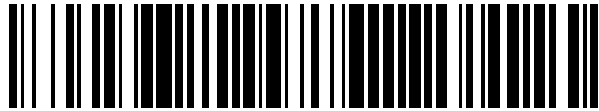


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 077**

51 Int. Cl.:

A61K 47/34 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 9/16 (2006.01)

A61K 9/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.07.2004 E 04777860 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **03.05.2006 EP 1651273**

54 Título: **Matrices poli-4-hidroxitirato para una administración prolongada de medicamentos**

30 Prioridad:

08.07.2003 US 485373 P

30.07.2003 US 491430 P

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

08.02.2013

73 Titular/es:

**TEPHA, INC. (100.0%)
99 HAYDEN AVENUE, SUITE 360
LEXINGTON MA 02421, US**

72 Inventor/es:

**HASIRCI, VASIF N. y
KESKIN, DILEK**

74 Agente/Representante:

URÍZAR ANASAGASTI, José Antonio

ES 2 395 077 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

Matrices poli-4-hidroxitirato para una administración prolongada de medicamentos.

Antecedentes de la invención

[0001] La presente invención se refiere en general a sistemas de administración de fármacos, derivados de poli-4-hidroxitirato.

[0002] El uso de polímeros biodegradables para hacer sistemas de administración de fármacos está bien establecido. Por ejemplo, Takeda Pharmaceuticals ha desarrollado una formulación basada en polilactida-co-glicolida para la administración de LHRH (hormona luteinizante- hormona liberadora) que puede ser administrada mensualmente y proporcionar un nivel terapéutico prolongado de LHRH para el tratamiento de cáncer de próstata; Guilford Pharmaceuticals ha desarrollado una formulación del fármaco quimioterapéutico contra el cáncer, carmustina (BCNU), vendido bajo el nombre comercial de GLIADEL™, que está basado en un polímero polianhídrido degradable. Otra compañía, Atrix Laboratories ha desarrollado un sistema llamado ATRIDOX™ basado en una polilactida degradable (PLA) para el suministro del antibiótico doxiciclina para la terapia periodontal. A pesar de esta evolución positiva todavía existe una necesidad de desarrollar sistemas de suministro de medicamentos nuevos y mejorados. Los dispositivos basados en la PLA, por ejemplo, se ha informado que causan inflamación localizada (véase la patente US N ° 6.214.387 de Berde y Langer. Berde, et al. (Abstracts of Scientific Papers, 1990 Annual Meeting, Amber. Soc. Anesthesiologists, 73:A776, September 1990) también han reportado inconvenientes de ciertos sistemas de liberación de fármacos polianhídridos degradables que incluyen rápida liberación inicial del fármaco, y respuestas inflamatorias al dispositivo o la formación de una cápsula de material seroso o fibrina. Para ciertas aplicaciones, tales como el tratamiento del dolor crónico o persistente, la anticoncepción o administración a largo plazo de antibióticos, factores de crecimiento o quimioterapéuticos, o la prevención de la reestenosis tras la implantación del stent, sería ventajoso desarrollar sistemas que puedan administrar fármacos durante períodos prolongados de tiempo. También sería deseable desarrollar sistemas que puedan cargarse con grandes cantidades de fármaco para proporcionar liberación prolongada y/o para permitir el uso de dispositivos más pequeños, así como sistemas que puedan suministrar diferentes tipos de fármacos (por ejemplo, hidrófobos, hidrófilos, péptidos, proteínas, ADN y ARN) sin disminuir la actividad (por ejemplo, resultante del despliegue de un péptido o proteína activa) del fármaco.

[0003] En consecuencia, es el objeto de esta invención proporcionar un sistema mejorado biodegradable de liberación controlada que administre un fármaco por un período de tiempo prolongado.

[0004] Es un objeto adicional de esta invención proporcionar un sistema mejorado biodegradable de liberación controlada que pueda cargarse con grandes cantidades de fármaco.

[0005] Es todavía otro objeto de esta invención proporcionar métodos para la preparación y la modulación de la velocidad de liberación del fármaco desde el sistema de liberación controlada.

Resumen de la invención.

[0006] Se dan a conocer sistemas biodegradables de liberación controlada que proporcionan liberación prolongada controlada de fármacos, y métodos para la fabricación de los mismos. Los sistemas se han formado a partir de un polímero biocompatible, biodegradable, en particular poli-4-hidroxitirato (PHA440). Los fármacos se incorporan generalmente en el polímero usando un método que produce una dispersión uniforme. El tipo de medicamento y la cantidad se seleccionan basándose en las propiedades farmacéuticas conocidas de estos compuestos. Los sistemas se pueden administrar por ejemplo por implantación, inyección, administración tópica, o ingestión oral. También pueden ser utilizados en combinación con un dispositivo médico, por ejemplo, un stent. Una ventaja importante del sistema de administración de fármacos es que no necesita ser retirado después de su uso, ya que se degrada lentamente y se elimina a través del cuerpo del paciente. El dispositivo tiene propiedades físicas deseables, incluyendo la resistencia, el módulo y la elongación.

Breve descripción de los dibujos

[0007]

Las figuras 1A y 1B son las estructuras químicas de poli-4-hidroxitirato (PHA440) y poli-3-hidroxitirato-co-4-hidroxitirato (PHA3444).

La Figura 2 es la descripción de las rutas biosintéticas para la producción de PHA440 (P4HB). Las enzimas de la ruta son:

1. Deshidrogenasa semialdehído succínico, 2. 4-hidroxitirato deshidrogenasa, 3. Oxidorreductasa diol, 4. Aldehído deshidrogenasa, y 5. Coenzima A transferasa y 6. PHA sintetasa.

Las figuras 3A y 3B son gráficos de la liberación de tetraciclina de PHA4400: TC (2:1) varillas (37 ° C, PBS, 364,0 nm) (n = 4). Figura 3A, liberación acumulada media (%) en función del tiempo, la figura 3B, liberación acumulada media (%) en función de la raíz cuadrada del tiempo.

5 Las figuras 4A y B son gráficos de liberación de tetraciclina (neutro) de PHA4400: TCN (2:1) varillas (37 ° C, PBS, 357,6 nm) (n = 4). Figura 4A, liberación acumulada media (%) en función del tiempo; figura 4B, liberación acumulada media (%) frente a la liberación en función de la raíz cuadrada del tiempo.

Las Figuras 5A y 5B son gráficos de la liberación de tetraciclina de PHA3444-34%: TC (2:1) varillas (37 ° C, PBS, 364,0 nm) (n = 4). La figura 5A muestra liberación acumulada media (%) en función del tiempo, la figura 5B muestra la liberación acumulada media (%) en función de la raíz cuadrada del tiempo.

