino en las proteínas. La patente U.S. N° 5.446.090 describe el uso de los derivados de la sulfona del glicol de polietileno para formar enlaces estables con los grupos sulfhidrilos de las proteínas. La Patente U.S. N° 5.880.255 describe el uso de derivados del tresilo para la reacción en grupos amino de las proteínas para formar un vínculo amino secundario simple y estable. La succinamida N-hidroxi también puede ser incorporada como el grupo reactivo.

## III. Formulaciones de Liberación Controlada para las Moléculas Bioactivas Conjugadas de Polímero

20 [0019] El término “liberación controlada” se refiere a controlar la tasa y/o la cantidad de moléculas bioactivas administradas de acuerdo a las formulaciones de administración de fármacos de la invención. La liberación controlada puede ser continua o discontinua, y/o lineal o no lineal. Esto se puede conseguir usando uno o más tipos de composiciones de polímero, cargas de fármaco, inclusión de excipientes o potenciadores de la degradación, u otros modificadores, administrados solos, en combinación o secuencialmente para producir el efecto deseado.

25 [0020] Se interpreta de forma general que el orden cero o la liberación lineal en el sentido de que la cantidad de molécula bioactiva liberada durante el tiempo permanece relativamente constante como una función de cantidad/unidad de tiempo durante el intervalo de tiempo deseado. Se interpretará de forma general la multifásica en el sentido de que la liberación tiene lugar en más de un “estallido”.

### 30 A. MICROPARTICULAS

35 [0021] La invención emplea micropartículas biodegradables para la liberación controlada de las moléculas bioactivas conjugadas de polímero. Como se usa en la presente, “micropartículas” se refiere a partículas que tienen un diámetro de preferiblemente menos de 1,0 mn, y más preferiblemente de entre 1,0 y 100,0 micrones. Las micropartículas incluyen microsferas, que son típicamente micropartículas esféricas sólidas. Las micropartículas también incluyen las microcápsulas, que son micropartículas esféricas que típicamente tienen un núcleo de un polímero, fármaco o composición diferente.

40 [0022] Las micropartículas pueden ser hechas usando una variedad de polímeros biodegradables usados para las formulaciones de liberación controlada, como es bien conocido en la técnica. Los polímeros adecuados por ejemplo incluyen, pero no están limitados a, poli(ácidos hidroxi) incluyendo el ácido poliláctico, ácido poliglicólico, y copolímeros de los mismos, polianhidridos, poliortoésteres, y ciertos tipos de polímeros de proteína y polisacárido. El término “bioerosionable” o “biodegradable”, como se usa en la presente, se refiere a polímeros que se disuelven o se degradan dentro de un periodo que es aceptable en la aplicación deseada (habitualmente la terapia *in vitro*), típicamente menos de alrededor de cinco años, y más preferiblemente menos de alrededor de un año, una vez expuestos a una solución fisiológica de pH de entre alrededor de 6-8 y a una temperatura de entre alrededor de 25° C – 38° C.

50 [0023] Los polímeros incluyen poli(ácidos hidroxi), especialmente poli(ácido glicólico-co-ácido láctico) (“PLGA”) que se degradan por hidrólisis tras la exposición al ambiente acuoso del cuerpo. El polímero es entonces hidrolizado para producir monómeros de ácido glicólico y láctico, que son subproductos normales del metabolismo celular. La tasa de desintegración del polímero puede variar desde varias semanas a periodos mayores de un año, dependiendo de varios factores incluyendo el peso molecular del polímero, tasa de monómeros de láctido a glicolido en la cadena de polímero, y estereoregularidad de las subunidades de monómero (mezclas de estereoisómeros L y D interrumpen la cristalinidad del polímero mejorando la descomposición del polímero). Las microsferas pueden contener mezclas de dos o más polímeros biodegradables, de diferente peso molecular y/o tasa de monómero.

60 [0024] Se pueden usar también polímeros biodegradables derivados, incluyendo polímeros hidrofílicos unidos al PLGA y similares. Se conocen una variedad de técnicas en la técnica que pueden ser usadas para formar microsferas. Estas incluyen, por ejemplo, pasos de emulsión únicos o dobles seguidos por la retirada del solvente. La retirada del solvente se puede conseguir por extracción, evaporación, o secado por pulverización entre otros métodos.

