

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 940**

51 Int. Cl.:

A61K 9/16 (2006.01)

A61K 9/50 (2006.01)

A61K 31/727 (2006.01)

A61K 38/28 (2006.01)

A61K 9/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.11.2008** **E 08850798 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2013** **EP 2219611**

54 Título: **Formas farmacéuticas para la liberación de compuestos activos**

30 Prioridad:

14.11.2007 EP 07380319

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.04.2013

73 Titular/es:

LABORATORIOS FARMACEUTICOS ROVI, S.A.
(100.0%)
C/JULIAN CAMARILLO 35
28937 MADRID, ES

72 Inventor/es:

LÓPEZ-BELMONTE ENCINA, IVÁN y
GUTIERRO ADURIZ, IBON

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 401 940 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

Formas farmacéuticas para la liberación de compuestos activos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a formas farmacéuticas para la liberación de compuestos activos para su absorción por la vía mucosa después de su administración, a formulaciones farmacéuticas que contienen dichas formas farmacéuticas y al uso de dichas formas farmacéuticas y dichas formulaciones para la fabricación de un medicamento aplicable a las mucosas.

Antecedentes de la invención

10 Un problema que se ha planteado en los últimos años en el sector farmacéutico es la existencia de una gran variedad de compuestos activos que se caracterizan fundamentalmente, porque no pueden administrarse por vía oral.

Las causas principales por las que estos compuestos no pueden ser administrados por esta vía son:

- su rápida degradación enzimática y metabólica,
- su inestabilidad química y biológica,
- 15 - su baja solubilidad en medio acuoso o,
- su limitada permeabilidad en el tracto gastrointestinal.

Algunos de los ejemplos de este tipo de compuestos activos que presentan estos problemas son:

- macromoléculas de tipo peptídico como insulina, interferones o calcitoninas,
- macromoléculas de tipo sacárido como heparina o, heparinas y derivados tales como HBPM (Heparinas de
- 20 - Bajo Peso Molecular), pentasacáridos
- otro tipo de moléculas hidrófilas más pequeñas como salbutamol o aciclovir.

25 Es necesario considerar que, aunque algunos de estos compuestos pueden ser administrados por vía oral, tienen una absorción gastrointestinal muy baja y/o muy errática, lo que plantea un grave problema para la comercialización de este tipo de fármacos, ya que los resultados obtenidos difieren enormemente de los esperados debido a este comportamiento en los procesos farmacocinéticos LADME (Liberación, Absorción, Distribución, Metabolización y Eliminación). Adicionalmente, estas macromoléculas tienen un carácter hidrófilo y son permeables muy débilmente, lo que condiciona una baja absorción por vías mucosas que, en el caso de la vía oral, es todavía peor, dado que estas macromoléculas tienen que pasar a través del estómago.

30 Como cualquier estructura celular, la mucosa digestiva permite fácilmente que pequeñas moléculas lipófilas pasen a través de ella, pero es muy impermeable a macromoléculas hidrófilas cargadas. Adicionalmente, este aspecto se amplifica por el hecho de que el tubo digestivo está revestido con una mucosa cargada negativamente, que tiene una tendencia natural a repeler las moléculas de la misma carga.

35 Un claro ejemplo de un compuesto activo cuya absorción está limitada por vía oral es la heparina, dado que después de su administración por vía oral, la absorción a través de la mucosa digestiva no estará limitada por su solubilidad, sino por su baja permeabilidad con respecto a la membrana intestinal, debida principalmente a su carga negativa. La permeabilidad de las heparinas a través del epitelio digestivo es, por tanto, muy baja, lo que hace muy difícil la administración de heparina/formulaciones que contienen heparina por vía oral.

40 Por este motivo, la vía de administración elegida en la mayoría de las clases de compuestos mencionadas anteriormente es la vía de administración parenteral, principalmente por medio de inyecciones intramusculares o subcutáneas. En la actualidad, algunos de estos compuestos se administran incluso por medio de formulaciones nasales y pulmonares como en el caso de la insulina o la calcitonina de salmón [Alpar, H. J.; Somavarapu, S.; Atuah, K. N.; Bramwell, V. W. Adv. Drug Deliv. Rev. 2005, 57, 411-430; Paltz, R. M.; Patton, J. S.; Foster, L.; Mohammed, E. Solicitud de EE.UU. N.º: 355578].

45 No obstante, un problema planteado por estas vías de administración es que, en la mayoría de los casos, estos tratamientos requieren largos periodos de terapia como, por ejemplo, en algunos tipos de diabetes, para los que se necesita tratamiento de por vida, siendo la frecuencia de administración diaria. Esto conlleva una gran desventaja, principalmente para el paciente y por este motivo es importante buscar vías alternativas. Fundamentalmente, la vía oral, que es la más cómoda para el paciente y la más económica, debería corresponderse con la preferida. Sin embargo, para este tipo de moléculas (principalmente para oligosacáridos y proteínas), el diseño de formulaciones preparadas para ser administradas por vía oral conlleva un problema e implica muchas complicaciones, dado que el

50 tracto gastrointestinal degrada estos compuestos activos. Esto significa que deberían formularse para permitir, en primer lugar, que la forma farmacéutica pase por el estómago sin degradar el compuesto activo y que, una vez que alcanza la mucosa de absorción óptima, libere una gran cantidad de este compuesto activo selectivamente en la pared de la mucosa en un intervalo de tiempo relativamente breve, de manera que se obtenga la actividad terapéutica o preventiva deseada.

En las últimas décadas, se han desarrollado numerosos vehículos diseñados para aumentar la biodisponibilidad sistémica después de la administración mucosal de numerosos compuestos activos tradicionalmente poco absorbibles, entre los que los autores de la invención pueden resaltar compuestos proteínicos tales como insulina [Norovirus capsid protein expressed in yeast forms virus-like particles and stimulates systemic and mucosal immunity in mice following an oral administration of raw yeast extracts. Xia y cols. *Journal of Medical Virology* (2006), fecha del volumen 2007, 79(1), 74-83; Delivery systems and adjuvants for oral vaccines. *Opinion on Drug Delivery* (2006), 3(6), 747-762; Gastrointestinal absorption of heparin by lipidization or coadministration with penetration enhancers. Ross y cols. *Current Drug Delivery* (2005), 2(3), 277-287]; antígenos [Gastrointestinal absorption of heparin by lipidization or coadministration with penetration enhancers. Ross, Benjamin y cols. *Current Drug Delivery* (2005), 2(3), 277-28; Oral heparin: status review. Arbi y cols. *Thrombosis Journal* (2006)] y anticuerpos, así como polisacáridos como heparinas no fraccionadas y heparinas de bajo peso molecular [Ximelagatran. Choudhury y cols. *Drugs of Today* (2006), 42(1), 3-19].

Dentro de las líneas de investigación desarrolladas con el fin de obtener vehículos diseñados para aumentar la biodisponibilidad sistémica después de la administración mucosal de numerosos compuestos activos que son tradicionalmente poco absorbibles, se incluyen las siguientes:

- Diseño de profármacos [Prodrug strategies to enhance the intestinal absorption of peptides. Gangwar y cols. *Drug Discovery Today* (1997), 2(4), 148-155].
- Uso de inhibidores del metabolismo de enzimas [Pharmacokinetic enhancement of protease inhibitor therapy. King y cols. *Clinical Pharmacokinetics* (2004), 43(5), 291-310].
- Desarrollo de promotores de absorción [patente EP1652836; patente IS-200602146].
- Desarrollo de dispositivos mucoadhesivos como sistemas bioadhesivos o parches intestinales [Oral delivery of macromolecules using intestinal patches: applications for insulin delivery. *Journal of Controlled Release* (2004), 98(1), 37-45].
- Desarrollo de sistemas de partículas.

Los sistemas bioadhesivos son estructuras de tamaño relativamente grande que se adhieren a la mucosa intestinal después de su administración por vía oral, incrementando significativamente el tiempo de tránsito intestinal de la formulación. Análogamente, estos dispositivos evitan, en gran medida, la necesidad de que los compuestos activos se difundan a través del entorno luminal o incluso a través de la mucosa que reviste el epitelio de absorción.

Un ejemplo de estos sistemas es el desarrollo de parches bioadhesivos, desarrollados por primera vez para la absorción sistémica de compuestos activos en el intestino por Eaimtrakarn y cols. [Retention and transit of intestinal mucoadhesive films in the rat small intestine. Eaimtrakarn y cols. *International Journal of Pharmaceutics* (2001), 224, 61-67] que consisten en un dispositivo de cuatro capas: (I) una película de revestimiento formada por un polímero insoluble en agua que protege los principios activos de las proteínas de la degradación luminal, (II) una superficie constituida por un polímero sensible al pH intestinal, (III) una película intermedia que lleva el compuesto activo y (IV) una película bioadhesiva colocada entre la película intermedia y los revestimientos superficiales diseñada para generar un alto gradiente de concentración entre el parche y los enterocitos intestinales.

Sin embargo, estos dispositivos se ven enormemente afectados por procesos fisiológicos de recambio de células y mucosas en el epitelio de absorción. Por este motivo el uso de estos dispositivos todavía no ha conseguido evitar el grave problema de la variabilidad entre administraciones, tanto en relación con el lugar de adhesión como en relación con el tiempo de contacto de la formulación con la membrana de absorción.

Para resumir lo anterior, la investigación actual en farmacología (basada en sistemas de partículas) se centra en dos áreas diferentes pero complementarias: sistemas de direccionamiento y de liberación controlada.

El perfil de liberación del compuesto activo depende de numerosos parámetros: tamaño, distribución, porosidad, degradación, permeabilidad del polímero, etc.

La administración de un fármaco libre por vía oral, intravenosa, etc., da lugar normalmente a una distribución sistémica del compuesto activo, cuando lo que resulta afectado es solamente un tejido, un área local o un tipo de célula. Desde esta perspectiva, tendría mucho más sentido conseguir una acción dirigida del fármaco, especialmente para aquellos compuestos con alta toxicidad (por ejemplo, anticarcinógenos) o para los que tienen un bajo índice terapéutico. Por ejemplo, la administración a través de estos sistemas de liberación de partículas implica una mejora en la administración de los agentes anestésicos, reduciendo el número necesario de dosis, evitando los efectos tóxicos sistémicos y aumentando su concentración en el sitio deseado [Le Corre, P., Rytting, J. H., Gajan, V., Chevanne, F., Le Verge, R., J. *Microencapsulation*, 14 (1997) 243; Blanco, M. D., Bernardo, M. V., Gómez, C., Muñiz, E., Teijón, J. M., *Biomaterials*, 20 (1999) 1919; Estebe, J. P., Le Corre, P., Chevanne, F., Malljgant, Y., Le Verge, R., *Anesth. Analg.* 81 (1995) 99].

El otro canal de investigación mencionado anteriormente en este campo son sistemas de liberación controlada. Se forman vectores de partículas por medio de elementos poliméricos que controlan la liberación y/o absorción del compuesto activo a través de diferentes mecanismos, entre los que los más característicos son la difusión del

compuesto activo a través de los poros o canales formados en la matriz polimérica y la degradación/erosión del material polimérico.

La patente de los EE.UU. US 6.475.493 desvela formulaciones de liberación controlada a pH ácido y la liberación rápida en medios básicos, con revestimientos acuosos de núcleos que comprenden, en mezcla heterogénea: a) al menos un polímero insoluble en agua en una proporción del 75 % en peso del revestimiento; b) un polímero soluble en agua entérico a pH mayor que 6,0 en una proporción del 1 al 25 % en peso del revestimiento y c) un polímero soluble en agua.

La degradación heterogénea del material polimérico tiene lugar en la superficie del material que está en contacto con el medio fisiológico. En este caso, la tasa de degradación es constante y el material no degradado mantiene su integridad química durante el proceso. Lógicamente, aquellos materiales con alta relación superficie/volumen se degradarán más deprisa que los equivalentes con una relación menor.

La degradación homogénea implica un deterioro al azar a lo largo de la masa polimérica. Mientras el peso molecular del polímero disminuye continuamente, el material puede mantener su forma original y conservar su masa hasta que el polímero haya experimentado una degradación considerable (más incluso que el 90 %) y alcance un peso molecular crítico; en ese instante comienza la solubilización y la pérdida de masa [Sáez y cols. *Liberación Controlada de Fármacos. Revista Iberoamericana de Polímeros. Vol 5(1). 2004*].

La solicitud de patente US-2005/0020539 A1 desvela composiciones farmacéuticas y procedimientos de preparación para la administración oral de heparina para su liberación selectiva en el intestino, que comprende una estructura de múltiples matrices que comprende a) una matriz interna de compuestos anfífilos y compuestos lipófilos en la que el compuesto activo está integrado al menos parcialmente y b) una matriz externa hidrófila en la que se dispersa la matriz a).

Para que las partículas tengan la actividad deseada, debería favorecerse la degradación homogénea en toda la masa polimérica al objeto de conseguir una liberación adecuada, además, debería favorecerse un potencial superficial adecuado de manera que las partículas se aproximen a la mucosa de absorción. En la actualidad el esfuerzo de grandes empresas multinacionales en el sector farmacéutico se centra en el desarrollo de sistemas coloidales con tamaño de partícula reducido, como una estrategia para aumentar la biodisponibilidad sistémica de compuestos activos.

En la literatura científica y en el estado de la técnica de las patentes se conoce bien el modo en que un tamaño de partícula reducido aumenta significativamente la dispersión del compuesto activo en una gran superficie luminal, favoreciendo una liberación controlada del fármaco [Potential of polyester microparticles for the sustained release of oral vaccine. Benoit, M. y cols. *Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, 1st, Budapest, 9-11 de mayo de 1995* (1995), 431-2], reduciendo las concentraciones locales de compuesto activo y permitiendo una mucoadhesión elevada [Preparation of thiomers microparticles and in vitro evaluation of parameters influencing their mucoadhesive properties. Albrecht, K.; y cols. *Drug Development and Industrial Pharmacy* (2006), 32 (10), 1149-1157], así como el paso sistémico de partículas enteras [Intestinal absorption of PLGA microspheres in the rat. Damge, C. y cols. *Journal of Anatomy* (1996), 189(3), 491-501] que liberan el compuesto activo de una forma controlada. Estudios realizados por numerosos autores revelan el potencial mostrado por estos dispositivos para mejorar la absorción intestinal de moléculas poco absorbibles, así como para mostrar la importancia del pequeño tamaño de las partículas en la absorción intestinal [Transmucosal macromolecular drug delivery. Prego, C. y cols. *Department Journal of Controlled Release* (2005), 101 (1-3), 151-162; Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle size. Desai y cols. *Pharmaceutical Research* (1996), 13(12), 1838-1845].

Estos sistemas coloidales incluyen micropartículas [Polymeric nano- and microparticle technologies for oral gene delivery. Bhavsar y cols. *Expert Opinion on Drug Delivery* (2007), 4(3), 197-213]; nanopartículas [Lectin-modified solid lipid nanoparticles as carriers for oral administration of insulin. Hang y cols. *International Journal of Pharmaceutics* (2006), 327(1-2), 153-159]; formación de complejos [Stable pharmaceutical formulations comprising macromolecular carriers and methods of use thereof. Tan y cols. WO2007021970] y liposomas [Investigation of lectin-modified insulin liposomes as carriers for oral administration. Zhang y cols. *International Journal of Pharmaceutics* (2005), 294(1-2), 247-259] entre otros.

- Las **micropartículas** son partículas esféricas o no esféricas, con diámetros preferidos inferiores a 125 µm. Este grupo incluye microcápsulas, que se definen como sistemas vesiculares en los que el fármaco está confinado a una cavidad rodeada por una única membrana (normalmente polimérica); y microesferas, que son sistemas matriciales en la forma de partículas esféricas con un tamaño entre uno y varias docenas de micrómetros, sin distinción entre revestimiento y núcleo, en las que el fármaco se disuelve o se dispersa en una matriz formada por materiales de soporte, generalmente polímeros biocompatibles y con un gran espectro de velocidades de liberación y propiedades degradativas [Torrado, J. J., Cadórniga, R., *Vectorización, CIF, 8* (1989a) 242]. El fármaco es liberado a través de diversos mecanismos, entre los que puede mencionarse la erosión superficial, la degradación/disolución de los materiales de matriz, la difusión y una combinación de difusión y erosión y erosión o degradación [Torrado, J. J., Cadórniga, R., *Farm. Clin.*, 6 (1989b) 724].

- Las **nanopartículas** son sistemas de partículas submicrométricas ($< 1 \mu\text{m}$). Dependiendo del procedimiento usado para preparar las nanopartículas, pueden obtenerse nanocápsulas o nanoesferas, siendo estas los equivalentes morfológicos de las microcápsulas y las microesferas, respectivamente [Rollot, J. M., Couvreur, P., Roblot-Treupel, L., Puisieux, F., J. Pharm. Sci., 75 (1986). 361-364].

El artículo "Oral bioavailability of a low molecular weight heparin using a polymeric delivery system", Journal of Controlled Release 2006, 113, 38 describe nanopartículas formadas por una técnica de múltiple emulsión y evaporación de solvente, que contiene una dispersión de tinzaparina en una matriz polimérica de poli(ϵ -caprolactona) y Eudragit RS que contiene polialcohol vinílico como tensioactivo.

El artículo "Microencapsulation of Low Molecular Weight heparin in Polymeric Particles Designed with Biodegradable and Nonbiodegradable Polycationic Polymers", Drug Delivery 2003, 10, 1 describe micropartículas formadas por el procedimiento de emulsión de agua/aceite/agua y evaporación de solvente, que contienen heparina de bajo peso molecular, polímeros biodegradables como poli(ϵ -caprolactona) o poli(D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico) y polímeros policationicos no biodegradables como Eudragit[®] RS o Eudragit[®] RL o Eudragit[®] RS: combinaciones de poli(ϵ -caprolactona); Eudragit[®] RS: poli(D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico); Eudragit[®] RS: Eudragit[®] RL: poli(D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico) en el que los polímeros están presentes en igual proporción. Debido a la naturaleza hidrófila de la sustancia activa (heparina de bajo peso molecular (HBPM)) se induce una difusión importante de la sustancia activa a través de la fase acuosa continua durante el procedimiento de emulsión y solidificación. Por este motivo, las partículas resultantes tienen una distribución variable de la sustancia activa a través de la partícula, teniendo siempre, en una mayor o menor proporción, acumulación de sustancia activa en la superficie, tal como se muestra en imágenes de microscopia confocal de barrido láser (Fig. 1 de referencia). Teniendo en cuenta que son partículas de pequeño tamaño que tienen una superficie de contacto específico alta con los ácidos gástricos y las enzimas, este aspecto significa que parte de los compuestos activos se pierde en su paso a través del estómago. Además, los sistemas de micropartículas, que conllevan intrínsecamente un contenido bajo de sustancia activa, tienen un menor rendimiento de encapsulación que las partículas de mayor tamaño. Por tanto, la cantidad de sustancia activa que pueden incorporar es pequeña.

La solicitud de patente US 2005/0013866 A1 (cuyos inventores son coautores del artículo mencionado en el párrafo anterior) desvela nanopartículas y micropartículas para la administración oral de heparinas, péptidos y proteínas, ácidos nucleicos y hormona del crecimiento, formados a partir de una matriz polimérica que comprende al menos un polímero biodegradable con al menos un polímero policationico. El polímero biodegradable puede seleccionarse a partir de poliésteres, poli- ϵ -caprolactona, polianhídridos, poliamidas, poliuretanos, poliacetales, poliortoésteres y polímeros naturales y el polímero policationico puede seleccionarse a partir de derivados de celulosa, copolímeros de ésteres de ácidos acrílico y metacrílico tales como cloruro de metacrilato de trimetilamoniometilo, quitosano y derivados y polilisina. Las partículas se obtienen por formación de una emulsión de agua/aceite/agua.

La solicitud de patente internacional WO 2005/032703 describe un dispositivo y un procedimiento para fabricar partículas. El procedimiento implica la formación de una emulsión por homogeneización de una fase orgánica que comprende una sustancia activa, un polímero y un solvente y una fase acuosa que comprende un tensioactivo. El solvente presente se extrae para obtener una suspensión de partículas a partir de la que se aíslan dichas partículas. En uno de los ejemplos la sustancia activa es heparina y el polímero es PLGA y Eudragit RS. Las partículas tienen un diámetro medio de 23 μm .

La gran ventaja de estos sistemas de micro- y nanopartículas en comparación con soluciones alternativas tales como implantes es que, debido a su pequeño tamaño, pueden inyectarse con una jeringa convencional, sin requerir intervención quirúrgica. Por otra parte y aunque parezca paradójico, puede ser más fácil introducir una microesfera en una célula que para el fármaco libre, dado que una nanopartícula o micropartícula de tamaño adecuado se incorpora fácilmente como una vacuola a través de fagocitosis.

Estos sistemas son muy interesantes como vehículos de fármacos que no pueden ser administrados con garantía por vía oral, como los nuevos fármacos de proteínas, péptidos, hormonas o enzimas que son el producto de la revolución biotecnológica y que se degradan fácilmente por las enzimas del tracto gastrointestinal. Además, se han descrito y ensayado clínicamente sistemas de micropartículas poliméricos que incorporan anticarcinógenos [Wood, R. W., Li, V. H. K., Kreuter, J., Robinson, J. R., Int. J. Pharm., 23 (1985) 175]; inmunosupresores [Yoshikawa, H., Nakao, Y., Takada, K., Muranishi, S., Wada, R. T., Tabata, Y., Hyon, S. H., Ikada, Y., Chem. Pharm. Bull., 37 (1989) 802]; vitaminas [Sánchez, A., Vila-Jato, J. L., Alonso, M. J., Int. J. Pharm., 99 (1993) 263]; antibióticos, agentes antibacterianos [Sánchez, A., Vila-Jato, J. L., Alonso, M. J., Int. J. Pharm., 99 (1993) 263]; antiinflamatorios [Dubemet, C., Benoit, J. P., Couarraze, G., Duchêne, D., Int. J. Pharm., 35 (1987) 145] y vacunas [Eldrige, J. H., Staas, J. K., Meulbroeck, J. A., McGhee, J. R., Tice, T. R., Gilley, R. M., Mol. Immunol., 28 (1991) 287] con muy buenos resultados.

Entre todos ellos, las nanopartículas (vectores de partículas con un diámetro inferior a 1 μm) han mostrado el mayor potencial debido principalmente a las ventajas conferidas por su reducido tamaño [Nanoencapsulation. II. Biomedical applications and current status of peptide and protein nanoparticulate delivery systems. Reis y cols. Nanomedicine (2006), 2(2), 53-65]. Estos dispositivos pueden prepararse usando polímeros como albúmina, etilcelulosa, gelatina,

caseína, poliésteres, polianhídridos, polialquilcianoacrilatos y polímeros naturales, entre otros [Polymeric nano- and microparticle technologies for oral gene delivery. Bhavsar y cols., *Expert Opinion on Drug Delivery* (2007), 4(3), 197-213; Starch microparticles as vaccine adjuvant. Rydell y cols. *Expert Opinion on Drug Delivery* (2005), 2(5), 807-828] a través de procedimientos como evaporación/extracción de solvente [Polymeric nano- and microparticle technologies for oral gene delivery. Bhavsar y cols. *Expert Opinion on Drug Delivery* (2007), 4(3), 197-213]; polimerización interfacial; coacervación simple [Polymeric coacervate microparticles useful for the sustained release administration of therapeutic agents. Heller, Phillip F. WO2006023207; Encapsulation of adenoviral vectors into chitosan-bile salt microparticles for mucosal vaccination. Lameiro y cols. *Journal of Biotechnology* (2006), 126(2), 152-162], coacervación compleja [Chitosan: An Attractive biocompatible polymer for macroencapsulation. C. Peniche y cols. *Macromolecules Bioscience*, (2003) 3, 511-520; Tramadol release from delivery system based on alginate-chitosan microcapsules. Acosta y cols. *Macromolecules Bioscience*, (2003) 3, 546-551] y precipitación de fluidos supercríticos [Drug delivery applications of supercritical fluid technology. Sunkara y cols. *Drug Delivery Technology* (2002), 2(1), 44, 46-50], entre otros.

Las ventajas otorgadas por el reducido tamaño de partícula en el aumento de la absorción de moléculas poco permeables a través de la barrera mucosa pueden encontrarse en numerosas publicaciones en la literatura científica [Mucoadhesive nanoparticulate systems for peptide drug delivery. Takeuchi y cols. *Advanced Drug Delivery Reviews* (2001), 47, 39-54; Enteral absorption of insulin in rats from mucoadhesive chitosan-coated liposomes. Takeuchi y cols. *Pharmaceutical Research* (1996), 13, 896-901].

La investigación realizada por Morishita y cols. [Mucosal insulin delivery systems based on complexation polymer hydrogels: effect of particle size on insulin enteral absorption. Morishita y cols. *Journal of Controlled Release* (2004), 97, 115-124] muestra claramente el grado en el que la reducción en el tamaño de partícula aumenta la biodisponibilidad sistémica de insulina cuando las formulaciones se administran intestinalmente. De acuerdo con las observaciones publicadas por estos autores, una reducción en el tamaño de partícula de 180-230 μm a $< 43 \mu\text{m}$ produce un aumento de 18 veces en la biodisponibilidad de la insulina administrada, pasando de una biodisponibilidad sistémica (relativa a la vía subcutánea) del 0,7 % al 12,8 %.

Sin embargo, estos sistemas de partículas de menor tamaño tienen una serie de inconvenientes; por ejemplo, para las microesferas, el obstáculo principal para conseguir sistemas parenterales eficaces es la degradación y la subsiguiente eliminación no específica por los sistemas reticuloendoteliales, a pesar de que se han realizado intentos para modificar estos sistemas apropiadamente [Davis, S. S., Illum, L., *Colloidal delivery systems – Opportunities and challenges. Site-Specific Drug Delivery*, E. Tomlinson, S. S. Davis (eds.), pág. 93-110 (1986), John Wiley & Sons Ltd.; RU], este aspecto empeora en el caso de la administración por vía oral, ya que en este caso se ha verificado el modo en que la degradación en el pH ácido del estómago hace que el compuesto activo alcance el sitio en el que debería ser absorbido en cantidades muy pequeñas, lo que produce pérdidas de hasta el 90 % en la actividad *in vitro*.

Para los sistemas de transporte conjugados poliméricos, su baja solubilidad provoca en general problemas en su preparación [Duncan, R., Kopeckova-Rejmanova, P., Strohmalm, J., Hume, I., Cable, H. C., Pohl, J., Lloyd, B., Kopecek, J., *Br. J. Cancer*, 55 (1987) 165-174.; Endo, N., Umemoto, N., Kato, Y., Takeda, Y., Hara, T., *J. Immunol. Methods*, 104 (1987) 253-258] y en su inyección en el torrente sanguíneo [Zunino, F., Pratesi, G., Micheloni, A., *J. Control. Rel.*, 10 (1989) 65-73].

Otras formas de liberación de compuestos activos son micelas que, aunque son uno de los sistemas menos estudiados, basan su actividad en características fisicoquímicas, especialmente en solventes orgánicos [Chu, B., *Langmuir*, 11 (1995) 414-421]. En la actualidad, existen micelas solubles en agua relacionadas con la química de los polímeros anfífilos, que son biocompatibles y biodegradables. Sin embargo, estas formulaciones tienen limitaciones en lo que respecta a la estabilidad del compuesto activo a liberar.

Homar y cols. *J Microencap* 2007, 24:7, 621-633 han estudiado la influencia de polímeros en la biodisponibilidad de celecoxib microencapsulado. Se prepararon micropartículas con un intervalo de tamaños de 11 a 34 micrómetros usando un procedimiento de emulsión seguido por evaporación del solvente. La biodisponibilidad relativa de celecoxib fue inferior al 20 % en todos los casos.

Por otra parte, el uso de tecnologías vinculadas con la producción de nanopartículas y micropartículas está limitada en la actualidad por un número considerable de factores que condicionan el desarrollo clínico e industrial ulterior de los mismos.

Entre los factores que limitan el uso de estas tecnologías están:

1. Procedimientos de preparación complejos.
2. Conversión de escala problemática [Microspheres for controlled release drug delivery. Varde y cols. *Expert Opinion on Biological Therapy* (2004), 4(1), 35-51].
3. Bajo rendimiento y eficacia de encapsulación: el uso de emulsiones y/o interfaces en muchos de los dispositivos basados en micropartículas y nanopartículas favorece la liberación/migración de las sustancias del fármaco para su incorporación hacia líquidos o medios que más adelante serán eliminados como parte del procedimiento de

preparación, lo que en ocasiones provoca una pérdida muy elevada de compuesto activo. De la misma forma, los procedimientos de preparación pueden generar numerosas pérdidas del material de formación de matriz, de la matriz o del revestimiento de partícula. La pérdida de material polimérico en los filtros usados en la preparación de micropartículas por evaporación/extracción de solvente y pérdidas por adhesión de material de formación de matriz en la preparación de micropartículas (-) por secado por pulverización pueden servir de ejemplo.

4. Baja reproducibilidad interlote. La especial sensibilidad de los sistemas coloidales a pequeñas variaciones en las condiciones de preparación del vector de partículas requiere un estricto control de todas las variables de fabricación, prestando especial atención a factores ambientales (temperatura, humedad, presión atmosférica), variaciones en los excipientes o materiales de partida así como en los instrumentos usados en su preparación. A modo de ejemplo, cualquier persona experta en la materia puede inferir que un pequeño aumento en la temperatura de preparación favorece la difusión del compuesto activo incorporado en la fase interna de una emulsión de Ag/Ac/Ag (agua/aceite/agua) hacia la fase acuosa externa, provocando una gran pérdida en el contenido de compuesto activo. Todos estos factores condicionantes suelen causar grandes variaciones interlote, siendo dos de los aspectos afectados más importantes:

a) Contenido de compuesto activo, perfil de liberación. Tal como se acaba de mencionar, pequeñas variaciones en las condiciones de preparación o los materiales de partida pueden causar grandes variaciones en el contenido de compuesto activo de estas formulaciones, lo que obstaculiza enormemente la normalización del procedimiento dentro de límites aceptables. Análogamente, variaciones en el contenido de compuesto activo así como en el tamaño de partícula de estas formulaciones (debidas fundamentalmente a pequeñas variaciones en las condiciones de agitación y a variaciones ambientales) provocan, como se ha explicado anteriormente, cambios en la liberación del compuesto activo a partir de estos vectores. Así, un aumento de tamaño de partícula retrasará la liberación del compuesto activo, modificando su perfil farmacocinético después de su administración y por tanto, su biodisponibilidad sistémica.

b) Especificaciones de producto final muy amplias. La variabilidad interlote, debida a la sensibilidad de estos sistemas a variaciones en las condiciones de preparación, fuerza el establecimiento de especificaciones de producto final muy amplias con el fin de validar la producción de un lote por un procedimiento industrial estandarizado previamente. Puede servir, por ejemplo, para establecer especificaciones para parámetros tales como contenido de compuesto activo o la liberación de compuesto activo en un tiempo determinado que, tal como se indica previamente, tiene una gran variabilidad interlote.

c) Solventes residuales: la preparación de sistemas de partículas por procedimientos como polimerización y emulsión interfacial, con posterior evaporación/extracción de solvente, requiere a menudo el uso de cantidades muy elevadas de solventes orgánicos, para los que la administración diaria está limitada en base a la mayoría de las Farmacopeas existentes en la actualidad. A pesar del hecho de que la eliminación de estos solventes forma parte del procedimiento de preparación de estos vectores, la avidez del solvente por algunos polímeros usados normalmente, la sensibilidad de los vectores de partículas a procedimientos de eliminación de solventes más eficaces (tales como, por ejemplo, liofilización) y los límites reducidos para la presencia de algunos de los solventes usados más comúnmente para la preparación de micropartículas y nanopartículas (como, por ejemplo, diclorometano, clasificado en las Farmacopeas Europea y de Estados Unidos como solvente de Clase 2), pueden condicionar el uso clínico de micropartículas y nanopartículas.

5. Problema de estabilidad a medio/largo plazo [*Strategic approaches for overcoming peptide and protein instability within biodegradable nano- and microparticles. Bilati y cols. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics (2005), 59(3), 375-388*].

6. Toxicidad relacionada con el tamaño de partícula. Cuando se administran vectores de partículas por vías mucosas, el contenido de compuesto activo de los mismos puede ser liberado en el entorno luminal por mecanismos ya descritos en el presente documento, o los vectores de partículas pueden atravesar completamente la membrana de absorción y posteriormente liberar el compuesto activo. A este respecto, el tamaño de partícula constituye el parámetro más importante, dado que una reducción en el tamaño de partícula provoca un aumento exponencial del material en forma de partículas que atraviesa completamente la barrera mucosa (*Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle size. Desai y cols. Pharmaceutical Research (1996), 13(12), 1838-1845*). A diferencia de los vectores de partículas de tamaño más grande, como puede ser el caso de los gránulos y pellas preparadas con polímeros, la absorción del material de formación de micropartículas y especialmente de nanopartículas, obliga a tener en cuenta aspectos toxicológicos relacionados con el suministro de estos materiales en la circulación sistémica. Asimismo, cualquier persona experta en la materia conoce las consecuencias de la exposición de materiales potencialmente antigénicos en la respuesta inmunitaria (como, por ejemplo, proteínas) en la forma de las micropartículas y las nanopartículas en estos órganos, tejidos o compartimentos corporales a los que pueden acceder las células inmunocompetentes, siendo posible generar una amplia diversidad de respuestas inmunitarias que comprenden desde la supresión de la proliferación de linfocitos a la aparición de reacciones de hipersensibilidad.

7. Acceso restringido a tecnologías de producción y dificultad de acceso a fabricación externalizada. Existe un alto número de procedimientos para la preparación de sistemas en forma de micropartículas y nanopartículas que en la actualidad están protegidos por patentes. Análogamente, la necesidad de usar altas cantidades de solvente, altas presiones de gases, el establecimiento de sofisticados procedimientos de control de las condiciones de fabricación, el alto coste de la maquinaria usada y la escasa presencia de estas formulaciones en el mercado son factores condicionantes, conocidos por una persona experta en la materia, que elevan los costes de producción y condicionan la existencia de instalaciones que tengan suficiente flexibilidad de fabricación para fabricar por contrato formulaciones de este tipo, empeorado también por la complejidad en la conversión a escala de las formulaciones de

micropartículas y nanopartículas desarrolladas en el laboratorio.

8. Altos costes de desarrollo y producción

A pesar de que los resultados obtenidos son prometedores con sistemas de partículas de pequeño tamaño, en general las biodisponibilidades sistémicas conseguidas con estos tipos de sistemas (sistemas con tamaño de partícula inferior a 100 μm) son relativamente bajas [*Issues in oral nanoparticle drug carrier uptake and targeting*. Florence, Alexander T. *Journal of Drug Targeting* (2004), 12(2), 65-70], obteniéndose los mejores resultados en la administración de moléculas con propiedades inmunológicas en las que las nanopartículas y las micropartículas de tamaño más pequeño tienen actividad intrínseca como adyuvantes antigénicos [*Potential of polymer microencapsulation technology for vaccine innovation*. Morris y cols. *Vaccine* (1994), 12(1), 5-11; *Particulate systems as adjuvants and carriers for peptide and protein antigens*. Liang et al *Current Drug Delivery* (2006), 3(4), 379-388].

Todos estos factores han limitado el acceso a estos productos en el mercado y revelan la necesidad de desarrollar vehículos que impliquen procedimientos de fabricación menos agresivos, que tengan propiedades de estabilidad mejoradas y cuya conversión a escala industrial sea posible o ejecutable por procedimientos usados más comúnmente en la industria farmacéutica.