10 Las figuras 6A y 6B son gráficos de la liberación de tetraciclina Neutra (TCN) de PHA3444-34%: TCN (2:1) varillas (37 ° C, PBS, 364,0 nm) (n = 4). La figura 6A muestra la liberación acumulada media (%) en función del tiempo, la figura 6B muestra la liberación acumulada media (%) en función de la raíz cuadrada del tiempo.

Descripción detallada de la invención

15 **[0008]** Se proporcionan sistemas biodegradables de suministro de fármacos para la liberación controlada y prolongada de fármacos. Estos sistemas pueden ser utilizados donde es necesario administrar una cantidad controlada de fármaco durante un período prolongado, y/o para emplear un sistema que requiera una alta carga de fármaco.

I. Definiciones

20 **[0009]** Poli-4-hidroxibutirato significa un homopolímero que comprende unidades de 4-hidroxibutirato. Puede ser referido como PHA4400 o P4HB. Copolímeros de poli-4-hidroxibutirato significan cualquier polímero que comprende 4-hidroxibutirato con una o más unidades diferentes de ácido hidroxilo, por ejemplo, poli-3-hidroxibutirato-co-4-hidroxibutirato (PH3444).

[0010] Biocompatible se refiere a materiales que no son tóxicos, y no provocan respuestas inflamatorias graves o crónicas *in vivo*. Todos los metabolitos de estos materiales también deben ser biocompatibles.

25 **[0011]** La biodegradación significa que el polímero debe romperse o disolverse *in vivo*, preferiblemente en menos de dos años, y más preferiblemente en menos de un año. La biodegradación se refiere a un proceso en un animal o humano. El polímero puede romper por erosión superficial, erosión en masa, hidrólisis o una combinación de estos mecanismos.

[0012] El término "microesferas" también incluye nanoesferas, micropartículas, y microcápsulas.

II. Sistemas de suministro de fármaco

A. Polímeros

30 **[0013]** Poli-4-hidroxibutirato (PHA4400) es un termoplástico fuerte, flexible, que se produce por un proceso de fermentación (Véase la Patente US_N ° 6.548.569 de Williams et al.). A pesar de su ruta biosintética, la estructura del poliéster es relativamente sencilla (Figura 1A). El polímero pertenece a una clase más amplia de materiales llamados polihidroxialcanoatos (PHA) que están producidos por microorganismos numerosos (para revisiones, ver: Steinbüchel, A. (1991), Polyhydroxyalkanoic Acids en Biomaterials, (Byrom, D., ed.), Pp 123-213. Nueva York: Stockton Press; Steinbüchel, A. y Valentin, SE (1995) FEMS Microbiana. Lett. 128:219-228, y Doi, Y. (1990) Microbial Polyesters, Nueva York: VCH).

35 **[0014]** Los polihidroxialcanoatos (PHAs) son una clase de poliésteres naturales que son sintetizados por numerosos organismos en respuesta al estrés ambiental. Para una revisión, véase Byrom, 3 Miscellaneous Biomaterials, 2 en Byrom, ed., Biomaterials Macmillan Publishers, Londres, 1991, pp 333-59; Hocking y Marchessault, 3Biopolyesters2 en Griffin, ed. Chemistry and Technology of Biodegradable Polymers, Chapman and Hall, London, 1994, pp.48-96; Holmes, 3Biologically Produced (R)-3-hydroxyalkanoate Polymers and Copolymers2 en Bassett, ed., Developments in Crystalline Polymers, Elsevier, Londres, vol. 2, 1988, pp 1-65; Lafferty et al, 3microbial Production of Poly-β-hydroxybutíric Acid2. en Rehm & Reed, eds., Biotechnology, Verlagsgesellschaft, Weinheim, vol. 66, 1988, pp 135-76; Müller & Seebach, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 32:477-502 (1993); Steinbüchel, 3Polyhydroxyalkanoic Acids2 en Byrom, ed, Biomaterials, MacMillan Publishers, Londres, 1991, pp 123-213; Williams & Peoples, CHEMTECH, 26:38-44, (1996), y la reciente revisión por parte de Madison & Husiman, Microbiol. & Mol. Biol.Rev. 63:21-53 (1999).

45 **[0015]** Los biopolímeros PHA pueden dividirse ampliamente en tres grupos de acuerdo a la longitud de sus grupos colgantes y sus respectivas rutas biosintéticas. Aquellos con grupos colgantes cortos, como polihidroxibutirato (PHB), un homopolímero de unidades de R-3-ácido hidroxibutírico (R-3HB), son materiales termoplásticos altamente cristalinos, y han sido conocido como los más largos (Lemoigne y Roukheldman, Annales des fermentations, 5:527-36 (1925)). Un segundo

grupo de PHAs que contiene las unidades más cortas de \underline{R} 3HB polimerizadas al azar con unidades de grupo colgante ácido hidroxil mucho más largas, fue primero citado en los años setenta (Wallen y Rohwedder, Environ. Ciencia. Technol., 8:576-79 (1974)). Una serie de microorganismos que específicamente producen copolímeros de \underline{R} -3HB con estas unidades colgantes más largas del grupo ácido hidroxil, son también conocidos y pertenecen a este segundo grupo (Steinbüchel y Wiese, Appl. Microbiol. Biotechnol., 37:691-97 (1992)). En los años ochenta, un grupo de investigación en los Países Bajos identificó un tercer grupo de PHAs, que contenía predominantemente grupos colgantes ácido hidroxil más largos (De Smet, et al., J. Bacteriol., 154:870-78 (1983)).

[0016] Los polímeros PHA pueden constituir hasta el 90% del peso seco de células de bacterias, y se encuentran como gránulos separados dentro de las células bacterianas. Estos gránulos de PHA se acumulan en respuesta a la limitación de nutrientes y sirven como materiales de reserva de carbono y energía. Vías diferentes son utilizadas por los microorganismos para producir cada grupo de estos polímeros. Una de estas vías que conducen a polihidroxialcanoatos de grupo colgante corto, (SPGPHAs) implica tres enzimas, en concreto, tiolasa, reductasa y PHB sintasa (a veces denominada polimerasa). Usando esta vía, el homopolímero PHB se sintetiza por condensación de dos moléculas de acetil-Coenzima A para dar acetoacetil-Coenzima A, seguido por reducción de este compuesto intermedio a \underline{R} -3-hidroxibutiril-Coenzima A, y posterior polimerización. La última enzima en esta vía, a saber, la sintasa, tiene una especificidad de sustrato que puede acomodar unidades monoméricas C3-C5 incluyendo unidades \underline{R} -4-hidroxil ácido y \underline{R} -5-hidroxil ácido. Esta ruta biosintética se encuentra, por ejemplo, en las bacterias *Zoogloea ramigera* y *Alcaligenes eutrophus*.