65 [0025] En el método de extracción del solvente, el polímero es disuelto en un solvente orgánico que es al menos parcialmente soluble en el solvente de extracción como el agua. La molécula bioactiva, ya sea en la forma soluble o

dispersada como partículas finas, es después añadida a la solución de polímero, y la mezcla es dispersada en una fase acuosa que contiene un agente de superficie activa como el poli(vinil alcohol). La emulsión resultante es añadida a un volumen más grande de agua donde el solvente orgánico es retirado del agente polímero/bioactivo para formar micropartículas endurecidas.

[0026] En el método de evaporación del solvente, el polímero es disuelto en un solvente orgánico volátil. LA molécula bioactiva, ya sea en forma soluble o dispersada como partículas finas, es después añadida a la solución de polímero, y la mezcla es suspendida en una fase acuosa que contiene un agente de superficie activa como el poli(vinil alcohol). La emulsión resultante es agitada hasta que la mayoría del solvente orgánico se evapora, dejando microesferas sólidas.

[0027] En el método de secado por pulverización, el polímero es disuelto en un solvente adecuado, como el cloruro de metileno (por ejemplo, 0,04 g/ml). Una cantidad conocida de molécula bioactiva (fármaco) es después suspendida (si no es soluble) o co-disuelta (si es soluble) en la solución de polímero. La solución o la dispersión es después disuelta por secado por pulverización. Se pueden obtener microesferas que varían en diámetro entre uno y diez micrones con una morfología, que depende de la selección del polímero.

[0028] Otros métodos conocidos, como la separación de fase y la coacervación, y variaciones de los anteriores, son conocidos en la técnica.

## B. NANOPARTICULAS

[0029] Se pueden emplear nanopartículas biodegradables para la liberación controlada de las moléculas bioactivas conjugadas de polímero, particularmente para la administración oral. Como se usa en la presente, el término "nanopartículas" se refiere a partículas que tienen un diámetro preferiblemente de entre alrededor de 20,0 nanómetros y alrededor de 2,0 micrones, típicamente entre alrededor de 100 nanómetros y 1,0 micrones.

[0030] La formulación de nanopartículas puede ser conseguida esencialmente como se ha descrito anteriormente para las micropartículas, excepto que el mezclado de alta velocidad o la homogeneización se usa para reducir el tamaño de las emulsiones de agente polímero/bioactivo por debajo de alrededor de 2,0 micrones, preferiblemente, por debajo de alrededor de 1,0 micrones. Por ejemplo, las técnicas adecuadas para hacer nanopartículas se describen en la WO 97/04747.

## EJEMPLOS

### I. Preparación y Caracterización de Formulaciones para la Administración de Leu-Encefalina

#### Ejemplo 1 – Preparación de leu-encefalina conjugada de glicol de polietileno (PEG-leu-encefalina)

[0031] La leu-encefalina modificada covalentemente con glicol de polietileno fue preparada de la manera siguiente: se disolvieron 25 mg de leu-encefalina en 500  $\mu$ L de DMSO anhidro que conteraía 50  $\mu$ L de TEA. Se disolvieron 250 mg de mPEG(5000)-SPA en 1,5 mL de DMSO anhidro y se añadieron por inyección directa a la solución de péptido. Se permitió que la reacción procediera durante 2 horas a temperatura ambiente o hasta que >90% del péptido se convirtió a su forma modificada PEG. Se consiguió el aislamiento del producto, mPEG(5000)-leu-encefalina, de los reactivos por recristalización (2x) del EtOH. El producto de la reacción fue un sólido blanco que era >95% pegilado (como se evaluó por la RP-HPLC).

#### Ejemplo 2- Preparación y caracterización de micropartículas convencionales ( $w_1/o/w_2$ ) que contienen leu-encefalina

[0032] Las partículas convencionales  $w_1/o/w_2$  que contienen leu-encefalina fueron preparadas de la manera siguiente: La leu-encefalina fue disuelta en una mezcla 1:9 DMSO:PBS a una concentración final de 35 mg/mL (su solubilidad máxima en PBS). El PLGA (50:50 láctido:glicolido; grupo ácido terminal; viscosidad inherente 0,16 L/g) fue disuelto en cloruro de metileno a una concentración final de 200 mg/mL. La emulsión primaria (w/o) fue creada por homogenización de 200  $\mu$ L de la solución péptida con 3 ml de la solución de polímero a 10.000 rpm durante 3 minutos. Esta emulsión primaria fue vertida en 100 mL de 0,5% de solución PVA y agitada a 750 rpm durante 3-6 horas. Después de que el solvente se hubiese evaporado y las micropartículas se hubiesen endurecido, fueron recogidas por filtración y secadas *in vacuo* antes del análisis. Las partículas fueron caracterizadas para la carga del núcleo (CL), eficiencia de encapsulación (EE), tamaño de partícula (PS), y liberación inicial (IR) de sus contenidos como sigue. La Tabla 1 muestra los resultados.