A pesar de que el uso de gránulos y pellas ha sido masivo para la administración oral de compuestos activos, el estado actual de la técnica muestra que ninguna formulación constituida por ellos, ni ningún otro derivado de los mismos como cápsulas o comprimidos, ha conseguido dar lugar a absorciones significativas de macromoléculas cuya biodisponibilidad sistémica después de su administración no parenteral está más limitada por la permeabilidad reducida en la barrera de absorción de la molécula que debido a la reducida solubilidad de las mismas en los fluidos lumbinales.

La solicitud de patente US-2005/0281871 A1 desvela un procedimiento de revestimiento por pulverización para revestir gránulos o pellas en el que la mezcla de componentes de revestimiento se realiza durante el procedimiento de pulverización, por pulverización simultánea de dos dispersiones acuosas que contienen los agentes de formación de película por separado, seleccionándose dichos agentes entre a) un éster de (met)acrilato de alquilo $\text{C}_1\text{-C}_4$ o ácido metacrílico entre el 30 y el 80 % en peso y monómeros de (met)acrilato portadores de un grupo amino terciario en el radical alquilo entre el 70 y el 20 % en peso y b) un polímero portador de grupos aniónicos seleccionados a partir de derivados de celulosa o copolímero de (met)acrilato. Así se evitan problemas relacionados con la formación de mezclas dispersadas por revestimiento por pulverización, tales como agregación o coagulación de componentes y el uso de emulsionantes no iónicos en el 10 % en peso y más alto, que homogeneizan las dispersiones pero que presentan como inconveniente un aumento en la inestabilidad del compuesto activo.

Por tanto, puede concluirse que los últimos avances en la tecnología farmacéutica de formulaciones orales que contienen compuestos activos de los tipos descritos anteriormente en el presente documento, con independencia de los problemas que pueden asociarse con el procedimiento de preparación industrial, están dirigidos a aumentar la superficie de contacto por adhesivos o por la reducción del tamaño de partícula. Esto favorece el contacto incrementando su superficie específica para conseguir absorciones significativas de compuestos activos a través de las vías mucosas. Los sistemas de partículas de mayor tamaño se dejan a un lado, debido a que el potencial de superficie de los mismos no puede calcularse (lo que supone un problema ya que no puede calcularse la carga superficial de las partículas para predecir la aproximación y la no repulsión de los mismos con la superficie mucosa) ni pueden ser fagocitados por las células debido a su mayor tamaño y debido a la dificultad de los que tienen mayor área superficial específica de adherirse a la mucosa mientras eluden la repulsión de la misma mucosa.

Persiste, por tanto, según la información desvelada en los documentos mencionados anteriormente, la necesidad de proporcionar nuevos sistemas de partículas para la administración de compuestos activos a través de la vía mucosa.

Por tanto, el objeto de la presente invención es proporcionar una forma farmacéutica de liberación selectiva para su administración por vía mucosa en altas cantidades de compuestos activos poco permeables, en particular, compuestos activos macromoleculares. La forma farmacéutica puede producirse a una escala industrial, resolviendo el problema de la baja homogeneidad de lotes existente en el caso de micro y nanopartículas.

Breve descripción de la invención

Los autores de la invención han observado previamente que cuando las formas farmacéuticas de la técnica anterior se usaron en mayor tamaño, la absorción disminuyó. Uno de los objetivos de la presente invención ha sido desarrollar, a través de diferentes estudios, una forma sólida que tenía las ventajas del gran tamaño de partícula con respecto a la conversión a escala y la fabricación y que también tenía ventajas en la absorción de moléculas de permeabilidad reducida en la membrana de absorción para las que la vía de administración oral ha estado limitada tradicionalmente.

En general, las condiciones que se pretende obtener serían las que permitirían que macromoléculas hidrófilas poco permeables, como las que portan grupos de carga negativa a pH superior o igual a 4 fueran dotadas de protección frente a un entorno luminal agresivo y fueran liberadas en un lugar y en condiciones ideales para su absorción.

Después de numerosos estudios, los autores de la invención han diseñado un modelo de forma farmacéutica con características que permiten la liberación selectiva del compuesto activo en las proximidades de la pared mucosa.

El objeto de la presente invención se centra en el uso de al menos un polímero de naturaleza catiónica que forma una matriz en una forma farmacéutica. Dicha matriz permite conseguir absorciones significativamente altas de moléculas cuya biodisponibilidad sistémica está más limitada por la permeabilidad reducida en la barrera de absorción debido a la solubilidad reducida de los mismos en los fluidos lumenales. En particular, las moléculas para las que tradicionalmente la vía de administración oral ha estado limitada, como, por ejemplo, heparinas no fraccionadas, heparinas de bajo peso molecular, fondaparinux y/o proteínas como, por ejemplo, insulina.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a una forma farmacéutica que contiene al menos un compuesto activo y una matriz polimérica, en la que:

- a) el compuesto activo es una molécula hidrófila poco permeable que contiene grupos con cargas negativas a pH superior o igual a 4 y
- b) la matriz polimérica comprende al menos un polímero de naturaleza catiónica

caracterizada porque el compuesto activo no se distribuye selectivamente en la superficie de la forma farmacéutica.

Los autores de la invención han mostrado que la presencia selectiva de un compuesto activo, por ejemplo bemiparina, en la superficie de la forma farmacéutica no es conveniente debido a que dicha situación invalida la respuesta producida por el sistema de liberación.

Un segundo aspecto de la invención es un procedimiento para preparar la forma farmacéutica mencionada anteriormente que comprende la combinación de al menos un compuesto activo y al menos un polímero de naturaleza catiónica en condiciones en las que se forma una matriz polimérica.

En un tercer aspecto, la invención proporciona una formulación farmacéutica para la administración de la forma descrita anteriormente.

Un cuarto aspecto de la invención es el uso de la forma farmacéutica mencionada anteriormente para preparar una formulación farmacéutica.

Un quinto aspecto de la invención es el uso de la forma farmacéutica o formulación farmacéutica mencionada anteriormente, para la fabricación de un medicamento aplicable a una mucosa seleccionada entre mucosa orofaríngea, mucosa gastrointestinal, mucosa pulmonar, mucosa nasal y mucosa vaginal.

Un sexto aspecto de la invención se refiere al uso de la forma farmacéutica o formulación farmacéutica mencionada anteriormente, como un medicamento aplicable a una mucosa seleccionada entre el grupo formado por mucosa orofaríngea, mucosa gastrointestinal, mucosa pulmonar, mucosa nasal y mucosa vaginal.

Un séptimo aspecto de la invención es un procedimiento de tratamiento en el que a un paciente se le administra una forma farmacéutica o una formulación farmacéutica según se define anteriormente. En particular, la forma farmacéutica o la formulación farmacéutica es aplicable a mucosas seleccionadas entre mucosa orofaríngea, mucosa gastrointestinal, mucosa pulmonar, mucosa nasal y mucosa vaginal.

Considerando la técnica anterior existente expuesta en la presente memoria descriptiva, no sería de esperar que una persona experta en la materia se sintiera inclinado a desarrollar sistemas de tamaño de partícula grande fabricados por procedimientos comunes y fácilmente estandarizables y que consigan biodisponibilidad sistémica significativamente alta de fármacos para los que la vía mucosa ha sido tradicionalmente inaccesible, mejorando la liberación así como la absorción de los mismos.

Descripción de las figuras

Figura 1: se representa un procedimiento para obtener granulados que incluye una etapa de granulación primaria (Diagrama 1) y una etapa de adición de los polímeros a los gránulos primarios así formados (Diagrama 2).

Figura 2: en la izquierda de la figura, se muestran gránulos secos (Gx10); a la derecha se muestran gránulos dispersados en solución de PVA al 4 % (Gx10).

Figura 3: rendimientos de fabricación medios de diferentes gránulos preparados con 2.000 (A), 3.000 (B), 4.000 (C) y 5.000 (D) U anti-Xa de enoxaparina después de mezcla con Eudragit® RS 30 D (RS) y Aquacoat® ECD (AqC); 100/0, 75/25, 50/50, 25/75, 0/100 % (n = 3 ± desviación típica).

Figura 4: contenido de agua de los gránulos primarios y de los gránulos con mezclado de polímeros por la adición de Eudragit® RS 30 D y Aquacoat® ECD en cantidades equivalentes (50/50) después de 2, 4, 8 y 24 horas de secado a 40 °C (n = 3 ± desviación típica).

Figura 5: cinética de liberación de enoxaparina en % a partir de diferentes gránulos primarios de celulosa microcristalina mezclada con suspensiones acuosas que contienen Eudragit® RS 30 D y/o Aquacoat® ECD preparado con 2.000 (A), 3.000 (B), 4.000 (C) o 5.000 (D) U anti-Xa de enoxaparina (n = 6 ± desviación típica).

Figura 6: cinética de liberación de enoxaparina a partir de gránulos primarios preparados con diferentes cantidades de enoxaparina y posteriormente mezclados con una suspensión acuosa que contiene el 100 % de Eudragit® RS 30 D (n = 6 ± desviación típica).

5 **Figura 7:** actividad anti-Xa por ml en plasma de conejos blancos de Nueva Zelanda después de la administración oral de 600 UI de anti-Xa/kg de gránulos de enoxaparina en cápsulas de gelatina. Los grupos corresponden a núcleos de MCC mezclados respectivamente con una suspensión que contiene Aquacoat y Eudragit RS (Aquac+Eudr RS), una suspensión de Eudragit RS (Eudr RS) y una suspensión de Aquacoat (Aquac) (n = 3).

10 **Figura 8:** tamaño medio de los gránulos producidos por adición de Eudragit RS (izquierda) o por la adición de Eudragit RS y PCL en cantidades equivalentes (derecha) (n = 3 ± desviación típica). (1x) corresponde a la cantidad añadida en una fase. (2x) corresponde a la cantidad añadida en dos fases de 200 mg de polímeros (en el caso de mezcla de Eudragit RS y PCL) o polímero (en el caso de la adición de Eudragit RS en solitario) cada una. (3x) corresponde a la cantidad añadida en tres fases de 200 mg cada una. (4x) corresponde a la cantidad añadida en cuatro fases de 200 mg cada una.

15 **Figura 9:** cinética de liberación de tinzaparina a partir de gránulos primarios mezclados con diferentes cantidades de Eudragit RS disuelto en acetona (n = 3). El gráfico de la izquierda corresponde a la adición de Eudragit en una sola fase.

20 **Figura 10:** cinética de liberación de tinzaparina desde gránulos primarios mezclados con diferentes cantidades de Eudragit RS y PCL disueltos en acetona (n = 3). El gráfico de la izquierda corresponde a la adición de Eudragit y PLC en una sola fase, mientras que el gráfico de la derecha corresponde a la adición de la mezcla de polímeros en fases de 200 mg cada una.

25 **Figura 11:** actividad anti-Xa por ml en plasma de conejos blancos de Nueva Zelanda después de la administración oral de 600 UI de anti-Xa/kg de gránulos de tinzaparina en cápsulas de gelatina. Dos grupos corresponden a gránulos primarios de MCC con tinzaparina mezclados respectivamente con 200 y 800 mg de una solución de Eudragit RS y PCL en acetona (200 mg de RS/PCL y 800 mg de RS/PCL) y el tercer grupo corresponde a gránulos primarios de MCC con tinzaparina mezclados con 800 mg de Eudragit RS (n = 3).

Figura 12: actividad anti-Xa por ml en plasma de conejos blancos de Nueva Zelanda después de la administración oral de 600 UI de anti-Xa/kg de gránulos de bemiparina en cápsulas de gelatina. SC corresponde a la administración de 150 UI/kg de Bemiparina disuelta en 1 ml de agua destilada por vía subcutánea (n = 3).

30 **Figura 13:** cinética de liberación de enoxaparina desde pellas con un diámetro entre 0,5 y 0,8 mm (arriba) y con un diámetro comprendido entre 0,8 y 1,2 mm (abajo) (n = 3).

Figura 14: actividad anti-Xa por ml en plasma de conejos blancos de Nueva Zelanda después de la administración oral de 600 UI de anti-Xa/kg de pellas de enoxaparina en cápsulas de gelatina. Un grupo corresponde a pellas con un tamaño comprendido entre 0,5 y 0,8 mm y otro grupo corresponde a pellas con un tamaño entre 0,8 y 1,2 mm (n = 3 ± desviación típica).

35 **Figura 15:** distribución del tamaño de partícula de los gránulos obtenidos. Las barras representan el % en masa de las diferentes fracciones obtenidas después del procedimiento de cribado.

Figura 16: liberación de Bemiparina a partir de los gránulos obtenidos. La figura representa el % de Bemiparina liberada con respecto al total como una función del tiempo. El medio de disolución es tampón de fosfato a pH 6,8 (n = 2; series 1 y 2).

40 **Figura 17:** actividad anti-Xa por ml en plasma de conejos blancos de Nueva Zelanda después de la administración oral de 600 UI de anti-Xa/kg de gránulos de bemiparina en cápsulas de gelatina. Los grupos corresponden a gránulos con porcentajes de revestimiento de la mezcla de polímeros del 8, el 4 y el 2,5 % respectivamente (n = 3). El 0 % corresponde a la administración de gránulos primarios (no revestidos) en cápsulas duras de gelatina en una dosis de 600 UI/kg. SC corresponde a la administración de 150 UI/kg de Bemiparina disuelta en 1 ml de agua destilada por vía subcutánea (n = 3).

45 **Figura 18:** actividad anti-Xa por ml en plasma de conejos blancos de Nueva Zelanda después de la administración oral de 600 UI de anti-Xa/kg de gránulos de bemiparina en cápsulas de gelatina. Los grupos corresponden a gránulos con porcentajes de revestimiento de la mezcla de polímeros del 4 % que se incorporan respectivamente en cápsulas de gelatina no entéricas y entéricas (n = 3). SC corresponde a la administración de 150 UI/kg de Bemiparina disuelta en 1 ml de agua destilada por vía subcutánea (n = 3).

Figura 19: distribución del tamaño de partículas de los gránulos producidos. Las barras representan el % en masa de las diferentes fracciones obtenidas después del procedimiento de cribado.

Figura 20: actividad anti-Xa por ml en plasma de conejos blancos de Nueva Zelanda después de la administración oral de 600 UI de anti-Xa/kg de gránulos de bemiparina en cápsulas de gelatina. Los grupos corresponden a

gránulos revestidos con una mezcla de Eudragit RS y PCL en proporción 9:1 (n = 3). SC corresponde a la administración de 150 UI/kg de Bemiparina disuelta en 1 ml de agua destilada por vía subcutánea (n = 3).

Figura 21: distribución del tamaño de partículas de los gránulos producidos. Las barras representan el % en masa de las diferentes fracciones obtenidas después del procedimiento de cribado.

5 **Figura 22:** actividad anti-Xa por ml en plasma de conejos blancos de Nueva Zelanda después de la administración oral de 600 UI de anti-Xa/kg de gránulos de bemiparina en cápsulas de gelatina. Los grupos corresponden a gránulos con o sin sub-revestimiento con Eudragit L y revestidos por una mezcla de Eudragit RS y PCL en proporción 1:1 (n = 3). SC corresponde a la administración de 150 UI/kg de Bemiparina disuelta en 1 ml de agua destilada por vía subcutánea (n = 3).

10 **Figura 23:** distribución del tamaño de partículas de los gránulos obtenidos. Las barras representan el % en masa de las diferentes fracciones obtenidas después del procedimiento de cribado.

Figura 24: liberación de Bemiparina a partir de los gránulos obtenidos. La figura representa el % de Bemiparina liberada con respecto al total en función del tiempo. El medio de disolución es tampón de fosfato de pH 6,8 (n = 2; series 1 y 2).

15 **Figura 25:** actividad anti-Xa por ml en plasma de conejos blancos de Nueva Zelanda después de la administración oral de 600 UI de anti-Xa/kg de gránulos de bemiparina en cápsulas de gelatina. Los gránulos tienen en la superficie una matriz de Eudragit RS y Pluronic F68 en proporción 1:1 (n = 3). SC corresponde a la administración de 150 UI/kg de Bemiparina disuelta en 1 ml de agua destilada por vía subcutánea (n = 3).

20 **Figura 26:** perfil de liberación *in vitro* de bemiparina desde micropartículas de Eudragit RS y PLGA preparadas por un procedimiento de emulsión de Ag/Ac/Ag/extracción de solvente (n = 3). Tamaño medio de micropartículas: 71,4 µm.

Figura 27: perfil de liberación *in vitro* de bemiparina desde micropartículas de Eudragit RS y PCL preparadas por un procedimiento de emulsión de Ag/Ac/Ag/extracción de solvente (n = 3). Tamaño medio de micropartículas: 76,5 µm.

25 **Figura 28:** perfil de liberación *in vitro* de bemiparina desde micropartículas de Eudragit RS y PLGA preparadas por un procedimiento de emulsión de Ag/Ac/Ag/extracción de solvente (n = 4). Tamaño medio de micropartículas: 2,2 µm. Los resultados se presentan como perfiles de liberación individuales de cada una de las cuatro medidas realizadas.

Figura 29: perfil de liberación *in vitro* de bemiparina desde micropartículas de Eudragit RS y PLGA preparadas por un procedimiento de emulsión de Ag/Ac/Ag/extracción de solvente (n = 3). Tamaño medio de micropartículas: 168,4 µm.

30 **Figura 30:** actividad anti-Xa en plasma después de la administración oral de 10.000 UI de bemiparina anti-Xa en gránulos preparados de acuerdo con el ejemplo 12 en monos Cynomolgus.

Figura 31: perfil de liberación de bemiparina a partir de gránulos revestidos con Eudragit RS y PLGA.

Figura 32: actividad anti-Xa en plasma después de la administración oral de 10.000 UI de bemiparina anti-Xa en gránulos preparados de acuerdo con el ejemplo 25 en monos Cynomolgus.

35 **Figura 33:** perfil de liberación *in vitro* de gránulos con distribución preferente de la bemiparina en la parte superior de una matriz polimérica de Eudragit RS y PLGA.

Descripción detallada de la invención

Tal como se usa en la descripción, los siguientes términos tienen el significado indicado a continuación, salvo que se establezca lo contrario:

40 "Matriz polimérica" se refiere a una estructura que comprende una masa sólida o semisólida de polímero o una mezcla de polímeros, en solitario o mezclada con uno o más excipientes.

"En contacto" significa que, en la forma farmacéutica, el compuesto activo bien está íntimamente mezclado con la matriz polimérica (contacto pleno) o bien está mezclado parcialmente con la matriz polimérica, por ejemplo cuando el núcleo (en el que está presente el compuesto activo) está revestido en su parte exterior por una composición que comprende la matriz polimérica (parcialmente en contacto).

"Forma o formulación de liberación no extendida" es una forma o formulación farmacéutica que libera el compuesto activo inmediatamente o poco después de la dosificación y no permite una reducción en la frecuencia de dosificación.

50 "Molécula hidrófila poco permeable" se refiere a una molécula con afinidad para medios acuosos y que presenta una baja absorción a través de la membrana mucosa en un sitio determinado. Así, por ejemplo, las moléculas hidrófilas

con una carga negativa a pH superior o igual a 4 tendrán dificultad para pasar a través de la mucosa del aparato digestivo que está revestida por mucosidad cargada negativamente y que tiene una tendencia natural a repeler moléculas con la misma carga.

5 "Biodegradable" se refiere a un material que puede ser degradado en el organismo, de manera que generalmente no se elimina intacto.

"Gránulos" se entienden como formulaciones constituidas por aglomerados de partículas o polvos de pequeño tamaño, que pueden tener una forma irregular o esférica. Los gránulos se usan como productos intermedios en la fabricación de una forma farmacéutica, aunque también pueden usarse como producto final.

10 "Núcleo" es la parte interior de un gránulo o una pella que puede contener el principio activo. El compuesto activo en el núcleo puede estar disperso en toda la masa del núcleo o puede formar una capa de revestimiento sobre una semilla inerte.

"Semilla inerte" es una sustancia en volumen (por ejemplo, celulosa microcristalina, almidón, sacarosa o cualquier otro material inerte) con forma esférica o no esférica destinada a ser usada como sustrato para posteriores revestimientos.

15 "Pella" se entiende como un material que está compactado en la forma de pequeñas esferas o cilindros por procedimientos tales como compactación, extrusión y/o esferonización (fusión de la masa sólida, humidificación de la masa seca, extrusión de la masa húmeda o fundida y rotación del extrudido por esferonización y posterior secado). La pella puede contener el compuesto activo en su interior o servir como soporte para la adición del compuesto activo sobre su superficie.

20 En la definición del procedimiento para la preparación de una forma farmacéutica, el término "combinación" significa que el compuesto activo puede ponerse o no en contacto con el polímero de naturaleza catiónica, por ejemplo, el compuesto activo puede mezclarse con el polímero de naturaleza catiónica o puede ser conformado en un "núcleo", separado opcionalmente del polímero catiónico por una capa intermedia.

25 "Condiciones en las que se forma una matriz polimérica" significa condiciones en las que se forma una masa sólida o semisólida de un polímero o mezcla de polímeros y opcionalmente uno o más excipientes, que contienen o no al menos un compuesto activo (por ejemplo, granulación, extrusión, estratificación, etc.)

30 Condiciones de gradiente de "inmersión máxima" son las condiciones para la determinación de liberación de sustancia activa *in vitro* para las que la concentración máxima de compuesto activo que puede liberarse en un medio de liberación es inferior al 30 % de la concentración de saturación, con el objetivo de que el gradiente de concentración pueda considerarse no limitante.

"Biomaterial" incluye todos los materiales capaces de ponerse en contacto con tejidos corporales con un objetivo terapéutico, diagnóstico o preventivo específico. Estos materiales deben ser biocompatibles.

35 "Biocompatible" se refiere a un material que no provoca una respuesta adversa importante del medio fisiológico después de la interacción con tejidos y fluidos corporales y en algunos casos, debe biodegradarse, tanto química como físicamente, o por una combinación de las dos, en componentes no tóxicos.

El primer aspecto de la invención se refiere a una forma farmacéutica que comprende al menos un compuesto activo y una matriz polimérica, en la que:

40 c) el compuesto activo es una molécula hidrófila poco permeable que contiene grupos con cargas negativas a pH superior o igual a 4 y

d) la matriz polimérica comprende al menos un polímero de naturaleza catiónica,

caracterizada porque el compuesto activo no está distribuido selectivamente en la superficie de la forma farmacéutica.

45 En la presente invención la expresión "el compuesto activo no está distribuido selectivamente en la superficie de la forma farmacéutica" debe entenderse en el sentido de que no se promueve la acumulación del compuesto activo en la superficie de la forma farmacéutica y su área circundante inferior. El fármaco nunca debe estar distribuido selectivamente en la superficie externa de la matriz polimérica, ya que esta configuración invalida la actividad del sistema de suministro del fármaco.

Según una realización preferida, la matriz polimérica forma parte de la superficie de la forma farmacéutica.

50 En una realización, en la forma farmacéutica de la invención la matriz polimérica está en contacto con el principio activo.

En una realización preferida de la forma farmacéutica de la invención, la matriz comprende al menos un polímero de naturaleza catiónica y al menos otro polímero de naturaleza aniónica o neutra. Además, la matriz puede contener

compuestos seleccionados entre plastificantes, deslizantes, potenciadores de la absorción, humectantes, tensioactivos, agentes de coloración y dispersantes.

Preferentemente, en la forma farmacéutica de la invención la liberación del compuesto activo es de al menos el 30 % en un tiempo inferior o igual a 60 minutos, más preferentemente al menos el 50 % en un tiempo inferior o igual a 60 minutos

El tamaño de partícula de la forma farmacéutica de la invención preferentemente es al menos 0,1 mm.

En una realización de la invención, la forma farmacéutica es una forma de liberación no extendida.

Preferentemente, el compuesto activo en la forma farmacéutica de la invención es una molécula hidrófila poco permeable que contiene grupos con cargas negativas a pH superior o igual a 4. En particular, se selecciona del grupo que consiste en antibióticos, antiinflamatorios, agentes antiinfecciosos, antiparasitarios, hormonas, sustancias con actividad inmunológica, vacunas, inmunomoduladores, inmunosupresores, citostáticos, diuréticos, agentes con actividad en el sistema digestivo, agentes con actividad en el sistema circulatorio, agentes con actividad en el sistema respiratorio, hormona del crecimiento humano, hormona del crecimiento recombinante, hormona del crecimiento bovino, hormona de liberación de hormona del crecimiento, interferones, analgésicos, agentes con actividad en el sistema nervioso central, eritropoyetina, somatostatina, hormona de liberación de gonadotropina, hormona foliculoestimulante, oxitocina, vasopresina, hormona paratiroidea, adrenocorticotropina, hormona de liberación de gonadotropina, trombopoyetina, calcitonina, interferones, interleucinas, insulinas, heparina no fraccionada, heparina de bajo peso molecular, heparinas de peso molecular ultrabajo, heparinoides, dermatano, glucosaminas, condroitinas, factor natriurético auricular, anticuerpos monoclonales, inhibidores de la proteasa, filgrastima, prostaglandinas (PGE2 y PGI2), ciclosporina, cromolina de sodio, cromoglicato y sus sales, vasopresina, vancomicina, neomicina, desferrioxamina, agentes antimicrobianos, antifúngicos, citostáticos, inmunomoduladores, vitaminas, antivirales, antígenos, ácido ribonucleico, ácido desoxirribonucleico, oligonucleótidos, secuencias CPG, plásmidos, compuestos activos de naturaleza proteica, compuestos activos de naturaleza polisacáridica, glucocerebrosidasa y derivados y combinaciones de los mismos. Más en particular, se selecciona del grupo que consiste en insulinas, heparina no fraccionada, heparina de bajo peso molecular, heparinas de peso molecular ultrabajo y heparinoides, más en particular todavía es heparina de bajo peso molecular.

Para los fines de la presente invención: "Heparina de Bajo Peso Molecular" son sales de glucosaminoglucano sulfatado con un peso molecular medio inferior a 8.000 Da y en las que un 60 % de las moléculas tienen un peso molecular inferior a 8.000. Estas moléculas tienen diferentes estructuras químicas, así como diferentes extremos reductores y no reductores de las cadenas de polisacárido. La actividad anti-factor Xa no es inferior a 70 UI por miligramo de sustancia seca. La relación entre anti-factor Xa y anti-factor IIa no es inferior a 1,5. La "Heparina de Peso Molecular Ultrabajo" son sales de glucosaminoglucano sulfatado con un peso molecular medio inferior a 4.000 Da. Estas moléculas tienen diferentes estructuras químicas así como diferentes extremos reductores y no reductores de las cadenas de polisacáridos. La actividad anti-factor Xa no es inferior a 70 UI por miligramo de sustancia seca. La relación entre anti-factor Xa y anti-factor IIa no es inferior a 10.

Según una realización de la forma farmacéutica de la invención, al menos un polímero de naturaleza aniónica o neutra y al menos un polímero de naturaleza catiónica están presentes en una proporción de al menos el 10 % cada uno en relación con el peso de la matriz polimérica.

En una realización particular de la invención, el polímero de naturaleza catiónica en la matriz polimérica de la forma farmacéutica se selecciona entre polímeros y copolímeros derivados de ácidos acrílico y metacrílico, colestiramina y polímeros naturales.

En particular, el polímero de naturaleza aniónica o neutra en la matriz polimérica de la forma farmacéutica se selecciona del grupo que consiste en: poliésteres, policaprolactonas, polímeros y copolímeros derivados de ácido acrílico, óxidos de polietileno, óxidos de polipropileno, copolímeros de óxidos de polietileno y polipropileno, polianhídridos, poliamidas, poliuretanos, policarbonatos, poliacetales, poliortoésteres, policianoacrilatos, polidioxanonas, poli(ϵ -hidroxiácidos), poli(ϵ -hidroxiácidos), polifosfacenos, polímeros naturales; mezclas, copolímeros y terc-polímeros de los mismos. Más en particular, los polímeros de naturaleza aniónica o neutra de los poliésteres se seleccionan del grupo constituido por: polímeros de ácido láctico, polímeros de ácido glicólico, copolímeros de ácido láctico y glicólico; la policaprolactona es poli- ϵ -caprolactona; los polímeros derivados de ácido acrílico se seleccionan entre el grupo de polimetilmetacrilatos; y los polímeros naturales se seleccionan entre el grupo de derivados de celulosa formados por celulosa microcristalina, hidroxipropilmetilcelulosa y etilcelulosa; mezclas, copolímeros y terc-polímeros de los mismos. Más en particular los polímeros de naturaleza aniónica y neutra en la matriz polimérica son biodegradables.

En una realización de la forma farmacéutica de la invención la matriz polimérica comprende poliésteres y polímeros biodegradables naturales como polímeros de naturaleza aniónica o neutra y derivados de ácido metacrílico con grupos de amonio cuaternario como polímeros de naturaleza catiónica. En particular, la matriz polimérica comprende poli- ϵ -caprolactona como polímero de naturaleza aniónica o neutra y un polímero derivado de ácido metacrílico con grupos de amonio cuaternario como un polímero de naturaleza catiónica. Más en particular, el polímero derivado de

ácido metacrílico con grupos de amonio cuaternario es un copolímero de cloruro de metacrilato de trimetilamonioetilo.

En otra realización, la matriz polimérica de la forma farmacéutica comprende un copolímero de óxido de polietileno y polipropileno como polímero de naturaleza neutra y un polímero derivado de ácido metacrílico con grupos de amonio cuaternario como polímero de naturaleza catiónica.

Entre las formas sólidas usadas para la administración de compuestos activos se incluyen gránulos, gránulos revestidos y pellas. Por tanto, de acuerdo con una realización, la forma farmacéutica de la invención es un gránulo y en otra realización, es una pella.

Cuando la forma farmacéutica de la invención es un gránulo, en una realización, el gránulo comprende un núcleo y una matriz polimérica, en el que dicho núcleo comprende al menos un compuesto activo y dicha matriz polimérica comprende al menos un polímero de naturaleza catiónica. La matriz polimérica puede comprender además al menos un polímero de naturaleza aniónica o neutra.

En una realización en particular, la matriz polimérica forma parte del núcleo del gránulo.

En otra realización en particular, la matriz polimérica en el gránulo forma una capa de revestimiento en o sobre el núcleo. En casos especiales, por ejemplo, cuando la matriz polimérica ejerce un efecto no deseable en los compuestos activos, la presencia de una capa de revestimiento intermedia entre los compuestos activos y la matriz polimérica es útil para evitar el contacto. La capa de revestimiento intermedia puede estar constituida por cualquier sustancia que proporcione separación física entre el núcleo y la matriz polimérica en la superficie. Ejemplos de sustancias de revestimiento pueden ser pero no se limitan a: derivados de celulosa, copolímeros de polióxidos de etileno de ácido acrílico o metacrílico, polióxidos de propileno, copolímeros de polióxidos de etileno y propileno, gelatina, lactosa, manitol. La capa de revestimiento intermedia puede contener también cualquier excipiente usado comúnmente en revestimiento de superficie como agentes deslizantes y plastificantes. Según una variante, el núcleo en el gránulo puede comprender una semilla inerte en el que el compuesto activo forma parte de una capa que reviste dicha semilla inerte. En este caso, el núcleo puede comprender también una capa intermedia entre la semilla inerte y la capa que comprende al menos un compuesto activo. Esta capa intermedia es útil para sellar la semilla inerte con el fin de evitar el efecto perjudicial de la humedad. Por tanto, esta capa comprende cualquier compuesto destinado a proteger de la humedad como, por ejemplo, etilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, polímeros neutros derivados de ácido metacrílico como, por ejemplo, Eudragit NM o Eudragit NE, poloxámeros y polietilenglicoles de alto peso molecular (por ejemplo, PEG 8000), poliftalato de acetato de vinilo, ftalato de acetato de celulosa y ceras.

Cuando la forma farmacéutica de la invención es una pella, comprende al menos un compuesto activo y una matriz polimérica, en la que dicha matriz polimérica comprende al menos un polímero de naturaleza catiónica. La matriz polimérica puede comprender además al menos un polímero de naturaleza aniónica o neutra.

Con respecto a las formas farmacéuticas protegidas por la presente invención, existen diferentes procedimientos por los que pueden ser fabricados o producidos.

A modo de ejemplo no limitativo e ilustrativo, se citan dos procedimientos generales para la obtención de gránulos o pellas que son suficientemente conocidos por cualquier persona experta en la materia:

Granulación en seco:

Es producida por la agregación de los componentes en polvo sometidos a alta presión seguida por una fragmentación o ruptura en fragmentos y posterior separación por cribado para obtener el tamaño de gránulo deseado. Las técnicas usadas más comúnmente son agitación y compactación por laminación [Roll compaction/dry granulation: pharmaceutical applications. Kleinebudde, Peter. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics (2004), 58(2), 317-326].

Granulación en húmedo:

Consiste en un procedimiento de amasado de una mezcla en polvo en presencia de líquido de granulación, agua o solvente orgánico, que puede tener un agente aglutinante disuelto o incorporarse con los otros componentes de la mezcla para favorecer la adhesión de partículas una vez que los gránulos se han secado [Theophylline granule formulation prepared by the wet granulation method: comparison of in vitro dissolution profiles and estimation of in vivo plasma concentrations. Karasulu y cols. European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics (2007), Volume 31(4), 291-298].

Una variante de este procedimiento es la granulación en lecho fluidizado, en la que el líquido de granulación se pulveriza sobre las partículas suspendidas en corriente de aire [Experimental study of wet granulation in fluidized bed: Impact of the binder properties on the granule morphology. Rajniak, P y cols. International Journal of Pharmaceutics (2007), 334(1-2), 92-102].

Este procedimiento permite también revestir gránulos preformados así como obtener gránulos a partir de semillas inertes en las que se aplica una suspensión o disolución del compuesto activo [Preparation and evaluation of sustained release indomethacin nonpareil seeds. The-Mahrouk y cols. Drug Development and Industrial Pharmacy (1993), 19(15), 1903-16], por ejemplo, núcleos de azúcar o almidón *nonpareil* o esferas de celulosa microcristalina.

5 Una variante adicional de esta técnica es la producción de pellas por el procedimiento de esferonización [The preparation of pellets containing a surfactant or a mixture of mono- and di-glicerides by extrusion/spheronization. Newton y cols. European Journal of Pharmaceutical Sciences (2007), 30(3-4), 333-342].

Por tanto, de acuerdo con un segundo aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de las formas farmacéuticas mencionadas anteriormente. Dicho procedimiento comprende la combinación de al menos un compuesto activo y al menos un polímero de naturaleza catiónica en condiciones en las que se forma una matriz polimérica y el compuesto activo no está distribuido selectivamente en la superficie de la forma farmacéutica.

Las formas farmacéuticas protegidas por la presente invención pueden obtenerse preferentemente por un procedimiento tal como procedimiento de granulación, extrusión, revestimiento o una combinación de los mismos.

De acuerdo con una realización, el procedimiento descrito en el párrafo anterior comprende la etapa consistente en someter a una composición que comprende al menos un compuesto activo a un procedimiento de granulación para producir un núcleo. En particular, la composición comprende además al menos un polímero de naturaleza catiónica. Más en particular, la composición comprende además al menos un polímero de naturaleza aniónica o neutra. Más en particular todavía, el procedimiento comprende además la etapa de revestimiento del núcleo con una composición que comprende al menos un polímero de naturaleza catiónica y preferentemente, la composición del revestimiento comprende además al menos un polímero de naturaleza aniónica o neutra.

Según otra realización, el procedimiento para preparar una forma farmacéutica de la invención comprende las etapas de:

- a) revestimiento de una semilla inerte con una composición que comprende al menos un compuesto activo para obtener un núcleo y
- b) revestimiento del núcleo preparado en a) con una composición que comprende al menos un polímero de naturaleza catiónica.

En una variante, el procedimiento comprende además la etapa a) revestimiento de la semilla inerte con una composición para formar una capa de revestimiento intermedia antes de realizar el revestimiento con una composición que comprenda al menos un principio activo.

