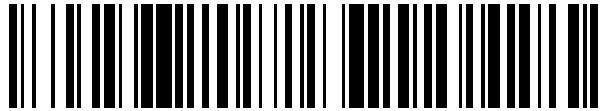


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 505 696**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/10** (2006.01)  
**A61K 9/16** (2006.01)  
**A61K 9/50** (2006.01)  
**A61K 38/00** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)  
**A61K 38/27** (2006.01)  
**A61K 39/39** (2006.01)  
**A61K 38/21** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.01.2000 E 00900954 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.07.2014 EP 1071407**

54 Título: **Micropartículas lipófilas que contienen un fármaco o un antígeno proteico y formulación que comprende las mismas**

30 Prioridad:

**18.01.1999 KR 9901232**  
**21.12.1999 KR 9959776**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**10.10.2014**

73 Titular/es:

**LG LIFE SCIENCES, LTD. (100.0%)**  
**20, YOIDO-DONG, YOUNGDUNGPO-GU**  
**SEOUL 150-721, KR**

72 Inventor/es:

**KIM, MYUNG JIN;**  
**KIM, SUN JIN;**  
**KWON, KYU CHAN y**  
**KIM, JOON**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 505 696 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

Micropartículas lipófilas que contienen un fármaco o un antígeno proteico y formulación que comprende las mismas

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a micropartículas, dispersiones, formulaciones en emulsión de aceite en agua y formulaciones en aerosol de acuerdo con las reivindicaciones 1 - 19.

**Antecedentes de la invención**

10 Es bien conocido que los fármacos o los antígenos proteicos adolecen de un problema de desnaturalización provocada por el calor, los disolventes orgánicos y/o un pH desfavorable (Weiqi Lu y col., PDA J. Pharm. Sci. Tech., 49, 13 - 19 (1995)). Habitualmente son administrados mediante inyección; sin embargo, debido a que sus actividades *in vivo* sólo duran un corto periodo de tiempo después de su administración, deben ser administrados repetidamente cuando se requiere un tratamiento a largo plazo. Por ejemplo, para tratar el enanismo infantil por déficit hipofisario, debe inyectarse la hormona de crecimiento humana (hGH) diariamente o cada dos días durante un periodo de 6 meses o más. Por lo tanto, se han realizado muchos esfuerzos para desarrollar formulaciones eficaces de liberación sostenida de fármacos o de antígenos proteicos .

15 Por ejemplo, se han realizado amplios estudios para desarrollar una formulación de micropartículas de acción sostenida preparada mediante el recubrimiento de un fármaco o de un antígeno proteico con un polímero sintético biodegradable, por ejemplo, polilactida, poliglicólido, poli(lactida-co-glicólido), poli-orto-éster o polianhídrido, que libera de forma continua el fármaco o el antígeno según se degrada el polímero en el cuerpo (M. Chasin y R. Langer, ed., Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems, Marcel Dekker (1990); y Heller, J., Adv. Drug Del. Rev., 10, 20 163 (1993)). Aunque este tipo de formulación tiene varias ventajas, adolece del grave problema de que el fármaco o el antígeno experimentan una desnaturalización tras su contacto con un disolvente orgánico durante el proceso de preparación del mismo (Park, T. G. y col., J. Control. Rel., 33, 211 - 223 (1995)). El uso de un disolvente orgánico es imprescindible debido a que el polímero biodegradable sólo se disuelve en un disolvente orgánico, por ejemplo, cloruro de metileno, acetato de etilo, acetonitrilo, cloroformo o acetona.

25 Con objeto de evitar dicho contacto indeseable de un fármaco o de un antígeno con un disolvente orgánico, Lee y col. han preparado una micropartícula mediante el recubrimiento de un antígeno con un polímero soluble en agua para obtener una partícula primaria; dispersando la partícula primaria en un disolvente orgánico que contiene un polímero biodegradable; y secando la dispersión resultante para obtener una micropartícula final (Lee, H. K. y col., J. Control. Rel., 44, 283 - 294 (1997); y la Patente de EE.UU. N° 5.753.234). Sin embargo, el proceso de preparación de dicha micropartícula es complicado y no es rentable.

30 También se han realizado intentos de desarrollar una formulación de liberación sostenida que contenga un polímero natural, por ejemplo, gelatina, colágeno, quitosán, carboximetil celulosa, alginato o ácido hialurónico. El polímero natural absorbe agua fácilmente para formar un gel con una elevada viscosidad que libera lentamente un fármaco o un antígeno. Por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 5.416.017 desvela una formulación de liberación sostenida para inyección de eritropoyetina que contiene entre un 0,01 y un 3 % de gel de ácido hialurónico; la Patente Japonesa abierta a consulta por el público N° 1-287041 (1989), una formulación de liberación sostenida para inyección de insulina que contiene un 1 % de un gel de ácido hialurónico; la Patente Japonesa abierta a consulta por el público N° 2 - 213 (1990), una formulación de liberación sostenida de calcitonina o de hormona de crecimiento humana que contiene un 5 % de gel de ácido hialurónico; y Meyer, J. y col. (J. Controlled Rel., 35, 67 (1995)), una formulación de liberación sostenida de factor estimulante de las colonias de granulocitos (G-CSF) que contiene entre un 0,5 y un 4 % de gel de ácido hialurónico.

35 Dichas formulaciones en gel de ácido hialurónico tienen un efecto de liberación sostenida debido a que los fármacos proteicos pasan lentamente a través de la matriz de gel con una elevada viscosidad. Sin embargo, un gel con una concentración de ácido hialurónico de varios % tiene una elevada viscosidad, por ejemplo, del orden de  $10^5$  a  $10^7$  centipoises, lo que hace difícil la inyección del mismo. Además, dado que tanto el fármaco como el ácido hialurónico se disuelven en agua, una formulación de hialurónico que es fácilmente diluida por los fluidos corporales tras la inyección, con una subsiguiente rápida liberación del fármaco, habitualmente en un día. Por ejemplo, la Patente Japonesa abierta a consulta por el público N° 1-287041 (1989) desvela que cuando se inyectó una formulación al 1 % de gel de ácido hialurónico que contiene insulina a un conejo, el efecto de disminución del nivel sanguíneo de glucosa era sostenido únicamente durante 24 horas; y Meyer, J. y col. (*vide supra*) y la Patente de EE.UU. N° 50 5.416.017, que cuando se administran a un animal una formulación al 2 % de gel de ácido hialurónico que contiene G-CSF y una formulación al 1,5 % de gel de ácido hialurónico que contiene interferón- $\alpha$  junto con proteína sérica, los niveles sanguíneos de estos fármacos proteicos caen repentinamente hasta por debajo de 1/10 de los niveles iniciales en 24 horas.

55 El hialuronato de bencilo (HYAFF™, Fidia S.P.A.), un éster sintético preparado mediante la esterificación del ácido hialurónico natural con alcohol bencílico, no se disuelve en agua sino en un disolvente orgánico tal como dimetilsulfóxido (DMSO). Se ha preparado una formulación de micropartículas de hialuronato de bencilo sólido que contiene un fármaco proteico mediante el método de emulsión-extracción con disolvente (Nightlinger, N.S. y col.,

5 Proceed. Intern. Sump. Control Rel. Bioact. Mater., 22º, artículo N° 3205 (1995); y Iium, L. y col., J. Controlled Rel., 29, 133 (1994)), que se lleva a cabo mediante la disolución del hialuronato de bencilo en DMSO; la dispersión del fármaco proteico en la disolución resultante; la adición de la dispersión resultante a un aceite mineral para formar una emulsión; y la adición de un disolvente que es miscible con el DMSO, por ejemplo, acetato de etilo, a la emulsión para extraer el DMSO de la misma, para obtener micropartículas sólidas que comprenden el fármaco proteico e hialuronato de bencilo.

10 Sin embargo, la formulación de hialuronato de bencilo tiene el inconveniente de que el fármaco proteico puede ser fácilmente desnaturalizado por el disolvente orgánico usado en la etapa preparativa, y también por el propio hialuronato de bencilo hidrófobo. Un ensayo de liberación *in vitro* de una micropartícula de hialuronato de bencilo que comprende factor estimulante de las colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) demostró que únicamente el 25 % del GM-CSF era liberado en los 2 días iniciales, y a continuación, ya no más GM-CSF (Nightlinger, N.S. y col., *vide supra*), lo que sugiere que la mayor parte del fármaco proteico estaba desnaturalizado.

15 Mientras tanto se realizaron varios intentos de desarrollar una formulación oral de un fármaco proteico o de un antígeno, mediante el uso, en particular, del hecho de que una micropartícula que contiene un antígeno con un tamaño de partícula de 5 µm o menos puede ser fácilmente fagocitada por un fagocito. Por lo tanto se espera que un antígeno pueda ser dirigido a una ubicación específica del cuerpo, por ejemplo, las placas de Payer del intestino delgado.