[0033] La medición de la carga del núcleo de las microesferas fue hecha disolviendo 10 mg de microesferas en 50% de acetonitrilo seguido por la centrifugación a pellet del polímero insoluble. Las alícuotas fueron analizadas por RP-HPLC y se compararon con los estándares representativos preparados en 50% de acetonitrilo. La liberación inicial de los contenidos de las microesferas fue medida suspendiendo muestras de 20 mg en 2 mL de PBS (50 mM, pH 7,2) conteniendo un 0,02% de Tween 20 y un 25% de EtOH. Las suspensiones fueron agitadas por vortex e

incubadas a 37° C. Tras 1 hora, las alícuotas fueron retiradas, filtradas y analizadas para la cantidad liberada por la RP-HPLC. Esta liberación acelerada en 1 hora mostró que se correlacionaba bien con la cantidad de activo liberado tras un 1 día en el PBS sin 4to.

### 5 **Ejemplo 3 – Preparación y caracterización de micro partículas convencionales ( $w_1/o/w_2$ ) que contienen conjugado de PEG-leu-encefalina**

10 **[0034]** Las micropartículas convencionales  $w_1/o/w_2$  que contienen PEG-leu-encefalina fueron preparadas de la manera siguiente: la PEG-leu-encefalina fue disuelta en una mezcla 1:9 DMSO:PBS a una concentración final de 50 mg/mL. El PLGA (50:50 láctido:glicolido; grupo ácido terminal; viscosidad inherente 0,16 L/g) fue disuelto en cloruro de metileno a una concentración final de 200 mg/mL. La emulsión primaria ( $w/o$ ) fue creada homogeneizando 200  $\mu$ L de la solución péptida con 3 mL de la solución de polímero a 10.000 rpm durante 3 minutos. Esta emulsión primaria fue vertida en 100 mL de solución de 0,5% de PVA y se permitió que agitara a 750 rpm durante 3-6 horas. Después de que el solvente se hubiese evaporado y de que las micropartículas se hubiesen endurecido, fueron recogidas por filtración y secadas *in vacuo* antes del análisis. Las partículas fueron caracterizadas por la carga del núcleo (CL), eficiencia de encapsulación (EE), tamaño de partícula (PS), y liberación inicial (IR) de sus contenidos como se describe en el Ejemplo 2. Estos datos se presentan en la Tabla 1.

### 20 **Ejemplo 4 – Preparación y caracterización de micropartículas de monofase que contienen leu-encefalina**

25 **[0035]** Las micropartículas de monofase que contienen leu-encefalina no modificada fueron preparadas de la manera siguiente: se disolvieron 10 mg de leu-encefalina en 1 mL de cloruro de metileno que contenía 30 de TFA, 90 mg de PLGA (50:50 láctido:glicolido; grupo lauril terminal; viscosidad inherente 0,61 L/g) fueron después disueltos en la solución péptida orgánica. La emulsión primaria ( $o/w$ ) se formó por agitación por vortex de esta solución con 2,5 mL de 2,5% de PVA durante 3 minutos. Se usaron aire forzado (15 minutos) y agitación (6-8 horas) para evaporar el solvente y endurecer las micropartículas. Tras el endurecimiento, las micropartículas fueron recogidas por filtración y secadas *in vacuo* antes del análisis. Los datos para la carga del núcleo (CL), eficiencia de encapsulación (EE), tamaño de partícula (PS), y liberación inicial (IR) de los contenidos se presentan en la Tabla 1.

### 30 **Ejemplo 5 – Preparación y caracterización de micropartículas de monofase que contienen conjugado de PEG-leu-encefalina**

35 **[0036]** Las **micropartículas** de monofase que contienen PEG-leu-encefalina fueron preparadas de la siguiente manera: se disolvieron 50 mg de PEG-leu-encefalina y 150 mg de PLGA (50:50 láctido:glicolido; grupo lauril terminal; viscosidad inherente 0,61 L/g) en 2mL de cloruro de metileno. La emulsión primaria ( $o/w$ ) se formó por agitación por vortex de la solución péptida/polímero orgánica con 5 mL de 2,5% de PVA durante 3 minutos. El solvente orgánico fue retirado de las micropartículas por agitación / evaporación al vacío durante 2 horas. Tras el endurecimiento de las micropartículas, fueron recogidas por filtración y secadas *in vacuo* antes del análisis. Los datos para la carga del núcleo (CL), eficiencia de encapsulación (EE), tamaño de partícula (PS), y liberación inicial (IR) de los contenidos se presentan en la Tabla 1.