En particular, la composición usada en la etapa b) comprende además al menos un polímero de naturaleza aniónica o neutra. Más en particular, se usa un procedimiento de pulverización en el revestimiento realizado en la etapa b).

Los procedimientos descritos anteriormente pueden comprender además la etapa de revestimiento del núcleo con una composición para formar una capa de revestimiento intermedia. Tal como se ha mencionado anteriormente en esta descripción, la presencia de una capa intermedia protege el compuesto activo cuando puede verse afectado por los polímeros comprendidos en la matriz. Según una realización adicional, el procedimiento para preparar una forma farmacéutica de la invención comprende las etapas de:

- a) mezcla de al menos un compuesto activo con al menos un polímero de naturaleza catiónica y
- b) extrusión de la mezcla homogeneizada.

Preferentemente, el compuesto activo se mezcla además con al menos un polímero de naturaleza aniónica o neutra en la etapa a).

Los procedimientos de preparación en particular de las formas farmacéuticas de la invención son los siguientes:

1. Preparar de gránulos que comprenden un núcleo de compuesto activo y celulosa microcristalina con un revestimiento que representa una ganancia de peso con respecto al gránulo no revestido 4 % y en el que la composición del revestimiento se selecciona entre:
 - a. Eudragit RS y policaprolactona en una relación 1:1 disueltos en acetona
 - b. Eudragit RS y PLGA en relación 1:1 disueltos en un solvente orgánico
 - c. Eudragit RS y copolímero de polióxido de etileno y propileno en una relación 1:1 disueltos en acetona
 - d. Eudragit RS y Aquacoat en relación 1:1 en suspensión acuosa
2. Preparación de gránulos del grupo 1 que incluye adicionalmente la aplicación de un revestimiento intermedio de derivados de celulosa (ftalato de acetato de celulosa o ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa), o Eudragit L o S para conferir gastrorresistencia y liberación no gástrica.
3. Preparación de gránulos obtenidos por granulación en húmedo de carboximetilcelulosa y heparina disueltas en agua sometida a granulación secundaria con Eudragit RS.
4. Preparación de gránulos por granulación en húmedo de celulosa microcristalina disuelta en agua y suspensión acuosa de Eudragit RS en la que la relación entre celulosa microcristalina: Eudragit RS es 1:0,8.

5. Preparación de una pella de heparina por extrusión/esferonización de celulosa microcristalina y Eudragit RS y una relación de 2,66:1.

La vía de administración de las formas farmacéuticas de la invención se selecciona entre vía oral, peroral, sublingual, intraduodenal, intrayeyunal, intraileal, intracolónica, rectal, intravaginal, nasal, intrapulmonar, ocular y ótica. Se prefiere la vía oral.

La forma farmacéutica según la presente invención puede procesarse posteriormente para obtener una formulación farmacéutica que es el producto final que se administrará a un paciente. Las características de la formulación farmacéutica dependen de la vía de administración, de los perfiles de liberación en particular o de otros efectos pretendidos.

Por ejemplo, los gránulos y pellas así producidos pueden ser diseñados para la preparación de comprimidos y/o cápsulas [Characterization of 5-Fluorouracil Release from Hydroxypropylmethylcellulose Compression-Coated Tablets. Wu y cols. Pharmaceutical Development and Technology (2007), 12(2), 203-210], o pueden someterse a tratamientos adicionales tales como revestimientos poliméricos de gránulos producidos para dar:

- Gastrorresistencia: [In vitro dissolution studies of sodium diclofenac coated granules with eudragit L-30D-55 by fluidized-bed system. Silva, OR. y cols. Drug Development and Industrial Pharmacy (2006), 32(6), 661-667], tales como, por ejemplo, poli(ftalato de acetato de vinilo), ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, copolímeros acrílicos como copolímeros de ácido metacrílico y éster metacrílico, succinato de acetato de hidroxipropilmetilcelulosa, etc.
- Mucoadhesividad: como, por ejemplo, quitosano o,

Por tanto, un tercer aspecto de la invención proporciona una formulación farmacéutica que comprende una forma farmacéutica como se describe anteriormente. Preferentemente, dicha formulación farmacéutica es una formulación de liberación no extendida. En particular, la formulación adopta la forma de un comprimido, una cápsula, un gránulo, una pella, una micropartícula, una suspensión oleosa y otros sistemas dispersos. La administración oral continúa siendo una vía atractiva para la liberación de moléculas farmacológicamente activas. Su fácil administración, la ausencia de dolor asociada a la administración, la mayor aceptación por el paciente y una relación coste/beneficio favorable han convertido estas formulaciones orales en las usadas más ampliamente para la administración de compuestos activos por vía oral. Por tanto, en una realización preferida la formulación farmacéutica de la invención es para administración por vía oral.

Un cuarto aspecto de la invención es el uso de la forma farmacéutica, tal como se ha descrito anteriormente para la preparación de una formulación farmacéutica. En particular, la formulación farmacéutica no es una formulación de liberación extendida.

Un quinto aspecto de la invención se refiere al uso de una forma farmacéutica o una formulación farmacéutica tal como se ha definido anteriormente, en la preparación de un medicamento aplicable a mucosas seleccionadas entre mucosa orofaríngea, mucosa gastrointestinal, mucosa pulmonar, mucosa nasal y mucosa vaginal.

Un sexto aspecto de la invención se refiere al uso de la forma farmacéutica o formulación farmacéutica mencionada anteriormente como un medicamento aplicable a mucosas seleccionadas entre el grupo formado por mucosa orofaríngea, mucosa gastrointestinal, mucosa pulmonar, mucosa nasal y mucosa vaginal.

Un séptimo aspecto de la invención es un procedimiento de tratamiento en el que se administra a un paciente una forma farmacéutica o una formulación farmacéutica según se define anteriormente. En particular, la forma farmacéutica o la formulación farmacéutica es aplicable a mucosas seleccionadas entre mucosa orofaríngea, mucosa gastrointestinal, mucosa pulmonar, mucosa nasal y mucosa vaginal.

A modo de resumen, los resultados desvelados por la presente invención favorecen la absorción de moléculas, en particular, aquellas cuya biodisponibilidad sistémica está más limitada por la reducida permeabilidad en la barrera de absorción de la molécula, debido a la solubilidad reducida de las mismas en los fluidos lumenales por vía mucosa, preferentemente administrada por vía oral, especialmente para moléculas que en el estado de la técnica son conocidas comúnmente por su baja y/o errática absorción por vía oral.

La forma farmacéutica objeto de la presente invención consigue rendimientos de incorporación del compuesto activo de al menos el 80 %, lo que representa una ventaja en comparación con las formulaciones de micropartículas y/o nanopartículas.

Ejemplos

Los ejemplos siguientes ilustran la invención y no deben considerarse en un sentido limitativo de la misma.

Heparinas como compuestos activos de interés.

Las heparinas son anticoagulantes que actúan por medio de la inactivación de determinados factores de la cascada de coagulación. Las heparinas se usan esencialmente por sus propiedades anticoagulantes (relacionadas con la

inhibición del factor IIa) y antitrombóticas (por la inhibición del factor Xa) para la prevención y el tratamiento de enfermedades tromboembólicas [*Low- and ultra-low-molecular weight heparins. Best Pract Res Clin Haematol. 2004; 17: 77-87*]:

- en prevención, para reducir la incidencia de complicaciones tromboembólicas después de una inmovilización prolongada debida a una enfermedad y después de intervenciones quirúrgicas [*Prevention of venous thromboembolism. Agnelli y Sonaglia, Tromb Res. 2000, 97: V49-62*].
- en la curación, para el tratamiento de trombosis venosa profunda [*Treatment of venous thromboembolism. Agnelli y Sonaglia, Tromb Res. 2000, 97: V63-72*], de embolias pulmonares, de coagulación intravascular diseminada, de obstrucción arterial aguda y de la fase aguda de infarto de miocardio.

En la actualidad, la heparina se extrae de la mucosa intestinal porcina o bovina [Heparins: all a nephrologist should know. Hetzel y cols. *Nephrol Dial Transplant. 2005; 20: 2036-42*], la heparina no fraccionada es una mezcla heterogénea de cadenas de mucopolisacárido sulfatado cuya masa molecular está entre 3.000 y 30.000 daltons. Su masa molecular media es de 15.000 daltons y corresponde a una molécula de heparina de 45 unidades osídicas aproximadamente [Molecular weight dependency of the heparin potentiated inhibition of thrombin and activated factor X. Effect of heparin neutralization in plasma. Andersson y cols. *Thromb Res. 1979; 15: 531-41*].

Si se realiza una despolimerización química o enzimática, se producen heparinas que están formadas por cadenas más cortas y en consecuencia, tienen una menor masa molecular, entre 1.000 y 10.000 daltons. Su masa molecular media es de 4.500 daltons. A continuación estas heparinas, denominadas heparinas de bajo peso molecular (HBPM), se distinguen de heparinas no fraccionadas (UH) por una actividad anti-Xa predominantemente.

La heparina actúa por la intermediación de un cofactor: antitrombina III (ATIII), que es un inhibidor de coagulación de plasma natural [Heparin and Low-Molecular-Weight Heparin: The Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. Hirsh y Raschke. *Chest. 2004; 126: 188S-203S*] y se comporta como un catalizador con respecto a ATIII. La ATIII tiene una acción lenta y progresiva. Una vez que la heparina se ha fijado en la ATIII por la intermediación del fragmento del pentasacárido, esta acción se vuelve inmediata. Esta fijación provoca un cambio en la formación de la ATIII que a continuación permite la fijación irreversible de la misma en el sitio activo de factores de coagulación de tipo serina proteinasa (factores IIa, Xa y IXa, principalmente). A continuación, la heparina se libera intacta y seguidamente puede reaccionar con una nueva molécula de antitrombina.

Debería mencionarse que el efecto farmacodinámico de las heparinas depende de la longitud de cadena de los oligosacáridos. De hecho, para inhibir la trombina, la heparina debe fijarse en ATIII y en trombina por un bloque de pentasacáridos. Por otra parte, para inhibir el factor Xa, la heparina solamente debería fijarse en la ATIII por el bloque de pentasacáridos. Así, los fragmentos con una masa molecular (MM) por debajo de 5.400 Da, es decir, 18 unidades de sacáridos, pierden su capacidad para fijarse simultáneamente a la trombina y a la ATIII y así tendrán una actividad esencialmente anti-Xa. Los fragmentos con una MM superior o igual a 5.400 Da serán tanto anti-Xa como anti-IIa. La heparina estándar comprende fragmentos con una masa molecular variable de 2.000 a 30.000 Da y por tanto tiene actividad en los dos factores, Xa y IIa [Heparin and Low-Molecular-Weight Heparin: The Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. Hirsh y Raschke. *Chest. 2004; 126: 188S-203S*]. Por tanto, tiene actividad antitrombótica y anticoagulante, en comparación con las heparinas de bajo peso molecular, que son esencialmente agentes antitrombóticos con predominio de actividad anti-Xa.

La enfermedad tromboembólica venosa sigue siendo responsable de una morbilidad y/o mortalidad importantes. De hecho, en los Estados Unidos, el número de personas hospitalizadas por este motivo se estima entre 300.000 y 600.000 al año. Además, esta enfermedad, debido a la embolia pulmonar de la que es la causa, sería responsable de 50.000 [Development of oral heparin therapy for prophylaxis and treatment of deep venous thrombosis. Money y Gorka. *Cardiovasc Surg. 2001; 9: 211-8*] a 100.000 muertes al año en los Estados Unidos [Prevention of venous thromboembolism. Agnelli y Sonaglia. *Tromb Res. 2000, 97: V49-62*].

Adicionalmente, la embolia pulmonar puede producirse sin trombosis venosa clínica, en adelante el interés estará en la prevención en lo que respecta a los pacientes con riesgos de trombosis, entre los que están: cáncer, más de 70 años de edad, inmovilidad prolongada, parálisis, obesidad o incluso tomando estrógenos por vía oral.

Dado que la heparina actúa sobre los factores de coagulación por un mecanismo de catálisis mediado por ATIII, la medida de su concentración en plasma no constituye un medio eficaz para determinar su actividad biológica.

Los procedimientos usados deberían reflejar en su lugar la capacidad de la heparina para inhibir los factores Xa y IIa. Por este motivo, pueden usarse diferentes procedimientos de medida en seres humanos y animales:

- la medida de la actividad de los factores de coagulación, expresada en unidades de inhibición de la actividad de Xa o de IIa.
- la medida del tiempo de hemorragia determinada por el tiempo de tromboplastina parcial activado (aPTT). Esta prueba explora la vía intrínseca de la coagulación que mide el tiempo de coagulación de plasma descalcificado y empobrecido en plaquetas en presencia de un equivalente de plaquetas (cefalina) y calcio.
- la medida del tiempo de protrombina que explora la vía de coagulación intrínseca; este procedimiento usa plasma sanguíneo recalcificado en presencia de tromboplastina tisular [Digestive absorption of heparin with

alternative formulations. Ubrich y cols., 2002. S.T.P. Pharma Sciences. 2002; 12: 147-55].

Existe otro procedimiento que se da solamente en animales y consiste en la medida de la variación en el tamaño de un trombo. Esto no permite cuantificar la respuesta, pero muestra si existe una acción farmacológica demostrada del anticoagulante.

5 Insulina como compuesto activo de interés

La insulina es la hormona "anabólica" por excelencia; es decir, permite proporcionar las células con el suministro suficiente de glucosa para el procedimiento de síntesis con gasto de energía, que a continuación, a través de glucólisis y respiración celular, producirá la energía necesaria en forma de ATP (mononucleótido trifosfato de adenosina) que usa el metabolismo como unidad de energía transportable para dichos procedimientos.

10 Mantiene la concentración de glucosa en nuestra sangre. Lo consigue porque cuando el nivel de glucosa es elevado el páncreas la libera en la sangre. Su función es la de favorecer la absorción celular en la glucosa.

Es una de las dos hormonas producidas por el páncreas junto con el glucagón (a diferencia de la insulina, cuando el nivel de glucosa disminuye, se libera en la sangre). La insulina es producida en el páncreas en los "islotes de Langerhans", por células denominadas células beta. Una forma de detectar si las células beta producen insulina consiste en llevar a cabo una prueba, verificando la presencia de péptido C en la sangre. El péptido C es liberado en la sangre cuando las células beta procesan la proinsulina, convirtiéndola en insulina. Solamente cuando entre el 10 % y el 20 % de las células beta están en buen estado, empiezan a aparecer los síntomas de diabetes, pasando primero a través de un estado anterior denominado luna de miel en el que el páncreas todavía secreta algo de insulina.

20 Normalmente, las insulinas usadas en la actualidad son sintetizadas por medio de ingeniería genética a través de tecnología de ADN recombinante, debido al hecho de que se persigue una actividad rápida, media o lenta.

Tipos de insulinas:

En diabetes de tipo I y en algunos casos de tipo II, es necesario inyectar insulina para mantener un nivel correcto de glucosa en la sangre. Existen los siguientes tipos de insulinas:

- 25 - Insulinas de acción rápida.
- Insulinas de acción intermedia o NPH.
- Insulinas de acción lenta.
- Insulinas de 24 horas.

Por zonas de inyección. Los autores de la invención también pueden clasificarlas por zonas de inyección como:

- 30 - Insulinas subcutáneas: cualquier insulina, ya sea de acción rápida o retardada.
- Insulinas endovenosas: solamente insulinas de acción rápida que no tengan retardantes.
- Insulina inhalada: en la actualidad existe un nuevo tipo de insulina, insulina inhalada, que a pesar de tener la misma eficacia que la tradicional, elimina la necesidad de que sea inyectada en el paciente.

35 Sin embargo, en el mercado no existe ninguna insulina que pueda ser administrada por vía oral, lo que hace nuestra formulación sólida extremadamente interesante.

Ejemplo 1: formación de gránulos con heparina.

Los gránulos de heparina se han preparado por la dispersión de una solución de heparina en celulosa microcristalina (MCC) con el fin de producir gránulos primarios que, a continuación, se han mezclado con la ayuda de una solución orgánica de Eudragit® RS (ERS) y poli-ε-caprolactona (PCL), ambos en cantidades equivalentes.

40 Como un procedimiento alternativo, los gránulos de heparina se han preparado humidificando los polímeros con una solución acuosa que contiene heparina. La primera fase consiste en dispersar una solución de heparina en un polvo de celulosa microcristalina. Los gránulos primarios, producidos durante esta fase, se vuelven a mezclar a continuación con la ayuda de una suspensión acuosa de Eudragit® RS y etilcelulosa.

45 Se han realizado estudios *in vitro* con el fin de determinar los rendimientos de fabricación y el contenido en agua de los gránulos fabricados y de evaluar la cinética de liberación *in vitro* del compuesto activo. Finalmente, se ha realizado un estudio preliminar *in vivo* en conejos blancos de Nueva Zelanda después de la administración oral de estos gránulos de heparina, con el fin de evaluar la absorción y la biodisponibilidad oral de la heparina.

Ejemplo 2: formación de gránulos con Enoxaparina

50 La enoxaparina es una heparina de bajo peso molecular (4.500 ± 1.000 Daltons) cuyas actividades antitrombóticas y anticoagulantes están disociadas. Se caracteriza por una mayor actividad anti-Xa que actividad anti-IIa, siendo la proporción entre las dos actividades de 3,6.

La forma usada para nuestros experimentos es una solución acuosa de LOVENOX[®] dosificada a 10.000 UI de anti-Xa/ml y diseñada comercialmente para la vía subcutánea.

Los polímeros usados para la creación de la matriz polimérica son:

Celulosa:

- 5 La celulosa es un homopolisacárido natural formado por unidades de α -D-glucopiranosas unidas entre sí por un enlace 1-4 glucosídico. Existen puentes de hidrógeno intra e intermoleculares en el interior de la molécula y la consecuencia inmediata de esta característica estructural es la insolubilidad de la celulosa en solventes orgánicos clásicos y en el agua. La celulosa se usa ampliamente en la industria farmacéutica como excipiente en compresión directa.

10 Eudragit[®] RS 30 D:

Eudragit[®] RS 30 D, proporcionado amablemente por Degussa (Darmstadt, Alemania), es un copolímero de cloruro de metacrilato de trimetilamonioetilo que tiene una carga positiva global con una baja concentración en grupos de amonio cuaternario (del 8 al 12 %). Este polímero es un polímero sintético no biodegradable. No es absorbido ni metabolizado, razón por la que se elimina intacto. Es insoluble en agua pero soluble en solventes orgánicos. Se presenta en la forma de una suspensión acuosa en una concentración de polímero del 30 % (m/v).

15 Aquacoat[®] ECD:

Aquacoat[®] ECD, proporcionado amablemente por FMC BioPolymer (Newark, DE, EE.UU.), corresponde a una suspensión de un polímero sintético de etilcelulosa, no iónico, insoluble en agua pero soluble en solventes orgánicos. Aquacoat[®] ECD se usa en la industria farmacéutica para la fabricación de gránulos y sistemas matriciales, así como para revestir comprimidos. Está disponible también en la forma de una suspensión acuosa en una concentración de polímero del 30 % (m/v).

A continuación se describen los procedimientos usados para la granulación:

Fase de granulación primaria

- 25 La primera fase, denominada granulación primaria, consiste en mezclar la solución acuosa de enoxaparina (2 ml a 2.000, 3.000, 4.000 o 5.000 UI de anti-Xa) con 1 g de celulosa microcristalina (MCC). Después de secar durante 2 horas 30 en el horno a 40 °C, los aglomerados son obligados a pasar a través de una criba de metal con una abertura de malla de 600 μ m. A continuación los gránulos primarios así producidos se secan durante 24 horas en el horno a 40 °C (Figura 1, Diagrama 1).

Adición de polímeros

- 30 La segunda fase, de regranulación, consiste en añadir una suspensión acuosa de polímeros a los gránulos primarios. A continuación los gránulos primarios se mezclan directamente con diferentes proporciones (100/0, 75/25, 50/50, 25/75, 0/100) de suspensiones acuosas de Aquacoat[®] ECD (AqC) y/o Eudragit[®] RS 30 D (RS) correspondientes a 400 mg de polímeros. El producto se seca en el horno a 40 °C durante 30 minutos. Una vez secos, se fuerza a pasar a los aglomerados a través de la criba de metal con una abertura de malla igual a 600 μ m. Los gránulos producidos se secan en el horno a 40 °C durante 24 horas (Figura 1, Diagrama 2).

Los gránulos "vírgenes", sin heparina, se han preparado de la misma manera, sustituyendo la solución de heparina por agua. Los gránulos primarios preparados con 500 y 1.000 UI de anti-Xa se mezclan también con Eudragit[®] RS 30 D al 100 %.

- 40 Finalmente, los gránulos primarios producidos con 500 mg de MCC y 5.000 UI de anti-Xa de enoxaparina (2 ml) y a continuación mezclados con Eudragit[®] RS 30 D al 100 %, también se han formulado según el mismo procedimiento.

Caracterización de los gránulos producidos:

Morfología y tamaño

- 45 Los gránulos se han observado al microscopio óptico en estas condiciones [Figura 2 (izquierda)] y después se han dispersado en una solución de PVA al 4 % [Figura 2 (derecha)]. Después de la adquisición de la imagen, se analiza por un programa informático (programa Kappa) que permite calcular el tamaño.

Rendimiento de fabricación

El rendimiento de la preparación se calcula con respecto a las masas iniciales de celulosa, los polímeros de adición y la enoxaparina.

Contenido de agua

El contenido de agua de los diferentes gránulos preparados se ha obtenido por potenciometría usando el método de Karl Fisher. Las medidas del contenido de agua se han realizado por duplicado para cada muestra. Estas medidas se han realizado con la ayuda del potenciómetro Metrohm SA 756 KF (Herisau, Suiza).

- 5 Con el fin de optimizar el tiempo de secado de los gránulos primarios y de los que contienen mezcla de polímeros, el contenido de agua de los gránulos sin heparina se ha medido a lo largo del tiempo después de 2, 4, 8 y 24 horas de secado.

Con respecto al contenido de agua de los gránulos de heparina, se ha medido después de 24 horas de secado.

Cinética de liberación *in vitro*

- 10 El objetivo de este ensayo es determinar la cantidad de enoxaparina liberada por los gránulos a lo largo del tiempo. Esta liberación *in vitro* debería realizarse en condiciones definidas llamadas "de inmersión", es decir, aquellas en las que la concentración máxima de compuesto activo que puede ser liberada en un medio de liberación es inferior al 30 % de la concentración de saturación, de manera que el gradiente de concentración puede considerarse no limitante.

- 15 Los ensayos de liberación se han realizado en un baño de agua termostatzado a 37 °C, suspendiendo con suave agitación magnética (200 rpm) 50 mg de cada lote de gránulos de enoxaparina en 20 ml de tampón de fosfato (PBS, 0,011 M y NaCl, 0,15 M) a pH 7,4.

- 20 Se han tomado muestras de 1,5 ml con la pipeta automática después de 5, 10, 15, 30, 45 minutos y después de 1, 2, 4, 6, 8 y 24 horas. Los volúmenes recogidos son sustituidos por 1,5 ml de tampón nuevo con el fin de mantener un volumen constante en los matraces. A continuación se filtran estas partes alícuotas con un filtro MILLIPORE con porosidad de 0,22 µm.

Las cantidades de enoxaparina liberadas se evalúan por nefelometría y a continuación se establecen las curvas que representan las cinéticas de liberación de enoxaparina de acuerdo con el tiempo. La cinética de liberación se ha realizado por duplicado para cada una de las muestras (n = 2).

Determinación nefelométrica

- 25 El procedimiento de determinación nefelométrica se basa en la capacidad de numerosos grupos sulfato y carboxilato de enoxaparina de formar complejos con grupos de amonio cuaternario de una solución de cloruro de cetilpiridinio al 0,1 % (m/v) en presencia de un tampón de acetato. La importancia del complejo producido se evalúa por espectrofotometría de absorción a 500 nm.

- 30 Se hace una escala de calibración a partir de 10 UI/ml de solución de reserva de enoxaparina preparada en un tampón de fosfato al 0,1 %.

Se añaden sucesivamente tampón de acetato (500 µl) y cloruro de cetilpiridinio (2 ml) a 500 µl de cada concentración de enoxaparina o a muestras para dosificar. La combinación se incuba a 37 °C en un baño de agua durante una hora y a continuación se determina la absorbancia a 500 nm con la ayuda de un espectrómetro (espectrofotómetro Uvikon 922 de Kontron instruments).

- 35 La proporción de liberación se estima a partir de la fórmula siguiente:

$$\text{Proporción liberada (\%)} = \frac{[(\text{unidades liberadas en tiempo } t \times 20) + (\text{unidades liberadas en } t-1 \text{ por ml})] \times 100}{(\text{unidades encapsuladas por gramo de polímero}) \times 0,05 \text{ g}}$$

Ejemplo 3: estudios *in vivo* de gránulos con Enoxaparina

- Se han administrado cápsulas de tamaño 0 que contienen gránulos de enoxaparina en una dosis de 600 UI/kg a conejos macho de raza blanca de Nueva Zelanda después de un ayuno de 12 horas, pero con acceso libre al agua.
- 40 Se han tomado muestras de sangre (1,5 ml) de la vena marginal de la oreja en intervalos de tiempo regulares después de la administración oral (2, 4, 6, 8, 10 y 24 horas). La sangre se recoge en tubos con citrato (1 volumen de citrato de sodio por 9 volúmenes de sangre). Después de centrifugar las muestras de sangre a 3.000g durante 10 minutos, se extrae el plasma sanguíneo y se dosifica la actividad plasmática de anti-Xa con la ayuda de un autómata STAGO. Se han sometido a ensayo solamente los gránulos preparados con 1 g de MCC y 5.000 UI de anti-Xa y a continuación se mezclaron con Eudragit® RS 30 D, con Aquacoat® ECD y con una mezcla 50/50 de los dos polímeros.
- 45

Principio de ensayo de actividad anti-Xa:

La determinación se realizó junto con antitrombina III (ATIII) purificada para que los resultados no dependieran de una posible carencia de esta proteína. El principio se basa en la inhibición *in vitro* de factor Xa por complejos ATIII-

heparina por un procedimiento amidolítico en el sustrato cromogénico, según Teien [Evaluation of an amidolytic heparin assay method: increased sensitivity by adding purified antithrombin III. Teien y Lie. Thromb Res. 1977; 10: 399-410].

ATIII + heparina ----->	[ATIII-heparina]
5 [ATIII-heparina] + Xa (en exceso conocido) ----->	[ATIII-heparina-Xa] + Xa residual
Xa residual + sustrato cromogénico (CBS 31,39) ---->	Para-nitroanilina

Cuando el factor Xa se fija a un sustrato cromogénico, este libera para-nitroanilina, siendo su cantidad inversamente proporcional a la cantidad de heparina presente en el medio inicial. La para-nitroanilina se determina por espectrometría de absorción a 405 nm.

- 10 Después de la dilución de la solución de reserva de enoxaparina en el tampón de Orwen Koller (Stago) se establece una escala de calibración de 0 a 0,8 UI de anti-Xa/ml. Las medidas de los puntos en la escala y las muestras de plasma se realizan con un kit Strachrom y con la ayuda de un autómata STA (Stago Diagnostica).

Ejemplo 4: cálculo de la biodisponibilidad relativa de gránulos con Enoxaparina

- 15 La biodisponibilidad es un parámetro que caracteriza la proporción y la velocidad a la que se absorbe un compuesto activo en el organismo con respecto a la dosis administrada. Normalmente, se caracteriza por la monitorización de la molécula no alterada en la sangre. La comparación de las áreas bajo las curvas después de las administraciones oral y subcutánea conduce a la biodisponibilidad relativa, que desvela la cantidad absorbida por vía oral con respecto a la cantidad absorbida por vía subcutánea, corregida por la dosis administrada. El parámetro velocidad se mide en general de forma indirecta, midiendo el tiempo hasta el tiempo máximo (Tmax) y la concentración máxima (Cmax).

20 La biodisponibilidad relativa se calcula según la fórmula:

$$\text{Biodisponibilidad relativa} = \frac{\text{área bajo la curva, dosis oral} \times \text{subcutánea}}{\text{área bajo la curva, dosis subcutánea} \times \text{oral}}$$

Ejemplo 5: cálculo del rendimiento de fabricación de gránulos con Enoxaparina

- 25 En la figura 3 se indican los rendimientos de fabricación medios de cada formulación de gránulo y varían entre el 90 % y el 99 %. Sin embargo, son ligeramente menores y están entre el 88 % y el 92 % para los gránulos preparados con 2.000 UI de heparina anti-Xa (figura 3) con desviaciones típicas más significativas.

Contenido de agua de los gránulos que contienen mezcla de polímeros

- 30 La figura 4 muestra lógicamente que el contenido de agua disminuye con el tiempo durante la fase de secado de los gránulos primarios y de los mezclados con Eudragit® RS 30 D y Aquacoat® ECD 50/50, con pequeñas diferencias significativas entre los gránulos primarios y los gránulos revestidos. Se obtiene un contenido de agua medio de aproximadamente el 4 % 24 h después de secar para los dos tipos de gránulos, con una pequeña diferencia entre 8 h (del 4 al 6 %) y 24 h (del 3 al 5 %) de secado.

- 35 En la figura 4 se indica el contenido de agua medio para cada forma de gránulos de enoxaparina preparados con diferentes cantidades de HBPM y más tarde mezclados con diferentes proporciones de polímero. Está situado entre el 2 y el 4 %, con independencia de la cantidad de heparina y el polímero o polímeros añadidos.

- 40 Este estudio preliminar se ha realizado con el fin de estandarizar el tiempo de secado de los gránulos primarios y de los gránulos que contienen mezcla de polímeros. Este estudio muestra un contenido de agua estable entre el 2 y el 5 % después de 24 horas de secado, tanto para los gránulos primarios como para los gránulos que contienen la mezcla de polímeros. Este tiempo de secado, de acuerdo con las características generales de los gránulos, se mantiene para los otros ensayos. El contenido de agua de los gránulos es un parámetro que puede afectar a la estabilidad de los gránulos. En efecto, un secado prolongado a 40 °C puede degradar la enoxaparina y un contenido de agua demasiado alto puede conllevar la degradación de los polímeros. De hecho, el agua puede desempeñar el papel de plastificante que modifica las propiedades fisicoquímicas de los polímeros y reduce así la estabilidad de la forma del fármaco.

- 45 Este procedimiento de fabricación de gránulos que contienen una mezcla de polímeros del compuesto activo y un polímero (dispersión de heparina de bajo peso molecular (enoxaparina) en el polímero de celulosa y el mezclado posterior con diferentes polímeros para la formación del gránulo final) constituida por dos fases, permite alcanzar rendimientos altos de fabricación, con pérdidas muy pequeñas durante todo el procedimiento. Este resultado es muy interesante dentro del marco de un desarrollo industrial, asociado a unos costes de producción y material no muy elevados.

Cinética de disolución *in vitro* de los gránulos que contienen mezcla de polímeros

Los resultados de la cinética de disolución se expresan como porcentaje de enoxaparina liberada con respecto a la cantidad inicial usada durante la preparación de los gránulos o en UI de enoxaparina liberada por gramo de gránulos (Figura 5). La cinética de disolución tendrá el mismo perfil caracterizado por una fase inicial importante denominada "explosión" en la que se libera prácticamente toda la enoxaparina y una segunda fase consistente en una meseta. Es posible mencionar también que cuanto mayor sea la cantidad de Eudragit® RS 30 D que contiene una formulación y más alto sea su porcentaje, menor será el número de UI de enoxaparina liberada. Por el contrario, cuanto mayor cantidad de etilcelulosa contenga una formulación, mayor será la liberación de heparina.

Los estudios *in vitro* han permitido, a la luz de la cinética de disolución, confirmar la existencia de interacciones electrostáticas entre los grupos de amonio cuaternario de Eudragit® RS 30 D y los grupos carboxilo y sulfato de enoxaparina. En efecto, cuanto mayor sea el número de gránulos que contiene el Eudragit® RS 30 D, menor será la enoxaparina liberada. Por el contrario, para los gránulos primarios formados por la mezcla de celulosa microcristalina y mezclados con etilcelulosa, los estudios de disolución *in vitro* muestran una liberación total de la enoxaparina, lo que sugiere una ausencia de interacción entre enoxaparina y etilcelulosa, un polímero sin carga global. Además, para la misma cantidad de Eudragit® RS 30 D, cuanto mayor sea el aumento en la cantidad de enoxaparina usado durante la preparación de los gránulos, mayor será la cantidad de enoxaparina liberada (figura 5). Si se toman como ejemplo los gránulos primarios de celulosa microcristalina mezclados con una dispersión acuosa que contiene Eudragit® RS 30 D al 100 % (figura 6), no tiene lugar liberación de enoxaparina en nuestras condiciones experimentales cuando se han usado 500 y 1.000 unidades de anti-Xa preparando los gránulos, mientras que aparece progresivamente una liberación para los gránulos que contienen 2.000, 3.000, 4.000 o 5.000 UI de enoxaparina. Por tanto, los autores de la invención pueden proponer la hipótesis de que con 500 y 1.000 UI, la cantidad de Eudragit® RS 30 D es suficiente para fijar toda la enoxaparina por enlaces electrostáticos que son difíciles de romper en las condiciones de disolución de este ensayo. Los autores de la invención pueden suponer asimismo que cuanto menor cantidad de heparina exista, más cadenas pueden fijarse a varios puntos en los grupos de amonio cuaternario de Eudragit® RS 30 D, no favoreciendo la liberación.

Además, para los gránulos primarios mezclados con Eudragit® RS 30 D, asociados o no con Aquacoat® ECD, cuanto menor sea la cantidad inicial de enoxaparina usada menor será la cantidad de heparina liberada. Este resultado se confirma adicionalmente por el hecho de que cuando se usan 500 o 1.000 unidades de enoxaparina anti-Xa para los gránulos primarios mezclados con una suspensión acuosa que contiene Eudragit® RS 30 D al 100 %, la liberación de HBPM disminuye adicionalmente, hasta llegar a cero (figura 6).

Sea cual sea la cantidad de enoxaparina en los granulados, los perfiles de liberación se caracterizan todos por una liberación inmediata más o menos importante, seguida por una meseta. La liberación inicial de enoxaparina puede conducir a la disolución de las cadenas de enoxaparina no fijadas en Eudragit® RS 30 D, siendo esta cantidad más importante cuanto más alta es la cantidad de enoxaparina en los granulados. Además, la liberación incompleta de la heparina después de 24 horas podría deberse al hecho de que las interacciones que unen la enoxaparina con el polímero son fuertes y en cualquier caso, no se rompen en las condiciones de disolución experimentales de los autores de la invención. Estos resultados demuestran que cantidades en aumento de Eudragit RS 30 D presente en la matriz del granulado reducen la cantidad de compuesto activo liberado.

Después de la administración oral de gránulos mezclados con suspensiones acuosas que contienen Eudragit® RS 30 D al 100 %, Aquacoat® ECD al 100 % y una mezcla 50/50 de Eudragit® RS 30 D/Aquacoat® ECD, se observa una absorción oral de enoxaparina, lo que demuestra que no existe correlación directa entre los estudios *in vitro* e *in vivo*. En efecto, los estudios *in vitro* muestran que los gránulos primarios de MCC mezclados solamente con etilcelulosa tienen el mejor perfil de liberación, mientras que *in vivo* estas mismas formulaciones tienen unas actividades anti-Xa muy bajas. Por el contrario, los granulados de MCC primarios mezclados solamente con Eudragit® RS 30 D tienen los perfiles de absorción oral más elevados. Este último resultado muestra la existencia de interacciones posibles entre las cargas positivas de los grupos de amonio cuaternario de Eudragit® RS y las cargas negativas de la mucosa intestinal, confirmando así las propiedades mucoadhesivas de los derivados poliacrílicos (Jiao y cols., 2002(c)). La adhesión de los gránulos en la pared digestiva puede crear un gradiente de concentración que facilitaría la liberación de enoxaparina en las proximidades de la mucosa intestinal. Por otra parte, Eudragit® RS 30 D, un polímero policationico, tal vez pueda, tal como quitosano, favorecer la apertura de las uniones densas y permitir así el paso de la enoxaparina por vía paracelular. La presencia por su parte de MCC en la superficie favorecería la liberación de cantidades suficientes de compuesto activo, demostrando que la presencia combinada de los dos polímeros en la superficie equilibra la relación necesaria entre la afinidad por la mucosa de absorción y la liberación de compuesto activo.