[0017] La ruta de biosíntesis que se utiliza para hacer el tercer grupo de PHAs, a saber, los polihidroxialcanoatos de grupo colgante largo (LPGPHAs), es aún desconocido en parte, sin embargo, actualmente se piensa que las unidades de hidroxil monoméricas que conducen a los LPGPHAs se derivan por la β -oxidación de ácidos grasos y la vía de ácidos grasos. Los sustratos de \underline{R} -3-hidroxil-Coenzima que resultan de estas rutas son polimerizados después por PHA sintasas (a veces denominadas polimerasas) que tienen especificidades de sustrato que favorecen las unidades monoméricas mayores en el rango C6-C14. Los PHAs de grupo colgante largo se producen, por ejemplo, por bacterias *Pseudomonads*.

[0018] Presumiblemente, el segundo grupo de PHAs que contienen tanto unidades cortas \underline{R} -3HB como monómeros de grupo colgante más largo, utilizan las vías descritas anteriormente para proporcionar los monómeros de ácido hidroxil. Estos últimos son entonces polimerizados por PHA sintasas capaces de aceptar estas unidades.

[0019] Hasta el momento, en total unos 100 tipos diferentes de hidroxil ácidos han sido incorporados en PHAs por métodos de fermentación (Williams, et. al., Int. J. Biol. Macromol., 25:111-21 (1999)). Notablemente, estos incluyen PHAs que contienen grupos colgantes funcionalizados como grupos ésteres, enlaces dobles, alcoxi, aromáticos, halógenos e hidroxil.

[0020] A mediados de los años 80, varios grupos de investigación estuvieron identificando y aislando activamente los genes y productos de genes responsables de la síntesis de PHA. Estos esfuerzos han conducido al desarrollo de sistemas transgénicos para la producción de PHAs tanto en microorganismos como en plantas, así como métodos enzimáticos para síntesis de PHA. Dichas rutas podrían aumentar más la lista de tipos de PHA. Estos avances se han revisado en Williams & Peoples, CHEMTECH, 26:38-44 (1996), Madison y Huisman, Microbio /. Mol. Biol. Rev., 63:21-53 (1999), y Williams & Peoples, Chem. Ber. Fr. 33:29-32 (1997).

[0021] Además de utilizar rutas biológicas para la síntesis de PHA, los polímeros de PHA también pueden derivarse por síntesis química. Un método ampliamente utilizado implica la polimerización por apertura del anillo de monómeros de β -lactona utilizando varios catalizadores o iniciadores como aluminóxanos, distannóxanos, o compuestos de alcoxi-zinc y aluminio alcoxi-(ver Agostini, et al., Polym. Sci., Parte A-1, 9:2775-87 (1971); Gross, et al, Macromolecules, 21:2657-68 (1988); Dubois, et al., Macromolécules, 26:4407-12 (1993); Le Borgne y Spassky, Polymer, 30:2312-19 (1989); Tanahashi y Doi, Macromolecules, 24:5732-33 (1991); Hori, et al, Macromolecules, 26:4388-90 (1993); Kemnitzer, et al, Macromolecules, 26.: 1221-1229 (1993); Hori, et al, Macromolecules, 26:5533-34 (1993);. Hoking y Marchessault, Polym. Bull, 30:163-70 (1993); Patentes US_Nos. 5.489.470 y 5.502.116 para Noda). Un segundo enfoque consiste en la polimerización por condensación de ésteres y se describe en la patente US N ° 5.563.239 para Hubbs, et al., y sus referencias. Los investigadores también han desarrollado métodos químico-enzimáticos para preparar PHAs. Xie et al., Macromolecules, 30:6997-98 (1997), por ejemplo, describe una polimerización de apertura de anillo de beta-butilolactona mediante lipasas termófilas para producir PHB.

[0022] Se conocen en la actualidad varias rutas biosintéticas para producir PHA4400, y éstas se muestran en la Figura 2. (Se ha intentado la síntesis química de PHA4400, pero ha sido imposible producir el polímero con un peso molecular suficientemente alto necesario para la mayoría de aplicaciones, véase Hori, et al (1995) Polímero 36:4703-4705).

[0023] Tepha, Inc. (Cambridge, MA) produce PHA4400 y PHA 3444 para el desarrollo de los usos médicos, y ha presentado diferentes archivos GSD en la Food and Drug Administration (FDA) de Estados Unidos para PHA4400 y PHA3444. Métodos para controlar el peso molecular de polímeros de PHA han sido descritos por la Patente US_N ° 5.811.272 a Snell et al., y métodos para purificar polímeros de PHA para uso médico han sido descritos por la Patente US_N ° 6.245.537 a Williams et

al. PHAs con tasas de degradación *in vivo* de menos de un año han sido descritos por la Patente US_N ° 6.548.569 a Williams et al. y el documento PCT WO 99/32536 a Martin al.

5 **[0024]** El uso de PHAs para producir una gama de dispositivos médicos ha sido revelado, por ejemplo, en la Patente US No.6.514.515 de Williams que describe andamios de ingeniería de tejidos, y en la Patente US_N ° 6.555.123 de Williams y Martin que describe la reparación, el aumento y la viscosuplementación de tejido blando, PCT WO 01/15671 a Williams da a conocer productos poliméricos desechables, y el documento PCT WO 01/19361 a Williams y Martin describe composiciones PHA de profármacos terapéuticos. Otras aplicaciones de PHAs han sido revisadas por Williams, SF y Martin, D.P. (2002) Aplicaciones de PHAs en medicina y farmacia, en Biopolímeros: poliésteres, III (Doi, Y. y Steinbuchel, A., Eds.) vol. 4, pp 91-127. Weinheim: Wiley-VCH.

10 **[0025]** Varios informes han descrito la utilización de copolímeros de 4-hidroxibutirato con 3-hidroxibutirato (PHA3444) para desarrollar sistemas de administración de fármacos. Por ejemplo, Gürsel, et al. (2001) Biomaterials 22:73-80, Korkusuz, et al. (2001) J. Biomed. Mater. Res. 55:2117-228, y Türesin et al. (2001) J. Biomater. Sci. Polymer Edn. 12:195-207 han descrito el uso de PHA3444 para desarrollar sistemas de liberación controlada para el tratamiento de la osteomielitis. La patente US_N ° 6.548.569 a Williams et al. da a conocer diferentes formas de PHA4400 (también conocidos como P4HB), incluyendo muestras porosas moldeadas por compresión, fibras, espumas, mallas recubiertas, y microesferas.