### 40 **Ejemplo 6 – Carga de Fármaco Aumentada para la Leu-Encefalina Pegilada**

45 **[0037]** Los datos de la Tabla 1 muestran que la unión covalente del PEG 5000 con la leu-encefalina aumenta la carga del fármaco (CL) alcanzable del 0,07% al 0,36% para la técnica de emulsión doble y del 0,3% al 3,95% para el método de monofase. LA pegilación resultó también en una eficiencia de encapsulación mejorada en gran medida para los dos métodos. La liberación inicial ("estallido") fue ligeramente menor (mejor) para la pegilada que para los péptidos no pegilados hechos por la monofase, y la carga del núcleo de fármaco fue más de 10 veces mayor para el péptido pegilado. La carga del núcleo de fármaco más alta permite que dosis más pequeñas de los sistemas de administración de fármaco biodegradables sean administradas a pacientes para conseguir la dosis de fármaco deseada.

Tabla 1. Características de las Micropartículas de Leu-Encefalina y PEG-Leu-Encefalina.

	Leu-encefalina		PEG-Leu-encefalina		
	Emulsión doble	Monofase	Emulsión Doble	Monofase	
5	TL (%) <sup>a</sup>	1,64	10	1,64	10
	CL (%)	0,07	0,3	0,36	3,95
10	EE (%)	4,43	3,04	17	40,3
	PS (µm)	50-250	20-100	50-200	40-100
	IR (%)	47,1	22,5	ND	20,8
15	Carga teórica (peso del peso activo/total del activo y polímero)				
	CL – Carga del núcleo (% de peso del activo en la micropartículas aislada)				
	EE – Eficiencia de Encapsulación (% de activo encapsulado en el proceso)				
	PS – Tamaño de Partícula Medio (estimado del SEM)				
20	IR – Liberación Inicial a 1 h de la disolución <i>in vitro</i> en el PBS (50 mM, pH 7,2) conteniendo un 0,02% de Tween 20 y un 25% de EtOH a 37°C				
	ND - No detectable				

## II. Preparación, Caracterización y Administración de Formulaciones para Administrar Bifalina

### Ejemplo 7 – Carga de Fármaco Aumentada y Estallido Disminuido para la Bifalina Pegilada

[0038] La bifalina es un péptido sintético con actividad analgésica en mamíferos. Con dos cadenas PEG 2000 unidas tiene una duración más larga de acción analgésica tras la administración intravenosa que la del péptido no pegilado. La bifalina y la bifalina no pegilada fueron comparadas por su comportamiento en la encapsulación de microesfera PLGA como se describe en los ejemplos siguientes. Como se muestra en la Tabla 2, la bifalina pegilada tiene una carga de núcleo de fármaco más alta, más eficiencia de encapsulación, y menor nivel de liberación inicial (estallido) que el péptido no pegilado.

### Ejemplo 8 - Preparación y caracterización de micropartículas convencionales ( $w_1/o/w_2$ ) que contienen bifalina

[0039] Las micropartículas convencionales  $w_1/o/w_2$  que contienen PEG-bifalina fueron preparadas de la manera siguiente: La bifalina fue disuelta en una mezcla ternaria PBS:DMSO:ácido acético (5:1:1,5) a una concentración final de 35 mg/mL. El PLGA (50:50 láctido:glicolido; grupo ácido terminal; viscosidad inherente 0,16 L/g) fue disuelto en cloruro de metileno a una concentración final de 200 mg/mL. La emulsión primaria (w/o) fue creada por la homogeneización de 200 µL de la solución de péptido con 3 mL de la solución de polímero a 10.000 rpm durante 3 minutos. Esta emulsión primaria fue vertida en 100 mL de 0,5% de solución PVA y se permitió que agitase a 750 rpm durante 3 horas. Después de que el solvente se hubiese evaporado y las micropartículas se hubiesen endurecido, fueron lavadas con agua, recogidas por filtración y secadas *in vacuo* antes del análisis. Los datos para la carga del núcleo (CL), eficiencia de encapsulación (EE), tamaño de partícula (PS), y liberación inicial (IR) de los contenidos se presentan en la Tabla 2.