20 Sin embargo, es difícil para las células M de las placas de Peyer absorber un antígeno debido a su hidrofobicidad y elevado peso molecular. Para mejorar la absorción de un antígeno por parte de las células M, se han empleado un agente mejorador de la absorción, tal como una micela mixta de ácidos biliares - ácidos grasos, un quelante, ácidos grasos, fosfolípidos, acilcarnitina, tensioactivos, glicéridos de cadena media (Lee, V. H. L., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Systems, 5, 69 - 97 (1988); Yoshioka, S. y col., J. Pharm. Sci., 71, 593 - 597 (1982); Scott - Moncrieff, J. C. y col., J. Pharm. Sci., 83, 1465 - 1469 (1994); Muranishi, S. y col., Chem. Pharm. Bull., 25, 1159 - 1163 (1977); Fix, J. A. y col., Am. J. Physiol., 251, G332 - G340 (1986); Shao, Z. y col., Pharm. Res., 10, 143 - 250 (1993); Constantinides, P. P. y col., Proc. Int. Symp. Control. Release Bioactive Mater., 20, 184 - 185 (1993); y Bjork, E. y col., J. Drug Targeting, 2, 501 - 507 (1995)). Además, se ha informado de que cuando una micropartícula preparada mediante la encapsulación de albúmina sérica bovina en un liposoma de lecitina - colesterol es administrada por vía oral a un animal, se incrementa la respuesta de la IgA en las glándulas salivares (Genco, R. y col., Ann. N. Y. Acad. Sci., 409, 650 - 667 (1983)).

30 Sin embargo, la única formulación de vacuna oral eficaz que se ha desarrollado con éxito es una vacuna contra la polio para la que existe un receptor en el intestino, y la micropartícula en liposomas tiene un problema de inestabilidad estructural.

35 El documento DE 41 07 153 A1 desvela vesículas lipídicas formadas por una o varias capas de moléculas anfífilas para el transporte de principios activos a través de barreras naturales tales como la piel, que comprenden un agente tensioactivo. La molécula anfífila es un líquido, mientras que la sustancia tensioactiva es un ténrido.

El documento WO 98/43664 se refiere a formulaciones de liberación sostenida de fármacos que comprenden micropartículas formadas por ácido hialurónico. Encerrado en las micropartículas desveladas hay un fármaco proteico o lipídico. La partícula tiene un tamaño medio de entre 0,1 y 40 µm.

40 El documento EP 0 485 143 A1 describe la incorporación de la forma natural de la L-asparaginasa, de una forma hidrofobizada de la L-asparaginasa, o de ambas simultáneamente, en liposomas. Las estructuras liposomales que contienen la enzima se preparan a partir de lípidos y, de acuerdo con la desvelación, tienen un diámetro de preferiblemente entre 100 y 200 nm.

45 El documento WO 98/29099 hace uso de liposomas para la administración mucosal de sustancias a mamíferos. Los liposomas comprenden un polímero natural reticulado, tal como un oligosacárido. El polímero natural reticulado está recubierto por un compuesto anfífilo (por ejemplo, un fosfolípido). Las partículas finales tienen preferiblemente un tamaño que varía entre 20 y 100 nm.

50 En el documento WO 98/13024 se describen mezclas de liposomas con ácidos hialurónicos. La divulgación busca proporcionar un procedimiento para la administración del fármaco lipófilo Ciclosporina A (CsA). Por lo tanto, el documento desvela la encapsulación de la CsA en liposomas para recuperar una composición de liposoma / CsA que permite combinar la CsA con la sustancia hidrófoba ácido hialurónico, para formar una composición farmacéutica.

### **Sumario de la invención**

Consecuentemente, es un objeto de la presente invención proporcionar una micropartícula con una estabilidad mejorada y una administración eficaz de un fármaco proteico o de un antígeno.

55 Es otro objeto de la presente invención proporcionar una formulación de liberación sostenida que comprende dicha micropartícula.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona una micropartícula lipófila de acuerdo con la reivindicación independiente 1. Las formas de realización y los aspectos preferidos de la invención se describen en las reivindicaciones siguientes 2 - 19.

### **Breve descripción de los dibujos**

5 Los anteriores objetos y características de la presente invención serán apreciables en la siguiente descripción de las formas de realización preferidas, tomadas con los dibujos anexos, en los que:

la Fig. 1 muestra los perfiles de liberación *in vitro* de las Micropartículas 11, 12 y 13;

las Figs. 2A y 2B reproducen los escáneres de RP HPLC de la disolución del extracto de la Micropartícula 12 obtenida en el Ejemplo de Ensayo 3 y una disolución acuosa estándar de hGH, respectivamente; y

10 las Figs. 3A y 3B ilustran los escáneres de SEC de la disolución del extracto de la Micropartícula 12 obtenida en el Ejemplo de Ensayo 3 y una disolución acuosa estándar de hGH, respectivamente.

### **Descripción detallada de la invención**

La micropartícula sólida lipófila de la presente invención comprende una sustancia lipófila y un principio activo.

El principio activo que se usa en la presente invención es un fármaco proteico, un fármaco peptídico o un antígeno.

15 Algunos fármacos proteicos o peptídicos representativos incluyen la hormona de crecimiento humana, la hormona de crecimiento bovina, la hormona de crecimiento porcina, la hormona liberadora de la hormona de crecimiento, el péptido liberador de la hormona de crecimiento, el factor estimulante de las colonias de granulocitos, el factor estimulante de las colonias de macrófagos, el factor estimulante de las colonias de macrófagos, eritropoyetina, la proteína morfogenética ósea, interferón, insulina, atriopeptina-III, un anticuerpo monoclonal, el  
20 factor de necrosis tumoral, el factor activador de los macrófagos, interleucina, el factor de degeneración tumoral, el factor de crecimiento insulinoide, el factor de crecimiento epidérmico, el activador del tisular plasminógeno y la urocinasa, pero estos no limitan los fármacos proteicos o peptídicos que pueden usarse en la presente invención.

Algunos antígenos representativos incluyen aquellos obtenidos a partir de: uno o más patógenos elegidos de entre el grupo que consiste en adenovirus de tipo 4 y 7, el virus de la hepatitis A, el virus de la hepatitis B, el virus de la hepatitis C, el virus de la gripe A y B, el virus de la encefalitis japonesa B, el virus del sarampión, el virus de las paperas, el virus de la rubéola, el virus de la polio, el virus de la rabia, el virus de la varicela, el virus de la fiebre amarilla y el virus de la inmunodeficiencia humana; uno o más patógenos elegidos de entre el grupo que consiste en  
25 *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi*, *Escherichia coli* enterotoxigénica, *Haemophilus influenza* de tipo b, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria meningitidis* A y C, *Neisseria meningitidis* B, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas cepacia*, *Salmonella typhi*, *Shigella* spp., *Streptococcus pneumoniae* y *Vibrio cholerae*; uno o más patógenos elegidos de entre el grupo que consiste en *Coccidioides immitis*, *Leishmania* sp. y *Plasmodium* sp.; uno o más patógenos responsables de las enfermedades elegidas de entre el grupo que consiste en carbunco sintomático bovino, fiebre epidémica bovina, carbunco bovino, enfermedad de Akabane bovina, fiebre aftosa bovina, mamitis bovina, inflamación nasotraqueal infecciosa bovina, diarrea vírica bovina,  
35 gastroenteritis infecciosa bovina, cólera porcina, diarrea epidémica porcina, gastritis atrófica porcina, enfermedad porcina causada por parvovirus, enteritis porcina causada por rotavirus, enfermedad de Newcastle en pollos, enfermedad de Marek en pollos, encefalomielitis en pollos, rabia, moquillos canino, enteritis canina causada por parvovirus y hepatitis infecciosa canina, siendo el antígeno un antígeno atenuado, inactivado o recombinante; o ADN, ARN, plásmido, ADN u oligonucleótido de CpG extraído a partir del patógeno, pero estos no limitan el antígeno  
40 que pueden usarse en la presente invención.

La sustancia lipófila que puede usarse en la presente invención incluye un lípido y sus derivados, un ácido graso y sus derivados, una cera y una mezcla de los mismos. Algunos lípidos representativos incluyen lecitina, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol. Algunos derivados representativos de lípidos incluyen araquidoil fosfatidilcolina y estearoil fosfatidilcolina. Algunos ácidos grasos representativos incluyen ácido  
45 mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico y sales de los mismos. Algunos derivados representativos de ácidos grasos incluyen estearato de glicerilo, palmitato de sorbitano, estearato de sorbitano, monooleato y polisorbato de sorbitano. Algunas ceras representativas incluyen una cera emulsionante aniónica, cera de carnaúba y cera microcristalina. De entre éstas, se prefieren las sustancias lipófilas tensioactivas tales como lecitina, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina.

50 La micropartícula lipófila de la presente invención comprende entre el 0,001 y el 99 % en peso, preferiblemente entre el 0,1 y el 10 % en peso, de un principio activo, y entre el 1 y el 99,999 % en peso, preferiblemente entre el 5 y el 50 % en peso, de una sustancia lipófila, basados en el peso de la micropartícula.

Además del principio activo, la micropartícula de la presente invención comprende adicionalmente ácido hialurónico o una sal inorgánica del mismo. Algunas sales inorgánicas de ácido hialurónico representativas incluyen hialuronato  
55 de sodio, hialuronato de potasio, hialuronato de amonio, hialuronato de calcio, hialuronato de magnesio, hialuronato de cinc e hialuronato de cobalto. El ácido hialurónico o su sal inorgánica puede usarse en una cantidad que varía

entre el 0,1 y el 99 % en peso basado en el peso de la micropartícula.