15 **[0026]** Los polímeros de polyhidroxialcanoato deben ser biocompatibles y biodegradables. Los polímeros son típicamente preparados por fermentación. Los polímeros preferidos son poli-4-hidroxibutirato. Ejemplos de estos polímeros se producen por Tepha, Inc. de Cambridge, MA utilizando métodos transgénicos de fermentación, y tienen un peso molecular promedio en la región de 50.000 a 1.000.000.

20 B. Fármacos

25 **[0027]** El fármaco usado en una formulación de liberación del fármaco en particular dependerá del tratamiento específico. Los ejemplos describen antibióticos para el tratamiento o prevención de la infección, sin embargo, la utilidad de los polímeros que se muestran aquí no se limita al uso de antibióticos. Otros fármacos que podrían ser potencialmente utilizados en una formulación de liberación de fármaco de los polímeros descritos aquí, incluyen medicina para el tratamiento de enfermedades, lesiones o dolor. El fármaco puede ser una proteína, péptido, polisacárido, molécula de ácido nucleico, o un compuesto orgánico natural o sintético. Estos incluyen, pero no están limitados a, péptidos o proteínas bioactivas, tales como factores de crecimiento, hormonas, y factores de unión celular, agentes anti-proliferativos, antibióticos, quimioterapéuticos, anestésicos, pequeñas moléculas de fármacos, esteroides, enzimas, lípidos, antígenos, anticuerpos, tensioactivos, vitaminas, agentes aromatizantes, moléculas radiactivas, edulcorantes, agentes nutricionales, y fragancias.

30 **[0028]** El porcentaje de carga del fármaco dependerá también del tratamiento específico y la cinética de liberación deseada. Los polímeros son adecuados para cargas de fármaco hasta por lo menos el 33% (es decir, proporciones de polímero a fármaco de 2:1). Cuando los polímeros de PHA que se describen aquí están cargados con fármaco (2:1), las formulaciones de liberación de fármaco se mantuvieron de forma flexible y conservaron sus propiedades mecánicas. Mayores cargas, de hasta 1:1 también se pueden utilizar y muestran buenas propiedades mecánicas. La cinética de liberación deseada también dependerá del tratamiento específico. En una realización deseada, el dispositivo se caracteriza por la liberación del fármaco lineal o de orden cero. En una realización más preferente, el dispositivo no libera una ráfaga del fármaco. El fármaco típicamente se libera durante un periodo de al menos 21 días, al menos un mes, por lo menos tres meses, o al menos seis meses. En general se prefiere una liberación lineal del fármaco. La longitud de tiempo para la liberación del fármaco puede controlarse mediante la selección del fármaco, variando la carga de fármaco y la forma y la configuración del dispositivo de liberación del fármaco. Los ejemplos muestran la liberación casi lineal de los fármacos antibióticos durante un periodo de 18 días. Se espera que el periodo de liberación se extenderá más allá de este periodo de tiempo y se puede variar la configuración del dispositivo.

III. Método de fabricación

35 **[0029]** Los sistemas de administración de fármacos se fabrican preferentemente por un método que dispersa uniformemente el fármaco por el dispositivo, tales como moldeo con disolvente, secado por pulverización y extrusión en estado fundido. También pueden, sin embargo, ser preparados por otros métodos tales como moldeo por compresión y liofilización. Los sistemas de administración podrán adoptar prácticamente cualquier forma, incluyendo gránulos, hojas, películas, y partículas, tales como microesferas, nanoesferas, micropartículas, y microcápsulas, así como formas moldeadas, tales como parches, comprimidos, suspensiones, pastas, barras, discos, pastillas, y otras formas moldeadas. Dispositivos preferidos incluyen microesferas y dispositivos moldeados implantables. Perfiles deseados de liberación pueden estar adicionalmente adaptados mediante la alteración de la forma física del sistema de entrega. (Por ejemplo, mediante la alteración de la superficie o porosidad del dispositivo, o mediante la variación de la proporción de fármaco a polímero.) Otros componentes

también pueden ser introducidos en la formulación como sea necesario para ayudar o mejorar la prestación, la administración, la liberación del fármaco, y/o supervisión.

IV. Método de administración

5 [0030] El método de administración del sistema de suministro de fármacos dependerá del tipo de fármaco y de sus propiedades farmacéuticas conocidas, y la forma, del sistema de suministro. Pequeños dispositivos se pueden implantar; se pueden inyectar microsferas, o como fijar parches a la piel, y tomar oralmente comprimidos, suspensiones y cápsulas por vía oral. Los métodos preferidos de administración son por inyección e implantación.

10 [0031] Como se demuestra en los ejemplos, estos polímeros son particularmente útiles para la construcción de la liberación del fármaco como sistemas con velocidades controlables. También son adecuados para la carga de cantidades significativamente mayores de fármaco dentro de una típica muestra de liberación controlada.

[0032] Ejemplos no limitantes se dan aquí para describir los métodos para preparar los sistemas de suministro de fármacos, y para ilustrar el perfil de liberación prolongada del fármaco y altas cargas de fármaco que se pueden lograr.

EJEMPLO 1: preparación de varillas de PHA4400

15 [0033] PHA4400 en polvo (Tepha, Inc., Cambridge, MA) ($M_w \sim 450$ K) se pesó, se colocó en nitrógeno líquido para hacerlo quebradizo, y se molió tres veces en una mezcladora durante 5 s de duración. Se añadió cloroformo a los gránulos resultantes hasta que se formó una pasta, y luego se añadió un fármaco antibiótico en una proporción de 2:1 de polímero:fármaco en peso. La pasta fue luego introducida en un molde de medidas 150x5x5 mm, y se dejó secar a temperatura ambiente. La formulación moldeada seca fue retirada del molde, y se cortaron secciones de 2 mm de espesor en varillas de dimensiones aproximadas de 2x5x5 mm.

20 [0034] Se prepararon muestras de varillas que contienen dos formas diferentes de antibiótico tetraciclina. Estas fueron una forma de HCl altamente soluble en agua, llamada TC, y una forma neutra, llamada TCN (Fako Pharmaceutical Co., Estambul). Los coeficientes de extinción para estas dos formas se determinaron como 0,117 ($\mu\text{g}/\text{mL}$ - a 364 nm para TC y 0,145 ($\mu\text{g} / \text{ml}$)⁻¹ a 357,6 nm para TCN a 37 ° C. Varillas que contienen relaciones de 10:1 y 5:1 de PHA4400 a fármaco también se prepararon como se describe anteriormente.