### Ejemplo 9 – Preparación y caracterización de micropartículas convencionales ( $w_1/o/w_2$ ) que contienen conjugado de PEG-bifalina

[0040] Las micropartículas convencionales  $w_1/o/w_2$  que contienen PEG-bifalina fueron preparadas de la manera siguiente: La PEG-bifalina fue disuelta en PBS a una concentración final de 50 mg/mL. El PLGA (50:50 láctido:glicolido; grupo ácido terminal; viscosidad inherente 0,16 L/g) fue disuelto en cloruro de metileno a una concentración final de 200 mg/mL. La emulsión primaria (w/o) fue creada por la homogeneización de 200 µL de la solución de péptido con 3 mL de la solución de polímero a 10.000 rpm durante 3 minutos. Esta emulsión primaria fue vertida en 100 mL de 0,5% de solución PVA y se permitió que agitase a 750 rpm durante 3 horas. Después de que el solvente se hubiese evaporado y las micropartículas se hubiesen endurecido, fueron lavadas con agua, recogidas por filtración y secadas *in vacuo* antes del análisis. Los datos para la carga del núcleo (CL), eficiencia de encapsulación (EE), tamaño de partícula (PS), y liberación inicial (IR) de los contenidos se presentan en la Tabla 2.

### Ejemplo 10 – Preparación y caracterización de micropartículas de monofase que contienen bifalina

[0041] Las micropartículas de monofase que contienen bifalina no modificada fueron preparadas de la manera siguiente: Se disolvieron 20 mg de bifalina y 180 mg de PLGA (50:50 láctido:glicolido; grupo lauril terminal; viscosidad inherente 0,61 L/g) en 2 mL de una mezcla 1:3 de ácido acético/cloruro de metileno. La emulsión primaria fue creada por la agitación por vortex de la fase oleosa con 5 mL de un 1% de PVA durante 3 minutos. La retirada de

los solventes orgánicos de la emulsión primaria o/w se consiguió por evaporación al vacío bajo agitación durante 4 horas. Tras la retirada del solvente, las micropartículas endurecidas fueron recogidas por filtración y lavadas varias veces con agua destilada desionizada para retirar cualquier PVA o bifalina no enlazada específicamente. Finalmente, las micropartículas fueron secadas *in vacuo* antes del análisis. Los datos para la carga del núcleo (CL), eficiencia de encapsulación (EE), tamaño de partícula (PS), y liberación inicial (IR) de los contenidos se presentan en la Tabla 2.

#### Ejemplo 11 – Preparación y caracterización de micropartículas de monofase que contienen conjugado de PEG-bifalina

[0042] Las micropartículas de monofase que contienen PEG- bifalina fueron preparadas de la manera siguiente: Se disolvieron 180 mg de PLGA (50:50 láctido:glicolido; grupo lauril terminal; viscosidad inherente 0,61 L/g) y 20 mg de PEG-bifalina en 2 mL de cloruro de metileno. La emulsión primaria fue creada por la agitación por vortex de la solución de polímero/péptido con 5 mL de 2,8% de alcohol de polivinilo (PVA, 80-85% hidrolizado) durante 3 minutos. El solvente orgánico fue retirado de la emulsión primaria (o/w) por evaporación al vacío bajo agitación durante 4 horas. Las micropartículas endurecidas fueron recogidas por filtración y lavadas varias veces con agua destilada para retirar cualquier PVA o PEG-bifalina no enlazada específicamente. Finalmente, las micropartículas fueron secadas *in vacuo* antes del análisis. Los datos para la carga del núcleo (CL), eficiencia de encapsulación (EE), tamaño de partícula (PS), y liberación inicial (IR) de los contenidos se presentan en la Tabla 2.

#### Ejemplo 12 – Efecto Analgésico en un Mamífero Tras la Administración de Bifalina Pegilada en una Microesfera Biodegradable.

[0043] Para evaluar la administración mejorada *in vivo* de la bifalina administrada de acuerdo a la presente invención, se puede realizar un estudio de comparación de la manera siguiente: las microesferas de PLGA de bifalina pegilada se pueden preparar por el método de emulsión doble como se describe en el Ejemplo 9. Las microesferas son suspendidas en un medio de carboximetilcelulosa (.5%) en agua con un 0,5% de Tween-20. Una dosis efectiva es después administrada subcutáneamente a ratas Sprague-Dawley y el efecto analgésico es medido por, por ejemplo, el ensayo del coletazo. La PEG-bifalina encapsulada en microesfera tiene un efecto analgésico que dura más que para una inyección de control de PEG-bifalina no encapsulada, El experimento puede ser repetido con PEG-bifalina PLGA-encapsulada preparada por el método de monofase del Ejemplo 11 con resultados similares.