La micropartícula de la presente invención puede comprender adicionalmente un excipiente soluble en agua con el fin de estabilizar el principio activo. El excipiente soluble en agua que puede usarse en la presente invención incluye un carbohidrato tal como hidroxipropil celulosa, carboximetil celulosa, carboximetil celulosa de sodio, chitosan, alginato, glucosa, xilosa, galactosa, fructosa, maltosa, sacarosa, dextrano y sulfato de condroitina; una proteína tal como albúmina y gelatina; un aminoácido tal como glicina, alanina, ácido glutámico, arginina, lisina y una sal de los mismos; un ácido graso tal como ácido esteárico; una sal inorgánica tal como fosfato; un tensioactivo tal como Tween® (ICI) polietilenglicol y una mezcla de los mismos. El excipiente soluble en agua puede usarse en una cantidad que varía entre el 0,001 y el 99 % en peso, preferiblemente entre el 0,1 y el 50 % en peso basado en la cantidad de la micropartícula.

La micropartícula lipófila de la presente invención puede prepararse mediante el recubrimiento de una partícula sólida que contiene un principio activo con una sustancia lipófila de acuerdo con uno cualquiera de los siguientes procedimientos.

La micropartícula lipófila de la presente invención es como se indica en la reivindicación 1, es decir, se prepara mediante la disolución de un principio activo en una disolución que contiene otros componentes adicionales tales como ácido hialurónico y un excipiente soluble en agua, añadiendo una sustancia lipófila tensioactiva tal como lecitina a la misma para permitir que la sustancia lipófila tensioactiva se hidrate, y secar por pulverización la disolución resultante. En la etapa de secado por pulverización, la sustancia lipófila tensioactiva migra a la superficie de las gotitas y recubre las partículas que contienen el principio activo.

La micropartícula inventiva así preparada tiene un tamaño medio de partícula que varía entre 0,1 y 200  $\mu\text{m}$ , preferiblemente entre 1 y 50  $\mu\text{m}$ , más preferiblemente entre 1 y 10  $\mu\text{m}$ .

La micropartícula inventiva que contiene un principio activo tiene varias ventajas: (1) el principio activo no se desnaturaliza y conserva su actividad completa; (2) libera completamente el principio activo durante un periodo de tiempo prolongado; (3) se dispersa fácilmente en un medio lipófilo tal como un aceite, y la dispersión así obtenida tiene una viscosidad baja y conserva la actividad completa del principio activo; (4) se fusiona fácilmente con la membrana fosfolipídica del cuerpo para transportar eficazmente el principio activo en el cuerpo; (5) cuando se administra por vía oral, puede ser translocada a las células M de las placas de Payer del intestino delgado.

La micropartícula de la presente invención puede formularse en las formas de dispersión, de emulsión y de aerosol.

Por lo tanto, la presente invención también proporciona una formulación en dispersión preparada mediante la dispersión de las micropartículas lipófilas inventivas en un medio lipófilo. El medio lipófilo que puede usarse en la presente invención incluye un aceite comestible, un aceite mineral, escualeno, escualano, aceite de hígado de bacalao, mono, di o triglicéridos, y una mezcla de los mismos. Algunos aceites comestibles representativos incluyen aceite de maíz, aceite de oliva, aceite de soja, aceite de cártamo, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, aceite de girasol y una mezcla de los mismos. El medio lipófilo puede comprender adicionalmente un agente dispersante o un conservante. La formulación en dispersión puede usarse para inyección o para su administración oral.

La presente invención también proporciona una formulación en emulsión de aceite en agua que comprende un medio acuoso para inyección y la formulación dispersante. El medio acuoso para inyección incluye agua destilada y una disolución tamponada. En la formulación en emulsión, las micropartículas lipófilas están recubiertas con un aceite y permanecen en la fase oleosa, mejorando la formación y la estabilización de la emulsión de agua en aceite. La formulación en emulsión puede usarse para inyección.

La formulación en emulsión, cuando el principio activo es un antígeno, puede comprender adicionalmente otro antígeno en el medio de inyección acuoso, proporcionando así una formulación de vacuna mixta. Por ejemplo, puede mezclarse una formulación en dispersión que comprende micropartículas del antígeno superficial de la hepatitis B (HBsAg) dispersado en un aceite comestible, con una vacuna de DTP que contiene el antígeno DTP adsorbido en alumbre en una disolución acuosa, para obtener una formulación en emulsión de aceite en agua. La formulación en emulsión así obtenida está formada por una fase acuosa que contiene el antígeno DTP adsorbido en alumbre y una fase oleosa que contiene micropartículas sólidas de HBsAg. En esta formulación en emulsión, el antígeno HBsAg y el DTP están presentes por separado en la fase acuosa y en la fase oleosa, respectivamente, evitando así interacciones indeseables entre el antígeno HBsAg y el DTP. Por el contrario, se sabe que una formulación de vacuna mixta preparada mediante la adsorción de varios antígenos en alumbre adolece de un bajo efecto de vacunación debido a interacciones indeseables entre los antígenos.

La presente invención también proporciona una formulación en aerosol que comprende la micropartícula inventiva. La formulación en aerosol puede prepararse de acuerdo con un procedimiento convencional mediante el uso de un excipiente convencional. La formulación en aerosol puede administrarse por vía nasal o a través de la membrana mucosa bronquial.

Los siguientes Ejemplos pretenden ilustrar adicionalmente la presente invención sin limitar su ámbito. Además, los

porcentajes dados a continuación para la mezcla de sólido en sólido, de líquido en líquido, y de sólido en líquido son sobre una base de p/p, vol/vol y p/vol, respectivamente, salvo que específicamente se indique de otro modo.

Se presentan con fines comparativos algunos Ejemplos que no entran en el ámbito de las presentes reivindicaciones.

5 **Ejemplo 1:** preparación de Micropartículas Lipófilas

Se añadió lecitina a una disolución tamponada de fosfato 10 mM (PBS) a una concentración del 2 % (p/v) y se hidrató concienzudamente. A la misma se añadió el antígeno de superficie de la hepatitis B recombinante (HBsAg, LG chemical Ltd.) hasta una concentración de 0,5 mg/ml y la disolución resultante fue suministrada a un secador por pulverización (Buchi 191) a un caudal de 0,55 ml/minuto para obtener micropartículas sólidas (Micropartícula 1). En esta etapa, la temperatura del aire entrante era de 70 °C y la temperatura del aire saliente, de 50 °C. El tamaño de partícula de las micropartículas así obtenidas estaba en el intervalo de 0,1 a 5 µm.

**Ejemplo 2:** preparación de Micropartículas Lipófilas

Se disolvió el HBsAg recombinante en PBS 10 mM hasta una concentración de 0,5 mg/ml y se añadió carboximetil celulosa al mismo hasta una concentración del 3 % (p/v). La disolución resultante fue suministrada a un secador por pulverización (Buchi 191) a un caudal de 0,55 ml/minuto para obtener partículas primarias. En esta etapa, la temperatura del aire entrante era de 70 °C y la temperatura del aire saliente, de 50 °C.

Se preparó una disolución al 5 % (p/v) de lecitina en etanol y las partículas primarias se dispersaron en la misma a una concentración del 5 % (p/v). La dispersión resultante fue suministrada a un secador por pulverización (Buchi 191) a un caudal de 1,0 ml/minuto para obtener micropartículas sólidas (Micropartícula 2). En esta etapa, la temperatura del aire entrante era de 85 °C y la temperatura del aire saliente, de 50 °C. El tamaño de partícula de las micropartículas así obtenidas estaba en el intervalo de 0,1 a 5 µm.

**Ejemplo 3:** preparación de Micropartículas Lipófilas

Se disolvió carboximetil celulosa en PBS 10 mM hasta una concentración de un 3 % (p/v). Se añadió lecitina a la misma hasta una concentración del 2 % (p/v) y se hidrató concienzudamente. Entonces se añadió el HBsAg recombinante a la misma a una concentración de 0,5 mg/ml. La disolución resultante fue suministrada a un secador por pulverización (Buchi 191) a un caudal de 0,55 ml/minuto para obtener micropartículas sólidas (Micropartícula 3). En esta etapa, la temperatura del aire entrante era de 70 °C y la temperatura del aire saliente, de 50 °C. El tamaño de partícula de las micropartículas así obtenidas estaba en el intervalo de 0,1 a 5 µm.

**Ejemplos 4 a 9:** preparación de Micropartículas Lipófilas

30 Se repitió el procedimiento del Ejemplo 3 mediante el uso de varios ingredientes indicados en la Tabla I para obtener varias micropartículas sólidas (Micropartículas 4 a 9).