Estos resultados permiten que los gránulos de enoxaparina ocupen un lugar interesante entre el grupo de otras estrategias que muestran la administración de heparinas por vía oral. Estos resultados muestran un fuerte potencial, que también se ha confirmado por la administración *in vivo* de formulaciones constituidas por un gránulo primario formado por una dispersión acuosa de Heparinas de Bajo Peso Molecular en un núcleo de MCC que posteriormente se reviste con el revestimiento en técnica de lecho fluidizado con una solución orgánica de una mezcla de Eudragit RS PO y Policaprolactona en una proporción 50/50.

Eudragit® RS PO es un copolímero de cloruro de metacrilato de trimetilamonioetilo que tiene una carga positiva global con una baja concentración en grupos de amonio cuaternario (del 8 al 12 %). Este polímero es un polímero sintético no biodegradable. No es absorbido o metabolizado, razón por la que se elimina intacto. Es insoluble en agua pero soluble en solventes orgánicos. Se presenta en la forma de un polvo seco.

5 Ejemplo 6: estudios *in vivo* de gránulos con Enoxaparina

Medida de actividad anti-Xa

La figura 7 compara las actividades de actividad anti-Xa en plasma después de la administración oral a conejos de gránulos de enoxaparina (600 UI/kg) y después de una inyección subcutánea de solución de enoxaparina comercial (300 UI/kg). Puede observarse que los gránulos primarios de MCC mezclados solamente con etilcelulosa (Aquacoat) tienen una actividad anti-Xa muy baja, en realidad casi nula. Por el contrario, los gránulos primarios de MCC mezclados solamente con Eudragit® RS 30 D, que generan la actividad más prolongada y los valores más elevados de Cmax (Cmax = $0,45 \pm 0,12$ UI de anti-Xa/ml), corresponden a un Tmax de 6 horas. Los gránulos primarios de MCC mezclados con la suspensión acuosa de Eudragit® RS y etilcelulosa en proporción 50/50 conducen a Cmax ligeramente inferiores (Cmax = $0,4 \pm 0,12$ UI de anti-Xa/ml) correspondientes a un Tmax de 4 horas.

15 Biodisponibilidades relativas

Después de calcular las áreas bajo la curva usando el método trapezoidal, las biodisponibilidades relativas calculadas 8 horas después de la administración oral de los gránulos han dado los valores siguientes: el 6,1 % para los gránulos primarios de MCC mezclados solamente con etilcelulosa, el 17,8 % para los gránulos primarios de MCC mezclados con Eudragit® RS y el 17,3 % para los gránulos primarios de MCC mezclados con la mezcla 50/50 de Eudragit® RS/etilcelulosa.

Cualquiera que sea la cantidad de enoxaparina en los granulados, los perfiles de liberación se caracterizan todos por una liberación inmediata más o menos importante, seguida por una meseta. La liberación inicial de enoxaparina puede conducir a la disolución de las cadenas de enoxaparina no fijadas en el Eudragit® RS 30 D, siendo esta cantidad más importante cuanto más elevada sea la cantidad de enoxaparina en los gránulos. Además, la liberación incompleta de la heparina después de 24 horas podría deberse al hecho de que las interacciones que unen la enoxaparina con el polímero son fuertes y en cualquier caso, no se rompen en las condiciones experimentales de disolución del presente estudio.

Después de la administración oral de gránulos primarios de MCC mezclados con suspensiones acuosas que contienen Eudragit® RS 30 D al 100 %, Aquacoat® ECD al 100 % y una mezcla 50/50 de Eudragit® RS 30 D/Aquacoat® ECD, se observa una absorción oral de enoxaparina, lo que demuestra que no existe correlación directa entre los estudios *in vitro* e *in vivo*. De hecho, los estudios *in vitro* muestran que los gránulos primarios de MCC mezclados solamente con etilcelulosa tienen el mejor perfil de liberación, mientras que *in vivo* estas mismas formulaciones tienen actividades anti-Xa muy bajas. Por el contrario, los gránulos primarios de MCC mezclados solamente con Eudragit® RS 30 D tienen los mayores perfiles de absorción oral. Este último resultado demuestra la existencia de posibles interacciones entre las cargas positivas de los grupos de amonio cuaternario de Eudragit® RS y las cargas negativas de la mucosa intestinal, confirmando así las propiedades mucoadhesivas de los derivados poliacrílicos, mientras que el derivado de celulosa permitiría la liberación de niveles suficientemente altos de compuesto activo. La adhesión de granulados en la pared digestiva puede crear un gradiente de concentración que facilitaría la liberación de enoxaparina en las proximidades de la mucosa intestinal. Por otro lado, Eudragit® RS 30 D, polímero policationico, como el quitosano, favorece probablemente la apertura de las uniones densas y permite así el paso de enoxaparina por vía paracelular.

Estos primeros resultados permiten que los granulados de enoxaparina ocupen un lugar interesante entre el grupo de otras estrategias que muestran la administración de heparinas por vía oral. Estos resultados muestran el fuerte potencial de las formulaciones preparadas en la presente invención.

45 Ejemplo 7: preparación de gránulos que contienen Tinzaparina

La tinzaparina es una heparina de bajo peso molecular cuyas actividades antitrombóticas y anticoagulantes están disociadas. Se caracteriza por una actividad anti-Xa mayor que la actividad anti-IIa, siendo la proporción entre ambas actividades de 1,8.

La forma usada para los experimentos de los autores de la presente invención es una solución acuosa de INNOHEP® dosificada con 18.000 UI de anti-Xa/0,9 ml y diseñada comercialmente para la vía subcutánea.

Los polímeros usados para la creación de la matriz polimérica son:

Celulosa:

En este ejemplo se ha usado su forma sólida disuelta en acetona a diferentes concentraciones.

Poli-ε-caprolactona (PCL):

La PCL es un poliéster alifático semicristalino con una masa molecular de 42.000 g/mol. Es un polímero biodegradable, para el que la hidrólisis da lugar a la formación de monómeros solubles en agua que se eliminan en la orina (Chen DR y cols. Polycaprolactone microparticles and their biodegradation. Polymer degradation and stability, 2000, 52: 117-126). La PCL es insoluble en agua y soluble en solventes orgánicos como acetona. La PCL se ha obtenido de Sigma-Aldrich.

Los procedimientos usados para la granulación han sido los siguientes:

La fabricación de los gránulos se realiza en dos fases. La primera fase, denominada granulación primaria, consiste en mezclar la solución acuosa de tinzaparina (5.000 UI de anti-Xa) con 1 g de celulosa microcristalina (MCC). Después de secar la masa, se obliga a los aglomerados a pasar a través de una criba de metal con abertura de malla de 600 µm. A continuación los granulados primarios así producidos se secan durante 5 minutos en el horno a 40 °C.

La segunda fase, de regranulación, consiste en añadir una solución de Eudragit RS y PCL en proporciones equivalentes en acetona (100 mg/ml de cada uno de los dos polímeros) a los gránulos. Se ha estudiado la adición de diferentes cantidades de esta mezcla de polímeros a los gránulos primarios de celulosa y tinzaparina. Así, variando el volumen de solución orgánica añadida a los gránulos primarios producidos anteriormente, se han obtenido gránulos con cantidades de la mezcla de Eudragit RS y PCL en cantidades de 200, 400, 600 y 800 mg por gramo de celulosa. La combinación se seca en el horno a 40 °C durante 30 minutos. Una vez seca, se obliga a los aglomerados a pasar a través de la criba de metal con una abertura de malla igual a 600 µm. Los gránulos producidos se secan en el horno a 40 °C durante 5 minutos.

En la tabla siguiente se muestran las proporciones de los diferentes polímeros así producidos:

Formulación	% Celulosa	% Eudragit RS	% PCL
1	83,33	8,33	8,33
2	71,43	14,28	14,28
3	62,50	18,75	18,75
4	55,55	22,22	22,22

Los gránulos “vírgenes”, sin heparina, se han preparado de la misma manera, sustituyendo la solución de heparina por agua.

En un procedimiento de regranulación alternativo, se añade una solución de Eudragit RS en acetona (200 mg/ml) a los gránulos primarios. Se ha estudiado la adición de diferentes cantidades de esta solución de Eudragit RS a los gránulos primarios de celulosa y tinzaparina. Así, variando el volumen de solución orgánica añadida a los gránulos primarios producidos anteriormente, se han obtenido gránulos con cantidades de Eudragit RS en cantidades de 200, 400, 600 y 800 mg por gramo de celulosa. La combinación se seca en el horno a 40 °C durante 30 minutos. Una vez secos, se obliga a los aglomerados a pasar a través de la criba de metal con una abertura de malla igual a 600 µm. Los gránulos producidos se secan en el horno a 40 °C durante 5 minutos.

En la tabla siguiente se muestran las proporciones de los diferentes polímeros así producidos:

Formulación	% Celulosa	% Eudragit RS
5	83,33	16,66
6	71,43	28,57
7	62,50	37,50
8	55,55	44,44

Los gránulos “vírgenes”, sin heparina, se han preparado de la misma manera, sustituyendo la solución de heparina por agua.

Caracterización de los gránulos producidos:**Morfología y tamaño**

El tamaño de partícula de los gránulos se ha determinado por la técnica de difracción láser en un aparato Malvern Mastersizer. Los gránulos primarios se vuelven a poner en suspensión en tampón de fosfato de pH 7,4. Durante la medida, la suspensión se mantiene agitando el recipiente de medida.

5 El tamaño medio de los gránulos producidos ha estado en todos los casos entre 100 y 150 μm tal como se representa en la figura 8.

Cinética de liberación *in vitro*

10 El objetivo de este ensayo es determinar la cantidad de tinzaparina liberada por los gránulos a lo largo del tiempo. Esa liberación *in vitro* debería realizarse en condiciones definidas denominadas "de inmersión", es decir, aquellas en las que la concentración máxima de compuesto activo que puede liberarse en un medio de liberación es inferior al 30 % de la concentración de saturación, de manera que el gradiente de concentración puede considerarse no limitante.

Los ensayos de liberación se han realizado en un baño de agua termostataado a 37 °C, suspendiendo con agitación magnética suave (300 rpm) 50 mg de cada lote de gránulos de tinzaparina en 20 ml de tampón de fosfato (PBS, 0,011 M y NaCl, 0,15 M) a pH 7,4 que contiene Tween 80 al 0,1 %.

15 Se tomaron muestras de 1 ml con la pipeta automática después de 5, 10, 15, 30, 45 minutos y después de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 24 horas. Los volúmenes recogidos fueron sustituidos por 1 ml de tampón nuevo con el fin de mantener un volumen constante en los matraces. A continuación se filtraron estas partes alícuotas con un filtro MILLIPORE con 0,22 μm de porosidad.

20 Las cantidades de tinzaparina liberada se evaluaron por nefelometría y a continuación se establecen las curvas que representan la cinética de liberación de tinzaparina con el tiempo. Las cinéticas de liberación se realizaron por triplicado para cada una de las muestras ($n = 3$). Los resultados se muestran en las figuras 9 y 10.

25 Los gránulos producidos tienen un perfil de liberación en dos fases, con una rápida liberación inicial seguida por una liberación sostenida. Tal como puede verse en las figuras 9 y 10, una mayor cantidad de polímeros añadida al núcleo primario reduce la liberación de la tinzaparina contenida en el mismo. Este hecho tiene lugar también tanto en los gránulos primarios mezclados con Eudragit RS como en aquellos mezclados con la solución de Eudragit RS y PCL y en ambos está relacionada con certeza con el aumento en la interacción entre tinzaparina y Eudragit RS.

Ejemplo 8: estudios *in vivo* de gránulos con Tinzaparina

Medida de la actividad anti-Xa

30 La figura 11 compara actividad anti-Xa en plasma después de la administración oral a conejos de gránulos con tinzaparina (600 UI/kg). Se ha observado que los gránulos primarios de MCC mezclados con 800 mg de Eudragit RS y PCL en cantidades equivalentes generan una absorción de tinzaparina muy superior que aquella obtenida con los gránulos primarios mezclados con 200 mg de la solución de Eudragit RS y PCL. A la luz de estos resultados, se demuestra claramente el incremento en el porcentaje de polimerización de Eudragit RS con respecto a la presencia de polímeros con una carga negativa o neutra (el 8,33 % en la formulación en la que se añaden 200 mg y más del 22 % en la formulación en la que se añaden 800 mg). Este incremento en la absorción se muestra a través de un valor superior de C_{max} (1,58 en comparación con 0,57 UI de anti-Xa/ml) así como a través de un aumento en el área bajo la curva y la biodisponibilidad ($F = 28,26$ en comparación con $F = 15,46$). Como puede observarse con claridad, el aumento en la biodisponibilidad no está relacionado con una mayor cantidad de compuesto activo liberado a partir de las formulaciones, ya que las formulaciones constituidas por gránulos primarios de MCC que se mezclan con 200 mg de la solución polimérica de Eudragit RS y PCL liberan más tinzaparina y a mayor velocidad que las formulaciones que se mezclan con 800 mg de la solución de Eudragit RS y PCL.

45 El ensayo *in vivo* demuestra que la tinzaparina, normalmente no absorbible después de su administración oral en forma de solución, se absorbe en cantidades significativamente elevadas cuando se administra en forma de gránulos cuando ellos tienen una composición adecuada. Las cantidades crecientes de Eudragit RS favorecen una mayor interacción del gránulo con la pared intestinal y principalmente con la mucosa cargada negativamente que la reviste, mientras que la presencia del poliéster biodegradable, PCL, favorece la liberación *in vivo* de tinzaparina en cantidades adecuadas. Esta hipótesis se ve respaldada por el hecho de que los gránulos primarios mezclados con 800 mg de Eudragit RS y PCL tiene un mayor perfil de absorción que los gránulos primarios de MCC que se mezclan con 800 mg de Eudragit RS.

Ejemplo 9: preparación de gránulos que contienen Bemiparina

La bemiparina es una heparina de bajo peso molecular cuyas actividades antitrombóticas y anticoagulantes están disociadas. Se caracteriza por una mayor actividad anti-Xa que la actividad anti-IIa, siendo la proporción entre las dos actividades entre 2 y 4.

La forma usada para los experimentos de la presente invención es una solución de Bemiparina acuosa partiendo de Bemiparina liofilizada (laboratorios ROVI) dosificada a 5.000 UI de anti-Xa/ml.

La fabricación de los gránulos se realiza en dos fases. La primera fase, denominada granulación primaria, consiste en mezclar la solución acuosa de Bemiparina (5.000 UI de anti-Xa en 1 ml) con 1 g de celulosa microcristalina (MCC). Después de secar la masa, se fuerza a los aglomerados a pasar a través de una criba de metal con abertura de malla de 600 µm. A continuación los gránulos primarios así producidos se secan durante 5 minutos en el horno a 40°C.

La segunda fase, de regranulación, consiste en añadir una dispersión acuosa de Eudragit RS (Eudragit RS 30 D) a los gránulos primarios. La combinación se seca en el horno a 40 °C durante 30 minutos. Una vez secos, se obliga a los aglomerados a pasar a través de la criba de metal con una abertura de malla igual a 600 µm. Los gránulos producidos se secan en el horno a 40 °C durante 5 minutos.

En la siguiente tabla se muestran las proporciones de los diferentes polímeros así producidos:

Formulación	% Celulosa	% Eudragit RS
1	55,55	44,44

Caracterización de los gránulos producidos:

Morfología y tamaño

El tamaño de partícula de los gránulos ha sido determinado por técnica de difracción láser en un aparato Malvern Mastersizer. Primero se vuelven a poner en suspensión los gránulos en tampón de fosfato de pH 7,4. Durante la medida, la suspensión se mantiene por agitación del recipiente de medida.

El tamaño medio de los gránulos producidos es de 150 µm aproximadamente.

Estudios *in vivo* de gránulos con Bemiparina

Medida de la actividad anti-Xa

La figura 12 compara las actividades anti-Xa en plasma después de la administración oral a conejos de gránulos con bemiparina en una dosis de 600 UI/kg. De forma similar a los producidos con gránulos de enoxaparina y tinzaparina, los gránulos que contienen Bemiparina dan lugar a niveles plasmáticos significativamente altos. La biodisponibilidad relativa a la administración subcutánea de Bemiparina disuelta en agua en una dosis de 150 UI/kg fue del 60,94 % y la Cmax de 0,54 UI/ml en plasma después de 4 horas.

Ejemplo 10: preparación de pellas que contienen Enoxaparina

La forma usada para los experimentos es una solución acuosa de LOVENOX® dosificada a 10.000 UI de anti-Xa/ml y diseñada comercialmente para la vía subcutánea.

La tabla siguiente muestra la composición de las pellas en porcentaje con respecto a la masa sólida final. Asimismo, en la tabla se incluye a modo de ilustración la cantidad de agua usada en la preparación de las pellas:

Eudragit RS 30D ^(a)	Plastificante de citrato de acetiltriethyl	MCC	Lactosa	Enoxaparina sódica ^(a,b)
20,76 %	0,4 %	55,23 %	21,10 %	2,51 %

Observaciones:

(a) Calculado como masa del sólido

(b) LOVENOX®: Enoxaparina sódica a una concentración de 10.000 UI/ml

- Dispersión de Eudragit RS 30D-69,20 g, de los que 20,76 g corresponden a la masa en seco del polímero y 48,44 g corresponden a la fase líquida

- Solución de enoxaparina (LOVENOX)-24,03 g, de los que 2,51 g corresponden a la enoxaparina en seco y 21,52 g corresponden a agua

En primer lugar, se mezclan la MCC, la lactosa y el plastificante durante 2 minutos en un mezclador (Tefal Kaleo, Francia). A continuación se añade gradualmente la dispersión de Eudragit RS a un flujo de 10 ml/min y la solución acuosa de enoxaparina, sometiendo la combinación a homogeneización durante 1 minuto. Se extruye la masa producida a través de poros de 0,6 mm (el grosor de la masa extrudida es 1 mm) y posteriormente se esferoniza durante 15 minutos a 640 rpm. Las pellas resultantes se secan en un horno ventilado a 40 °C durante 48 horas.

Los gránulos así producidos contienen 25,1 mg de Enoxaparina por gramo de pellas.

A pesar de que todos los componentes de la pella se distribuyen homogéneamente a lo largo de la formulación, la proporción de polímeros que forman la matriz y por tanto, están en la superficie es significativamente alta (el 55,23 % de MCC y el 20,76 % de Eudragit RS). Su no presencia en mayor cantidad es probablemente la causa de que la biodisponibilidad obtenida no esté en el nivel de los gránulos, tal como se hará evidente más adelante.

Caracterización de las pellas producidas:

Morfología y tamaño

El tamaño de partícula de las pellas producidas se ha determinado al microscopio óptico. El procedimiento permite preparar pellas con diámetros entre 0,5 y 1,2 mm. Para los ensayos *in vitro* e *in vivo*, se criba la masa de pellas para separarlas en dos partes con tamaños comprendidos entre 0,5-0,8 mm y 0,8-1,2 mm.

Cinética de liberación *in vitro*

El objetivo de este ensayo es determinar la cantidad de enoxaparina liberada por las pellas con el tiempo. Esta liberación *in vitro* debería realizarse en condiciones definidas denominadas "de inmersión", es decir, aquellas en las que la concentración máxima de compuesto activo que pueda liberarse en un medio de liberación es inferior al 30 % de la concentración de saturación, de manera que el gradiente de concentración pueda considerarse no limitante.

Los ensayos de liberación se han realizado en un baño termostatzado a 37°C, suspendiendo con agitación magnética suave (300 rpm) 50 mg de cada lote de pellas de enoxaparina en 20 ml de tampón de fosfato (PBS, 0,011 M y NaCl, 0,15 M) a pH 7,4, que contiene el 0,1 % de Tween 80.

Se han tomado muestras de 1 ml con la pipeta automática después de 5, 15 y 30 minutos y después de 1, 2, 4 y 24 horas. Los volúmenes recogidos se sustituyen por 1 ml de tampón nuevo con el fin de mantener un volumen constante en los matraces. A continuación se filtran estas partes alícuotas con un filtro MILLIPORE con 0,22 µm de porosidad.

Las cantidades de enoxaparina liberadas se evalúan por nefelometría y a continuación se establecen las curvas que representan la cinética de liberación de enoxaparina en función del tiempo. La cinética de liberación se ha realizado por triplicado para cada una de las muestras (n = 3).

Las pellas producidas tienen un perfil de liberación en dos fases, con una rápida liberación inicial seguida por una liberación sostenida. Tal como puede verse en la figura 13, no se observan diferencias relevantes en relación con la velocidad de liberación del compuesto activo en concordancia con el tamaño de pella, liberándose en todos los casos la enoxaparina rápidamente.

Ejemplo 11: estudios *in vivo* de pellas con Enoxaparina

Medida de la actividad anti-Xa

La figura 14 compara las actividades anti-Xa en plasma después de la administración oral a conejos de pellas con enoxaparina (600 UI/kg). Tal como puede observarse en la figura, la administración oral de las pellas a conejos blancos de Nueva Zelanda, con tamaños entre 0,5-0,8 mm y 0,8-1,2 mm, proporcionan absorciones significativamente altas, con niveles plasmáticos que se mantienen durante un periodo de 10 horas. La Cmax obtenida con pellas de tamaño entre 0,5 y 0,8 mm es 0,305 UI/ml después de 4 horas, mientras que la obtenida con pellas de tamaño entre 0,8 y 1,2 mm es 0,21 UI/ml después de 4-6 horas. Los valores de biodisponibilidad absoluta obtenidos son respectivamente del 13,7 % para pellas de tamaño entre 0,5-0,8 mm y del 10,4 % para pellas de tamaño entre 0,8-1,2 mm. A pesar de que las pellas de menor tamaño proporcionan mayor biodisponibilidad que las más grandes, resulta sorprendente obtener biodisponibilidades de esta magnitud con tales partículas grandes.

Este ensayo *in vivo* demuestra que el uso apropiado de polímeros en la preparación de formulaciones permite conseguir la absorción de enoxaparina en cantidades importantes después de su administración por vía oral. El efecto combinado de una adhesión suficiente a la pared mucosa y una liberación eficiente del compuesto activo proporcionada por Eudragit RS y celulosa microcristalina es suficientemente significativa para permitir que compuestos activos poco permeables a la barrera de absorción pasen a través de ella, a pesar del gran tamaño de las pellas que puede superar el milímetro de diámetro. Esta observación resulta sorprendente a la luz de la información que puede encontrarse hoy en día en el estado de la técnica, que subraya continuamente la necesidad de reducir el tamaño de la formulación para producir dispersiones más eficaces con un tiempo de contacto mayor con la mucosa de absorción. También resulta evidente para una persona experta en la materia que las

formulaciones incluidas en los ejemplos en el presente documento tienen ventajas adicionales innegables con respecto a la producción de micropartículas y nanopartículas, dado que son producidas por procedimientos usados comúnmente en la industria farmacéutica, tienen menos variabilidad en producción interlote y pueden aumentarse fácilmente de escala a lotes industriales, a diferencia de lo que sucede con otras formulaciones.

5 Ejemplo 12: formación de gránulos revestidos que contienen Bemiparina

La fabricación de los gránulos se realiza en dos fases. La primera fase, denominada preparación de núcleos, consiste en preparar gránulos primarios de bemiparina con celulosa microcristalina (MCC). Se ha usado un granulador/mezclador Zanchetta Rotolab[®] de alta velocidad preparando los gránulos.

Composición:

10	Avicel pH 101	100 g	95,24 %
	Bemiparina	5 g	4,76 %
	Agua milli-Q	c.s.	

Procedimiento de preparación:

- | | | |
|----|----|--|
| 15 | 1. | Disolver la Bemiparina en 50 ml de agua milli-Q y colocarla en el embudo de decantación. |
| | 2. | Pesar la cantidad exacta de avicel y colocarla en el recipiente del granulador. |
| | 3. | Añadir la solución de Bemiparina al avicel en movimiento debido a la paleta de impulsión. |
| | 4. | Verificar el grado de humectación del avicel y la formación de gránulos. |
| | 5. | Añadir la cantidad necesaria de agua milli-Q hasta que se forman los gránulos. |
| | 6. | Retirar los gránulos del equipo y cribarlos a través de una criba con una abertura de malla de 1 mm. |
| 20 | 7. | Secar en horno a 37 °C durante 2 horas y a continuación a temperatura ambiente. |

Condiciones del equipo:

Velocidad del impulsor (paleta de impulsión)	250-300 rpm
Troceador	Desactivado
Camisa de calentamiento	Desactivada

- 25 La segunda fase, de revestimiento, consiste en añadir una mezcla de polímeros a los gránulos primarios, disueltos o bien en suspensión, pulverizando los núcleos primarios en lecho fluidizado (Mini Glatt[®] con accesorio de microkit). A continuación los gránulos primarios se revisten directamente con diferentes proporciones de cada uno de los polímeros.

Composición:

30	Solución de revestimiento: Eudragit RS PO	2,5 g
	PCL	2,5 g
	Acetona	100 ml

- 35 Realizando el revestimiento de los gránulos primarios producidos anteriormente, los autores de la invención introducen 30 gramos de los mismos en el granulador para revestirlos con la solución de revestimiento mencionada anteriormente en la que ambos polímeros están en una relación 1:1. Los gránulos se han preparado con diferentes porcentajes de revestimiento (2,5, 4 y 8 % p/p en relación con la masa inicial de gránulos primarios introducidos). Se ha usado la misma concentración de sólidos en todos ellos, el 5 % en peso con respecto al volumen de acetona y el mayor o menor grado de revestimiento se consigue variando el volumen de la solución usada revistiendo el gránulo primario.

40 Procedimiento de preparación:

- | | | |
|----|----|--|
| 40 | 1. | Colocar el núcleo interno (30 g) en el producto llenando el tubulador del lecho fluidizado. |
| | 2. | Llenar el tubo flexible con la solución de revestimiento hasta la boquilla de pulverización. |
| | 3. | Encender el equipo y ajustar los parámetros del procedimiento. |
| | 4. | Realizar el revestimiento y retirar el producto final del tubulador. |

45 Parámetros del procedimiento:

Temperatura (°C)	Índice de bombeo	Presión de aire del procedimiento (bares)	Presión de aire de pulverización (bares)	Temperatura del aire del procedimiento (°C)
Temp. ambiente	1,0	0,08-0,15	0,50	25

Una vez que ha concluido la pulverización de la solución polimérica, el aire del procedimiento se mantiene durante 20 segundos secando el revestimiento.

Caracterización de los gránulos producidos:

5 Morfología y tamaño

Los granulados revestidos con la matriz de Eudragit RS y PCL, representando el revestimiento una ganancia del 4 % con respecto al gránulo primario de MCC y Bemiparina, se han observado al microscopio óptico en estas condiciones y después de haberse dispersado en una solución de PVA al 4 %. El tamaño se ha determinado por separación por cribado, usando cribas con aberturas de malla de 2, 1,5, 1,25, 1, 0,71, 0,315 y 0,125 mm. El resultado se expresa en porcentaje de la masa total medida que representan las diferentes fracciones obtenidas. En la figura 15 puede observarse la distribución de tamaños obtenida.

Tal como puede observarse en la figura, el 72,82 % de la masa total de los granulados tiene un tamaño de partícula superior a 0,315 mm, siendo la fracción principal la que tiene un tamaño entre 0,71 y 0,315 mm, lo que constituye el 45,85 % de la masa total del granulado.

15 Cinética de liberación *in vitro*

Los ensayos de liberación se han realizado en condiciones de inmersión en un aparato de disolución de 6 vasos con baño de agua termostatzado a 37 °C. Se han introducido 166 mg de gránulos producidos (con revestimiento al 4 %) en una cápsula de gelatina dura número 1 y las cápsulas se han introducido en cestas de centrífuga que se sumergen en el medio de disolución (400 ml de tampón de fosfato de pH 6,8). La velocidad de rotación de las cestas de centrífuga se ha mantenido a 100 rpm.

Se han tomado muestras de 1,5 ml con la pipeta automática después de 30 minutos y después de 1, 1,5, 2, 4, 6 y 24 horas. Los volúmenes recogidos se sustituyen por 1,5 ml de tampón nuevo con el fin de mantener un volumen constante en los vasos. A continuación estas partes alícuotas se filtran con un filtro MILLIPORE con porosidad de 0,22 µm.

Las cantidades de bemiparina liberada se evalúan por nefelometría y a continuación se establecen las curvas que representan la cinética de liberación de bemiparina en función del tiempo. La cinética de liberación se ha realizado por duplicado para cada una de las muestras (n = 2).

Tal como puede observarse en la figura 16, el perfil de liberación es de dos fases, similar al producido con los gránulos preparados por mezclado. En las dos medidas realizadas los porcentajes liberados después de una hora superan el 80 % del total incorporado. En este caso puede observarse que la cantidad de Eudragit RS y PCL es muy baja en el gránulo con respecto a la incorporada en las formulaciones producidas mezclando. No obstante, el revestimiento polimérico que contiene la matriz de Eudragit RS y PCL es capaz de liberar el compuesto activo de una forma similar a la producida con las formulaciones anteriores. A pesar de que se observa cierta retención de Bemiparina en el gránulo, probablemente debido a su interacción con el polímero catiónico, la cantidad de compuesto activo es suficiente para que sea liberada en cantidades significativamente altas.

Ejemplo 13: estudios *in vivo* de gránulos con Bemiparina

Medida de la actividad anti-Xa

La figura 17 compara las actividades anti-Xa en plasma después de la administración oral a conejos de cápsulas duras de gelatina (con revestimiento entérico de Eudragit L) que contienen gránulos de Bemiparina producidos según el ejemplo 12 (600 UI/kg). Tal como puede observarse en la figura, el revestimiento polimérico desempeña un papel extraordinariamente importante en la actividad biológica de las formulaciones administradas, ya que la administración oral de bemiparina en gránulos MCC no revestidos no provoca la aparición de niveles plasmáticos del compuesto activo. Asimismo, se observa una clara influencia del grosor del revestimiento en la actividad biológica de los gránulos producidos. A pesar del hecho de que el revestimiento del gránulo primario con una ganancia de peso del 2,5 % de la mezcla de Eudragit RS y PCL da lugar a la presencia de niveles plasmáticos detectables, probablemente la cantidad de revestimiento añadida no es suficiente para revestir completamente el granulado primario. Sin embargo, las adiciones de la mezcla de polímeros que representan una ganancia de peso del 4 y el 8 % proporcionan altas absorciones, con niveles plasmáticos que se mantienen durante un periodo de 24 horas. Los valores de C_{max} y las biodisponibilidades relativas obtenidas para cada una de estas formulaciones se reflejan en la siguiente tabla:

% revestimiento	Cmax	F(%) relativo a 150 UI/kg sc
0	0	0
2,5	0,90	5,58
4	0,3978	39,59
8	0,447	47,66

Es importante subrayar que en estos ejemplos Eudragit RS y la PCL se encuentran en cantidades equivalentes en la superficie. El efecto combinado de una adhesión suficiente a la pared mucosa y una liberación eficaz del compuesto activo proporcionado por Eudragit RS y PLC es suficientemente importante para permitir que los compuestos activos poco permeables a la barrera de absorción pasen a través de ella.

Para los objetivos de aclarar los resultados obtenidos y mostrar la actividad alcanzada con el material polimérico adecuado, se ha evitado intencionadamente la incorporación de excipientes usados comúnmente en procedimientos de granulación (tanto para el núcleo como para el revestimiento) pero también es obvio para una persona experta en la materia que este procedimiento de preparación pueda realizarse también usando cualquiera de los excipientes que puedan requerirse para optimizar el procedimiento de granulación.

Adicionalmente, se ha estudiado la actividad anti-Xa en el plasma de conejos blancos de Nueva Zelanda después de la administración oral de 600 UI/kg de gránulos de bemiparina preparados según el procedimiento descrito en el ejemplo 18 con un revestimiento del 5 % en cápsulas de gelatina no entéricas.

Tal como puede verse en la figura 18, el revestimiento entérico modifica el perfil cinético obtenido solamente en relación con el tiempo de aparición de los niveles plasmáticos de la actividad anti-Xa, pero ni la Cmax obtenida ni la biodisponibilidad varían significativamente con el uso de revestimientos entéricos en las cápsulas de gelatina. Por tanto, se demuestra suficientemente que la absorción de bemiparina obtenida no está relacionada con la liberación de formulaciones en el tracto intestinal, sino que las formulaciones permiten la absorción de bemiparina después de una única administración oral. El retardo observado en la aparición de niveles plasmáticos en el caso de las cápsulas entéricas está relacionado directamente con el tiempo necesario para que la cápsula pase a través de la cavidad digestiva y empiece a desintegrarse en un entorno de pH adecuado en el duodeno.

Ejemplo 14: formación de gránulos revestidos que contienen Bemiparina

La fabricación de los gránulos se realiza en dos fases. La primera fase, denominada preparación de núcleos, consiste en preparar gránulos primarios de bemiparina con celulosa microcristalina (MCC). Se ha usado un granulador/mezclador Zanchetta Rotolab® de alta velocidad preparando los gránulos.

Composición:

Avicel pH 101	100 g	95,24 %
Bemiparina	5 g	4,76 %
Agua milli-Q	c.s.	

Procedimiento de preparación:

1. Disolver la Bemiparina en 50 ml de agua milli-Q y colocarla en el embudo de decantación.
2. Pesar la cantidad exacta de avicel y colocarla en el recipiente del granulador.
3. Añadir la solución de Bemiparina al avicel en movimiento debido a la paleta de impulsión.
4. Verificar el grado de humectación del avicel y la formación de granulado.
5. Añadir la cantidad necesaria de agua milli-Q hasta que se forma el granulado.
6. Retirar el granulado del equipo y cribarlo a través de una criba con una abertura de malla de 1 mm.
7. Secar en horno a 37 °C durante 2 horas y a continuación a temperatura ambiente.

Condiciones del equipo:

Velocidad del impulsor (paleta de impulsión)	250-300 rpm
Troceador	Desactivado
Camisa de calentamiento	Desactivada

La segunda fase, de revestimiento, consiste en añadir una mezcla de polímeros a los granulados primarios, disueltos o en suspensión, por pulverización de los núcleos primarios en lecho fluidizado (Mini Glatt® con accesorio de

microkit). A continuación los granulados primarios se revisten directamente con diferentes proporciones de cada uno de los polímeros.

Composición:

Solución de revestimiento:	Eudragit RS PO	4,5 g
	PCL	0,5 g
	Acetona	100 ml

Realizando el revestimiento de los gránulos primarios producidos anteriormente, se introducen 30 gramos de los mismos en el granulador revistiéndolos con la solución de revestimiento mencionada anteriormente en la que la proporción entre Eudragit RS PO: PCL es 9:1. Los gránulos se han preparado con un porcentaje de revestimiento del 5 % p/p en relación con la masa inicial de los gránulos primarios introducidos.

Procedimiento de preparación:

1. Colocar el núcleo interno (30 g) en el producto llenando el tubulador del lecho fluidizado.
2. Llenar el tubo flexible con la solución de revestimiento hasta la boquilla de pulverización.
3. Encender el equipo y ajustar los parámetros del procedimiento.
4. Realizar el revestimiento y retirar el producto final del tubulador.