Tabla 2. Características de las Micropartículas de Bifalina y PEG-Bifalina

	Bifalina		PEG-Bifalina	
	Emulsión Doble	Monofase	Emulsión Doble	Monofase
TL (%) <sup>a</sup>	1.0	10	1.64	10
CL (%)	0.24	0.36	1.48	6.86
EE (%)	14.28	3.64	90.52	68.6
PS (µm)	50-250	20-100	20-200	20-100
IR (%)	ND	49,4	19	15,6

<sup>a</sup> Carga teórica (peso del peso activo/total del activo y del polímero)

CL – Carga del núcleo (% de peso del activo en la micropartículas aisladas)

EE – Eficiencia de Encapsulación (% de activo encapsulado en el proceso)

PS – Tamaño de Partícula Medio (estimado del SEM)

IR – Liberación Inicial a 1 h de la disolución *in vitro* en el PBS (50 mM, pH 7,2) conteniendo un 0,02% de Tween 20 y un 25% de EtOH a 37°C

ND - No detectable

### III. Preparación, Caracterización y Administración de Formulaciones para Administrar Insulina

#### Ejemplo 13 – Preparación de insulina humana conjugada con glicol de polietileno (PEG-insulina)

[0044] La insulina humana fue modificada covalentemente con glicol de polietileno de la manera siguiente: se disolvieron 116 mg de insulina humana recombinante en 4mL de DMSO anhidro que contenía 200 µL de TEA. Se disolvió 1 g de mPEG(5000)-SPA en 10 mL de DMSO anhidro y se añadió a la solución de insulina por inyección directa. La reacción procedió durante toda la noche (6-10 horas) a temperatura ambiente o hasta que >90% de la proteína estaba pegilada. El PEG no reaccionado y la insulina pegilada fueron aisladas por precipitación (2x) de Et<sub>2</sub>O. El producto final fue un sólido granular sólido que estaba >95% pegilado (de acuerdo con el análisis RP-HPLC).



**Ejemplo 14 – Preparación y caracterización de micropartículas convencionales ( $w_1/o/w_2$ ) que contienen insulina humana**

5 [0045] Las micropartículas convencionales  $w_1/o/w_2$  que contienen insulina humana fueron preparadas de la manera siguiente: la insulina recombinante humana fue disuelta en DMSO:0,1N HCl (1:1) a una concentración final de 50mg/mL y se disolvió PLGA (50:50 láctido:glicolido; grupo terminal lauril; viscosidad inherente 0,61 L/g) en cloruro de metileno a una concentración final de 200 mg/mL. La emulsión primaria (w/o) se formó por la homogenización de 200  $\mu$ L de la solución de proteína y 3 mL de la solución de polímero a 10.000 rpm durante 3 minutos. La emulsión primaria fue entonces añadida a 100 mL de 0,5% de PVA y se permitió que agitase bajo vacío durante 3-6 horas. Una vez que los solventes orgánicos fueron retirados, las micropartículas fueron filtradas, lavadas varias veces con agua, y secadas *in vacuo* antes del análisis. La Tabla 3 enumera las características de las micropartículas.

**Ejemplo 15 – Preparación y caracterización de micropartículas convencionales ( $w_1/o/w_2$ ) que contienen que contienen conjugado de PEG-insulina**

15 [0046] Las micropartículas convencionales  $w_1/o/w_2$  que contienen PEG-insulina fueron preparadas de la manera siguiente: la PEG-insulina fue disuelta en una mezcla DMSO:H<sub>2</sub>O (1:2) a una concentración final de 50mg/mL y se disolvió PLGA (50:50 láctido:glicolido; grupo terminal lauril; viscosidad inherente 0,61 L/g) en cloruro de metileno a una concentración final de 200 mg/mL. La emulsión primaria (w/o) se formó por la homogenización de 200  $\mu$ L de la solución de proteína y 3 mL de la solución de polímero a 10.000 rpm durante 3 minutos. Esta emulsión primaria fue entonces añadida a 100 mL de 0,5% de PVA y se permitió que agitase bajo vacío durante 3-6 horas. Una vez que los solventes orgánicos fueron retirados, las micropartículas fueron filtradas, lavadas varias veces con agua, y secadas *in vacuo* antes del análisis. La Tabla 3 enumera las características de las micropartículas.