Tabla I

Micropartícula N°	Principio activo	Excipiente soluble en agua	Sustancia lipófila	Tamaño de partícula (µm)
1	0,5 mg/ml < HBsAg	-	2 % (p/v) de lecitina	0,1 - 5
2	0,5 mg/ml < HBsAg	3 % (p/v) de carboximetil celulosa	5 % (p/v) de lecitina	0,1 - 5
3	0,5 mg/ml < HBsAg	3 % (p/v) de carboximetil celulosa	2 % (p/v) de lecitina	0,1 - 5
4	0,5 mg/ml < HBsAg	3 % (p/v) de carboximetil celulosa	1 % (p/v) de lecitina	0,1 - 5
5	0,5 mg/ml < HBsAg	3 % (p/v) de carboximetil celulosa	0,5 % (p/v) de lecitina	0,1 - 5
6	0,5 mg/ml < HBsAg	3 % (p/v) de carboximetil celulosa	2 % (p/v) de lecitina	0,1 - 5
7	0,5 mg/ml < HBsAg	3 % (p/v) de gelatina	2 % (p/v) de lecitina	0,1 - 5
8	0,5 mg/ml < HBpreS2Ag <sup>1)</sup>	3 % (p/v) de carboximetil celulosa	2 % (p/v) de lecitina	0,1 - 5
9	2,16 mg/ml < SEC-SER <sup>2)</sup>	3 % (p/v) de carboximetil celulosa	2 % (p/v) de lecitina	0,1 - 5

- 1) Antígeno de la Hepatitis B preS2
- 2) Proteína mutante C1 de la enterotoxina estafilocócica (LG Chemical Ltd.) (usada en una cantidad tal que la concentración de la proteína resulta del 6 % en peso basado en el peso total de los ingredientes)

**Ejemplo 10:** preparación de Micropartículas Lipófilas

5 Se disolvió carboximetil celulosa en PBS 10 mM hasta una concentración de un 3 % (p/v), la disolución resultante se filtró y se esterilizó. Se añadió lecitina a la misma hasta una concentración de un 2 % (p/v) y se hidrató concienzudamente. Se disolvió un extracto de ADN de *E. coli* en PBS 10 mM en una cantidad de 1 mg/ml, y esta disolución se añadió a la mezcla anterior hasta una concentración de un 6 % en peso basada en el peso total de la mezcla, seguido de una mezcla mediante el uso de un agitador magnético. La suspensión resultante fue suministrada a un secador por pulverización (Buchi 191) a un caudal de 0,55 ml/minuto para obtener micropartículas sólidas (Micropartícula 10). En esta etapa, la temperatura del aire entrante era de 70 °C y la temperatura del aire saliente, de 50 °C. El tamaño de partícula de las micropartículas así obtenidas estaba en el intervalo de 0,2 a 3 µm.

**Ejemplo 11:** preparación de Micropartículas Lipófilas

15 Se disolvió hormona del crecimiento humana (hGH) en PBS 5 mM hasta una concentración de 2 mg/ml y después se añadió a la misma Tween 80 en una cantidad del 0,01 % en peso basada en el peso del PBS. En la misma se disolvió hialuronato sódico con un peso molecular de 1.000.000 hasta una concentración de un 0,2 % (p/v). La disolución resultante fue suministrada a un secador por pulverización (Buchi 190) a un caudal de 3 ml/minuto para obtener partículas primarias. En esta etapa, la temperatura del aire entrante era de 85 °C. El tamaño medio de partícula de las partículas primarias así obtenidas era de 3 µm.

20 Se disolvió lecitina en etanol hasta una concentración de un 1 % (p/v) y después las partículas primarias se suspendieron en la misma a una concentración del 1 % (p/v). La suspensión resultante fue suministrada a un secador por pulverización (Buchi 190) para obtener micropartículas (Micropartícula 11). El tamaño medio de partícula de las micropartículas así obtenidas era de 7 µm.

**Ejemplos 12 a 24:** preparación de Micropartículas Lipófilas

Se repitió el procedimiento del Ejemplo 11 mediante el uso de varios ingredientes indicados en la Tabla II para obtener varias micropartículas sólidas (Micropartículas 12 a 24).

Tabla II

Micropartícula N°	Partícula primaria					Micropartícula			
	Principio activo	Excipiente soluble en agua	Hialuronato sódico (% (p/v) / PM)	Temperatura del aire entrante (°C)	Tamaño medio de partícula (µm)	Partícula primaria (% (p/v))	Sustancia lipófila	Disolvente	Tamaño medio de partícula (µm)
11	2 mg/ml de hGH	0,01 % en peso de Tween 80	0,2 % (p/v) / PM: 1,000.000	85	3	1	1 % (p/v) de lecitina	Etanol	7
12	1 mg/ml de hGH	0,01 % en peso de Tween 80	0,1 % (p/v) / PM: 2,000.000	85	2	1	1 % (p/v) de lecitina	Etanol	5
13	0,1 mg/ml de hGH	0,01 % en peso de Tween 80	0,09 % (p/v) / PM: 2,000.000	85	2	1	1 % (p/v) de lecitina	Etanol	5
14	2 mg/ml de bST <sup>e</sup>	0,01 % en peso de Tween 80	0,2 % (p/v) / PM: 2,000.000	85	3	2	1 % (p/v) de lecitina	Etanol	7
15	2 mg/ml de pST <sup>b</sup>	0,01 % en peso de Tween 80	0,2 % (p/v) / PM: 2,000.000	85	3	1	1 % (p/v) de lecitina	Etanol	7
16	0,4 mg/ml de GM-CSF <sup>c</sup>	0,01 % en peso de Tween 80	0,16 % (p/v) / PM: 2,000.000	85	3	1	1 % (p/v) de lecitina	Etanol	7
17	1.000 UI/ml de EPO	0,01 % en peso de Tween 80, & 0,5 mg/ml de albúmina sérica	0,25 % (p/v) / PM: 2,000.000	85	3,5	1	1 % (p/v) de lecitina	Etanol	7
18	200.000 UI/ml de Interferón-α	0,01 % en peso de Tween 80, 0,2 mg/ml de D-manitol & 0,2 mg/ml de albúmina sérica	0,25 % (p/v) / PM: 2,000.000	105	3,5	1	1 % (p/v) de lecitina	Etanol	7
19	200.000 UI/ml de Interferón-γ	0,01 % en peso de Tween 80, 0,2 mg/ml de Glicina, & 0,2 mg/ml de albúmina sérica	0,25 % (p/v) / PM: 2,000.000	105	3,5	1	1 % (p/v) de lecitina	Etanol	7
20	20 UI/ml de insulina	0,01 % en peso de Tween 80	0,2 % (p/v) / PM: 2,000.000	85	3	1	1 % (p/v) de lecitina	Etanol	7



(continuación)

Micropartícula N°	Partícula primaria					Micropartícula			
	Principio activo	Excipiente soluble en agua	Hialuronato sódico (% (p/v) / PM)	Temperatura del aire entrante (°C)	Tamaño medio de partícula (µm)	Partícula primaria (% (p/v))	Sustancia lipófila	Disolvente	Tamaño medio de partícula (µm)
21	2 mg/ml de IGF-1 <sup>e)</sup>	0,01 % en peso de Tween 80	0,2 % (p/v) / PM: 2,000.000	85	3	1	1 % (p/v) de lecitina	Etanol	7
22	1 mg/ml de hGH	0,01 % en peso de Tween 80	0,1 % (p/v) / PM: 2,000.000	85	2	1	0,5 % (p/v) de ácido esteárico	Cloruro de metileno	6
23	1 mg/ml de hGH	0,01 % en peso de Tween 80	0,1 % (p/v) / PM: 2,000.000	85	2	1	0,5 % (p/v) de monoestearato de sorbitano	Alcohol isopropílico	7
24	1 mg/ml de hGH	0,01 % en peso de Tween 80	0,1 % (p/v) / PM: 2,000.000	85	2	1	0,5 % (p/v) de monoestearato de glicerilo	Cloruro de etileno	7

a) somatotropina bovina  
b) somatotropina porcina  
c) factor estimulante de las colonias de granulocitos y macrófagos  
d) eritropoyetina  
e) factor de crecimiento insulinoide-I

**Ejemplo 25:** preparación de Formulaciones en Dispersión de Aceite de Semilla de Algodón de la Micropartícula 3

Se añadió la Micropartícula 3 preparada en el Ejemplo 3 a aceite de semilla de algodón y se dispersó mediante el uso de un agitador magnético para obtener cinco dispersiones de aceite de semilla de algodón que contienen 20, 50, 100, 200 y 500 mg/ml de la Micropartícula 3, respectivamente.

5 **Ejemplo 26:** preparación de Formulaciones en Dispersión de Aceite Comestible de la Micropartícula 3

Se repitió el procedimiento del Ejemplo 25 mediante el uso de aceite de soja, de aceite de maíz y de aceite de sésamo, respectivamente, para obtener dispersiones de aceite de soja, de aceite de maíz y de aceite de sésamo que contienen cada una 100 mg/ml de la Micropartícula 3.

**Ejemplo 27:** preparación de Formulaciones en Dispersión de Aceite Comestible de la Micropartícula 8

10 Se repitió el procedimiento del Ejemplo 25 mediante el uso de la Micropartícula 8 para obtener dispersiones de aceite de semilla de algodón, de aceite de soja, de aceite de maíz y de aceite de sésamo que contienen cada una 100 mg/ml de la Micropartícula 8.

**Ejemplo 28:** preparación de Formulaciones en Dispersión de Aceite Comestible de la Micropartícula 9

15 Se repitió el procedimiento del Ejemplo 25 mediante el uso de la Micropartícula 9 para obtener dispersiones de aceite de semilla de algodón, de aceite de soja, de aceite de maíz y de aceite de sésamo que contienen cada una 100 mg/ml de la Micropartícula 9.

**Ejemplo 29:** preparación de Formulaciones en Dispersión de Aceite Comestible de la Micropartícula 10

20 Se repitió el procedimiento del Ejemplo 25 mediante el uso de la Micropartícula 10 para obtener dispersiones de aceite de semilla de algodón, de aceite de soja, de aceite de maíz y de aceite de sésamo que contienen cada una 100 mg/ml de la Micropartícula 10.