25 EJEMPLO 2: Liberación del fármaco a partir de varillas PHA4400

[0035] Una varilla preparada como se describe en el Ejemplo 1 fue pesada previamente y se introdujo en un tubo Falcon de 50 ml que contiene 30 ml de PBS (tampón fosfato) 0,1 M 7.4. pH. El tubo se colocó en un baño de agua con agitación y se mantuvo a 37° C. La liberación del antibiótico se determinó por espectrofotometría UV utilizando los coeficientes de extinción citados en el Ejemplo 1 en 4 horas, 24 horas, y después diariamente con sustitución completa del tampón de liberación con PBS. Los estudios de liberación se llevaron a cabo por triplicado como mínimo para cada antibiótico.

30 [0036] El comportamiento de liberación parecía seguir la cinética de liberación de Higuchi (los valores de k para TC y TCN fueron 7,79 y 2,62, respectivamente) para un período de 11 días liberando sólo una fracción del contenido total, véanse las figuras 3 y 4. TC liberado a una velocidad mayor que la TCN menos soluble en agua. La liberación media acumulada de TC a los 11 días fue de aproximadamente un 25% frente al 9% para TCN, demostrando liberación a largo plazo o sostenida.

35 [0037] La liberación de polímero cargado 10:1 fue también determinada. La liberación de PHA4400 cargado 10:1 con TC mostró una liberación de orden cero durante un período de aproximadamente 15 días, con una ráfaga corta inicialmente menor, posiblemente debido a los restos de cristales de fármaco dejados en la superficie durante el secado. La liberación de TCN no mostró ráfaga, y liberación de orden cero casi perfecta después de la primera hora, con un total de 17% en quince días, lo que indica que la liberación del fármaco continuaría durante varios meses.

40 [0038] La liberación de polímero cargado 05:01 fue similar, con un nivel levemente más alto de liberación y de menor duración en comparación con el sistema cargado 101:1.

EJEMPLO DE REFERENCIA 3: Preparación de varilla de PHA3444

45 [0039] PHA3444 (34% 44) en polvo (Tepha, Inc., Cambridge, MA) ($M_w \sim 477$ K) se pesó, se colocó en nitrógeno líquido para hacerlo frágil, y se molió tres veces en un mezclador durante 5 s de duración. Se añadió cloroformo a los gránulos resultantes, hasta que se formó una pasta, y luego se añadió un fármaco antibiótico en una proporción de 2:1 de polímero:fármaco en peso. La pasta después se introdujo en un molde de medidas 150x5x5 mm, y se dejó secar a temperatura ambiente. La formulación moldeada seca se retiró del molde, y se cortaron secciones de 2 mm de espesor en varillas de dimensiones aproximadas 2x5x5 mm (como en el Ejemplo 2).

[0040] Se prepararon muestras de varillas que contienen dos formas diferentes de antibiótico de tetraciclina. Estas fueron una forma HCl altamente soluble en agua, llamada TC, y una forma neutra, llamado TCN (como anteriormente).

EJEMPLO DE REFERENCIA 4: Liberación de fármaco de varillas de PHA3444-34%

5 [0041] Una varilla preparada como se describe en el Ejemplo 3 cargada 2: 1 con TC o TCN fue pesada previamente y se introdujo en un tubo Falcon de 50 ml que contiene 30 ml de PBS 0,1 M pH 7,4 (tamponada con fosfato). El tubo se colocó en un baño de agua con agitación y se mantuvo a 37 ° C. La liberación del antibiótico se determinó por espectrofotometría UV utilizando los coeficientes de extinción citados en el Ejemplo 1 en 4 horas, 24 horas, y después diariamente con sustitución completa del tampón de liberación con PBS. Los estudios de liberación se llevaron a cabo por triplicado como mínimo para cada antibiótico.

10 [0042] El comportamiento de liberación parecía seguir la cinética de liberación de Higuchi (los valores de k para TC y TCN fueron 17,45 y 5,62, respectivamente) para un período de 18-días liberando sólo una fracción del contenido total, ver figuras 5A y 5B y 6A y 6B. TC se liberó a una velocidad mayor que TCN menos soluble en agua. La liberación media acumulada de TC a los 17 días fue de aproximadamente 65% versus 23% en el caso TCN. No se observó ráfaga de liberación ni con TC ni con TCN.

15 [0043] Se obtuvieron resultados similares con PHA3444-50% (PHA3444 que contiene 50% de monómero 44) polímero PHA cargado 2:1, sin embargo, con una corta ráfaga de liberación de casi 25% del fármaco. Un total del 60% de la TC se libera en 15 días, el 62% en 23 días, con el gráfico de liberación en función del la raíz cuadrada del tiempo produciendo una línea recta como se esperaba de un dispositivo monolítico de liberación. Los resultados no fueron muy diferentes con un PHA3444-23% (PHA3444 que contiene 23% de monómero 44) cargado 2:1 con TC o TCN.

20 **EJEMPLO 5: Efectividad biológica del antibiótico liberado**

[0044] En este ejemplo, las propiedades antibióticas de la tetraciclina liberada de las varillas de PHA se determinó en un ensayo biológico *in vitro* contra *E. coli* DH5a. Para este bioensayo *in vitro*, se utilizó el Método de Difusión en Agar y el tamaño de una zona de eliminación se determinó después de aplicar la solución de antibiótico a una placa petri cultivada con una capa de *E. Coli* DH5a. Todas las etapas de este procedimiento se llevan a cabo bajo condiciones asépticas.

25 [0045] Se preparó Penassay Broth Medium usando los componentes en la Tabla 1. El pH del medio fue. 7,00+- 0,05 y las condiciones de esterilización fueron 121 ° C durante 15 min. Para medios sólidos, se añadió agar (1% p/v) antes de la esterilización. La cepa bacteriana *E. coli* DH5a se inoculó en 200 ml de caldo de cultivo, se agitó durante la noche a 37 ° C a 200 rpm en un agitador orbital. Inocular 200 mL de bacterias a las placas que contienen Penassay Broth Médium sólido.

Tabla 1: Componentes de Penassay Broth Médium.

COMPONENTE	CANTIDAD (g/l)
Extracto Bovino Bacto	1.5
Extracto Levadura Bacto	1.5
Bacto Peptona	5.0
Bacto Dextrosa	1.0
NaCl	3.5
K ₂ HPO ₄	3.68
KH ₂ PO ₄	1.32

30 [0046] Al día siguiente, las soluciones de TC (25 µL), recogidas en los días primero, séptimo y decimocuarto (producto de liberación de las últimas 24 horas) y esterilizadas mediante un microfiltro, se aplicaron a discos de filtro estériles. Dos discos con soluciones de TC se colocaron en cada placa y se mantuvieron a 37 ° C durante 24 horas. El radio de la zona de eliminación se determinó en mm. Los resultados se muestran en la Tabla 2. Los resultados para las zonas de eliminación para la tetraciclina liberada de varilla hecha de PHA3444-23% y polímeros PHA3444-50% fueron similares a los del polímero PHA3444-34%, pero no se muestran en la Tabla 2

Control negativo: Se aplica buffer de 25 microlitros que no contiene ningún fármaco en la placa de Petri.