Parámetros del procedimiento:

Temperatura (°C)	Índice de bombeo	Presión de aire del procedimiento (bares)	Presión de aire de pulverización (bares)	Temperatura del aire del procedimiento (°C)
Temp. ambiente	1,0	0,08-0,15	0,50	25

Una vez que ha concluido la pulverización de la solución polimérica, el aire del procedimiento se mantiene durante 20 segundos secando el revestimiento.

Caracterización de los gránulos producidos:

Morfología y tamaño

El granulado revestido con la matriz de Eudragit RS y PCL (en proporción 9:1), representando el revestimiento una ganancia del 4 % con respecto al peso del gránulo primario de MCC y Bemiparina, se ha observado al microscopio óptico en estas condiciones y después de que se haya dispersado en una solución de PVA al 4 %. El tamaño se ha determinado por separación por cribado, usando cribas con aberturas de malla de 2, 1,5, 1,25, 1, 0,71, 0,315 y 0,125 mm. El resultado se expresa en porcentaje de la masa total medida que representan las diferentes fracciones obtenidas. En la figura 19 puede observarse la distribución de tamaños obtenida.

Tal como puede observarse en la figura, el tamaño de partícula resultante es menor cuando se usa una relación 1:1 entre el Eudragit RS y la PCL presentes en el revestimiento. Un 50,30 % de la masa total de los gránulos tiene un tamaño de partícula entre 0,315 mm y 0,125 mm.

Ejemplo 15: estudios *in vivo* de gránulos con Bemiparina del ejemplo 14

Medida de la actividad anti-Xa

La figura 20 compara las actividades anti-Xa en plasma después de la administración oral a conejos de cápsulas duras de gelatina (con revestimiento entérico de Eudragit L) que contienen gránulos de Bemiparina producidos según el ejemplo 14 (600 UI/kg). Tal como puede observarse en la figura, el aumento de la proporción de Eudragit RS en la superficie hasta una proporción de 9:1 en relación con la PCL da lugar a niveles claramente inferiores de actividad plasmática que los obtenidos con la administración de gránulos que tienen cantidades superficiales equivalentes de Eudragit RS y PCL. Sin embargo, en esta proporción pueden alcanzarse absorciones significativamente altas. La mayor presencia de Eudragit RS y la mayor interacción producida con la Bemiparina contenida en el gránulo condicionan la liberación del compuesto activo y por tanto, la absorción del mismo, a pesar de la mayor bioadhesividad que este polímero otorga a la formulación. Los valores de Cmax y las biodisponibilidades relativas obtenidas se reflejan en la siguiente tabla:

% revestimiento	Cmax	F(%) relativa a 150 UI/kg sc
5	0,265	25,37

Ejemplo 16: formación de gránulos revestidos que contienen Bemiparina y que tienen una capa de revestimiento intermedia

Las formulaciones incluidas en este ejemplo pretenden mostrar la posibilidad de añadir subrevestimientos con polímeros entre el núcleo primario y el revestimiento exterior con la mezcla de polímeros de Eudragit RS y PCL para evitar el contacto entre el compuesto activo y los polímeros que permiten la absorción de los mismos sin que la actividad del revestimiento polimérico como promotor de la absorción de Bemiparina varíe significativamente. La fabricación de granulados se realiza en tres fases. La primera fase, denominada preparación de núcleos, consiste en preparar gránulos primarios de bemiparina con celulosa microcristalina (MCC). Se ha usado un granulador/mezclador Zanchetta Rotolab® de alta velocidad preparando los gránulos.

Composición:

Avicel pH 101	100 g	95,24 %
Bemiparina	5 g	4,76 %
Agua milli-Q	c.s.	

Procedimiento de preparación:

1. Disolver la Bemiparina en 50 ml de agua milli-Q y colocarla en el embudo de decantación.
2. Pesar la cantidad exacta de avicel y colocarla en el recipiente del granulador.
3. Añadir la solución de Bemiparina al avicel en movimiento debido a la paleta de impulsión.
4. Verificar el grado de humectación del avicel y la formación de granulado.
5. Añadir la cantidad necesaria de agua milli-Q hasta que se forma el granulado.
6. Retirar el granulado del equipo y cribarlo a través de una criba con una abertura de malla de 1 mm.
7. Secar en horno a 37°C durante 2 horas y a continuación a temperatura ambiente.

Condiciones del equipo:

Velocidad del impulsor (paleta de impulsión)	250-300 rpm
Troceador	Desactivado
Camisa de calentamiento	Desactivada

La segunda fase, de subrevestimiento, consiste en añadir una mezcla de polímeros a los gránulos primarios, disueltos o en suspensión, por pulverización de los núcleos primarios en lecho fluidizado (Mini Glatt® con accesorio de microkit). A continuación se revisten los gránulos primarios directamente con el polímero hasta que se obtiene una ganancia de peso del 4 %.

Composición:

Solución de revestimiento:	Eudragit L	5 g
	Acetona	100 ml

Realizando el revestimiento de los gránulos primarios producidos anteriormente, se introducen 30 gramos de los mismos en el granulador revistiéndolos con la solución de subrevestimiento mencionada anteriormente.

Procedimiento de preparación:

1. Colocar el núcleo interno (30 g) en el producto que llena el tubulador del lecho fluidizado.
2. Llenar el tubo flexible con la solución de revestimiento hasta la boquilla de pulverización.
3. Encender el equipo y ajustar los parámetros del procedimiento.
4. Realizar el revestimiento y retirar el producto final del tubulador.

Parámetros del procedimiento:

Temperatura (°C)	Índice de bombeo	Presión de aire del procedimiento (bares)	Presión de aire de pulverización (bares)	Temperatura del aire del procedimiento (°C)
Temp. ambiente	1,0	0,08-0,15	0,50	25

Una vez que ha concluido la pulverización de la solución polimérica, el aire del procedimiento se mantiene durante 20 segundos secando el revestimiento.

La tercera fase, de revestimiento, consiste en añadir a los gránulos primarios un revestimiento polimérico que contiene Eudragit RS PO y PCL en una proporción de 1:1, por pulverización de los núcleos producidos en la segunda etapa en un lecho fluidizado (Mini Glatt® con accesorio de microkit). A continuación los granulados con subrevestimiento se revisten directamente con la mezcla de polímeros hasta que se obtiene una ganancia de peso del 4 %. El procedimiento y los parámetros de revestimiento son idénticos a los de las fases de subrevestimiento.

Caracterización de los gránulos producidos:

Morfología y tamaño

Los gránulos revestidos con la matriz de Eudragit RS y PCL y con un subrevestimiento de Eudragit L en el gránulo primario de MCC y Bemiparina se han observado al microscopio óptico en estas condiciones y después de que se hayan dispersado en una solución de PVA al 4 %. El tamaño se ha determinado por separación por cribado, usando cribas con aberturas de malla de 2, 1,5, 1,25, 1, 0,71, 0,315 y 0,125 mm. El resultado se expresa en porcentaje de la masa total medida que representan las diferentes fracciones obtenidas. En la figura 21 puede observarse la distribución de tamaños obtenidos.

Tal como puede observarse en la figura 21, la adición de un subrevestimiento aumenta el tamaño de partícula de los gránulos producidos, siendo la fracción que tiene un tamaño de partícula superior 0,315 mm el 86,10 % de la masa total de los gránulos. La fracción principal es la que representa partículas de entre 0,71 y 0,315 mm, con el 39,01 % del total.

Ejemplo 17: estudios *in vivo* de gránulos revestidos que contienen Bemiparina y que tienen una capa de revestimiento intermedia

Medida de la actividad anti-Xa

La figura 22 compara las actividades anti-Xa en plasma después de la administración oral a conejos de cápsulas duras no entéricas de gelatina que contienen gránulos de Bemiparina producidos según el ejemplo 16 y su comparación con gránulos de bemiparina que contienen solamente el revestimiento externo de Eudragit RS y PCL en una proporción de 1:1 según el ejemplo 12 (600 UI/kg). Como es evidente en la figura, la aplicación de un subrevestimiento en la estructura del gránulo mantiene los niveles de absorción de Bemiparina obtenidos sin un subrevestimiento. En este caso es evidente que la presencia de compuesto activo en la superficie no es estructuralmente necesaria para que el vehículo consiga la absorción del compuesto activo, ya que existe una separación física entre el compuesto activo y la mezcla polimérica en la superficie. Una vez que se administra la formulación, el gránulo se hidrata y la Bemiparina empieza a difundirse hacia el exterior y son adecuadas las proporciones entre la interacción del revestimiento polimérico con la pared del aparato digestivo y la liberación del compuesto activo que consiguen que la Bemiparina sea absorbida en cantidades suficientemente altas. Análogamente, es evidente que la absorción de Bemiparina conseguida en el gránulo usando las mismas composiciones en la superficie es equivalente e independiente de la estructura interna del vehículo de partículas siempre que el compuesto activo se libere rápidamente.

En la siguiente tabla se reflejan los valores de Cmax y las biodisponibilidades relativas obtenidos para cada una de estas formulaciones:

% revestimiento	Cmax	F(%) relativa a 150 UI/kg sc
4 (solamente externo)	0,3978	39,59
4 (subrevestimiento)+4 (externo)	0,400	45,63

A pesar del hecho de que el subrevestimiento se ha preparado por pulverización de una solución polimérica en acetona, cualquier persona experta en la materia puede deducir fácilmente que es posible obtener resultados similares usando cualquier otro solvente polimérico o por pulverización de una suspensión acuosa del mismo que comercializa la empresa (Degussa, Alemania) con el nombre de Eudragit L 30D.

Con el fin de aclarar los resultados obtenidos y de mostrar la actividad conseguida con la mezcla polimérica adecuada, se ha evitado intencionadamente la incorporación de excipientes usados comúnmente en procedimientos de granulación (tanto para el núcleo como para el revestimiento) pero para una persona experta en la materia es obvio también que este procedimiento de preparación puede realizarse asimismo usando cualquiera de los excipientes que pueden ser necesarios para optimizar el procedimiento de granulación.

Ejemplo 18: formación de gránulos revestidos que contienen Bemiparina

La fabricación de los gránulos se realiza en dos fases. La primera fase, denominada preparación de núcleos, consiste en preparar gránulos primarios de bemiparina con celulosa microcristalina (MCC). Preparando los gránulos se ha usado un granulador/mezclador de alta velocidad Zanchetta Rotolab®.

Composición:

Avicel pH 10190 g	85,71 %
Bemiparina 15 g	14,29 %
Agua milli-Q c.s.	

5 Procedimiento de preparación:

1. Disolver la Bemiparina en 50 ml de agua milli-Q y colocarla en el embudo de decantación.
2. Pesar la cantidad exacta de avicel y colocarla en el recipiente del granulador.
3. Añadir la solución de Bemiparina al avicel en movimiento debido a la paleta de impulsión.
4. Verificar el grado de humectación del avicel y la formación del granulado.
- 10 5. Añadir la cantidad necesaria de agua milli-Q hasta que se forme el granulado.
6. Retirar el granulado del equipo y cribarlo a través de una criba con una abertura de malla de 1 mm.
7. Secar en horno a 37 °C durante 2 horas y a continuación a temperatura ambiente.

Condiciones del equipo:

	Velocidad del impulsor (paleta de impulsión)	250-300 rpm
15	Troceador	Desactivado
	Camisa de calentamiento	Desactivada

La segunda fase, de revestimiento, consiste en añadir una mezcla de polímeros a los gránulos primarios, disueltos o en suspensión, pulverizando los núcleos primarios en lecho fluidizado (Mini Glatt® con accesorio de microkit). A continuación los granulados primarios se revisten directamente con diferentes proporciones de cada uno de los polímeros.

Composición:

Solución de revestimiento: Eudragit RS PO	2,5 g
Pluronic F68	2,5 g
Acetona	100 ml

25 Para realizar el revestimiento de los gránulos primarios producidos anteriormente, se introducen 30 gramos de los mismos en el granulador revistiéndolos en la solución de revestimiento mencionada anteriormente en la que los dos polímeros están en una relación 1:1. Los gránulos se han preparado con un porcentaje de revestimiento del 5 % p/p en relación con la masa inicial de gránulos primarios introducidos.

Procedimiento de preparación:

- 30 1. Colocar el núcleo interno (30 g) en el producto que llena el tubulador del lecho fluidizado.
2. Llenar el tubo flexible con la solución de revestimiento hasta la boquilla de pulverización.
3. Encender el equipo y ajustar los parámetros del procedimiento.
4. Realizar el revestimiento y retirar el producto final del tubulador.

Parámetros del procedimiento:

Temperatura (°C)	Índice de bombeo	Presión de aire del procedimiento (bares)	Presión de aire de pulverización (bares)	Temperatura del aire del procedimiento (°C)
Ambiente	1,0	0,08-0,15	0,50	25

35 Una vez que ha concluido la pulverización de la solución polimérica, el aire del procedimiento se mantiene durante 20 segundos para que el revestimiento se seque.

Caracterización de los gránulos producidos:**Morfología y tamaño**

40 Los gránulos revestidos con la matriz de Eudragit RS y Pluronic F68 (en relación 1:1), representando el revestimiento una ganancia del 4 % con respecto al peso del gránulo primario de MCC y Bemiparina, se han

observado al microscopio óptico en estas condiciones y después de que hayan sido dispersados en una solución de PVA al 4 %. El tamaño se ha determinado por separación por cribado, usando cribas con aberturas de malla de 2, 1,5, 1,25, 1, 0,71, 0,315 y 0,125 mm. El resultado se expresa en porcentaje de la masa total medida que representan las diferentes fracciones obtenidas. En la figura 23 puede observarse la distribución de tamaños obtenidos.

- 5 Tal como puede observarse en la figura, el 96,44 % de la masa total del granulado tiene un tamaño de partícula superior a 0,125 mm.

Cinética de liberación *in vitro*

- 10 Los ensayos de liberación se han realizado en condiciones de inmersión en un aparato de disolución de 6 vasos con baño de agua termostático a 37 °C. Se han introducido 166 mg de gránulos producidos (con revestimiento al 4 %) en una cápsula de gelatina dura número 1 y las cápsulas se han introducido en cestas de centrifuga que se sumergen en el medio de disolución (400 ml de tampón de fosfato de pH 6,8). La velocidad de rotación de la cesta de centrifuga se ha mantenido en 100 rpm.

- 15 Se han tomado muestras de 1,5 ml con la pipeta automática después de 30 minutos y después de 1, 1,5, 2, 4, 6 y 24 horas. Los volúmenes recogidos se sustituyen por 1,5 ml de tampón nuevo con el fin de mantener un volumen constante en el interior de los vasos. A continuación estas partes alícuotas se filtran con un filtro MILLIPORE de 0,22 µm de porosidad.

Las cantidades de bemiparina liberada se evalúan por nefelometría y a continuación se establecen las curvas que representan la cinética de liberación de bemiparina en función del tiempo. La cinética de liberación se ha realizado por duplicado para cada una de las muestras (n = 2).

- 20 La figura 24 muestra que el perfil de liberación de estas formulaciones es de dos fases. En este caso, la liberación inicial representa más del 80 % en todas las medidas realizadas. Puede observarse claramente que el Poloxámero 188, que es un polímero que muestra avidez por el agua, facilita la hidratación del gránulo y la liberación de la bemiparina contenida en el mismo.

Ejemplo 19: estudios *in vivo* de gránulos con Bemiparina del ejemplo 18

25 Medida de la actividad anti-Xa

- La figura 25 compara las actividades anti-Xa en plasma después de la administración oral a conejos de cápsulas duras de gelatina (con revestimiento entérico de Eudragit L) que contienen gránulos de Bemiparina producidos según el ejemplo 18 (600 UI/kg). Tal como puede observarse en la figura, la administración de gránulos de bemiparina que presentan en el revestimiento una matriz polimérica constituida por Eudragit RS y Pluronic F68 en proporción 1:1 da lugar a niveles significativamente altos de actividad plasmática. En la siguiente tabla se reflejan los valores de C_{max} y las biodisponibilidades relativas obtenidas:

% revestimiento	C _{max}	F(%) relativa a 150 UI/kg sc
5	0,352	41,20

- A modo de conclusión, puede resaltarse que el uso apropiado de polímeros en la preparación de formulaciones permite conseguir la absorción de compuestos activos poco permeables en cantidades significativas después de su administración por vía oral. El efecto combinado de una adhesión suficiente a la pared mucosa y una liberación eficaz del compuesto activo proporcionado por Eudragit RS y los polímeros que se combinan con él en proporciones adecuadas es suficientemente importante para permitir que compuestos activos, poco permeables a la barrera de absorción pasen a través de ella, a pesar del gran tamaño de las formulaciones presentadas a modo de ejemplo que puede superar un milímetro de diámetro. Esta observación es sorprendente a la luz de la información que puede encontrarse hoy en día en el estado de la técnica, lo que subraya continuamente la necesidad de reducir el tamaño de la formulación para producir dispersiones más eficientes con un mayor tiempo de contacto con la mucosa de absorción. Para una persona experta en la materia también es evidente que las formulaciones incluidas en los ejemplos en la presente memoria descriptiva tienen ventajas adicionales innegables con respecto a la producción de micropartículas y nanopartículas, ya que se producen por procedimientos usados comúnmente en la industria farmacéutica, tienen menos variabilidad en la producción interlote y pueden aumentarse fácilmente de escala para lotes industriales, a diferencia de lo que sucede con las otras formulaciones.

Ejemplo 20 (comparativo): preparación de micropartículas de Eudragit RS y PLGA que contienen Bemiparina

- Se prepararon micropartículas que contienen Bemiparina por un procedimiento de emulsión de Ag/Ac/Ag/extracción de solvente. Brevemente, se emulsionaron 4 ml de una solución acuosa que tenía Bemiparina al 5 % (p/v) en 20 ml de una solución de Eudragit RS y PLGA en acetato de etilo (cada polímero al 2,5 % p/v) por sonicación durante 30 s a 11W. A continuación se vertió esta emulsión en 80 ml de una solución de PVA al 0,1 % (p/v) en agua con agitación

magnética. La agitación magnética se mantuvo durante 1 min y a continuación se vertió el contenido completo en 1.600 ml de solución de PVA al 0,1 % (p/v) en agua y se mantuvo toda la masa con agitación mecánica durante 1 h. A continuación se separaron las micropartículas por filtración, se lavaron con agua y se secaron en un horno de vacío a 37 °C durante 2 días.

- 5 En la siguiente tabla se muestran las proporciones relativas de cada uno de los dos polímeros:

% PLGA	% Eudragit RS
50	50

Caracterización de las micropartículas:

Tamaño de partícula

- 10 El tamaño de partícula se determinó por técnicas de difracción por láser usando un aparato Malvern Mastersizer. Primero se volvieron a poner las micropartículas en suspensión en tampón de fosfato a pH 7,4. Durante la medida, la suspensión se mantuvo por agitación mecánica de la celda de medida.

El promedio del tamaño medio de las micropartículas obtenidas fue de 71,4 µm.

Perfil de liberación *in vitro*

- 15 El objetivo de este ensayo es determinar la cantidad de bemiparina liberada de micropartículas a lo largo del tiempo. Esta medida debe realizarse en condiciones de "inmersión", es decir, el medio de liberación debe tener un volumen en el que la concentración máxima de fármaco sea inferior al 30 % de la concentración de saturación de este fármaco, con el fin de evitar los efectos limitantes de gradientes de concentración del fármaco de la superficie de micropartículas.

- 20 Los estudios de liberación se han realizado por resuspensión (agitación magnética a 300 rpm) de 50 mg de cada lote de micropartículas en 20 ml de tampón de fosfato (PBS, 0,011 M y NaCl 0,15 M) a pH 7,4 que tenía Tween 80 al 0,1 % (p/v) a 37 °C.

- 25 Se recogieron muestras de 1 ml a 5, 15 y 30 minutos y después a 1, 2, 7 y 24 horas. Los volúmenes recogidos fueron sustituidos en el medio por 1 ml de tampón nuevo con el fin de mantener el volumen constante. A continuación se filtraron las muestras (tamaño de poro 0,22 µm, Millipore). La cantidad de bemiparina en las muestras se determina por nefelometría. En la figura 26 se muestran los perfiles de liberación determinados (n = 3).

- 30 Las micropartículas de bemiparina proporcionan un perfil de liberación en dos fases, con una liberación rápida inicial seguida por una segunda fase de liberación lenta. Como puede verse en la Figura 26, más del 50 % de la bemiparina encapsulada se está liberando de las micropartículas durante los primeros 60 minutos. Esto permitiría que el fármaco se liberara en cantidades significativamente elevadas una vez que las micropartículas se sitúan en el tracto gastrointestinal.

Estudios *In vivo* con micropartículas de Bemiparina

Estudio en conejos blancos de Nueva Zelanda

- 35 Se administraron oralmente micropartículas de bemiparina a conejos blancos de Nueva Zelanda que pesaban 3 kg en promedio. La dosis de Bemiparina fue de 600 UI de anti-Xa por kg y la cantidad requerida de micropartículas se suministró oralmente a los conejos en cápsulas de gelatina dura. Se usaron 2 grupos de tres conejos y cada grupo recibió cápsulas de gelatina dura que contenían micropartículas de PLGA/Eudragit RS cargadas con Bemiparina con las siguientes variables:

Grupo 1: micropartículas de bemiparina en cápsulas de gelatina dura no gastrorresistentes

Grupo 2: micropartículas de bemiparina en cápsulas de gelatina dura gastrorresistentes

- 40 Se recogieron muestras de sangre después de la administración oral en los instantes de tiempo 1, 2, 4, 6, 8, 10 y 24 horas. La presencia de Bemiparina en plasma de los conejos se determinó midiendo los niveles de anti-factor Xa en plasma.

La administración oral de micropartículas de Eudragit RS y PLGA que tenían bemiparina no proporcionó niveles detectables de actividad anti-Xa en plasma de conejos en ninguno de los animales estudiados.

- 45 **Estudio en monos *Cynomolgus***

Se administró oralmente Bemiparina que contenía micropartículas a monos *Cynomolgus* que tenían un peso medio de 3 kg. La dosis de Bemiparina fue de 10.000 UI de anti-Xa por animal.

Se recogieron muestras de sangre 8 y 24 horas después de la administración oral de micropartículas y se determinó la presencia de Bemiparina en plasma de monos midiendo la actividad del anti-factor Xa en plasma.

La administración oral de micropartículas de Eudragit RS y PLGA que contenía bemiparina no proporcionó niveles plasmáticos detectables de actividad anti-Xa en ninguno de los animales estudiados.

5 **Ejemplo 21 (comparativo): preparación de micropartículas de Eudragit RS y Policaprolactona que contienen Bemiparina**

Se prepararon micropartículas que contenían Bemiparina por un procedimiento de emulsión de Ag/Ac/Ag/extracción de solvente. Brevemente, se emulsionaron 4 ml de una solución acuosa que tenía Bemiparina al 5% (p/v) en 20 ml de una solución de Eudragit RS y PLGA en acetato de etilo (cada polímero al 2,5 % p/v) por sonicación durante 30 s a 11 W. A continuación se vertió esta emulsión en 80 ml de una solución de PVA al 0,1 % (p/v) en agua con agitación magnética. La agitación magnética se mantuvo durante 1 min y a continuación se vertió el contenido completo en 1.600 ml de solución de PVA al 0,1 % (p/v) en agua y se mantuvo toda la masa con agitación mecánica durante 1 h. A continuación se separaron las micropartículas por filtración, se lavaron con agua y se secaron en un horno de vacío a 37°C durante 2 días.

15 En la siguiente tabla se muestran las proporciones relativas de cada uno de los dos polímeros:

% PLGA	% Eudragit RS
50	50

Caracterización de las micropartículas:

Tamaño de partícula

20 El tamaño de partícula se determinó por técnicas de difracción por láser usando un aparato Malvern Mastersizer. En primer lugar se volvieron a poner en suspensión las micropartículas en tampón de fosfato a pH 7,4. Durante la medida, la suspensión se mantuvo por agitación mecánica de la celda de medida.

El promedio del tamaño medio de las micropartículas obtenidas fue de 76,5 µm.

Perfil de liberación *in vitro*

25 El objetivo en este ensayo es determinar la cantidad de bemiparina liberada de micropartículas a lo largo del tiempo. Esta medida debe realizarse en condiciones de "inmersión", es decir, el medio de liberación debe tener un volumen en el que la concentración máxima de fármaco sea inferior al 30 % de la concentración de saturación de este fármaco, con el fin de evitar los efectos limitantes de los gradientes de concentración del fármaco de la superficie de micropartículas.

30 Se han realizado estudios de liberación por la resuspensión (agitación magnética a 300 rpm) de 50 mg de cada lote de micropartículas en 20 ml de tampón de fosfato (PBS, 0,011 M y NaCl 0,15 M) a pH 7,4 que tenía Tween 80 al 0,1 % (p/v) a 37 °C.

35 Se recogieron muestras de 1 ml a 5, 15 y 30 minutos y después a 1, 2, 4 y 24 horas. Se sustituyeron los volúmenes recogidos en el medio por 1 ml de tampón nuevo con el fin de mantener el volumen constante. A continuación se filtraron las muestras (tamaño de poro de 0,22 µm, Millipore). La cantidad de bemiparina en las muestras se determinó por nefelometría. En la Figura 27 se muestran los perfiles de liberación determinados (n = 3).

La naturaleza más hidrófoba de la Policaprolactona en comparación con PLGA retrasa la hidratación de las micropartículas y en consecuencia, la bemiparina se está liberando más lentamente en las primeras horas. Este retardo en la liberación inicial debería permitir la liberación de cantidades clínicamente relevantes de bemiparina en el tracto gastrointestinal una vez que las micropartículas se hayan liberado de la cápsula de gelatina dura.

40 **Estudios *in vivo* con micropartículas de bemiparina**

Estudio en conejos blancos de Nueva Zelanda

45 Se administraron micropartículas de bemiparina oralmente a conejos blancos de Nueva Zelanda que pesaban 3 kg en promedio. La dosis de Bemiparina fue de 600 UI de anti-Xa por kg y la cantidad requerida de micropartículas fue suministrada oralmente a conejos en cápsulas de gelatina dura. Se usaron 2 grupos de tres conejos y cada grupo recibió cápsulas de gelatina dura que contenían micropartículas de PCL/Eudragit RS cargadas con Bemiparina con las siguientes variables:

Grupo 1: micropartículas de bemiparina en cápsulas de gelatina dura no gastrorresistentes

Grupo 2: micropartículas de bemiparina en cápsulas de gelatina dura gastrorresistentes

Se recogieron muestras de sangre después de la administración oral en los instantes de tiempo de 1, 2, 4, 6, 8, 10 y 24 horas. La presencia de bemiparina en plasma de conejos se determinó midiendo los niveles de anti-factor Xa en plasma.

- 5 La administración oral de micropartículas de Eudragit RS y PCL que tenían bemiparina no proporcionó niveles detectables de actividad anti-Xa en plasma de conejos en ninguno de los animales estudiados.

Estudio en monos Cynomolgus

Se administró oralmente bemiparina que contenía micropartículas a monos Cynomolgus que tenían un peso medio de 3 kg. La dosis de bemiparina fue de 10.000 UI de anti-Xa por animal.

- 10 Se recogieron muestras de sangre 8 y 24 horas después de la administración oral de micropartículas y se determinó la presencia de Bemiparina en plasma de monos midiendo la actividad del anti-factor Xa en plasma.

La administración oral de micropartículas de Eudragit RS y PCL que contenían bemiparina no proporcionó niveles plasmáticos detectables de actividad anti-Xa en ninguno de los animales estudiados.

Ejemplo 22 (comparativo): preparación de micropartículas de Eudragit RS y PLGA que contienen Bemiparina

- 15 Con el fin de reducir el tamaño de partícula de las micropartículas fabricadas según el ejemplo 20, se prepararon micropartículas que contenían Bemiparina por un pequeño cambio en el procedimiento de emulsión de Ag/Ac/Ag/extracción de solvente descrito en el ejemplo 20. Brevemente, se emulsionaron 4 ml de una solución acuosa que tenía Bemiparina al 5 % (p/v) en 20 ml de una solución de Eudragit RS y PLGA en acetato de etilo (cada
- 20 polímero al 2,5 % p/v) por sonicación durante 30 s a 11 W. A continuación se vertió esta emulsión en 50 ml de una solución de PVA al 8 % (p/v) en agua con agitación magnética. La agitación magnética se mantuvo durante 1 min y a continuación se vertió el contenido completo en 100 ml de solución de isopropanol al 2 % (p/v) en agua y se mantuvo toda la masa con agitación mecánica durante 1 h. A continuación se separaron las micropartículas por filtración, se lavaron con agua y se secaron en un horno de vacío a 37 °C durante 2 días.

En la siguiente tabla se muestran las proporciones relativas de cada uno de los dos polímeros:

% PLGA	% Eudragit RS
50	50

25

Caracterización de las micropartículas:

Tamaño de partículas

- 30 El tamaño de partículas se determinó por técnicas de difracción por láser usando un aparato Malvern Mastersizer. Primero se volvieron a poner las micropartículas en suspensión en tampón de fosfato a pH 7,4. Durante la medida, la suspensión se mantuvo por agitación mecánica de la celda de medida.

El promedio del tamaño medio de las micropartículas obtenidas fue de 2,2 µm.

Perfil de liberación *in vitro*

- 35 El objetivo en este ensayo es determinar la cantidad de bemiparina liberada de micropartículas a lo largo del tiempo. Esta medida debe realizarse en condiciones de "inmersión", es decir, el medio de liberación debe tener un volumen en el que la concentración máxima de fármaco es inferior al 30 % de la concentración de saturación de este fármaco, con el fin de evitar los efectos limitantes de los gradientes de concentración del fármaco de la superficie de micropartículas.

- 40 Se han realizado estudios de liberación por la resuspensión (agitación magnética a 300 rpm) de 50 mg de cada lote de micropartículas en 20 ml tampón de fosfato (PBS, 0,011 M y NaCl 0,15 M) a pH 7,4 que tenía Tween 80 al 0,1 % (p/v) a 37 °C.

Se recogieron muestras de 1 ml a 5, 15 y 30 minutos y después a 1, 2 y 24 horas. Se sustituyeron los volúmenes recogidos en el medio por 1 ml de tampón nuevo con el fin de mantener el volumen constante. A continuación se filtraron las muestras (tamaño de poro de 0,22 µm, Millipore). La cantidad de bemiparina en las muestras se determinó por nefelometría. En la Figura 28 se muestran los perfiles de liberación determinados (n = 4).

- 45 La figura muestra el modo en que las micropartículas fabricadas según el nuevo procedimiento proporcionan una liberación inicial más lenta de Bemiparina. Una velocidad de precipitación más lenta de los polímeros que forman la matriz podría conducir a la formación de matrices menos porosas.

Estudio *in vivo* en conejos blancos de Nueva Zelanda

Se administraron oralmente micropartículas de bemiparina a conejos blancos de Nueva Zelanda que pesaban 3 kg en promedio. La dosis de Bemiparina fue de 600 UI de anti-Xa por kg y la cantidad requerida de micropartículas fue suministrada oralmente a los conejos en cápsulas de gelatina dura.

- 5 Se recogieron muestras de sangre después de la administración oral en los instantes de tiempo de 1, 2, 4, 6, 8, 10 y 24 horas. La presencia de bemiparina en plasma de conejos se determinó midiendo niveles de anti-factor Xa en plasma.

La administración oral de micropartículas de Eudragit RS y PLGA que tenían bemiparina no proporcionó niveles detectables de actividad anti-Xa en plasma de los conejos en ninguno de los animales estudiados.

10 Ejemplo 23 (comparativo): preparación de micropartículas de Eudragit RS y PLGA que contienen Bemiparina

Con el fin de aumentar el tamaño de partícula de micropartículas fabricadas según el ejemplo 20, se prepararon micropartículas que contenían Bemiparina por un pequeño cambio en el procedimiento de emulsión de Ag/Ac/Ag/extracción de solvente descrito en el ejemplo 20. Brevemente, se emulsionaron 4 ml de una solución acuosa que tenía Bemiparina al 5 % (p/v) y PEG1500 al 20 % en 20 ml de una solución de Eudragit RS y PLGA en acetato de etilo (cada polímero al 2,5 % p/v) por agitación mecánica (Ultraturrax T25 a 9.500 rpm). A continuación se vertió esta emulsión en 80 ml de una solución de PVA al 0,1 % (p/v) en agua con agitación magnética. La agitación magnética se mantuvo durante 1 min y a continuación se vertió toda la masa en 1.400 ml de solución de PVA al 0,1 % (p/v) en agua y se mantuvo toda la masa con agitación mecánica durante 1 h. A continuación se separaron las micropartículas por filtración, se lavaron con agua y se secaron en un horno de vacío a 37 °C durante 2 días.

20 Caracterización de las micropartículas:**Tamaño de partícula**

El tamaño de partícula se determinó por técnicas de difracción por láser usando un aparato Malvern Mastersizer. Primero se volvieron a poner las micropartículas en suspensión en tampón de fosfato a pH 7,4. Durante la medida, la suspensión se mantuvo por agitación mecánica de la celda de medida.

- 25 El promedio de tamaño medio de las micropartículas obtenidas fue de 168,4 µm.

Perfil de liberación *in vitro*

El objetivo en este ensayo es determinar la cantidad de bemiparina liberada de micropartículas a lo largo del tiempo. Esta medida debe realizarse en condiciones de "inmersión", es decir, el medio de liberación debe tener un volumen en el que la concentración máxima de fármaco sea inferior al 30 % de la concentración de saturación de este fármaco, con el fin de evitar los efectos limitantes de los gradientes de concentración del fármaco de la superficie de micropartículas.

Se han realizado estudios de liberación por la resuspensión (agitación magnética a 300 rpm) de 50 mg de cada lote de micropartículas en 20 ml tampón de fosfato (PBS, 0,011 M y NaCl 0,15 M) a pH 7,4 que tenía Tween 80 al 0,1 % (p/v) a 37 °C.

- 35 Se recogieron muestras de 1 ml a 5, 15 y 30 minutos y después a 1, 2 y 24 horas. Se sustituyeron los volúmenes recogidos en el medio por 1 ml de tampón nuevo con el fin de mantener el volumen constante. A continuación se filtraron las muestras (tamaño de poro 0,22 µm, Millipore). La cantidad de bemiparina en las muestras se determinó por nefelometría. En la Figura 29 se muestran los perfiles de liberación determinados (n = 3).

- 40 Aun cuando estas partículas tienen un tamaño de partícula mayor, el perfil de liberación de Bemiparina es muy similar al obtenido con micropartículas que tienen un tamaño medio de 71,4 µm. Tal como puede verse en la figura, más del 50 % de la Bemiparina encapsulada se libera durante la primera hora, lo que debería permitir obtener cantidades significativas de bemiparina liberada una vez que las micropartículas se están liberando en el tracto gastrointestinal.

Estudio *in vivo* en conejos blancos de Nueva Zelanda

- 45 Se administraron oralmente micropartículas de bemiparina a conejos blancos de Nueva Zelanda que pesaban 3 kg en promedio. La dosis de Bemiparina fue de 600 UI de anti-Xa por kg y la cantidad requerida de micropartículas fue suministrada oralmente a conejos en cápsulas de gelatina dura.

Se recogieron muestras de sangre después de la administración oral en los instantes de tiempo de 1, 2, 4, 6, 8, 10 y 24 horas. La presencia de bemiparina en plasma de conejos se determinó midiendo niveles de anti-factor Xa en plasma.

50

La administración oral de micropartículas de Eudragit RS y PLGA que tenían bemiparina no proporcionó niveles detectables de actividad anti-Xa en plasma de conejos en ninguno de los animales estudiados.