**Ejemplo 30:** preparación de Formulaciones en Dispersión de Aceite de Semilla de Algodón de la Micropartícula 12

Se repitió el procedimiento del Ejemplo 25 mediante el uso de la Micropartícula 12 para obtener cinco dispersiones de aceite de semilla de algodón que contienen cada una 50, 100, 200, 360 y 500 mg/ml de la Micropartícula 12, respectivamente.

25 **Ejemplo 31:** preparación de Formulaciones en Dispersión de Aceite Comestible de la Micropartícula 12

Se repitió el procedimiento del Ejemplo 25 mediante el uso de la Micropartícula 12 para obtener dispersiones de aceite de soja, de aceite de maíz y de aceite de sésamo que contienen cada una 100 mg/ml de la Micropartícula 12.

**Ejemplo 32:** preparación de Formulaciones en Dispersión de Aceite Comestible de la Micropartícula 14

30 Se repitió el procedimiento del Ejemplo 25 mediante el uso de la Micropartícula 14 para obtener dispersiones de aceite de semilla de algodón, de aceite de soja, de aceite de maíz y de aceite de sésamo que contienen cada una 360 mg/ml de la Micropartícula 14.

**Ejemplo 33:** preparación de Formulaciones en Dispersión de Aceite Comestible de la Micropartícula 15

35 Se repitió el procedimiento del Ejemplo 25 mediante el uso de la Micropartícula 15 para obtener dispersiones de aceite de semilla de algodón, de aceite de soja, de aceite de maíz y de aceite de sésamo que contienen cada una 360 mg/ml de la Micropartícula 15.

**Ejemplo 34:** preparación de Formulaciones en Dispersión de Aceite Comestible de la Micropartícula 18

Se repitió el procedimiento del Ejemplo 25 mediante el uso de la Micropartícula 18 para obtener dispersiones de aceite de semilla de algodón, de aceite de soja, de aceite de maíz y de aceite de sésamo que contienen cada una 360 mg/ml de la Micropartícula 18.

40 **Ejemplo 35:** preparación de Formulaciones en Emulsión de la Micropartícula 3

Cada una de las dispersiones de aceite de soja, de aceite de maíz y de aceite de sésamo obtenidas en el Ejemplo 26 se añadió a un volumen de 4 veces de una disolución de NaCl al 0,9 % para obtener una mezcla de aceite y agua (1:4) que contiene 20 mg/ml de la Micropartícula 3. La mezcla resultante se mezcló para obtener una emulsión de aceite en agua homogénea de color blanco opaco.

45 **Ejemplo 36:** preparación de Formulaciones en Emulsión de la Micropartícula 12

Se repitió el procedimiento del Ejemplo 35 mediante el uso de las dispersiones de semilla de algodón obtenidas en el Ejemplo 30 para obtener cinco emulsiones homogéneas de aceite en agua de color blanco opaco, que contenían

respectivamente 5, 20, 50, 120 y 200 mg/ml de la Micropartícula 12, siendo las proporciones entre el aceite y el agua de las mismas de 1:9, 1:4, 1:3, 1:2 y 2:3, respectivamente.

5 En estas formulaciones en emulsión, las micropartículas sólidas estaban dispersadas en la fase oleosa, y las gotitas de aceite que contienen las micropartículas eran estables debido a la superficie lipófila de las micropartículas. Las emulsiones eran estables a la temperatura ambiente durante un periodo de más de 2 semanas.

**Ejemplo 37:** preparación de Formulaciones en Emulsión de la Micropartícula 12

Se repitió el procedimiento del Ejemplo 35 mediante el uso de las dispersiones de aceite de soja, de aceite de maíz y de aceite de sésamo obtenidas en el Ejemplo 31 para obtener formulaciones en emulsión homogéneas de aceite en agua de color blanco opaco.

10 **Ejemplo 38:** preparación de una Formulación en Emulsión de la Micropartícula 22

Se repitió el procedimiento del Ejemplo 25 mediante el uso de la Micropartícula 22 y aceite de soja para obtener una dispersión de aceite de soja que contiene 100 mg/ml de la Micropartícula 22. Usando la dispersión resultante, se repitió el procedimiento del Ejemplo 35 para obtener una formulación en emulsión homogénea de aceite en agua de color blanco opaco.

15 **Ejemplo 39:** preparación de una Formulación en Emulsión de la Micropartícula 23

Se repitió el procedimiento del Ejemplo 25 mediante el uso de la Micropartícula 23 y aceite de soja para obtener una dispersión de aceite de soja que contiene 100 mg/ml de la Micropartícula 23. Usando la dispersión resultante, se repitió el procedimiento del Ejemplo 35 para obtener una formulación en emulsión homogénea de aceite en agua de color blanco opaco.

20 **Ejemplo 40:** preparación de una Formulación en Emulsión de la Micropartícula 24

Se repitió el procedimiento del Ejemplo 25 mediante el uso de la Micropartícula 24 y aceite de soja para obtener una dispersión de aceite de soja que contiene 100 mg/ml de la Micropartícula 24. Usando la dispersión resultante, se repitió el procedimiento del Ejemplo 35 para obtener una formulación en emulsión homogénea de aceite en agua de color blanco opaco.

25 **Ejemplo 41:** preparación de Formulaciones en Emulsión de la Micropartícula 14

30 Se repitió el procedimiento del Ejemplo 35 mediante el uso de las dispersiones de aceite de semilla de algodón, de aceite de soja, de aceite de maíz y de aceite de sésamo obtenidas en el Ejemplo 32 y unos volúmenes de 2 veces de una disolución de NaCl al 0,9 % para obtener cuatro formulaciones en emulsión homogéneas de aceite en agua de color blanco opaco. Cada una de las formulaciones así obtenida contenía 120 mg/ml de la Micropartícula 14 en una mezcla de aceite y agua (1:2).

**Ejemplo 42:** preparación de Formulaciones en Emulsión de la Micropartícula 15

35 Se repitió el procedimiento del Ejemplo 35 mediante el uso de las dispersiones de aceite de semilla de algodón, de aceite de soja, de aceite de maíz y de aceite de sésamo obtenidas en el Ejemplo 33 y unos volúmenes de 2 veces de una disolución de NaCl al 0,9 % para obtener cuatro formulaciones en emulsión homogéneas de aceite en agua de color blanco opaco. Cada una de las formulaciones así obtenida contenía 120 mg/ml de la Micropartícula 15 en una mezcla de aceite y agua (1:2).

**Ejemplo 43:** preparación de Formulaciones en Emulsión de la Micropartícula 18

40 Se repitió el procedimiento del Ejemplo 35 mediante el uso de las dispersiones de aceite de semilla de algodón, de aceite de soja, de aceite de maíz y de aceite de sésamo obtenidas en el Ejemplo 34 y unos volúmenes de 2 veces de una disolución de NaCl al 0,9 % para obtener cuatro formulaciones en emulsión homogéneas de aceite en agua de color blanco opaco de la Micropartícula 18. Cada una de las formulaciones así obtenida contenía 120 mg/ml de la Micropartícula 18 en una mezcla de aceite y agua (1:2).

**Ejemplo 44:** preparación de Formulaciones en Emulsión de la Micropartícula 3

45 Se repitió el procedimiento del Ejemplo 35 excepto porque se usó alumbre en lugar de NaCl al 0,9 %, para obtener formulaciones en emulsión homogéneas de aceite en agua de color blanco opaco.

**Ejemplo Comparativo 1:** preparación de la Micropartícula comparativa 1

Se repitió el procedimiento del Ejemplo 2 sin el uso de lecitina para obtener micropartículas comparativas recubiertas sin ninguna sustancia lipófila (Micropartícula Comparativa 1).

**Ejemplo Comparativo 2:** preparación de una Formulación en Emulsión de la Micropartícula Comparativa 1

Se repitió el procedimiento del Ejemplo 25 mediante el uso de la Micropartícula Comparativa 1 y aceite de soja para obtener una dispersión de aceite de soja que contiene 100 mg/ml de la Micropartícula Comparativa 1 (Dispersión Comparativa 1), que contenía micropartículas agregadas dispersadas no homogéneamente.

**Ejemplo Comparativo 3:** preparación de una Formulación en Emulsión de la Micropartícula Comparativa 1

- 5 Se repitió el procedimiento del Ejemplo 35 mediante el uso de Dispersión Comparativa 1 y disolución salina fisiológica para inyección para obtener una formulación en emulsión (Emulsión Comparativa 1), que no era una emulsión homogénea sino que mostraba una separación con micropartículas agregadas.

**Ejemplo Comparativo 4:** preparación de la Micropartícula Comparativa 2

- 10 Se repitió el procedimiento del Ejemplo 11 mediante el uso de 1 mg/ml de hGH, un 0,1 % (p/v) de hialuronato sódico con un peso molecular de 2.000.000 para obtener micropartículas comparativas sin un recubrimiento lipófilo (Micropartícula Comparativa 2).

**Ejemplo Comparativo 5:** preparación de una Formulación en Emulsión de la Micropartícula Comparativa 2

- 15 Se repitió el procedimiento del Ejemplo 25 mediante el uso de la Micropartícula Comparativa 2 y aceite de semilla de algodón para obtener una dispersión de aceite de semilla de algodón que contiene 100 mg/ml de la Micropartícula Comparativa 2 (Dispersión Comparativa 2).