Control Positivo: Se aplican buffer de 25 microlitros conteniendo 10 mg TC/ml en la placa de Petri.

Los polímeros ensayados incluyen PHA4400 y PHA3444 34-%. La relación de polímero a antibiótico Tetraciclina en las varillas de muestra de ensayo se proporciona bajo cada muestra de polímero.

5 Tabla 2: Resultados del ensayo Antibiograma

Tiempo (días)	Radio de la zona (mm)				
	PHA4400 10:1	PHA4400 5:1	PHA3444-34% 2:1	Control positivo	Control negativo
1	10	12	15	20	0
7	9	11	12		
14	6	6	10		

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un dispositivo biodegradable de administración controlada de fármaco que comprende fármaco distribuido uniformemente en homopolímero poli-4-hidroxibutirato, en el que el fármaco se incorpora en el polímero en un porcentaje de carga de hasta 50% en peso del dispositivo y menos del 60% del fármaco es liberado *in vitro* en buffer fosfato 0,1 M, pH 7,4 a 37 ° C después de 10 días.
2. El dispositivo de suministro de fármaco de la reivindicación 1, en donde menos del 35% del fármaco se libera *in vitro* en buffer fosfato 0,1 M, pH 7,4 a 37 ° C después de 10 días.
3. El dispositivo de suministro de fármaco de la reivindicación 1 en el que el fármaco se selecciona del grupo que consiste en proteínas, péptidos, polisacáridos, moléculas de ácido nucleico, y compuestos orgánicos sintéticos o naturales.
- 10 4. El dispositivo de suministro de fármaco de la reivindicación 3 en el que el fármaco es un antibiótico.
5. El dispositivo de suministro de fármaco de la reivindicación 1 en el que el medicamento está revestido sobre un dispositivo médico.
6. El dispositivo de suministro de fármaco de la reivindicación 1 en el que el poli-4-hidroxibutirato está formado en o revestido sobre un stent.
- 15 7. El dispositivo de suministro de fármaco de la reivindicación 1 en una forma seleccionada del grupo que consiste en gránulos, láminas, películas, partículas, y formas moldeadas.
8. El dispositivo de suministro de fármaco de la reivindicación 1, en el que el dispositivo muestra liberación lineal o liberación de orden cero del fármaco.
- 20 9. El dispositivo de suministro de fármaco de la reivindicación 1 en el que el dispositivo es fabricado por colada de disolvente, atomización, o extrusión en estado fundido.
10. El dispositivo de suministro de fármaco de la reivindicación 1 en el que el dispositivo no libera una ráfaga de fármaco.
11. El dispositivo de suministro de fármaco de la reivindicación 1 en el que el dispositivo libera fármaco durante al menos 21 días, al menos un mes, al menos tres meses o al menos seis meses.
12. Un dispositivo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para su uso en la administración de fármacos.
- 25 13. El dispositivo de suministro de fármaco de cualquier reivindicación precedente en el que el fármaco se selecciona de péptidos o proteínas bioactivos, tales como factores de crecimiento, hormonas, y factores de unión celular, agentes anti-proliferativos, antibióticos, quimioterapéuticos, anestésicos, pequeñas moléculas de fármaco, esteroides, enzimas, lípidos, antígenos, anticuerpos, agentes tensioactivos, vitaminas, agentes aromatizantes, moléculas radiactivas, edulcorantes, agentes nutricionales, y fragancias.

Figura 1A. Estructura química del poli-4-hidroxibutirato (PHA4400).

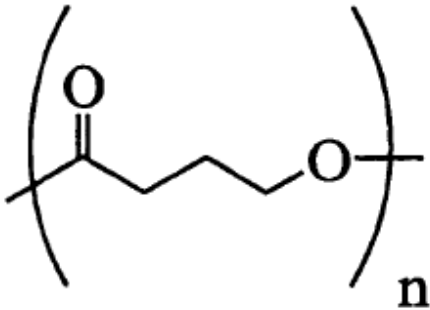


Figura 1B. Estructura química del poli-3-hidroxibutirato-co 4-hidroxibutirato (PHA3444).

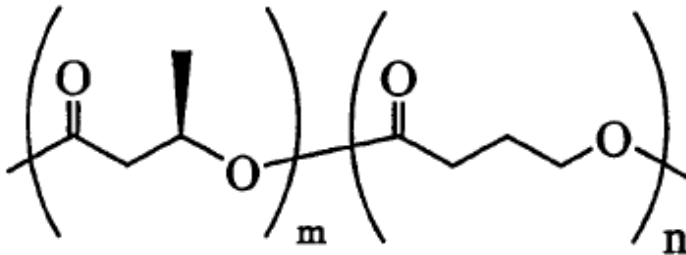


Figura 2. Vías biosintéticas para la producción de PHA4400 (P4HB). Enzimas de ruta son: 1. Deshidrogenasa semialdehído succinil, 2. 4-hidroxibutirato deshidrogenasa, 3. oxidorreductasa diol, 4. aldehído deshidrogenasa, 5. Coenzima A transferasa y 6. PHA sintetasa.

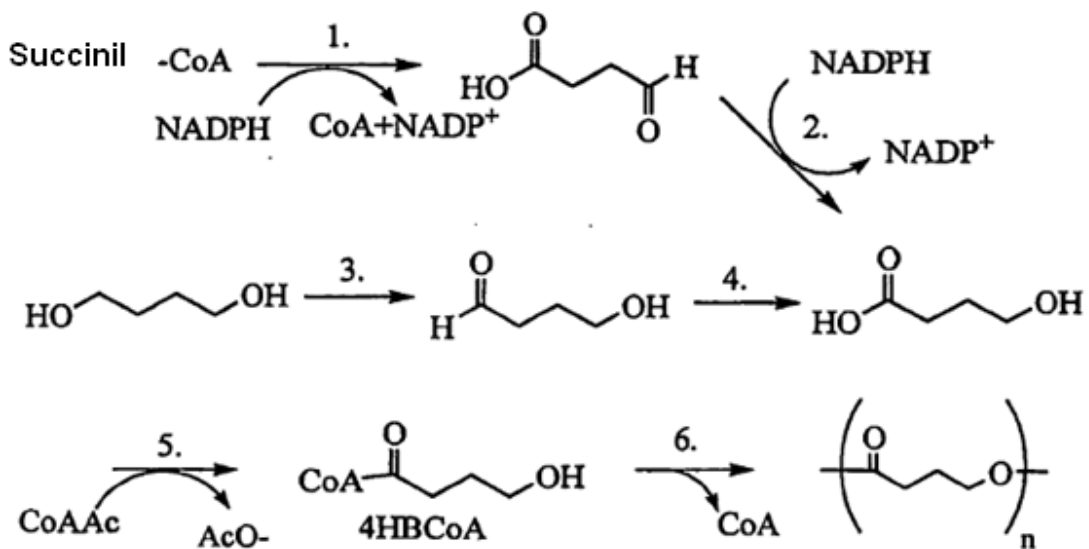


Figura 3A.