Ejemplo 24: administración oral *in vivo* en monos *Cynomolgus* de los gránulos descritos en el ejemplo 12

5 Se administró oralmente bemiparina que contenía gránulos que tenían un revestimiento externo de una matriz polimérica de PCL y Eudragit RS en monos *Cynomolgus* que tenían un peso medio de 3 kg. La dosis de bemiparina fue de 10.000 UI de anti-Xa por animal.

Se recogieron muestras de sangre 8 y 24 horas después de la administración oral de micropartículas y la presencia de Bemiparina en plasma de monos se determinó midiendo la actividad de anti-factor Xa en plasma.

10 La administración oral de micropartículas de Eudragit RS y PCL que contenían bemiparina proporcionó valores clínicamente relevantes de anti-Xa en plasma según se muestra en la Figura 30.

Los resultados muestran claramente el modo en que los gránulos preparados de acuerdo con el ejemplo 12 proporcionan niveles plasmáticos *in vivo* de actividad anti-Xa. Sin embargo, todas las micropartículas preparadas por procedimientos de emulsión/extracción de solvente no consiguieron proporcionar niveles plasmáticos *in vivo* después de la administración oral a conejos y monos.

15 Ejemplo 25: preparación de gránulos que contienen Bemiparina

Se prepararon gránulos que contenían Bemiparina de acuerdo con el siguiente procedimiento. En una primera etapa se distribuyó Bemiparina por capas en semillas inertes de MCC con una solución acuosa que tenía Bemiparina al 20 % (p/v) y Kollidon K30 al 1 % en un aparato de lecho fluido (Glatt). Los parámetros del procedimiento fueron:

	Temperatura del aire de entrada, °C	68-70
20	Temperatura del producto, °C	41-43
	Presión de aire del procedimiento, bares	0,2
	Boquilla, mm	0,5
	Presión de pulverización, bares	0,8
	Velocidad de pulverización, g/min	1,6
25	Secado (38-40°C), min	5

La carga del fármaco en las esferas fue del 20 % (p/p)

A continuación las semillas inertes en capas del fármaco fueron revestidas con una mezcla de Eudragit RS y PLGA por pulverización de una solución orgánica que tenía los dos polímeros en un aparato de lecho fluido. Los parámetros del procedimiento fueron:

30	Pre-calentamiento (25-27°C), min	20
	Temperatura del aire de entrada, °C	26-27
	Temperatura del producto, °C	22-25
	Presión de aire del procedimiento, bares	0,2
	Boquilla, mm	0,5
35	Presión de pulverización, bares	0,6
	Velocidad de pulverización, g/min	2,4
	Secado (25 °C), min	3

La carga de la mezcla de polímeros en las partículas finales fue del 6 %.

Caracterización de los gránulos:

40 El tamaño de partícula se ha determinado por separación por cribado, usando cribas con aberturas de malla de 2, 1,5, 1,25, 1, 0,71, 0,315 y 0,125 mm. La fracción principal recogida presentaba un tamaño de partícula entre 1 y 0,71 mm.

Los ensayos de liberación se han realizado en condiciones de inmersión en un aparato de disolución de 6 vasos con baño de agua a 37 °C. Se han introducido 300 mg de gránulos en el medio de disolución (900 ml de tampón de fosfato de pH 6,8). La velocidad de rotación de las paletas se ha mantenido en 100 rpm.

5 Se han tomado muestras de 1 ml con el muestreador automático después de 15 y 30 minutos y después de 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16 y 20 horas. Los volúmenes recogidos se sustituyen por 1 ml de tampón nuevo con el fin de mantener un volumen constante dentro de los vasos. A continuación estas partes alícuotas se filtran con un filtro MILLIPORE de 0,22 µm de porosidad.

10 Las cantidades de bemiparina liberada se evalúan por nefelometría y a continuación se establecen las curvas que representan la cinética de liberación de bemiparina en función del tiempo. La cinética de liberación se ha realizado por duplicado para cada una de las muestras (n = 2).

La Figura 31 muestra que el perfil de liberación de estas formulaciones tiene dos fases. En este caso, la liberación inicial representa más del 80 % en todas las medidas realizadas. Los gránulos permiten la liberación de Bemiparina en cantidades suficientes para realizar las administraciones *in vivo*.

Ejemplo 26: administración oral *in vivo* en monos *Cynomolgus* de los gránulos descritos en el ejemplo 25

15 Se administraron oralmente gránulos que contenían Bemiparina que tenían un revestimiento externo de una matriz polimérica de PLGA y Eudragit RS en monos *Cynomolgus* que tenían un peso medio de 3 kg. La dosis de Bemiparina fue de 10.000 UI de anti-Xa por animal.

Se recogieron muestras de sangre 8 y 24 horas después de la administración oral de micropartículas y se determinó la presencia de Bemiparina en plasma de los monos midiendo la actividad del anti-factor Xa en plasma.

20 La administración oral de gránulos de Eudragit RS y PLGA que contenían bemiparina proporcionó valores clínicamente relevantes de anti-Xa en plasma según se muestra en la Figura 32.

25 Los resultados muestran claramente el modo en que los gránulos preparados según el ejemplo 25 proporcionan niveles plasmáticos *in vivo* de actividad anti-Xa. De nuevo, los resultados indican la superioridad de estas formulaciones en comparación con las micropartículas preparadas por procedimientos de emulsión/extracción de solvente.

Ejemplo 27 (comparativo): preparación de gránulos que contienen Bemiparina

Se prepararon gránulos que contenían Bemiparina de acuerdo con el siguiente procedimiento. En una primera etapa se revistieron semillas inertes de MCC con una mezcla de Eudragit RS y PLGA por pulverización de una solución orgánica que tenía los dos polímeros en un aparato de lecho fluido. Los parámetros del procedimiento fueron:

30	Pre-calentamiento (25-27°C), min	20
	Temperatura del aire de entrada, °C	26-27
	Temperatura del producto, °C	22-25
	Presión de aire del procedimiento, bares	0,2
	Boquilla, mm	0,5
35	Presión de pulverización, bares	0,6
	Velocidad de pulverización, g/min	2,4
	Secado (25°C), min	3

La carga de mezcla de polímeros en las partículas finales fue del 6 %.

40 La Bemiparina se distribuyó por capas en las semillas inertes revestidos con polímero con una solución acuosa que tenía Bemiparina al 20 % (p/v) y Kollidon K30 al 1 % en un aparato de lecho fluido (Glatt). Los parámetros del procedimiento fueron:

	Temperatura del aire de entrada, °C	68-70
	Temperatura del producto, °C	41-43
	Presión de aire del procedimiento, bares	0,2
45	Boquilla, mm	0,5

Presión de pulverización, bares	0,8
Velocidad de pulverización, g/min	1,6
Secado (38-40 °C), min	5

La carga de fármaco en las esferas fue del 20 % (p/p).

5 **Caracterización de los gránulos:**

El tamaño de partícula se ha determinado por separación por cribado, usando cribas con aberturas de malla de 2, 1,5, 1,25, 1, 0,71, 0,315 y 0,125 mm. La fracción recogida presentó un tamaño de partícula entre 1 y 0,71 mm.

10 Los ensayos de liberación se han realizado en condiciones de inmersión en un aparato de disolución de 6 vasos con baño de agua a 37 °C. Se han introducido 300 mg de gránulos en el medio de disolución (900 ml de tampón de fosfato de pH 6,8). La velocidad de rotación de las paletas se ha mantenido en 100 rpm.

Se han tomado muestras de 1 ml con el muestreador automático después de 15 y 30 minutos y después de 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16 y 20 horas. Los volúmenes recogidos se sustituyen por 1 ml de tampón nuevo con el fin de mantener un volumen constante dentro de los vasos. A continuación estas partes alícuotas se filtran con un filtro MILLIPORE de 0,22 µm de porosidad.

15 Las cantidades de bemiparina liberada se evalúan por nefelometría y a continuación se establecen las curvas que representan la cinética de liberación de bemiparina en función del tiempo. La cinética de liberación se ha realizado por duplicado para cada una de las muestras (n = 2).

20 La Figura 33 muestra que el perfil de liberación de estas formulaciones tiene dos fases. En este caso, la liberación inicial representa casi el 100 % en todas las medidas realizadas. Los gránulos liberan Bemiparina mucho más deprisa que los gránulos obtenidos en el ejemplo 25. La distribución preferente del fármaco en la parte superior de la matriz polimérica evita el control en la liberación por la matriz polimérica.

Ejemplo 28 (comparativo): administración oral *in vivo* en monos *Cynomolgus* de los gránulos descritos en el ejemplo 27

25 Se administró oralmente Bemiparina que contenía gránulos que tenían Bemiparina distribuida en capas sobre una matriz polimérica de PLGA y Eudragit RS en monos *Cynomolgus* que tenían un peso medio de 3 kg. La dosis de Bemiparina fue de 10.000 UI de anti-Xa por animal.

Se recogieron muestras de sangre 8 y 24 horas después de la administración oral de micropartículas y la presencia de Bemiparina en plasma de monos se determinó midiendo la actividad del anti-factor Xa en plasma.

30 La administración oral de gránulos de Eudragit RS y PLGA que contenían bemiparina no proporcionó valores detectables de anti-Xa en plasma en ninguno de los animales estudiados.

REIVINDICACIONES

1. Una forma farmacéutica, que es un gránulo o pella, que tiene un tamaño de partícula de al menos 0,1 mm, que comprende al menos un compuesto activo y una matriz polimérica, en la que:
 - a) el compuesto activo se selecciona del grupo que consiste en: insulinas, heparina no fraccionada, heparina de bajo peso molecular, heparinas de peso molecular ultrabajo y heparinoides;
 - b) la matriz polimérica comprende al menos un polímero de naturaleza catiónica seleccionado del grupo que consiste en polímeros y copolímeros derivados de ácidos acrílico y metacrílico, colestiramina y polímeros naturales; y el compuesto activo no se acumula en la superficie de la forma farmacéutica, que puede obtenerse por un procedimiento de granulación, extrusión, revestimiento o una combinación de los mismos.
2. La forma farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la matriz polimérica comprende además al menos un polímero de naturaleza aniónica o neutra.
3. La forma farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en la que el compuesto activo es heparina de bajo peso molecular.
4. La forma farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 3, en la que al menos un polímero de naturaleza aniónica o neutra y al menos un polímero de naturaleza catiónica están presentes en una proporción de al menos el 10 % cada uno en relación con el peso de la matriz polimérica.
5. La forma farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el polímero de naturaleza aniónica o neutra en la matriz polimérica se selecciona del grupo que consiste en poliésteres, policaprolactonas, polímeros y copolímeros derivados de ácido acrílico, óxidos de polietileno, óxidos de polipropileno, copolímeros de óxidos de polietileno y de polipropileno, polianhídridos, poliamidas, poliuretanos, policarbonatos, poliacetales, poliortoésteres, policianoacrilatos, polidioxanonas, poli(α -hidroxiácidos), poli(β -hidroxiácidos), polifosfacenos, polímeros naturales; mezclas, copolímeros y terc-polímeros de los mismos.
6. La forma farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5, en la que entre los polímeros de naturaleza aniónica o neutra, los poliésteres se seleccionan del grupo que consiste en polímeros de ácido láctico, polímeros de ácido glicólico, copolímeros de ácidos láctico y glicólico; la policaprolactona es poli- ϵ -caprolactona; los polímeros derivados de ácido acrílico se seleccionan del grupo que consiste en polimetilmetacrilatos; y los polímeros naturales se seleccionan del grupo que consiste en derivados de celulosa formados por celulosa microcristalina, hidroxipropilmetilcelulosa y etilcelulosa; mezclas, copolímeros y terc-polímeros de los mismos.
7. La forma farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en la que los polímeros de naturaleza aniónica y neutra en la matriz polimérica son biodegradables.
8. La forma farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en la que la matriz polimérica comprende poliésteres y polímeros naturales biodegradables como polímeros de naturaleza aniónica o neutra y derivados del ácido metacrílico con grupos de amonio cuaternario como polímeros de naturaleza catiónica.
9. La forma farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en la que la matriz polimérica comprende poli- ϵ -caprolactona como un polímero de naturaleza aniónica o neutra y un polímero derivado de ácido metacrílico con grupos de amonio cuaternario como un polímero de naturaleza catiónica.
10. La forma farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9, en la que el polímero derivado de ácido metacrílico con grupos de amonio cuaternario es un copolímero de cloruro de metacrilato de trimetilamonioetilo.
11. La forma farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en la que la matriz polimérica comprende un copolímero de polietileno y de óxido de polipropileno como polímero de naturaleza neutra y un polímero derivado de ácido metacrílico con grupos de amonio cuaternario como polímero de naturaleza catiónica.
12. La forma farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que es un gránulo en el que la matriz polimérica forma una capa de revestimiento en o sobre el núcleo.
13. La forma farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 2, que contiene además una capa intermedia entre el núcleo y la capa de revestimiento.
14. La forma farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 a 13, en la que el núcleo comprende una semilla inerte y una capa de revestimiento que comprende el compuesto activo.
15. La forma farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 14, que comprende además una capa intermedia entre la semilla inerte y la capa que comprende el compuesto activo.
16. Un procedimiento para la preparación de una forma farmacéutica según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, que comprende las etapas de a) combinación de al menos un compuesto activo y al menos un polímero de naturaleza catiónica; y b) envío de la mezcla obtenida a una etapa de granulación o extrusión.

17. Un procedimiento para la preparación de una forma farmacéutica según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 que comprende las etapas de a) revestimiento de una semilla inerte con una composición que comprende al menos un compuesto activo para obtener un núcleo; y b) revestimiento del núcleo preparado en la etapa a) con una composición que comprende al menos un polímero de naturaleza catiónica.
- 5 18. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17, que comprende además antes de la etapa b) el revestimiento de la semilla inerte revestido con el compuesto activo, con una composición para formar una capa de revestimiento intermedia.
19. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 18, en el que en la etapa b) se usa un procedimiento de pulverización.
- 10 20. Un procedimiento para la preparación de una forma farmacéutica según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, que comprende las etapas de a) mezclado de al menos un compuesto activo con al menos un polímero de naturaleza catiónica y b) extrusión de la mezcla homogeneizada.
21. Una formulación farmacéutica que comprende una forma farmacéutica según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, para administración por vía oral.
- 15 22. Una forma farmacéutica de acuerdo según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para su uso como un medicamento.

Diagrama 2

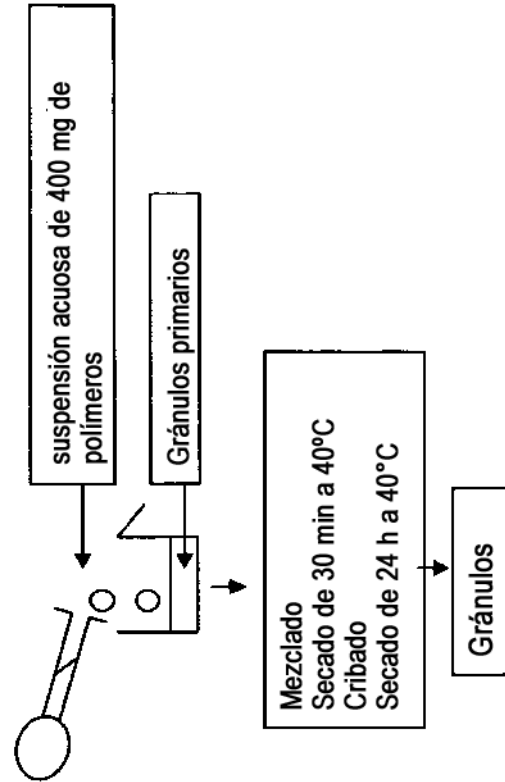
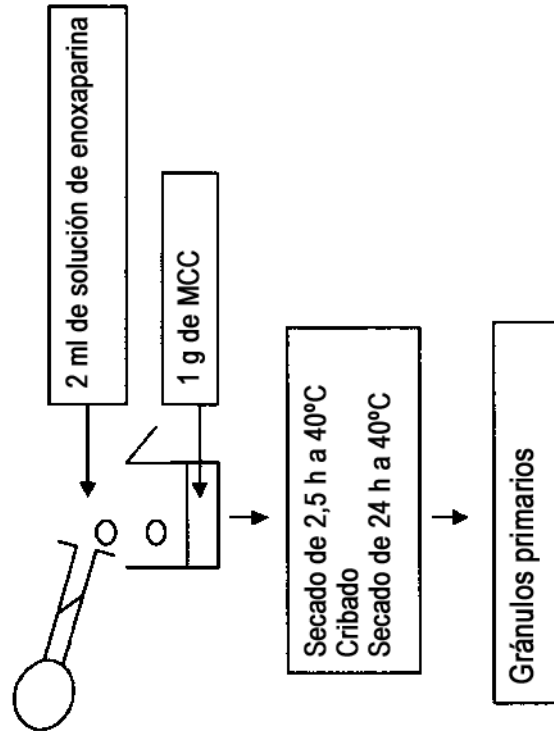


Figura 1

Diagrama 1



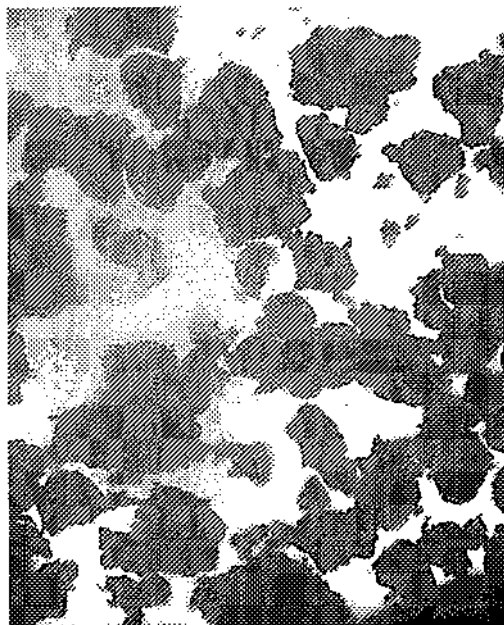
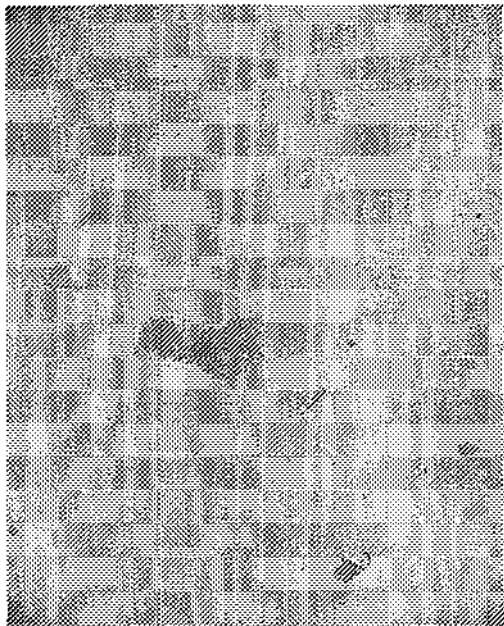