**Ejemplo Comparativo 6:** preparación de una Formulación en Emulsión de la Micropartícula Comparativa 2

Se repitió el procedimiento del Ejemplo 35 mediante el uso de la Dispersión Comparativa 2. La mezcla resultante (Emulsión Comparativa 2) no formó una emulsión homogénea, sino que mostró una separación de fases, con las micropartículas dispersadas en ambas fases de aceite y de agua.

- 20 **Ejemplo Comparativo 7:** preparación de la Micropartícula Comparativa 3

Se repitió el procedimiento del Ejemplo 11 mediante el uso de  $2 \times 10^5$  UI/ml de interferón- $\alpha$ , 0,2 mg/ml de D-manitol, 0,2 mg/ml de albúmina sérica y un 0,25 % (p/v) de hialuronato sódico con un peso molecular de 2.000.000 a una temperatura del aire entrante de 105 °C para obtener unas micropartículas comparativas sin un recubrimiento lipófilo (Micropartícula Comparativa 3) que tenían un tamaño medio de partícula de 3,5  $\mu$ m.

- 25 **Ejemplo Comparativo 8:** preparación de una Formulación en Dispersión Oleosa de la Micropartícula Comparativa 3

Se repitió el procedimiento del Ejemplo 25 mediante el uso de la Micropartícula Comparativa 3 y aceite de semilla de algodón para obtener una dispersión de aceite de semilla de algodón que contiene 100 mg/ml de la Micropartícula Comparativa 3 (Dispersión Comparativa 3).

**Ejemplo Comparativo 9:** preparación de una Formulación en Emulsión de la Micropartícula Comparativa 3

- 30 Se repitió el procedimiento del Ejemplo 35 mediante el uso de la Dispersión Comparativa 3. La mezcla resultante (Emulsión Comparativa 3) no formó una emulsión homogénea sino que mostró una separación de fases, con las micropartículas dispersadas en ambas fases de aceite y de agua.

**Ejemplo de Ensayo 1:** ensayo de estabilidad de las Micropartículas 1 y 3

- 35 Para examinar si un antígeno contenido en una micropartícula mantiene su actividad, se disolvieron cada una de las Micropartículas 1 y 3 en agua y se diluyeron con un volumen de agua de entre 1.000 y 100.000 veces, y se examinó la antigenicidad del HBsAb mediante el uso del kit AUZYME (Abbott, EE.UU.). Los resultados se muestran en la Tabla III.

Tabla III

Micropartícula N°	Antigenicidad antes de la preparación (%)	Antigenicidad Después de Preparación (%)
1	89,5	86,7
3	88,6	82,3

- 40 Como puede apreciarse en la Tabla III, la antigenicidad del HBsAg contenido en la micropartículas inventivas estaba ampliamente mantenido antes y después de la preparación. Por lo tanto, el antígeno contenido en la micropartícula de la presente invención preserva su antigenicidad.

**Ejemplo de Ensayo 2:** ensayo de liberación *in vitro* de las Micropartículas 11, 12 y 13

5 Cada una de las Micropartículas 11, 12 y 13 se dispersó en una disolución tamponada (NaCl 150 mM, fosfato 10 mM, 0,05 % de azida sódica, pH 7,4) de forma que la concentración de la hGH era de 1,0 mg/ml. Se llevó a cabo un ensayo de liberación *in vitro* agitando la dispersión resultante a 37 °C y en un momento preestablecido, la dispersión se centrifugó a 800 g durante 10 minutos y se mezcló una muestra del sobrenadante, recogida en una cantidad de 1/10 de volumen de la dispersión, con un volumen igual de la anterior disolución tamponada. La hGH contenida en el sobrenadante se cuantificó mediante el uso del método de Lowry mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

10 La Fig. 1 muestra los perfiles de liberación de las Micropartículas 11, 12 y 13 así determinados. Como puede observarse en la Fig. 1, según aumenta el peso molecular del ácido hialurónico, y según disminuye el contenido en hGH, la tasa de liberación de la hGH se hace más lenta. Por lo tanto, la tasa de liberación del fármaco proteico puede controlarse mediante el ajuste del peso molecular del ácido hialurónico y el contenido en fármaco proteico. Además, los resultados de los ensayos de liberación *in vitro* demostraron que no se produce una liberación explosiva inicial del fármaco proteico y que la tasa de liberación es constante hasta que se libera el 70 % de la proteína.

#### Ejemplo de Ensayo 3: ensayo de estabilidad de la Micropartícula 12

15 Para examinar si la hGH contenida en la Micropartícula 12 mantiene su actividad, se repitió el procedimiento del Ejemplo de Ensayo 1 y se determinó la cantidad de hGH liberada desde la Micropartícula 12 en 48 horas tanto mediante una HPLC en fase inversa (RP) como con una cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). La RP HPLC se usó para valorar el grado de desnaturalización oxidativa y desamidativa de la proteína; y la SEC, la desnaturalización de la proteína por agregación.

20 Las Figs. 2A y 2B representan los resultados de la RP HPLC para la disolución del extracto de la Micropartícula 12 y la disolución acuosa de la hGH usadas en la preparación de la Micropartícula 12, respectivamente.

Las Figs. 3A y 3B proporcionan los resultados de la SEC para la disolución del extracto de la Micropartícula 12 y la disolución acuosa de la hGH usadas en la preparación de la Micropartícula 12, respectivamente.

25 Como puede apreciarse en las Figs. 2 y 3, la cantidad de hGH liberada desde la micropartícula inventiva es idéntica a la de la disolución acuosa original de hGH acuerdo con los resultados de la RP HPLC; y los resultados de la SEC muestran que el contenido en la hGH monomérica es del 95 % o más. Estos resultados sugieren que la hGH no se desnaturaliza durante la preparación de las micropartículas inventivas.

#### Ejemplo de Ensayo 4: ensayo de liberación *in vitro* de las Micropartículas 14 a 21

30 Se repitió el procedimiento del Ejemplo de Ensayo 2 mediante el uso de cada una de las Micropartículas 14 a 21, y se determinaron las cantidades acumulativas del fármaco liberado a las 10 y a las 72 horas, así como el contenido en proteína monomérica de la muestra a las 72 horas. Los resultados se muestran en la Tabla IV.

Tabla IV

Micropartícula N°	Cantidad liberada (%) a las 10 horas	Cantidad liberada (%) a las 72 horas	Contenido en monómero (%)
14	45	92	94
15	47	87	89
16	44	89	97
17	32	76	95
18	54	92	94
19	49	88	95
20	60	95	95
21	38	93	97

35 Como puede apreciarse en la Tabla IV, las micropartículas de la presente invención liberan el fármaco proteico durante un periodo de 3 días, sin ningún signo de desnaturalización del fármaco proteico.

#### Ejemplo de Ensayo 5: ensayo de inyectabilidad 1

Para examinar si las micropartículas de la presente invención están dispersadas homogéneamente en una dispersión de aceite o en una emulsión de aceite en agua, se llevaron a cabo ensayos de inyectabilidad. La inyectabilidad se define como la fuerza necesaria para empujar una jeringa llena con una muestra de prueba a una

velocidad de 80 mm/minuto. Se usó una aguja de inyección de calibre 23. Las muestras usadas en estos ensayos eran una dispersión de alumbre preparada mediante la dilución del alumbre con PBS 20 veces; aceite de soja; la dispersión en aceite de soja del Ejemplo 26; la emulsión del Ejemplo 44, la Dispersión Comparativa 1 y la Emulsión Comparativa 1, y los resultados se muestran en la Tabla V.

5

Tabla V

Formulación	Conc. de la Micropartícula (mg/ml)	Inyectabilidad (kg <sub>f</sub> )
Dispersión de alumbre	0	0,1
Aceite de soja	0	0,5
Dispersión del Ejemplo 26	50	0,1
Emulsión del Ejemplo 44	20	0,5
Dispersión Comparativa 1	50	No inyectada
Emulsión Comparativa 1	20	No inyectada

Como puede apreciarse en la Tabla V, la dispersión del Ejemplo 26 es fácilmente inyectable, demostrando que las Micropartículas 3 de la presente invención están bien dispersadas en el aceite en comparación con la Micropartícula Comparativa 1 sin ningún recubrimiento de lecitina. Particularmente, dado que la emulsión de la presente invención tiene una inyectabilidad superior, puede usarse en la preparación de una formulación mixta.

10

#### Ejemplo de Ensayo 6: ensayo de inyectabilidad 2

Se repitió el procedimiento del Ejemplo de Ensayo 5 para una disolución acuosa de NaCl al 0,9 %, de aceite de semilla de algodón, la dispersión en aceite de semilla de algodón del Ejemplo 30, la emulsión del Ejemplo 36, la Dispersión Comparativa 2 y la Emulsión Comparativa 2, mediante el uso de una aguja de jeringa de calibre 26. Los resultados se muestran en la Tabla VI.