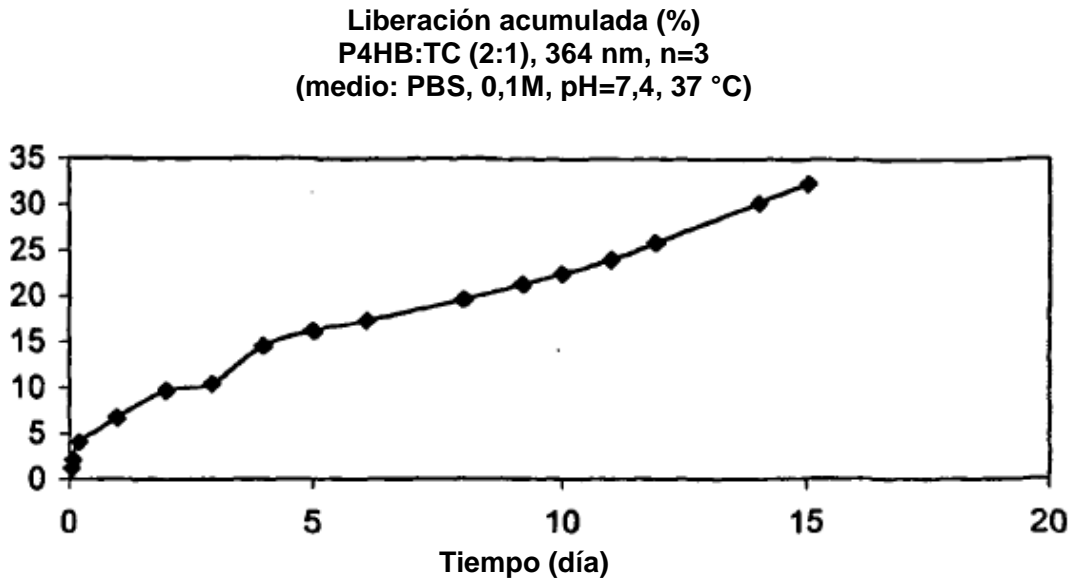


Figura 3B.

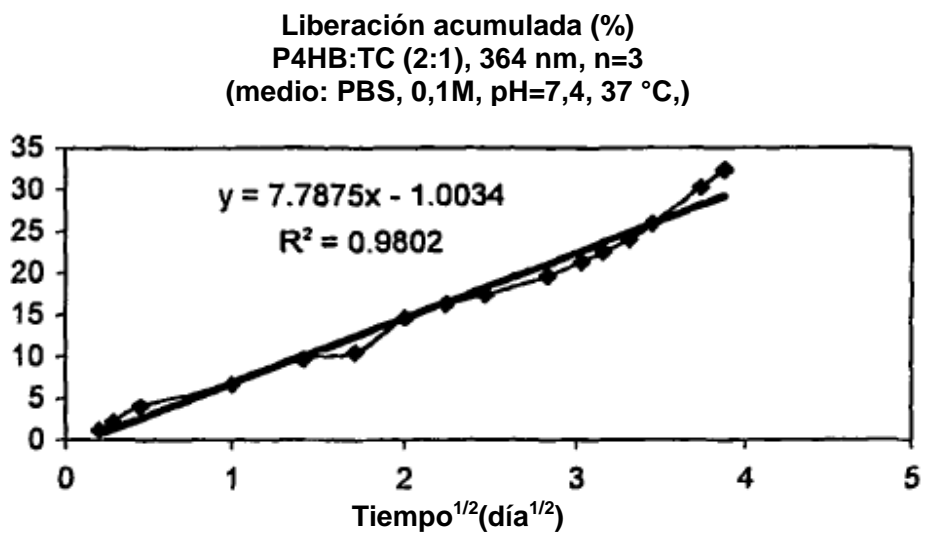


Figura 4A.

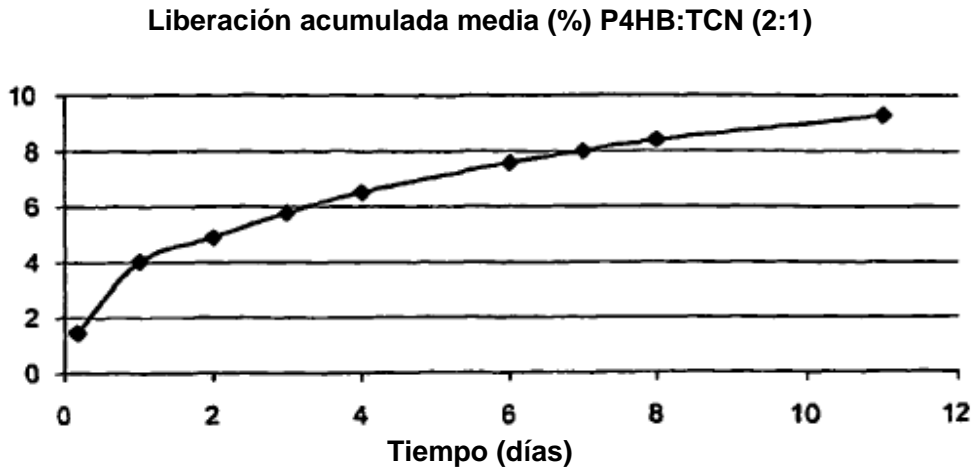


Figura 4B.