**Ejemplo 16 – Preparación y caracterización de micropartículas de monofase que contienen insulina humana**

25 [0047] Las micropartículas de monofase que contienen insulina humana fueron preparadas de la manera siguiente: se disolvieron 20 mg de insulina humana recombinante (Zn<sup>2+</sup>-sal de insulina) en 2 mL de una mezcla de ácido acético:cloruro de metileno (1,4:1). Se disolvieron entonces 180 mg de PLGA (50:50 láctido:glicolido; grupo terminal lauril; viscosidad inherente 0,61 L/g) en la solución péptida orgánica. La emulsión primaria fue creada por agitación por vortex de la solución de péptido/polímero orgánica con 5mL de un 1% de PVA durante 3 minutos. Los solventes orgánicos fueron retirados por evaporación al vacío bajo agitación durante 2 horas. Las micropartículas parcialmente endurecidas fueron añadidas al vaso de precipitados que contenía 100 mL de agua y se agitaron durante otras 2 horas para retirar completamente todos los solventes orgánicos. Las micropartículas fueron recogidas por filtración, lavadas varias veces con agua, y secadas *in vacuo* antes del análisis. La Tabla 3 enumera las características de las micropartículas.

**Ejemplo 17 – Preparación y caracterización de micropartículas de monofase que contienen conjugado de PEG-insulina**

30 [0048] Las micropartículas de monofase que contienen PEG-insulina fueron preparadas de la manera siguiente: se disolvieron 63 mg de PEG-insulina y 137 mg de PLGA (50:50 láctido:glicolido; grupo terminal lauril; viscosidad inherente 0,61 L/g) en 2 mL de cloruro de metileno. La emulsión primaria se formó por agitación por vortex de la fase oleosa con 5 mL de un 1% de PVA durante 3 minutos. La retirada del solvente se consiguió por evaporación al vacío durante 2 horas seguido por agitación a condiciones ambientales durante 1 hora. Las micropartículas endurecidas fueron recogidas por filtración y lavadas varias veces con agua antes del secado *in vacuo* y del análisis. La Tabla 3 enumera las características de las micropartículas.

**Ejemplo 18 – Carga de Fármaco Aumentada y Eficiencia de Encapsulación para La Insulina Pegilada**

45 [0049] Los Datos en la Tabla 3 muestran que la insulina pegilada consigue una carga de fármaco aumentada en las microesferas PLGA preparadas por los métodos de monofase y emulsión doble. La insulina pegilada también tiene mayor eficiencia de encapsulación, una ventaja principal cuando se usan péptidos y proteínas biológicamente activos de alto valor.

Tabla 3. Características de las Micropartículas de Insulina y PEG-Insulina.

	Insulina		PEG-Insulina	
	Emulsión Doble	Monofase	Emulsión Doble	Monofase
TL (%) <sup>a</sup>	1,64	10	1,64	31,5
CL (%)	0,23	0,6	0,54	15,5
EE (%)	13,86	6	33	49,2
PS (Pm)	100-350	30-100	50-250	50-100

<sup>a</sup> Carga Teórica (peso del peso activo/total del activo y el polímero)

CL – Carga del núcleo (% de peso del activo en la micropartículas aislada)

EE – Eficiencia de Encapsulación (% de activo encapsulado en el proceso)

PS – Tamaño de Partícula Medio (estimado del SEM)

#### Ejemplo 19 – Efecto Hipoglucémico de la PEG-Insulina PLGA-Encapsulada

[0050] Las microesferas PLGA de PEG-Insulina y una dosis equivalente de insulina libre fueron administradas subcutáneamente a ratas normales. La sangre fue extraída periódicamente y anticoagulada. Los niveles de glucosa en sangre fueron medidos por pruebas estándar. Como se muestra en la Tabla 4, el uso de la PEG-insulina en microesferas PLGA suprimió significativamente la reducción inicial en la glucosa en sangre en relación a los valores observados para la insulina modificada. Además, estos datos de manera importante muestran que la preparación de microesfera de PEG-insulina liberó su fármaco en una forma biológicamente activa que fue capaz de reducir efectivamente los niveles de glucosa en sangre en un modelo animal *in vivo* sin el efecto “estallido” de las formulaciones convencionales, no modificadas.

Tabla 4. Estudio *In Vivo* de las Micropartículas de Insulina y PEG-Insulina.