15

Tabla VI

Formulación	Conc. de la Micropartícula (mg/ml)	Inyectabilidad (kg <sub>f</sub> )
Disolución acuosa de NaCl al 0,9 %	0	0,1
Aceite de semilla de algodón	0	1,6
Dispersión del Ejemplo 30	100	1,7
Emulsión del Ejemplo 36	120	0,8
Dispersión Comparativa 2	100	10,5
Emulsión Comparativa 2	20	23,3

Como puede apreciarse en la Tabla VI, la Micropartícula 12 de la presente invención tiene una buena dispersibilidad en aceite de semilla de algodón debido al recubrimiento de lecitina, y la dispersión en aceite de semilla de algodón de la presente invención tiene una inyectabilidad equivalente a la del aceite de semilla de algodón. Además, la emulsión del Ejemplo 36 tenía una inyectabilidad menor que la del aceite de semilla de algodón a pesar de la elevada concentración de la Micropartícula 12.

20

Por el contrario, la Micropartícula Comparativa 2 tiene una dispersibilidad inferior en aceite de semilla de algodón debido a la ausencia de un recubrimiento lipófilo, que provoca la mala inyectabilidad de la Dispersión Comparativa 2. Además, cuando la superficie hidrófila de la Micropartícula Comparativa 2 causaba una separación de fases en la Emulsión Comparativa 2, con una consecuente filtración del componente de hialuronato sódico en la fase acuosa para aumentar la viscosidad de la capa acuosa. Por lo tanto, la Emulsión Comparativa 2 tiene una inyectabilidad incluso peor que la de la Dispersión Comparativa 2.

25

#### Ejemplo de Ensayo 7: ensayo de inyectabilidad 3

Se repitió el procedimiento del Ejemplo de Ensayo 5 para las emulsiones obtenidas en los Ejemplos 38 a 40, y aceite de soja como control. La inyectabilidad del aceite de soja era de 1,4 kg<sub>f</sub>, y las de las emulsiones obtenidas en los Ejemplos 38 a 40 estaban en el intervalo de 0,3 a 0,5 kg<sub>f</sub> similares a las de la disolución acuosa de NaCl al 0,9 %. La superficie lipófila de las micropartículas de la presente invención quedó recubierta con aceite de semilla de soja, dando como resultado una emulsión homogénea de aceite en agua que tenía una inyectabilidad equivalente a la del

30

agua.

**Ejemplo de Ensayo 8:** inyección de la Formulación a un animal

Para examinar la actividad biológica de la formulación de la presente invención en una inyección, se añadió la Micropartícula 3 a aceite de semilla de soja para preparar cuatro dispersiones con unas cargas de HBsAg recombinante de 0,5, 0,125, 0,03125 y 0,0078 µg de proteína/ml, respectivamente. Como formulación comparativa se diluyó una vacuna de la hepatitis B (LG Chemical Ltd., Corea) que contiene alumbre como coadyuvante inmune con PBS para preparar muestras con unas cargas de HBsAg de 0,5, 0,125, 0,03125 y 0,0078 µg de proteína/ml, respectivamente.

Cada muestra de dispersión se inyectó intraperitonealmente a ratones Balb/C machos de 4 semanas de edad (H-2d) (10 ratones) y se recogieron muestras sanguíneas de los mismos 4 meses después de la inyección. Se obtuvieron los sueros a partir de las muestras sanguíneas y se determinaron los títulos de anticuerpos de los mismos y la formación de anticuerpos (%) mediante el uso del kit AUSAB EIA (Abbott, EE.UU.) y se calculó la DE<sub>50</sub> (µg) de la micropartícula mediante el uso de un método estadístico (análisis probit). Los resultados se muestran en la Tabla VII.

15 Tabla VII

Dosis (mUI/ml) de la Formulación	0,5	0,125	0,0312	0,0078	DE <sub>50</sub> (µg)
Micropartícula 3	106,35	38,98	13,32	4,68	0,0121
Formulación Comparativa	12,43	6,1	4,32	3,15	0,1504

Como puede apreciarse en la Tabla VII, la micropartícula de la presente invención tiene una cantidad menor de DE<sub>50</sub> que la formulación comparativa, y un título de anticuerpos mayor que la formulación comparativa cuando se inyecta la misma cantidad de antígeno. Por lo tanto, la micropartícula de la presente invención funciona como un coadyuvante para la formación superior de anticuerpos.

**Ejemplo de Ensayo 9:** administración oral de la Formulación a un animal

Para examinar la actividad biológica de la formulación de la presente invención en una administración oral, se añadió la Micropartícula 3 a aceite de semilla de soja para preparar una dispersión con una carga de HBsAg recombinante de 5 µg de proteína/ml. Como formulación comparativa se diluyó una vacuna de la hepatitis B (LG Chemical Ltd., Corea) con PBS para obtener la misma carga de 5 µg de proteína/ml.

Cada muestra de dispersión se administró por vía oral a ratones Balb/C machos de 4 semanas de edad (H-2d) (10 ratones), y se administró dos veces más, 2 y 4 semanas después. Se tomaron muestras sanguíneas de los ratones después de 8 semanas. Se obtuvieron los sueros a partir de las muestras sanguíneas y se determinaron los títulos de anticuerpos y la formación de anticuerpos (%) mediante el uso del kit AUSAB EIA (Abbott, EE.UU.). Los resultados se muestran en la Tabla VIII

30 Tabla VIII

Formulación	Formación de anticuerpos (%)	Títulos de anticuerpos (mUI/ml)
Micropartícula 3	80	10,1
Formulación Comparativa	0	0

Como puede apreciarse en la Tabla VIII, los ratones a los que se les administró la micropartícula de la presente invención tenían una formación de anticuerpos del 80 %, mientras que los ratones a los que se les administró la formulación comparativa no formaron anticuerpos. Por lo tanto, la micropartícula de la presente invención tiene una capacidad superior para la formación de anticuerpos *in vivo* incluso cuando se administra por vía oral. Esto sugiere que la micropartícula de la presente invención puede emplearse ventajosamente en una formulación para administración oral.

**Ejemplo de Ensayo 10:** ensayo de citotoxicidad en linfocitos

Para examinar si la micropartícula de la presente invención induce una respuesta inmunitaria mediada por células, se añadió la Micropartícula 3 a un aceite de semilla de soja para obtener una dispersión con una carga de 10 µg de proteína/ml. Como formulación comparativa, se diluyó una vacuna de la hepatitis B (LG Chemical Ltd., Corea) con PBS hasta la misma carga de 10 µg de proteína/ml.

Cada formulación en dispersión se administró subcutáneamente a ratones Balb/C machos de 4 semanas de edad

(H-2d) (10 ratones), y se administró después dos veces más a intervalos de 2 meses. Semanas después de la última administración se obtuvieron linfocitos precitotóxicos (CTL) a partir de los ratones inmunizados y se cultivaron para obtener células efectoras (E). Las células E se cultivaron junto con las células objetivo (T) variando la proporción entre las células E y las células T, y después se determinó el número de células T lisadas por las células E (lisis específica (%)) como sigue.

$$\text{Lisis específica (\%)} = \frac{\text{cpm}_{\text{muestra}} - \text{cpm}_{\text{liberación natural}}}{\text{cpm}_{\text{liberación máxima}} - \text{cpm}_{\text{liberación natural}}} \times 100$$

Un valor elevado de lisis específica significa que la respuesta inmunitaria mediada por células es inducida activamente. Los resultados se muestran en la Tabla IX.

Tabla IX

E:T	20:1	5:1	1:1
Formulación			
Micropartícula 3	20 %	8 %	2 %
Formulación Comparativa	2 %	1 %	2 %

Como puede apreciarse en la Tabla IX, la micropartícula de la presente invención indujo una respuesta inmunitaria mediada por células, mientras que la formulación comparativa no lo hizo.

**Ejemplo de Ensayo 11:** ensayo con animales

Para examinar el efecto mejorador inmunitario de la micropartícula de la presente invención, se añadió la Micropartícula 9 a aceite de semilla de soja para obtener una dispersión con una carga de SEC-SER de 4,0 mg de proteína/ml. Como formulación comparativa se mezcló el antígeno SEC-SER con un coadyuvante comercial ISA de acuerdo con la guía del fabricante, y después se diluyó hasta la misma carga de 4,0 mg de proteína/ml. Como control, se dispersaron las micropartículas preparadas repitiendo el procedimiento Ejemplo 9 excepto porque se omitió el antígeno, en aceite de semilla de soja.

Cada formulación en dispersión se inyectó intramuscularmente a vacas en el 2º o el 3º periodo de lactancia (5 vacas) con un gran número de células somáticas, y se inyectó dos veces más, 2 y 4 semanas después. Se tomaron muestras sanguíneas de las vacas después de 2, 6, 10 y 14 semanas y después se determinó el título del anticuerpo. Los resultados expresados en el lector de ELISA se muestran en la Tabla X.

Tabla X

	Antes de la inyección	2 semanas	6 semanas	10 semanas	14 semanas
Formulación Comparativa	1	2,552	2,667	2,466	2,322
Micropartícula 9	1	4,472	5,123	5,911	4,522
Control	1	1,335	1,486	2,002	2,278

Como puede apreciarse en la Tabla X, la formulación de la presente invención indujo la formación de un elevado nivel de anticuerpos que se prolongó durante 14 semanas después de la primera inyección. Por lo tanto, la formulación de la presente invención puede emplearse ventajosamente como una vacuna animal.

**Ejemplo de Ensayo 12:** ensayo con animales

Se examinó el efecto de la administración de la formulación inventiva que contiene hGH mediante el uso de ratas enanas hembra de 7 semanas de edad (peso corporal: aproximado 100 g) que tienen una baja secreción hereditaria de la hormona de crecimiento.