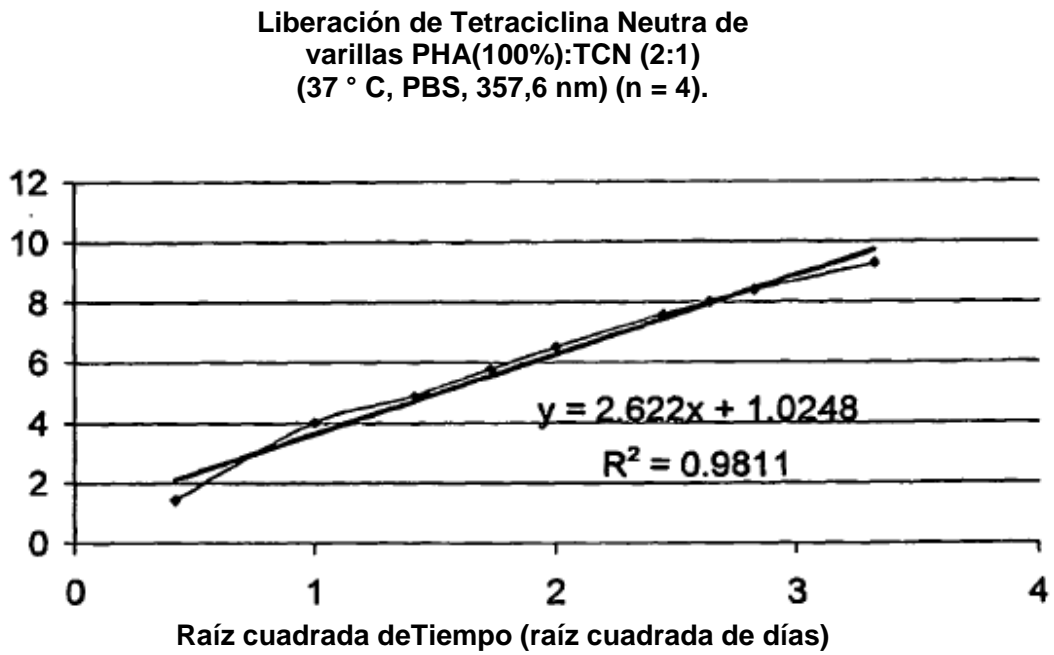


Figura 5A.

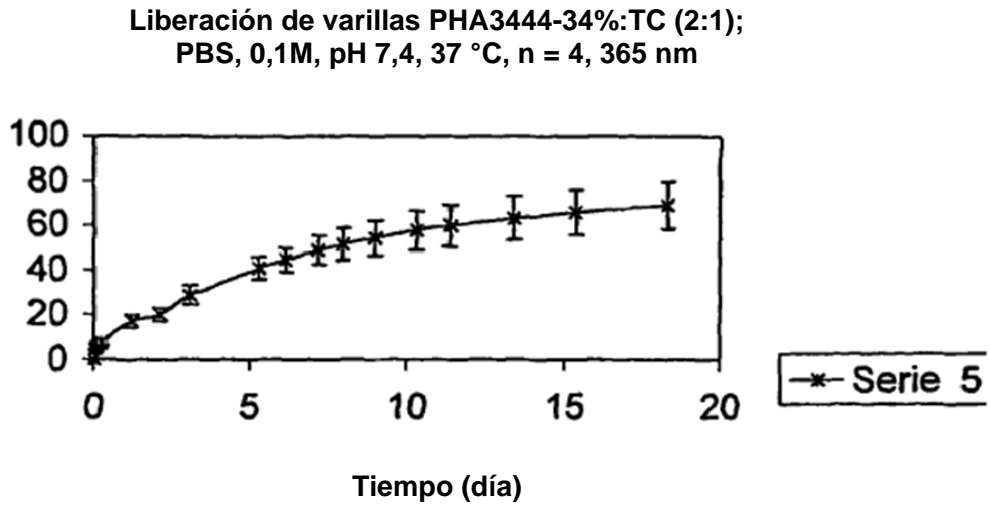


Figura 5B.

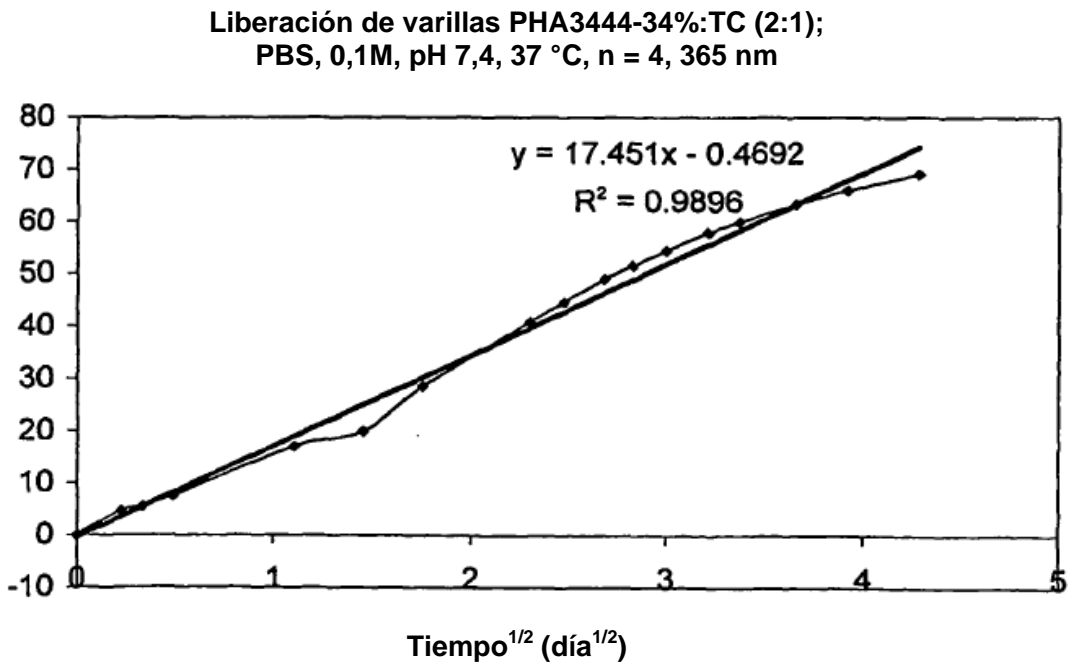


Figura 6A

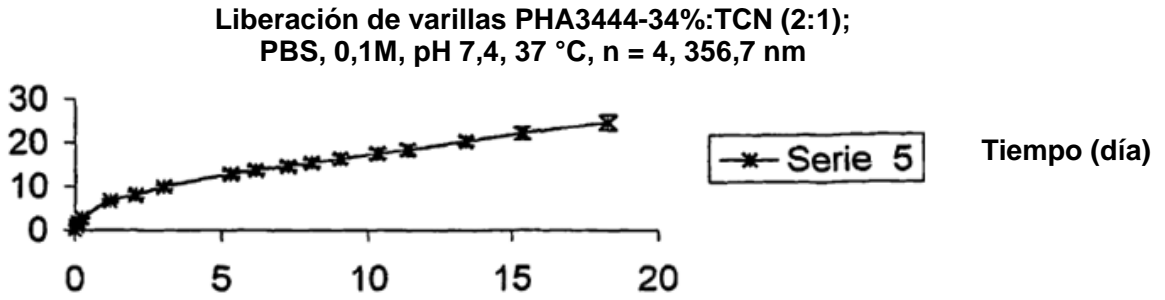


Figura 6B