Figura 2

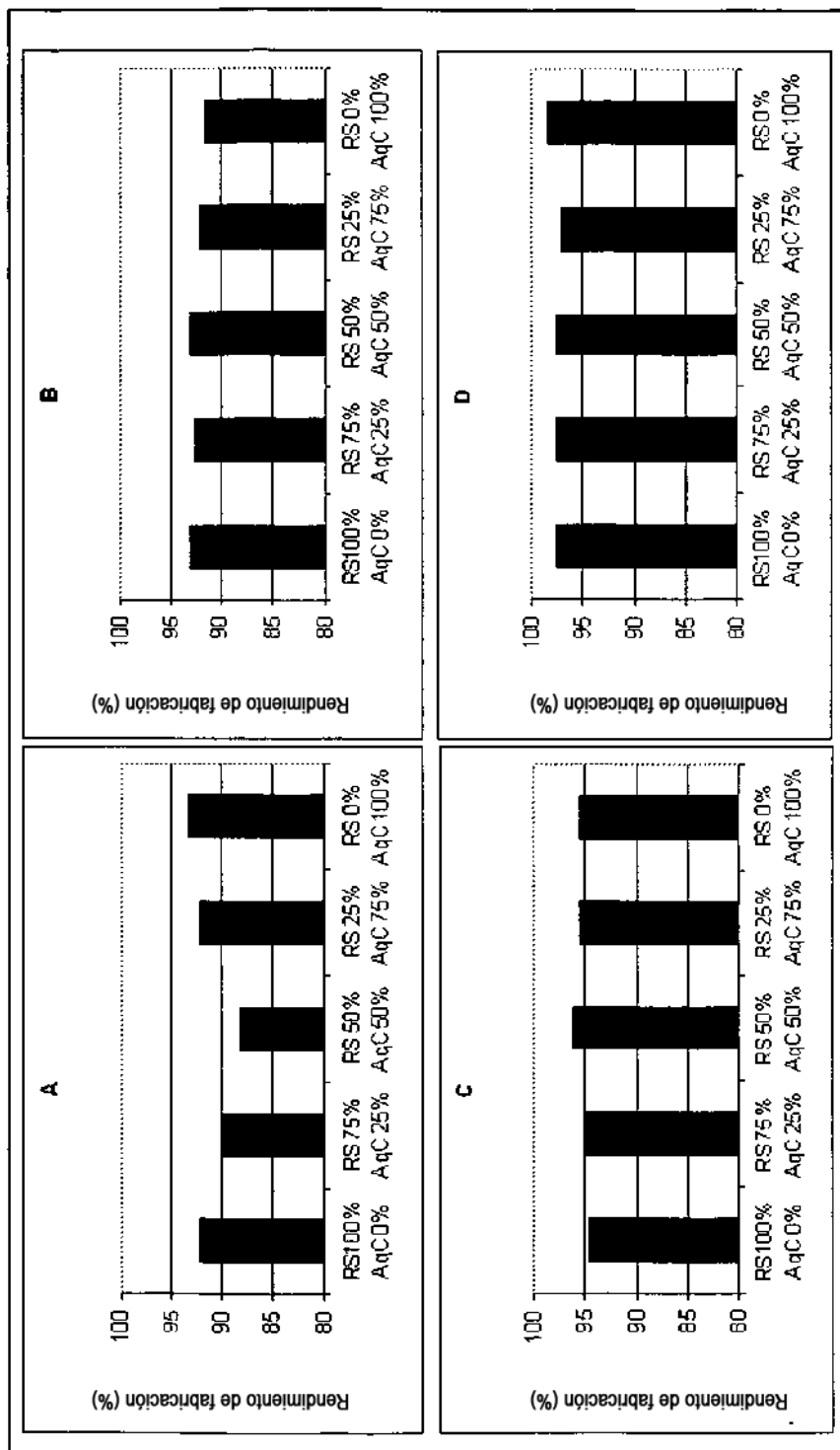


Figura 3

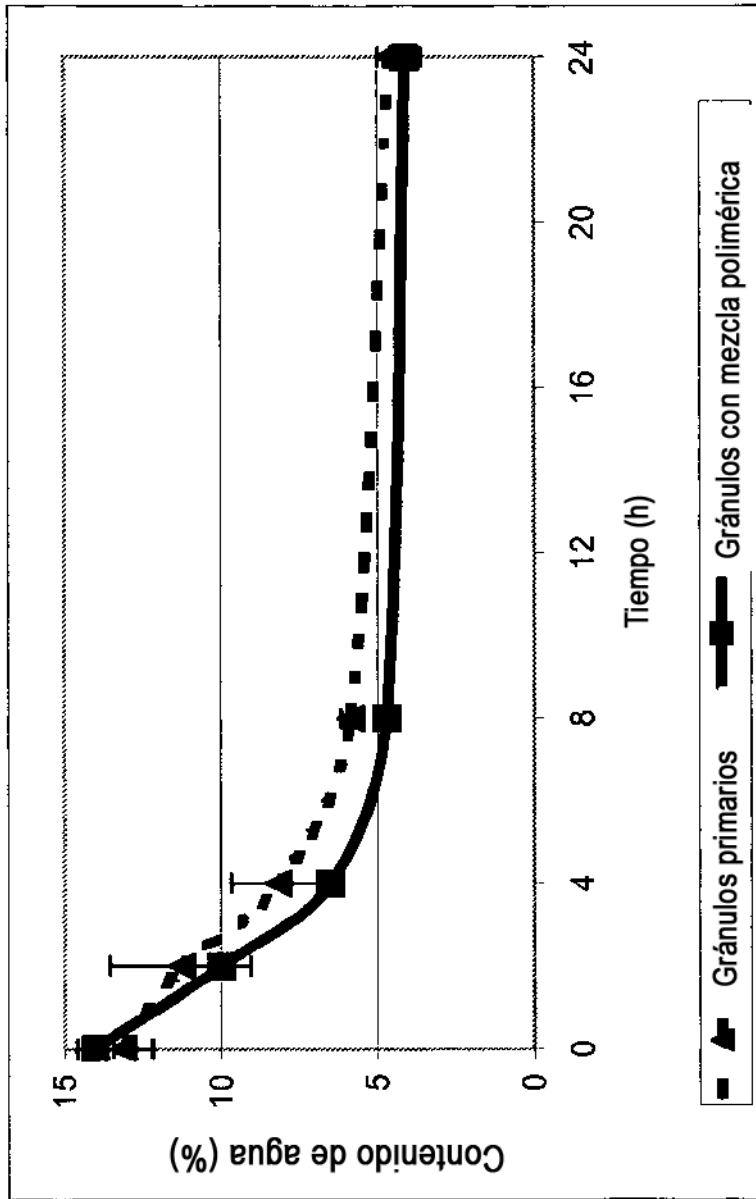


Figura 4

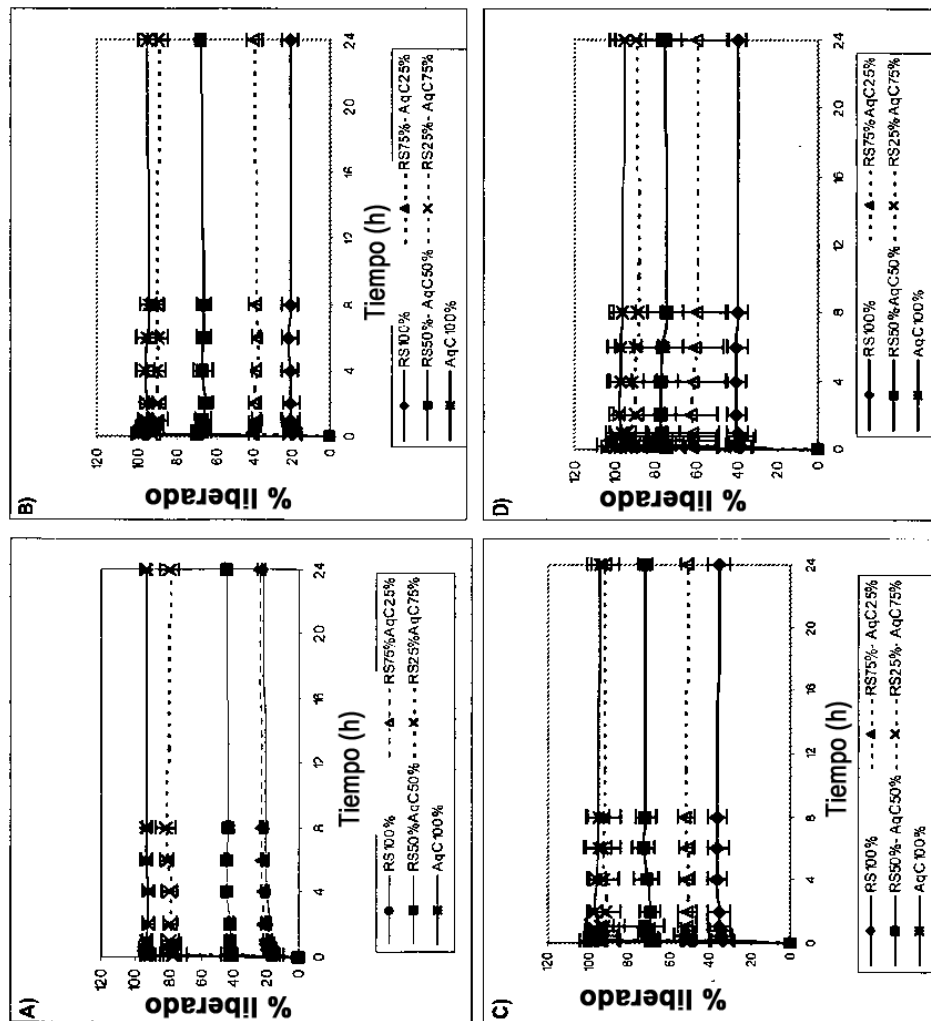


Figura 5

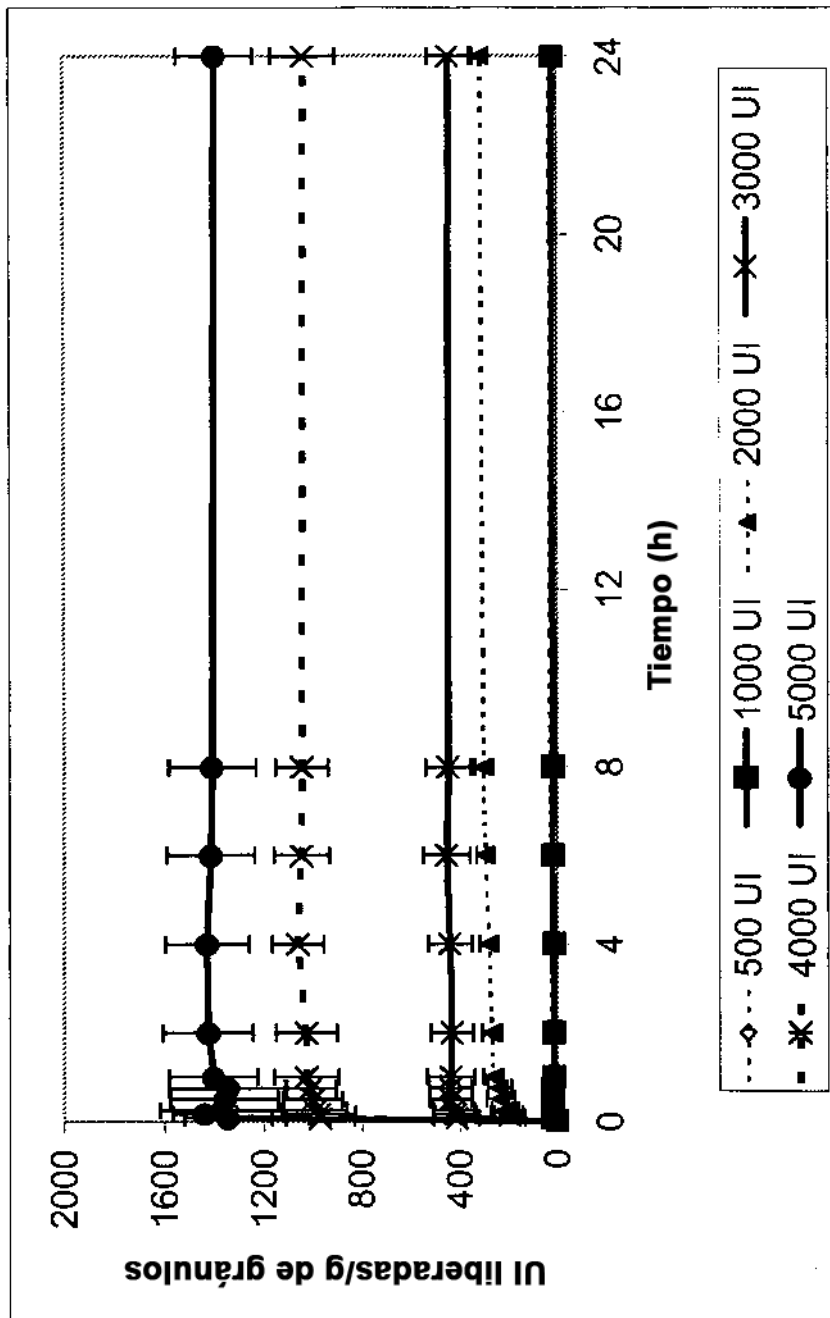


Figura 6

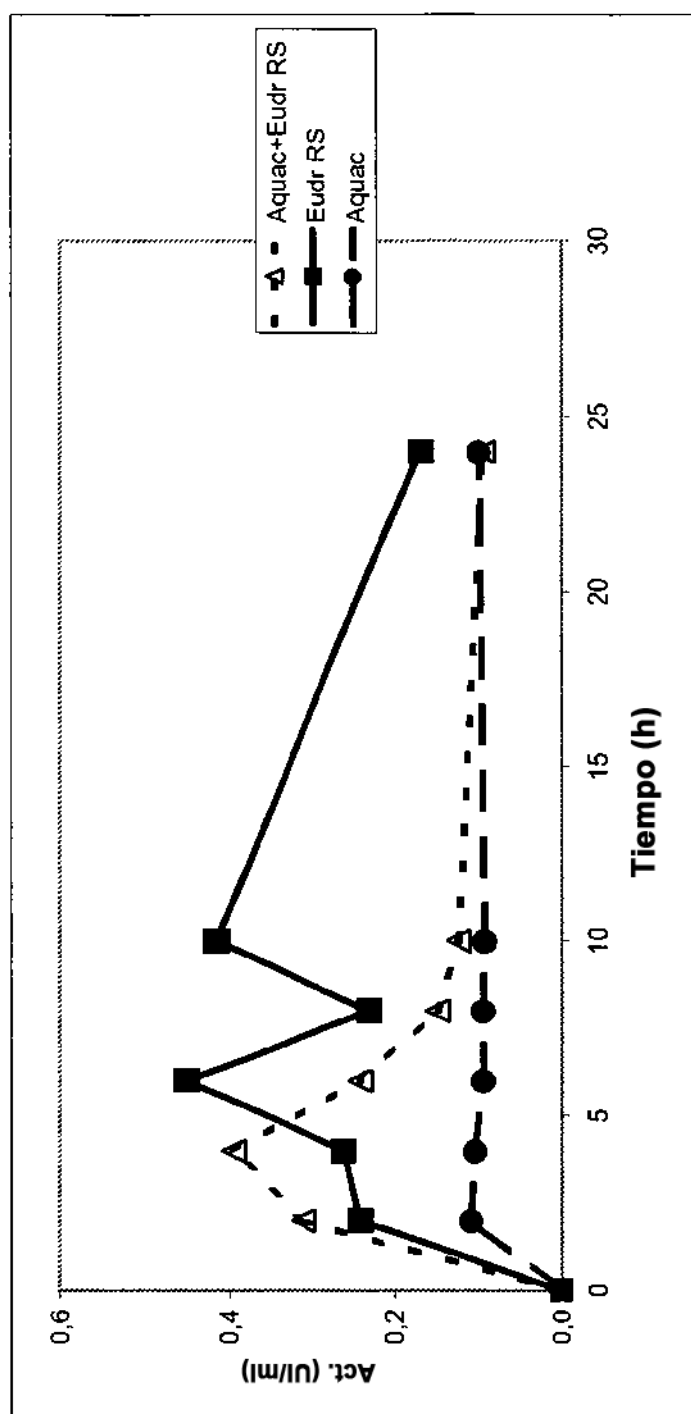


Figura 7

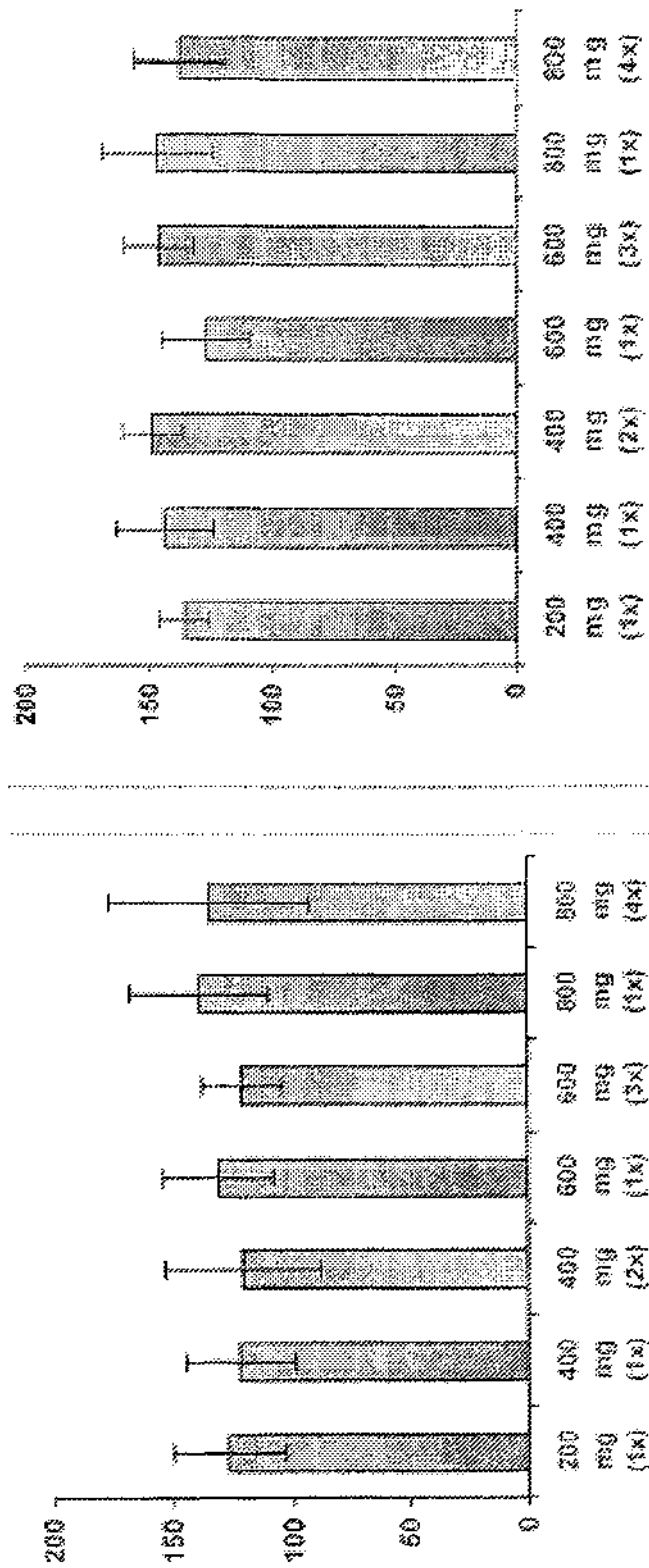


Figura 8

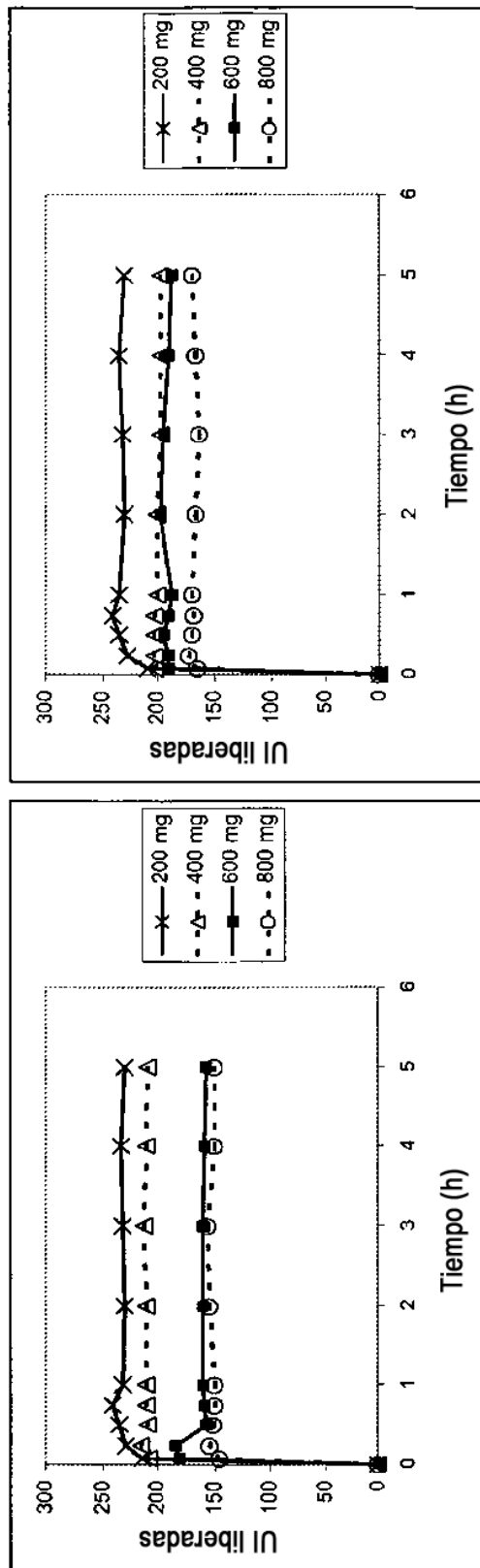


Figura 9

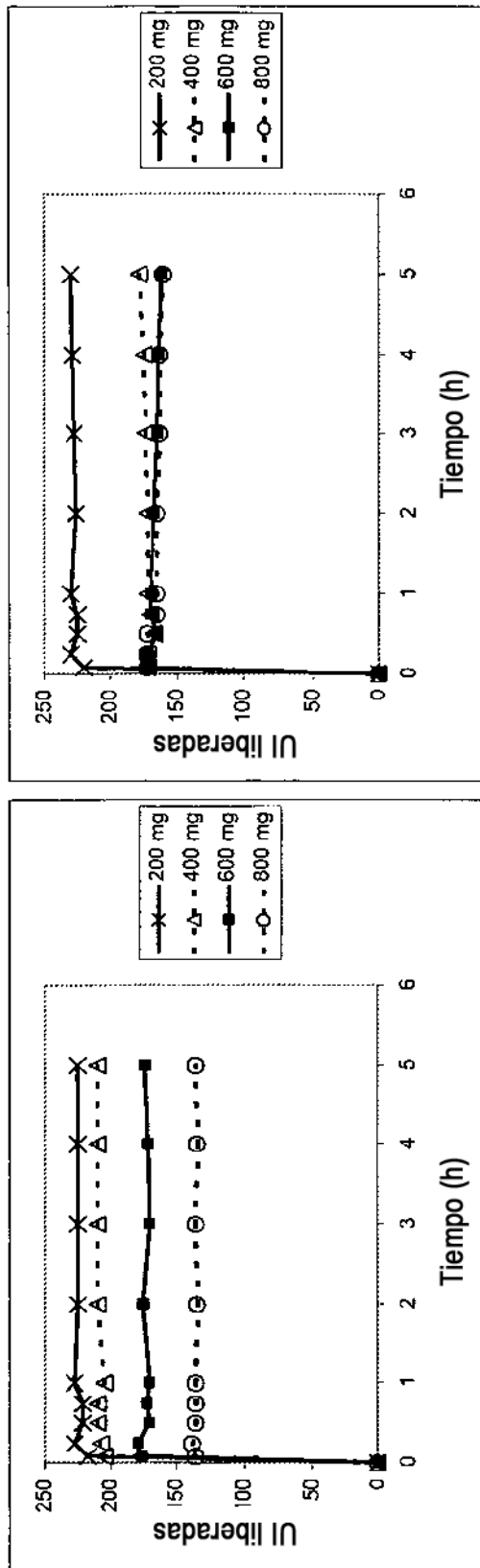


Figura 10

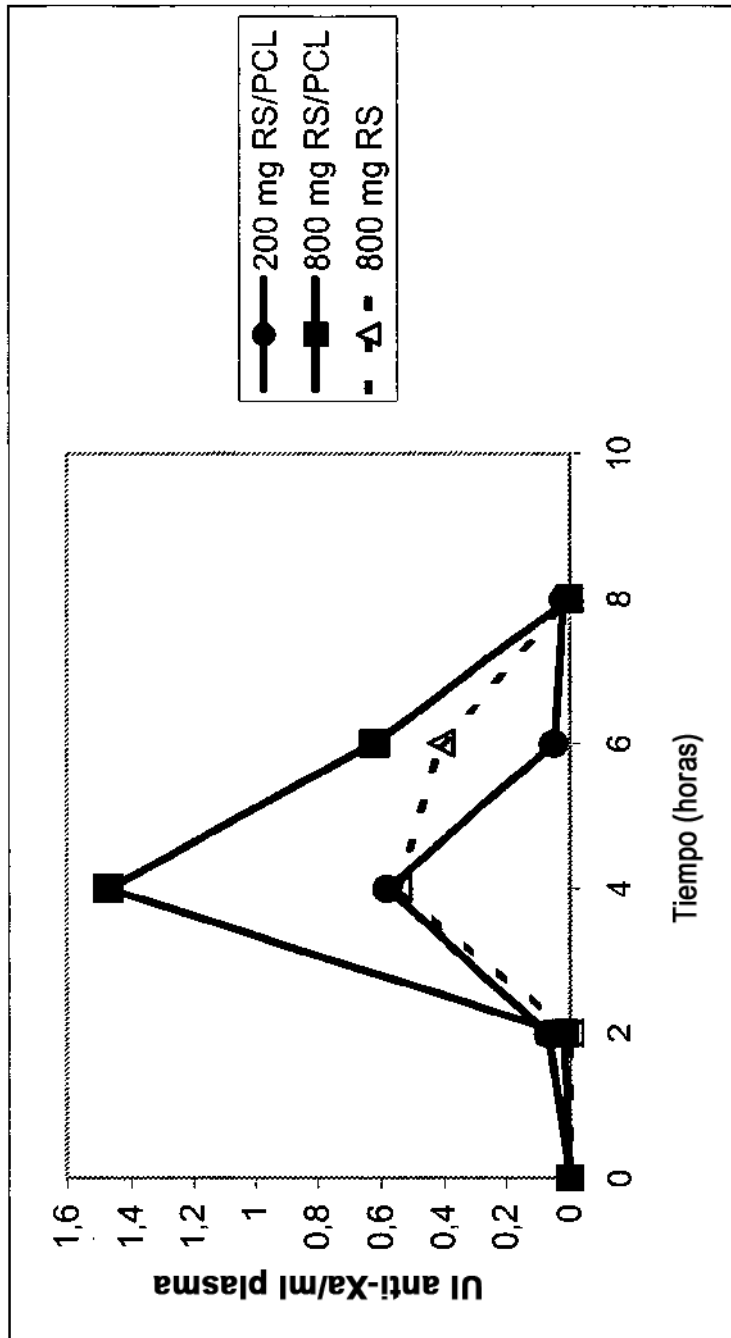


Figura 11

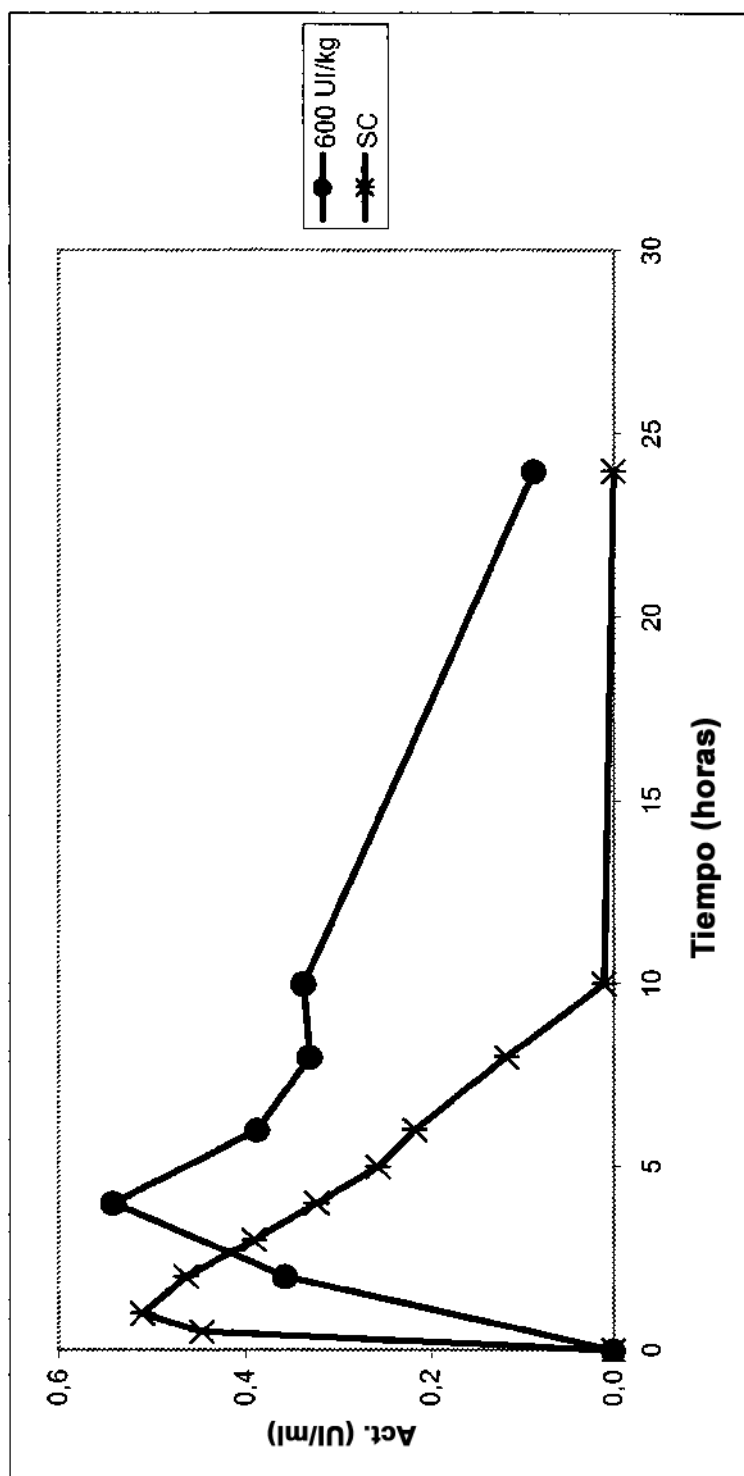


Figura 12

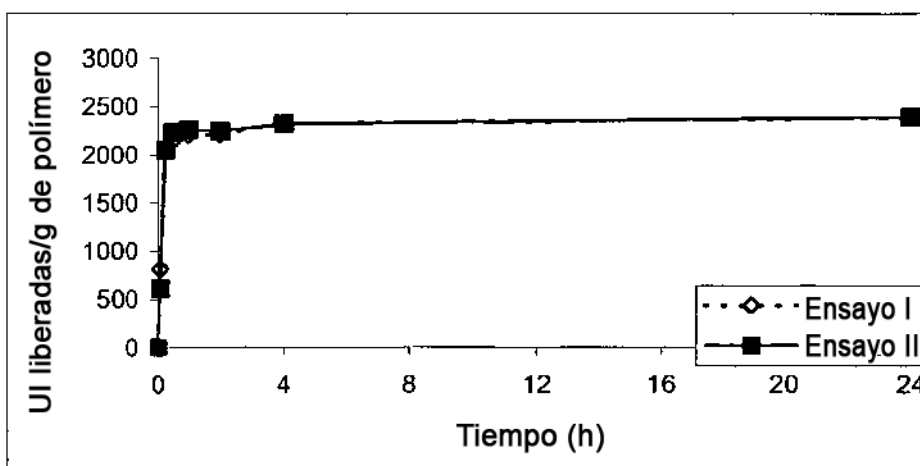
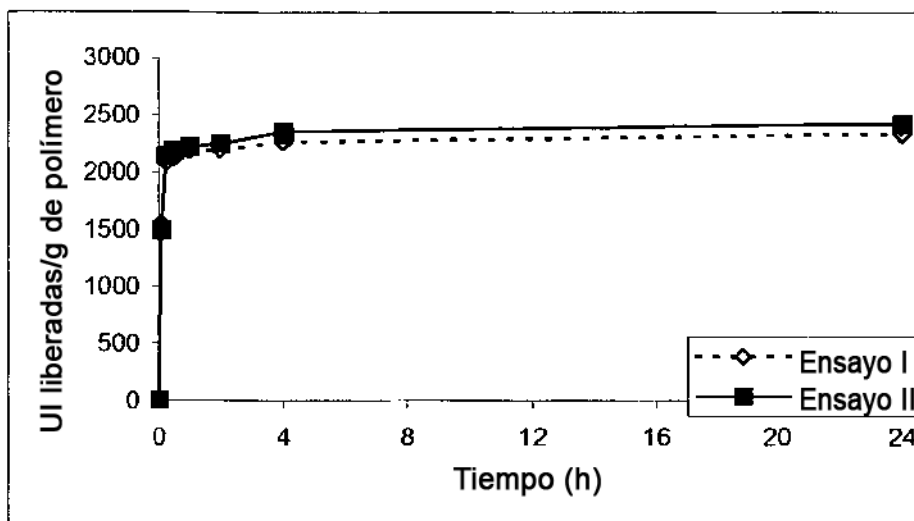