Tiempo (hr)	Insulina (Humulina-U)		PEG-Insulina	
	%BGL <sup>a</sup>	SD	%BGL <sup>a</sup>	SD
0	100	0	100	0
1	25,8	6,6	111,1	16
2	14,9	11,4	86,5	17,6
4	68,1	11,6	97	13,3
6	89,3	7	98,5	12,1
8	75	1,7	82	6,8
12	75,8	8,2	88,8	6,6

<sup>a</sup> el % de BLG indica que los valores de glucosa mostrados están normalizados a un porcentaje del nivel basal

#### IV. Preparación y Caracterización de Formulaciones para Administrar GM-CSF (Ejemplos Comparativos)

##### Ejemplo 20 – Preparación de GM-CSF conjugado de glicol de polietileno

[0051] El GM-CSF puede ser covalentemente conjugado con el glicol de polietileno (PEG) de la manera siguiente: se disuelven 100 mg de GM-CSF en 10 ml de regulador de fosfato de pH 7,5, a temperatura ambiente. A continuación se añaden 100 mg de glicol de tresilo-monometoxi-polietileno (MW = 5000 daltons), y la mezcla se agita durante 1 hora. EL GM-CSF no reaccionado y las fracciones de GM-CSF pegiladas son aisladas del glicol de tresilo-monometoxi-polietileno no reaccionado por cromatografía en gel. El GM-CSF pegilado es después dializado en 100 mM de regulador Tris y ajustado a una concentración de 50 mg/ml.

##### Ejemplo 21 – Preparación de micropartículas que encapsulan GM-CSF pegilado

[0052] Las micropartículas que encapsulan GM-CSF pegilado pueden ser preparadas de la manera siguiente: se disuelven 6,0 gm de PLGA (50:50 láctido:glicolido; viscosidad inherente 0,351/g) en 20 ml de acetato de etilo. Se añade 1 ml de GM-CSF pegilado del Ejemplo 20 y se agita rápidamente con un homogeneizador a 10.000 rpm para crear una emulsión de agua en aceite. La emulsión de polímero/fármaco/acetato de etilo es después bombeada a

5 través de un mezclador estático en combinación con una corriente bombeada de agua que contiene un 1% de alcohol de polivinilo (PVA). Esta acción produce una emulsión w/o/w, que fue posteriormente añadida a 1 litro de agua 5C con agitación. Tras 2 horas las microesferas de PLGA endurecidas que contienen el GM-CSF pegilado son recogidas en un tamiz de 25 micrones y secadas. Las microesferas resultantes serán de un rango de tamaño de entre 25-200 µm.

**Ejemplo 22 – Preparación de nanopartículas que encapsulan GM-CSF pegilado**

10 **[0053]** Las nanopartículas que encapsulan GM-CSF pegilado pueden ser preparadas de la manera siguiente: se disuelven 3,0 gm de PLGA (mismo material que en el Ejemplo 21) en 5 ml de diclorometano y 5 ml de acetona. Se añaden 0,5 ml de GM-CSF pegilado del Ejemplo 20 y la mezcla se agita a 10.000 rpm con un homogeneizador. La mezcla es añadida a 200 ml de agua que contiene un 5% de PVA. La mezcla es después homogeneizada a 15.000 rpm durante el tiempo que sea requerido para formar nanopartículas de menos de alrededor de 1,0 micrón de diámetro. Los solventes orgánicos pueden ser retirados por vacío y las nanoesferas pueden ser recuperadas del  
15 agua y secadas.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para producir una composición para la liberación controlada de una molécula bioactiva, el método comprendiendo:
- A)
- 10 (i) disolver (a) un PLGA y (b) un conjugado de PEG-leu-encefalina en un solvente de cloruro de metileno para formar una monofase; o  
(ii) disolver (a) un PLGA y (b) un conjugado de PEG-bifalina en un solvente de cloruro de metileno para formar una monofase; o  
(iii) disolver (a) un PLGA y (b) un conjugado de PEG-insulina en un solvente de cloruro de metileno para formar una monofase;
- 15 B) formar una emulsión por agitación por vortex de la monofase con el PVA; y
- C) formar micropartículas o nanopartículas que comprenden el PLGA que encapsula el conjugado.
- 20 2. Un método de la reivindicación 1 en donde la composición es para la administración oral.
3. El método de la reivindicación 1 en donde la composición es para la administración
- 25 (i) por inhalación o administración mucosal; o  
(ii) por inyección
- opcionalmente en donde la inyección es subcutánea o intramuscular.