Figura 13

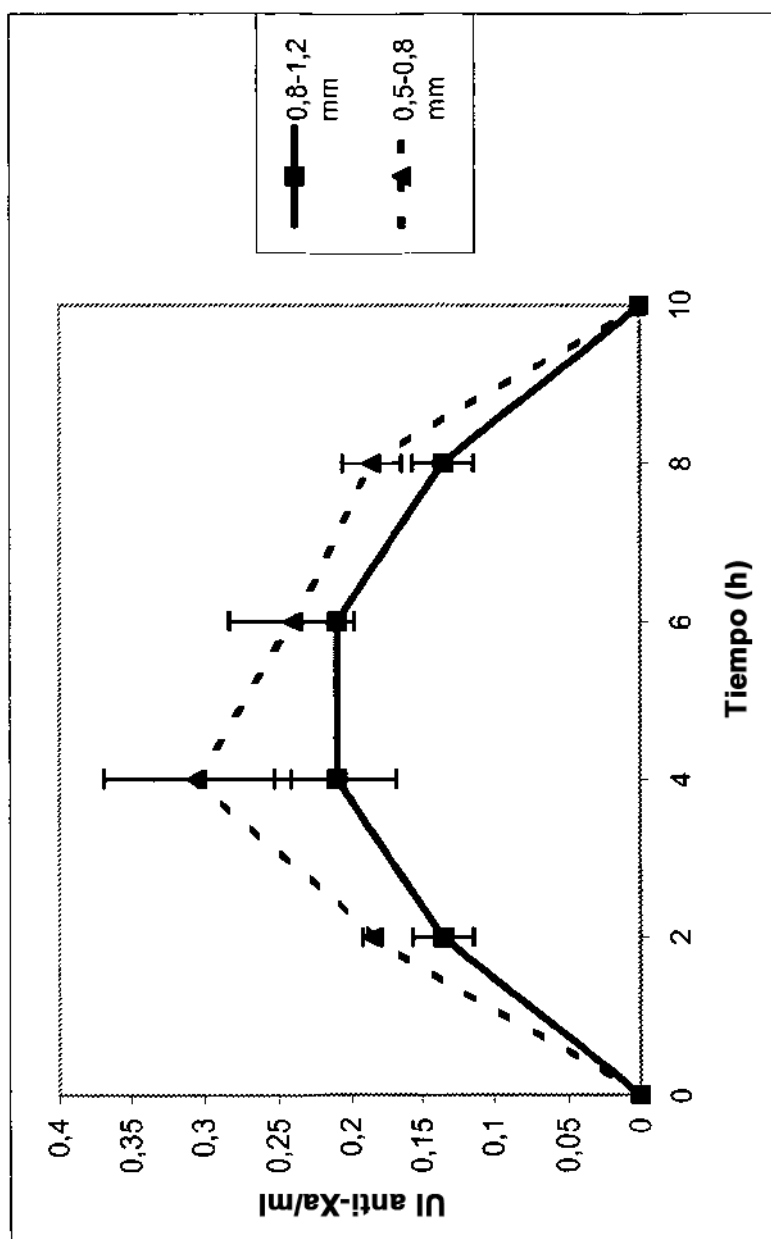


Figura 14

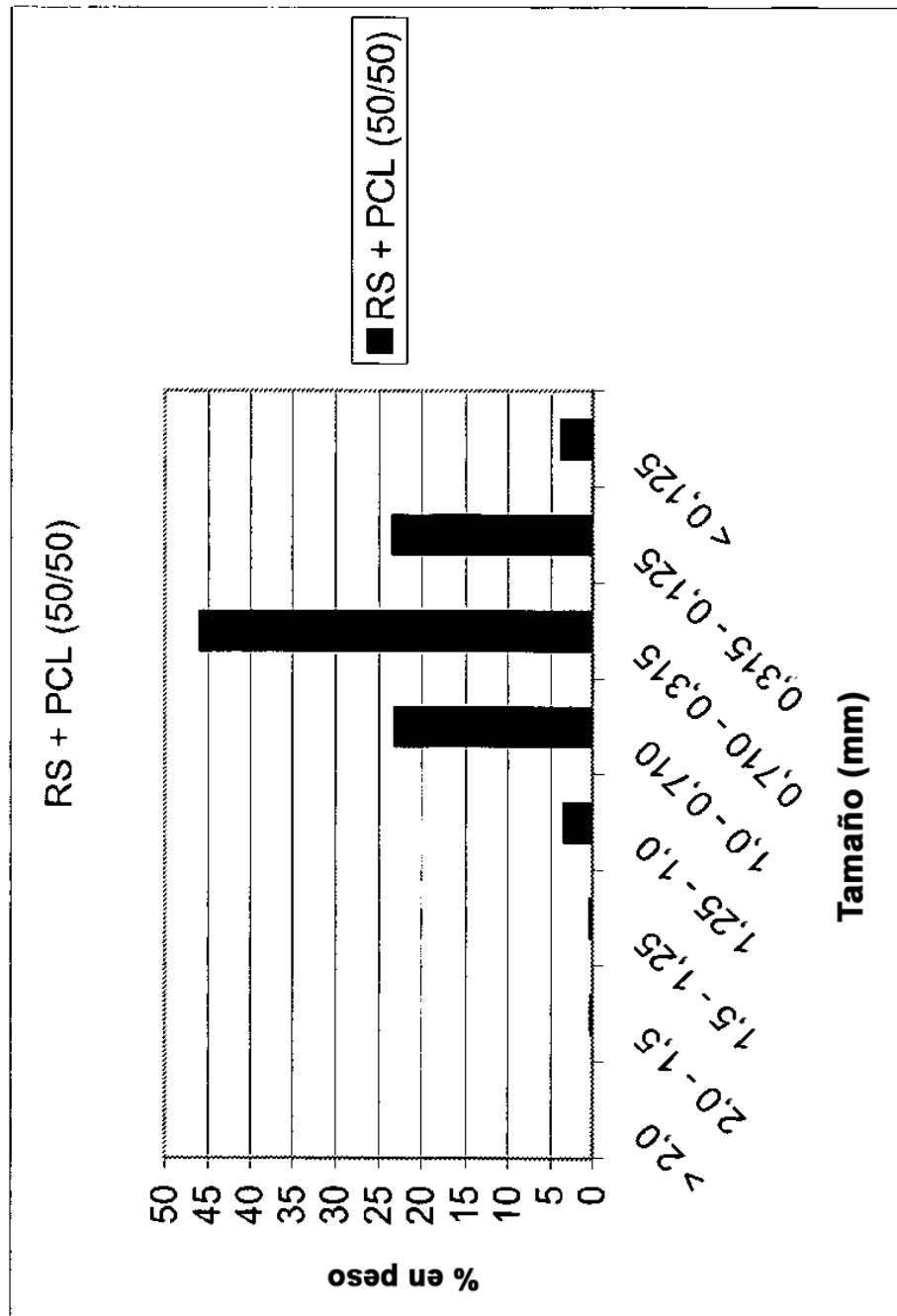


Figura 15

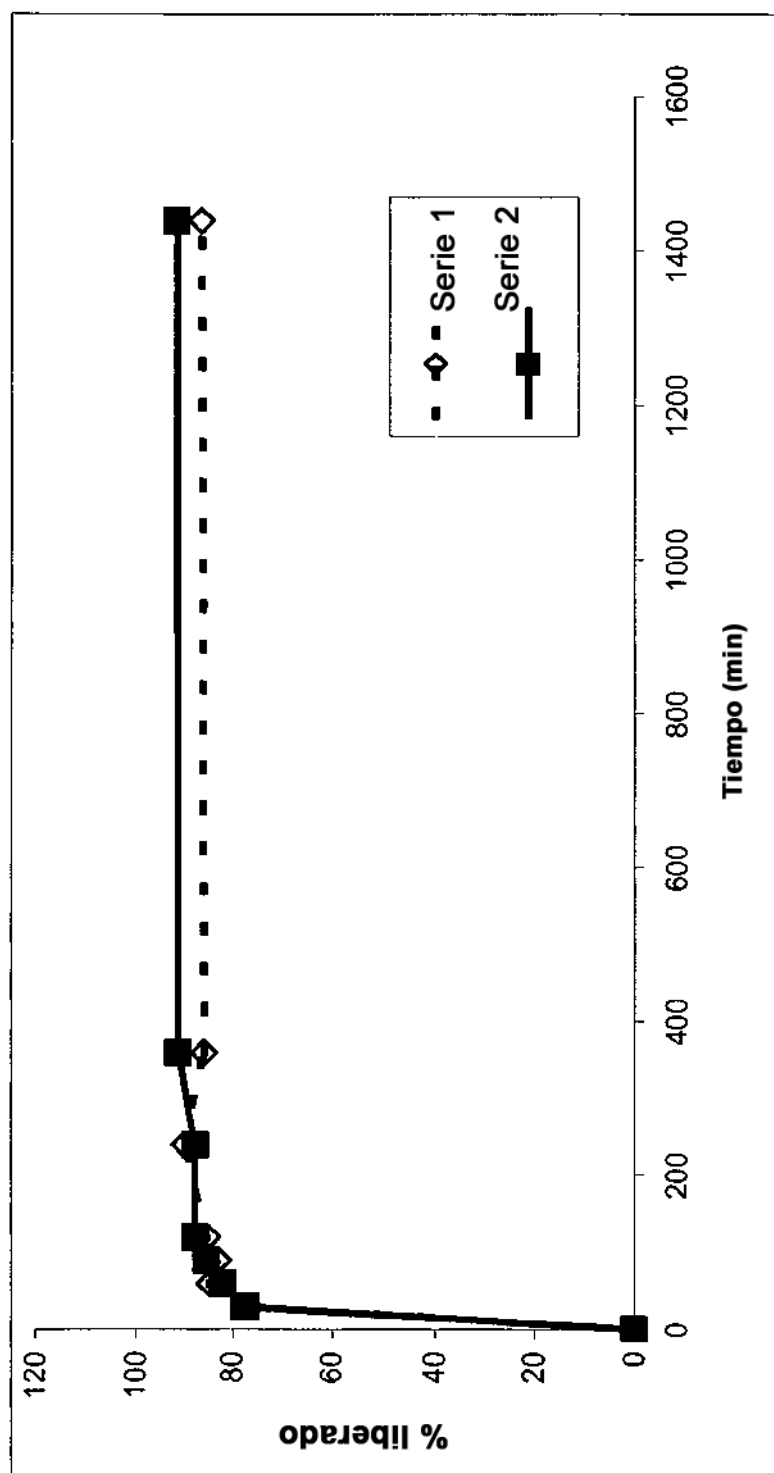


Figura 16

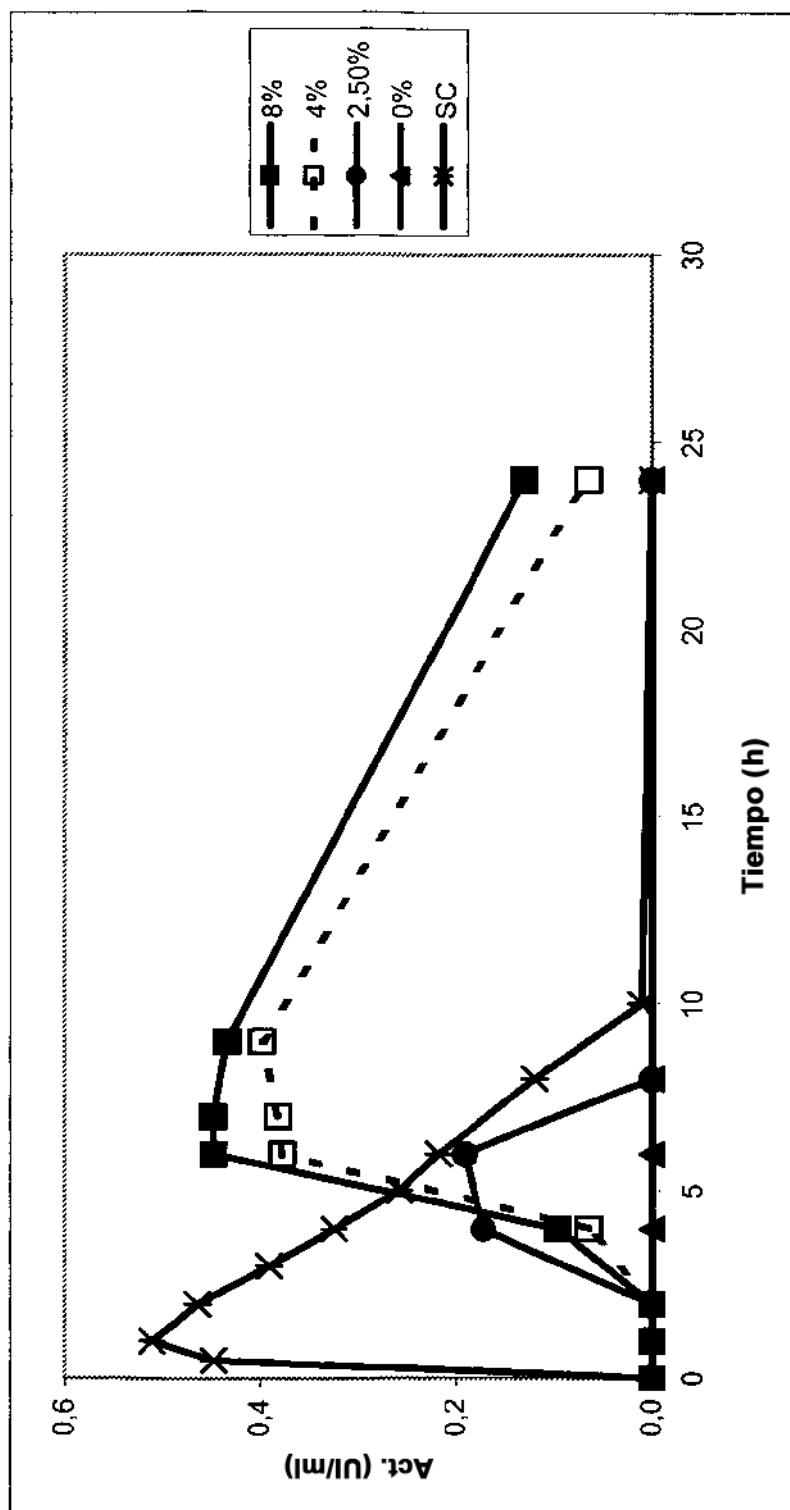


Figura 17

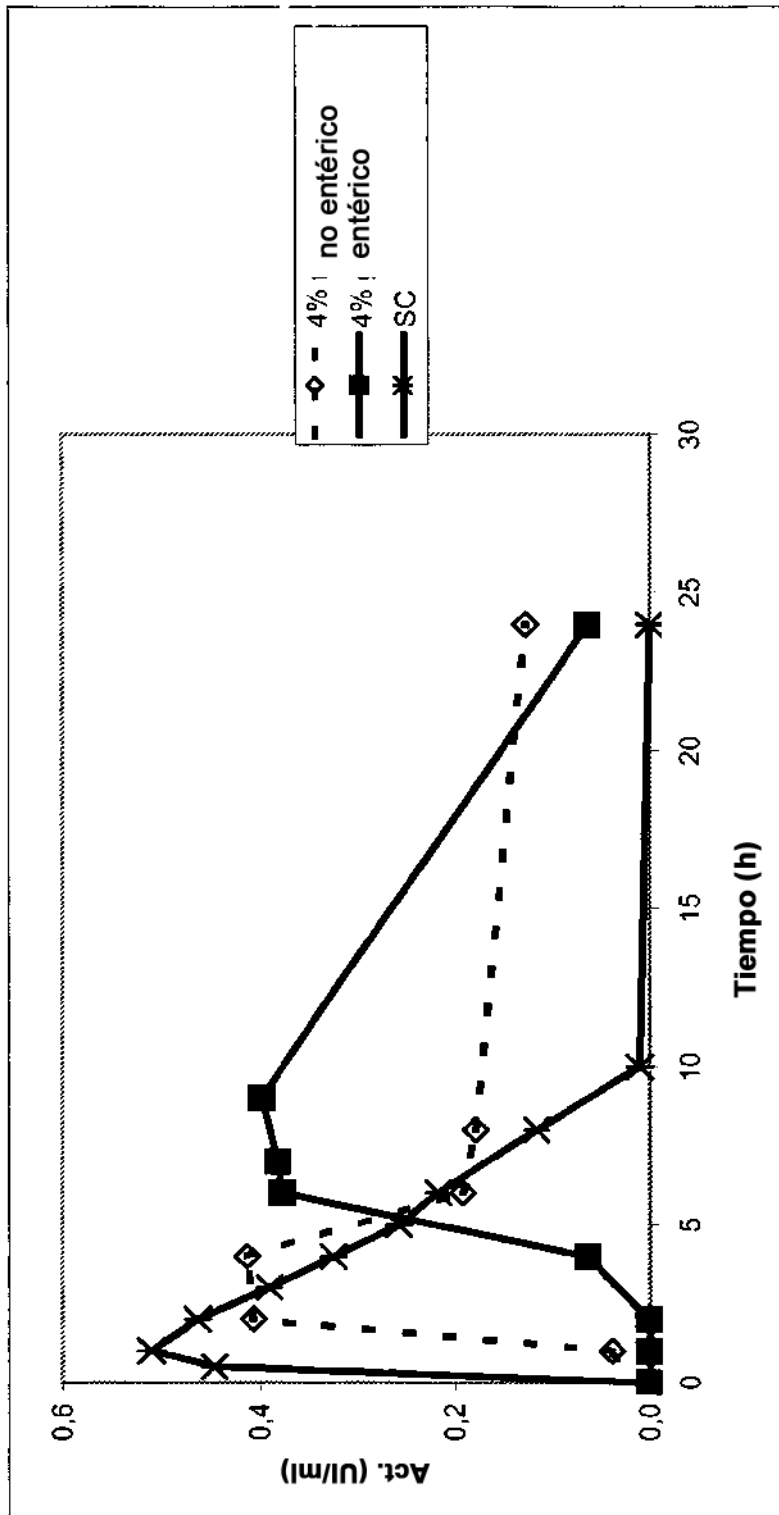


Figura 18

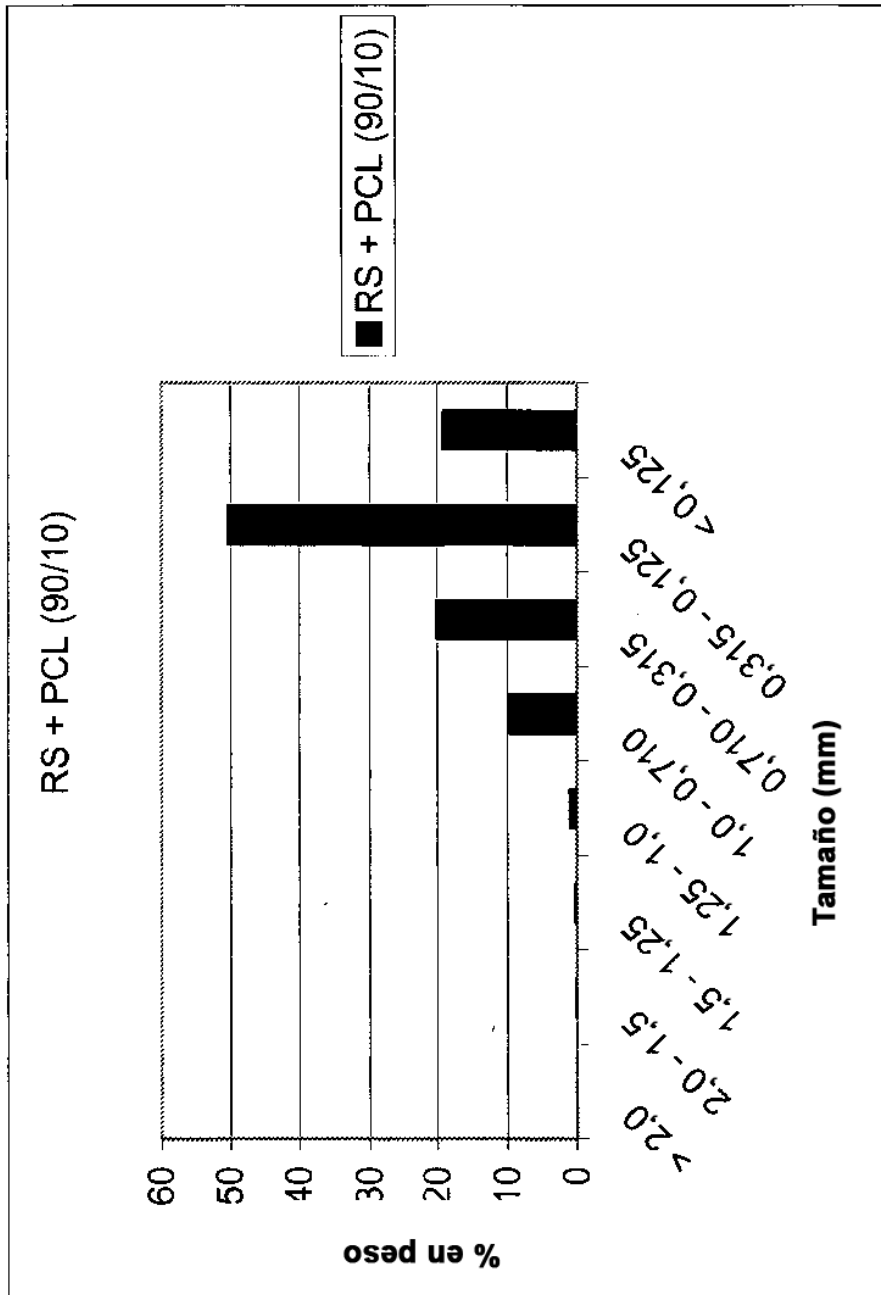


Figura 19

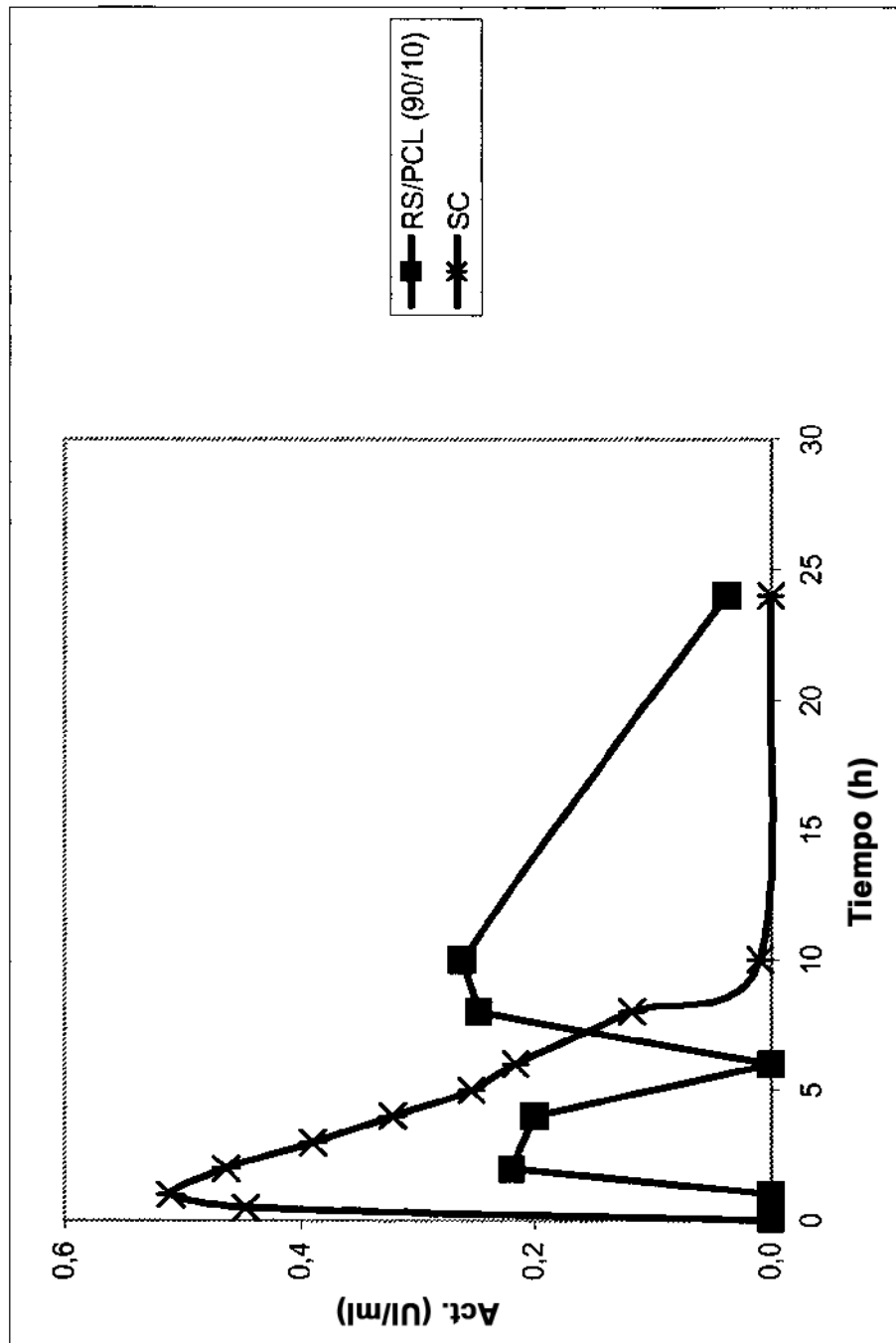


Figura 20

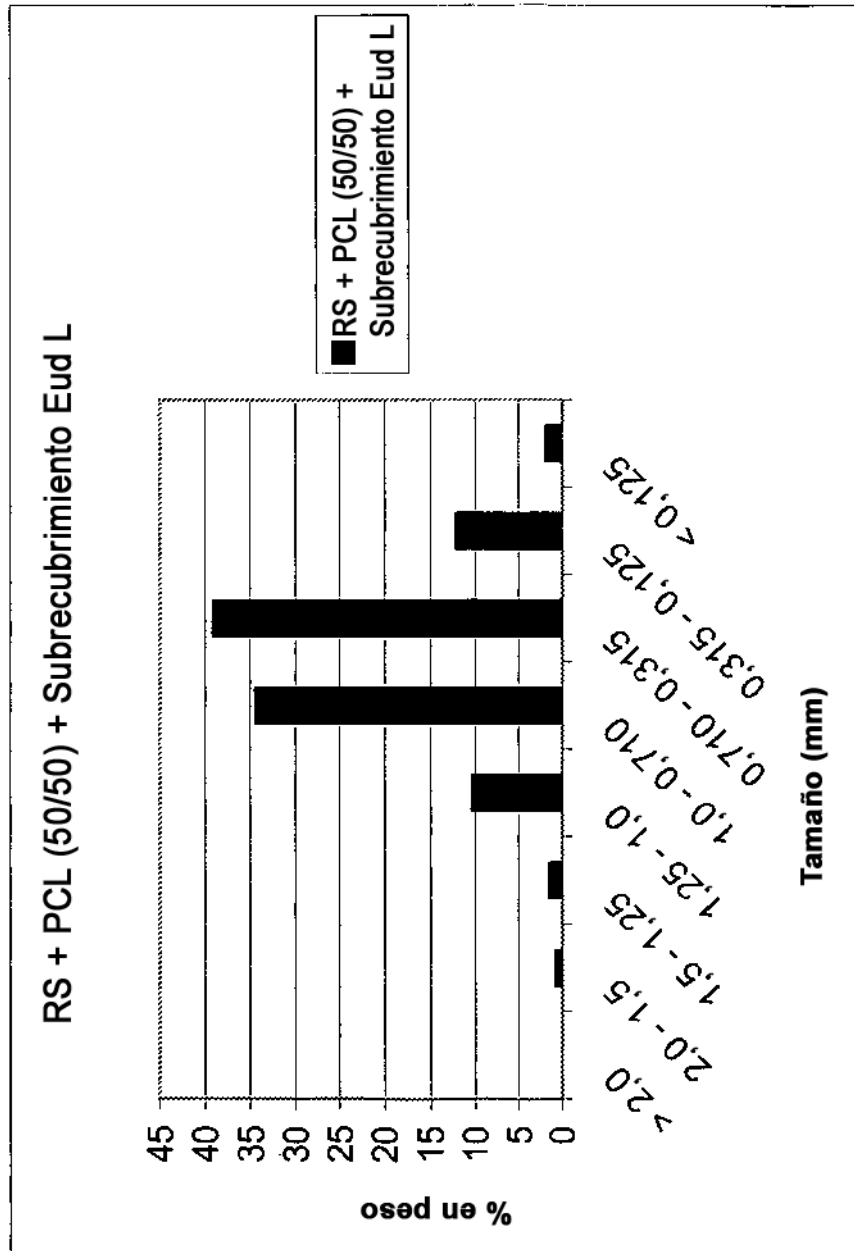


Figura 21

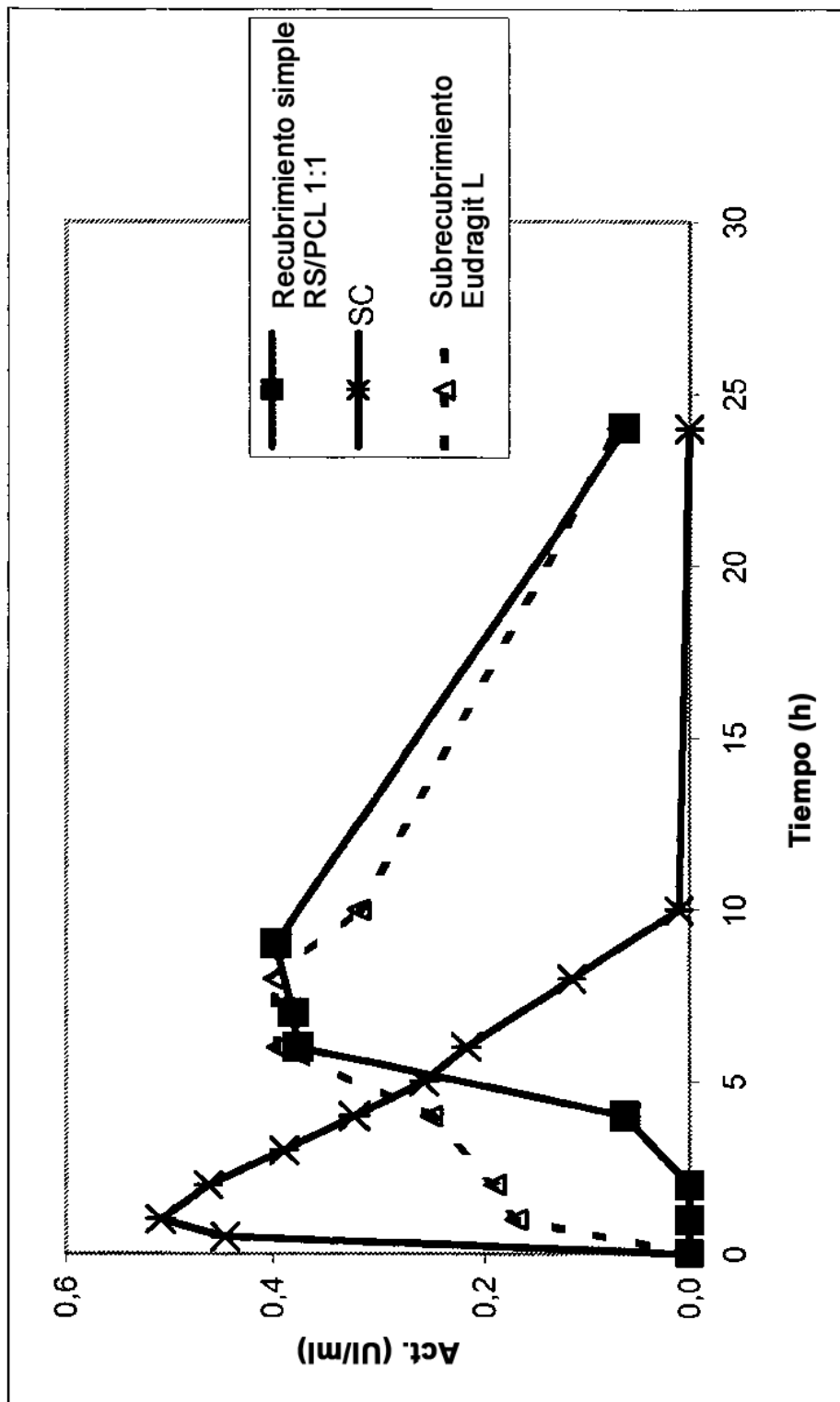


Figura 22

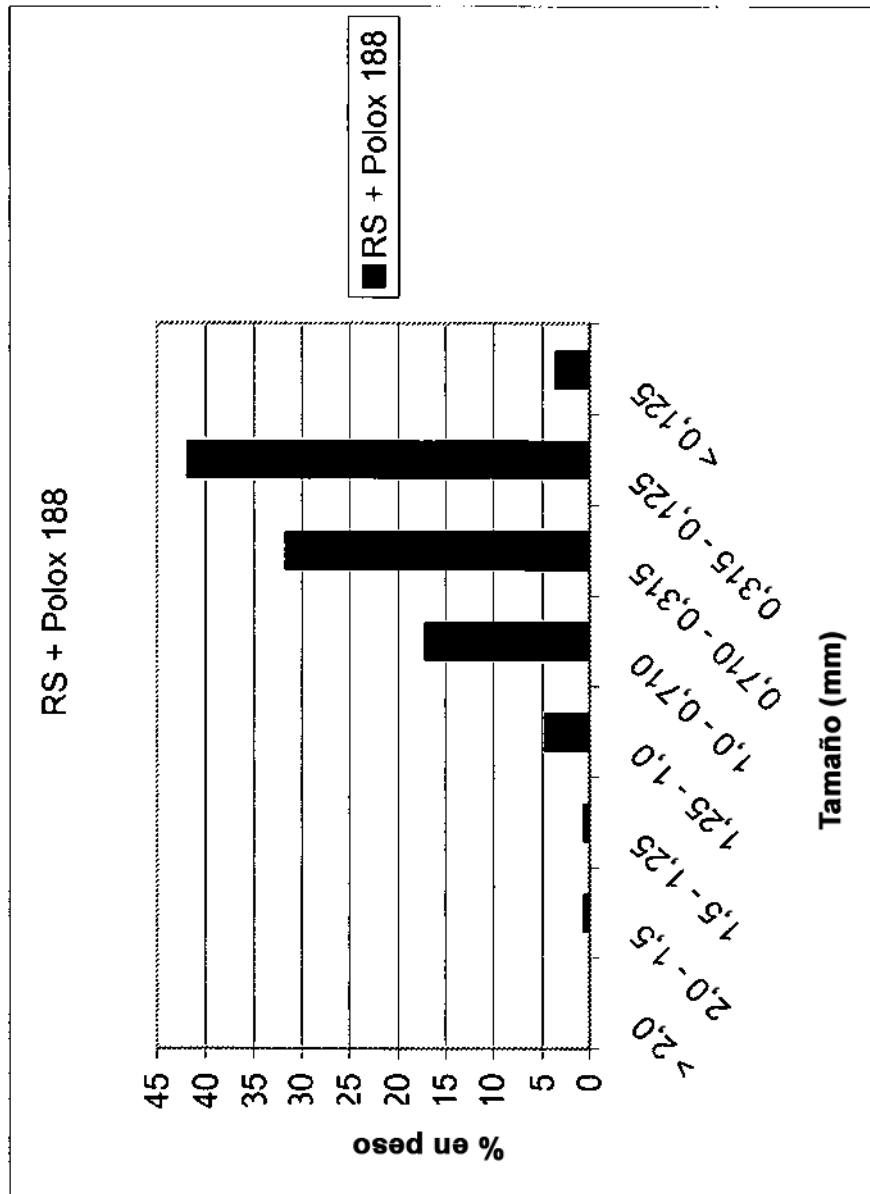


Figura 23

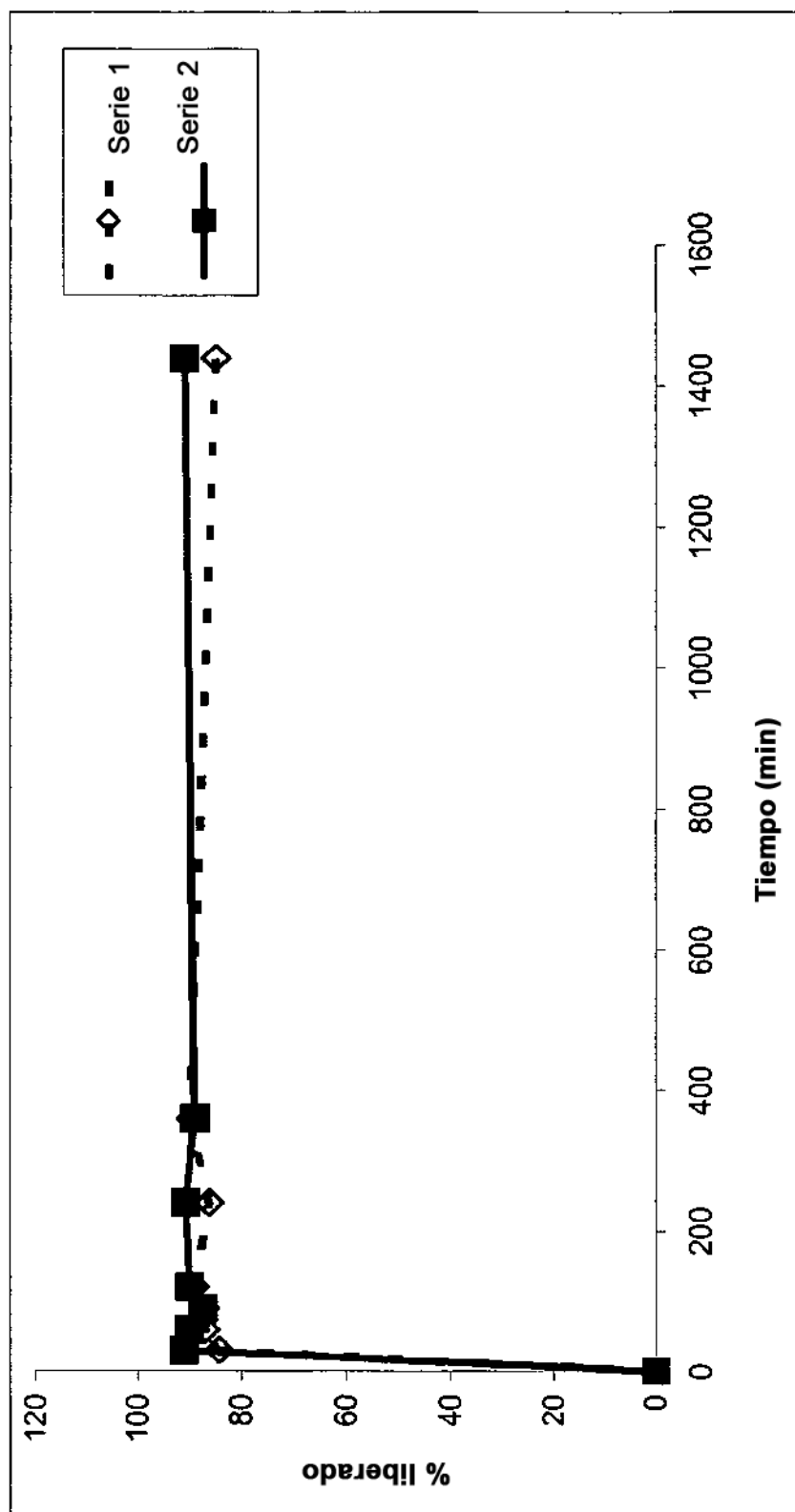


Figura 24

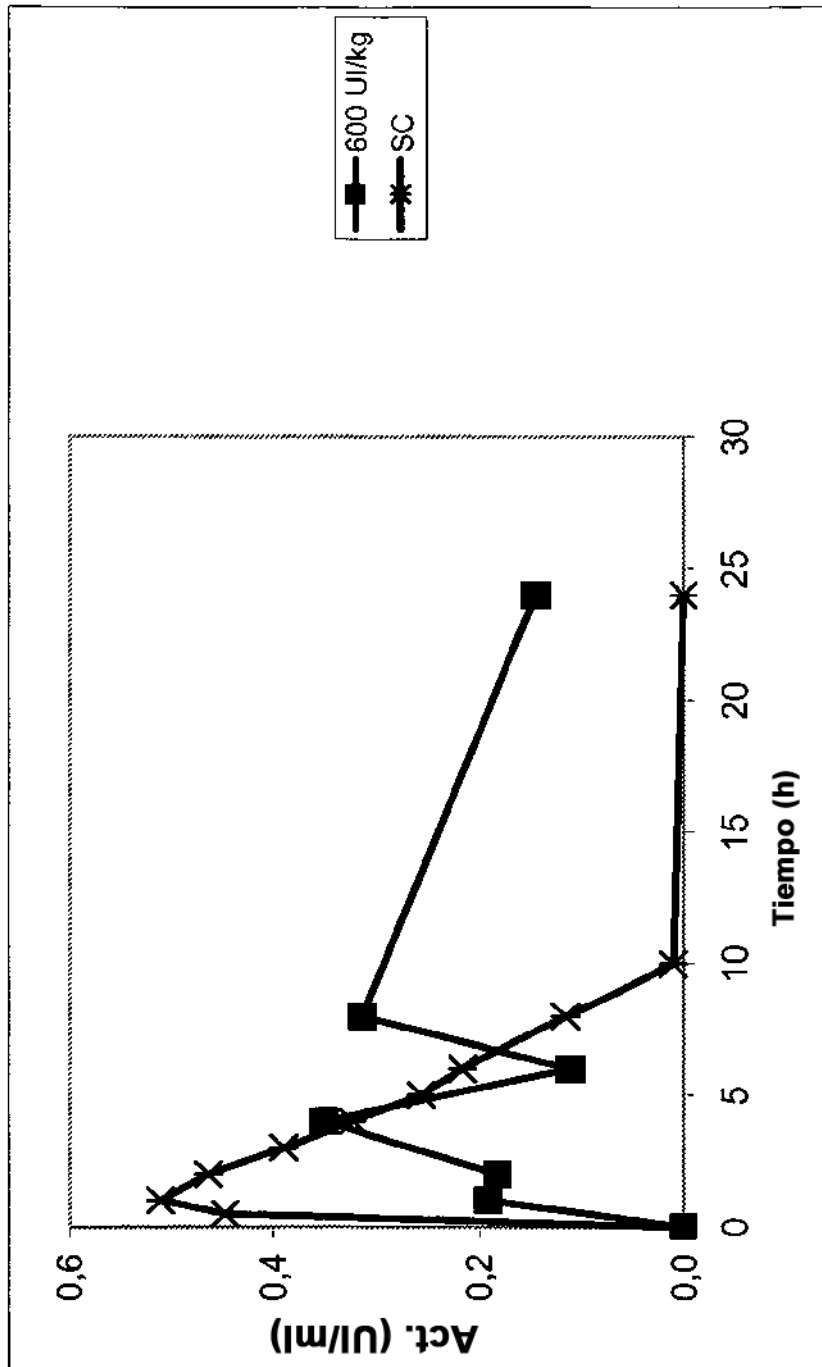


Figura 25

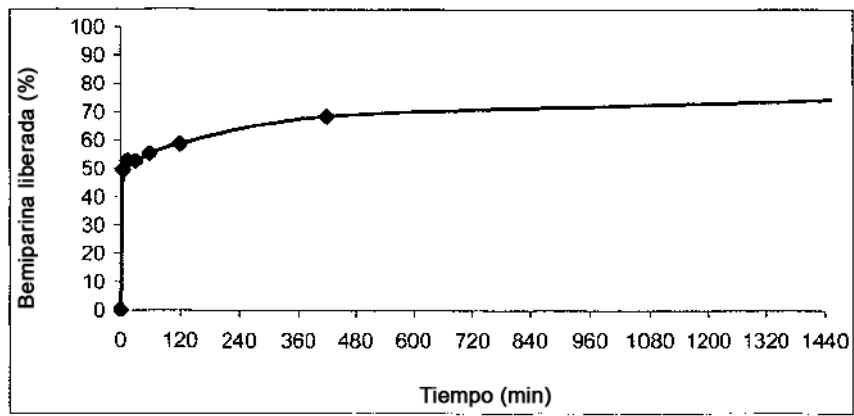


Figura 26

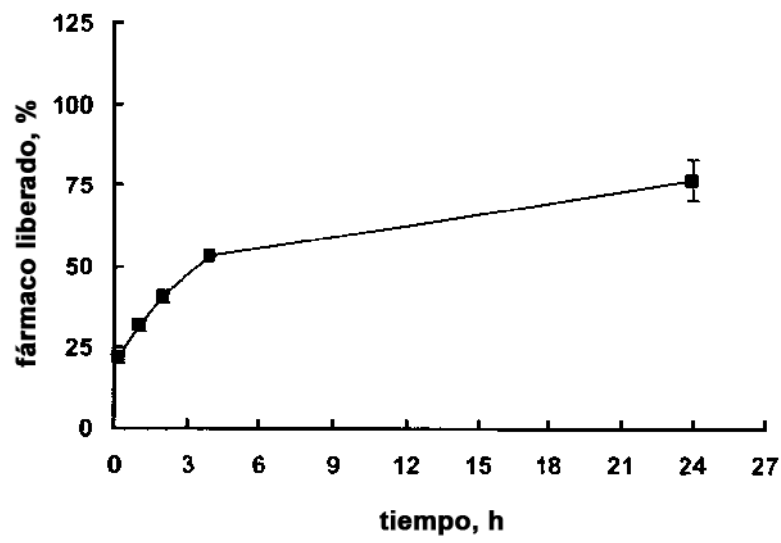


Figura 27

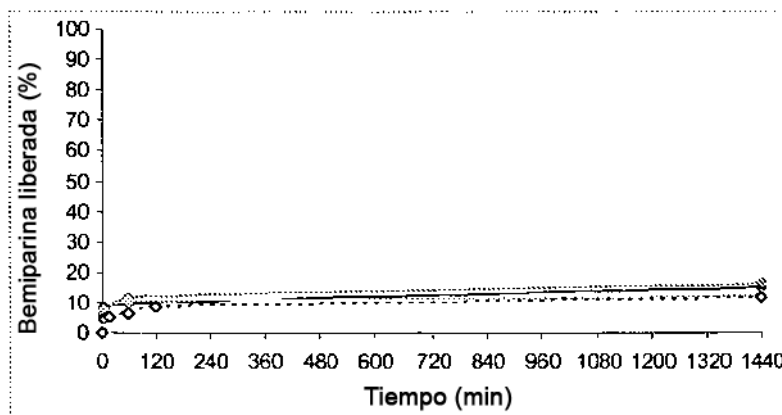


Figura 28

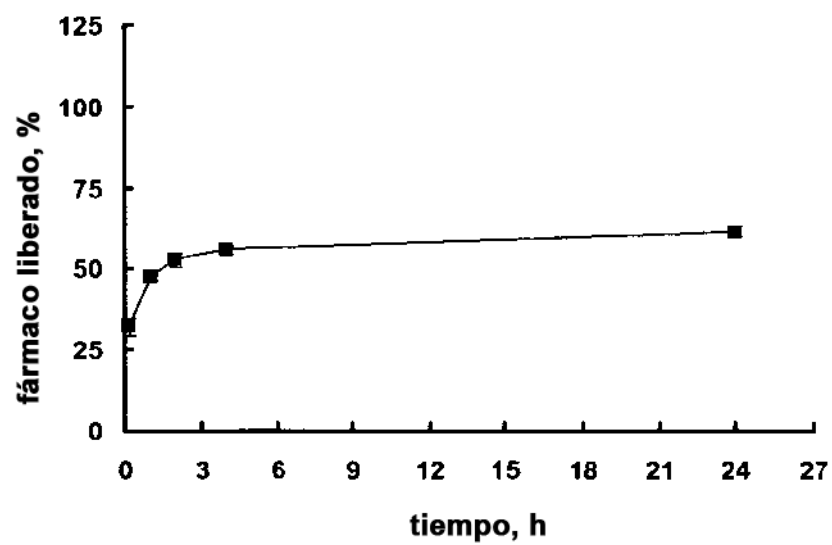


Figura 29

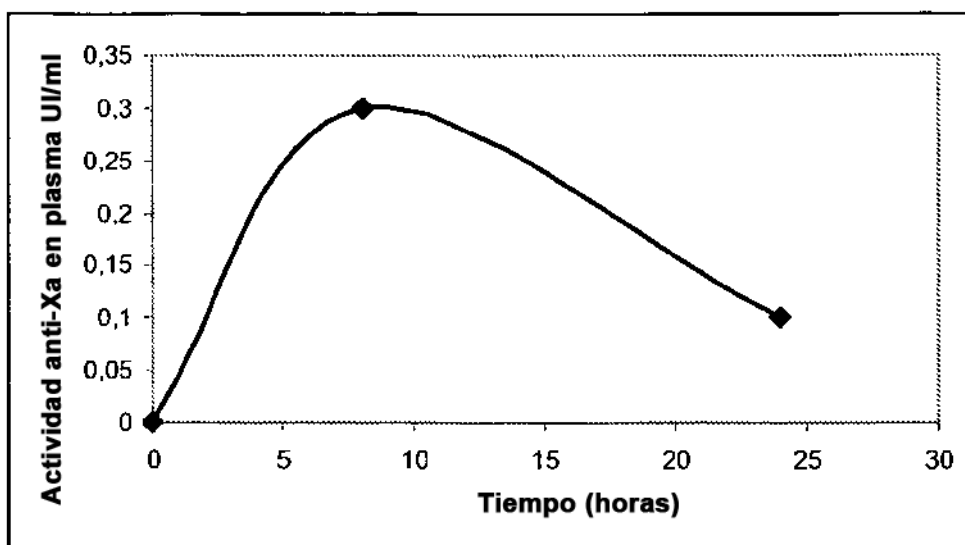


Figura 30

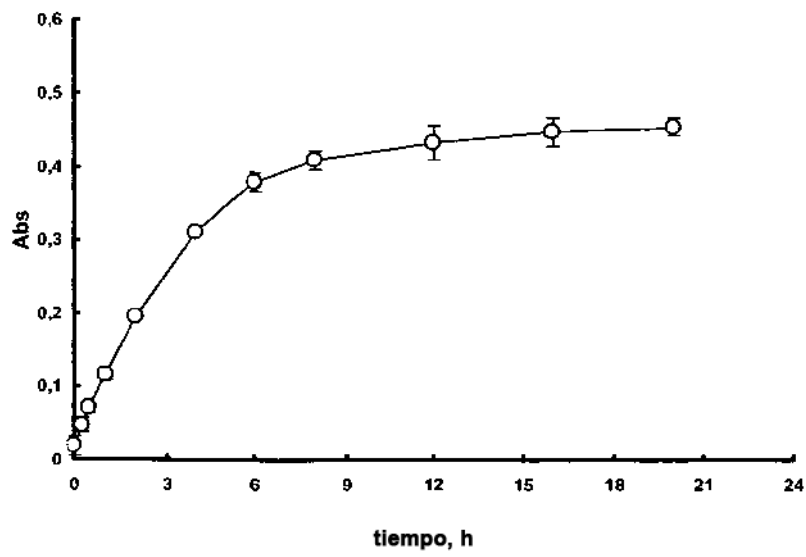


Figura 31

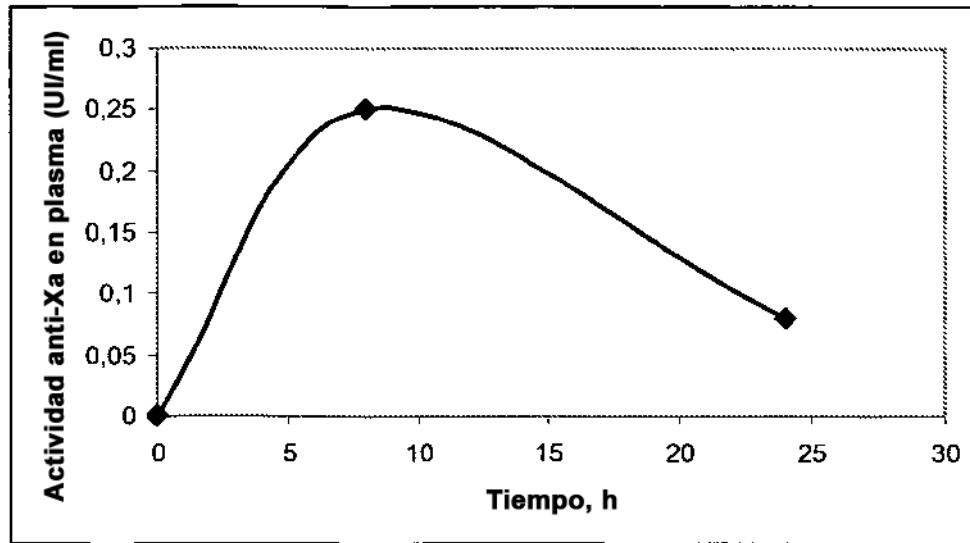


Figura 32

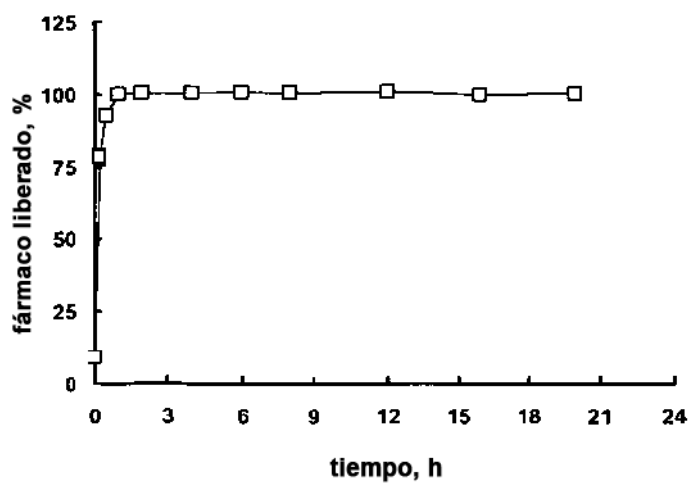


Figura 33