Para el ensayo se eligieron la dispersión de los Ejemplos 30, la emulsión del Ejemplo 36, la Dispersión Comparativa 2, la Emulsión Comparativa 2 y UtroprinR (LG Chemical Ltd., Corea), una formulación acuosa, y cada una se administró a un grupo de 10 ratas enanas a una dosis de hGH de 350 µg por rata, y después se examinó la ganancia de peso. Como control se usaron ratas que no recibieron la hGH. Las ganancias de peso netas acumulativas medias se muestran en la Tabla XI.



Tabla XI

(unidad: g)						
Día	1	2	3	4	5	6
Control	0,9	2,7	3,6	4,7	6,3	7,5
Utropin®	4,7	4,2	5,3	6,4	7,1	8,5
Dispersión Comparativa 2	5,0	5,7	7,2	8,5	10,2	11,5
Emulsión Comparativa 2	4,3	4,9	3,6	5,4	6,7	7,8
Dispersión del Ejemplo 30	5,5	6,6	7,3	8,7	11,4	12,3
Emulsión del Ejemplo 36	5,3	6,8	8,1	9,2	11,3	13,0

Como puede apreciarse en la Tabla XI, el peso medio de las ratas con Utropin® aumentó el primer día, pero disminuyó el segundo día. El peso aumentó después a una tasa similar a la del grupo de control.

- 5 El peso medio de las ratas del grupo con la Dispersión Comparativa 2 aumentó de forma continua, mientras que el de las ratas del grupo con la Emulsión Comparativa 2 disminuyó el tercer día. Debido a que las micropartículas de la Emulsión Comparativa 2 tienen una superficie hidrófila, el fármaco se disuelve, y por lo tanto tiene un efecto de ganancia de peso igual al de la formulación acuosa, Utropin®.

- 10 Por el contrario, el peso medio de las ratas a las que se les administró la dispersión del Ejemplo 30 y la emulsión del Ejemplo 36 aumentó durante 6 días a unas tasas mayores que con cualquiera de la Dispersión Comparativa 2 o la Emulsión Comparativa 2.

Las micropartículas de la presente invención con recubrimientos de lecitina están recubiertas con aceite de semilla de algodón incluso después de la inyección, y sólo absorben agua lentamente, liberando así el fármaco a una tasa constante.

- 15 **Ejemplo de Ensayo 13:** ensayo con animales

La dispersión del Ejemplo 32 y la emulsión de los Ejemplos 41 se administraron cada una a ratas enanas hembra de 7 semanas de edad (peso corporal: aproximado 100 g) a una dosis de bST de 12,5 mg por rata, y después se examinaron las ganancias de peso. Como control se usaron ratas que no recibieron bST. Las ganancias de peso netas acumulativas medias se muestran en la Tabla XII.

- 20 **Tabla XII**

(unidad: g)								
Día	1	2	3	4	5	6	8	10
Control	1,4	2,9	4,6	6,1	6,5	7,2	8,8	10,4
Dispersión del Ejemplo 32	10,3	10,8	14,9	18,1	19,4	20,6	22,2	22,7
Emulsión del Ejemplo 41	9,7	11,5	14,6	17,7	19,9	20,8	22,5	22,9

- 25 Como puede apreciarse en la Tabla XII, el peso medio de las ratas a las que se les administró la dispersión del Ejemplo 32 o la emulsión del Ejemplo 41 aumentó de forma continua durante 6 días y la tasa de ganancia diaria de peso era mayor que la del grupo de control. Después de 8 días, la ganancia de peso se hizo insignificante, lo que sugiere que el tiempo de liberación del fármaco es de aproximadamente 8 días en ambos casos.

- Ejemplo de Ensayo 14:** ensayo de inhibición del efecto citopático

Se administraron cada una de la emulsión del Ejemplo 43, la Dispersión Comparativa 3, en la formulación acuosa de interferón- $\alpha$  a ratones de 5 meses de edad (peso corporal: 2,5 kg) a una dosis de interferón- $\alpha$  de 300  $\mu$ g.

- 30 Se determinaron los niveles sanguíneos del fármaco mediante el uso de un ensayo de inhibición del efecto citopático, que se llevó a cabo mediante el tratamiento de las células con interferón- $\alpha$ , la adición de un virus a las mismas y después la determinación de la inhibición de la patología celular. En el ensayo se usaron células de riñón bovino macho (MDBO CATCC CCF-22) y el virus de la estomatitis vesicular (ATCC VR 158). Se midieron los títulos de interferón- $\alpha$  en la sangre durante 5 días y los resultados se muestran en la Tabla XIII.

Tabla XIII

	7 horas	día 1	día 2	día 3	día 4	día 5
Formulación Acuosa	$1,4 \times 10^3$	$1,2 \times 10$	ND*	ND	ND	ND
Dispersión Comparativa 3	$2,1 \times 10^3$	$2,6 \times 10^3$	$9,1 \times 10^2$	$3,4 \times 10^2$	$1,7 \times 10^2$	$1,5 \times 10$
Emulsión del Ejemplo 43	$1,7 \times 10^3$	$2,2 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	$4,6 \times 10^2$	$2,8 \times 10^2$	$8,7 \times 10$
* no detectado						

5 Como puede apreciarse en la Tabla XIII, los títulos de interferón- $\alpha$  para las ratas a las que se les administró la dispersión del Ejemplo 43 fueron elevados durante el período de ensayo completo de 5 días, mostrando unos niveles mayores de interferón- $\alpha$  en comparación con el grupo de la Dispersión Comparativa 3 desde el día 2. Por lo tanto, la dispersión de la presente invención tiene unas características de liberación prolongada debido a la superficie lipófila de las micropartículas.

#### Ejemplo Comparativo de Ensayo 1

10 Se disolvió hGH en PBS 5 mM hasta una concentración de un 2,3 mg/ml y después se disolvió en la misma hialuronato sódico con un peso molecular de 2.000.000 hasta una concentración de un 2 % (p/v) para obtener una formulación de ácido hialurónico en gel.

15 Se llevó a cabo un ensayo de liberación *in vitro* mediante el uso de la formulación en gel repitiendo el procedimiento del Ejemplo de Ensayo 2. Como resultado se liberó el 100 % de la hGH en el sobrenadante en 1 hora. Por lo tanto, esta formulación en gel tiene un tiempo de liberación del fármaco que es mucho más corto que el de las micropartículas de la presente invención.

#### Ejemplo Comparativo de Ensayo 2: ensayo con animales

Se repitió el procedimiento para la preparación de una formulación en gel de ácido hialurónico en el Ejemplo Comparativo de Ensayo 1 mediante el uso de 1,5 mg/ml de hGH para obtener una formulación en gel de ácido hialurónico sin fluidez.

20 La formulación en gel así obtenida se administró a ratas enanas a una dosis de hGH de 150  $\mu$ g por rata, y después se examinó la ganancia media de peso durante 6 días. Como formulación comparativa se administró a las ratas una formulación en disolución acuosa, Utropin® a la misma dosis de hGH. Como control se usaron ratas que no recibieron la hGH. Los resultados expresados en ganancias de peso acumulativas se muestran en la Tabla XIV.

Tabla XIV

Día	1	2	3	4	5	6
Grupo						
Control	1,6	2,4	4,1	4,8	6,2	8,1
Formulación en Gel	3,2	3,6	3,0	6,1	6,7	7,7
Utropin®	3,3	2,6	4,2	6,4	7,8	8,3

25 Como puede apreciarse en la Tabla XIV, la ganancia de peso media de las ratas a las que se les administró la formulación en gel es similar a la del grupo con Utropin®. La tasa de ganancia de peso después de 2 días no era significativamente diferente entre los tres grupos, lo que sugiere que la liberación del fármaco desde la formulación en gel no duró más de 1 día.

#### 30 Ejemplo Comparativo de Ensayo 3

Se disolvió hGH en PBS 5 mM hasta una concentración de 2 mg/ml y después se añadió a la misma Tween 80 hasta una concentración del 0,01 % en peso. La disolución resultante fue suministrada a un secador por pulverización (Buchi 190) a un caudal de 3 ml/minuto para obtener micropartículas. En esta etapa, la temperatura del aire entrante era de 85 °C. El tamaño medio de partícula de las micropartículas así preparadas era de 2,5  $\mu$ m.

35 Se disolvió hialuronato de bencilo en dimetilsulfóxido (DMSO) hasta una concentración del 6 % y después se dispersaron en el mismo las micropartículas. La dispersión resultante se añadió a un aceite mineral que contiene Aracel A™ (Atlas Chemical Ind.). La mezcla se homogenizó para obtener una microemulsión. La microemulsión estaba formada por el aceite mineral como una fase continua, y el hialuronato de bencilo / disolución de DMSO

como una fase dispersada.

Se añadió acetato de etilo a la microemulsión mientras se agitaba para extraer el DMSO de la fase dispersada, proporcionando micropartículas de hialuronato de bencilo que contienen hGH. El tamaño medio de partícula de las micropartículas era de 5,5 µm y el contenido en hGH era del 45 % en peso.

- 5 Se llevó a cabo un ensayo de liberación *in vitro* mediante el uso de la formulación de hialuronato de bencilo así obtenida repitiendo el procedimiento del Ejemplo de Ensayo 2, y las cantidades acumulativas de la hGH liberada se muestran en la Tabla XV.

Tabla XV

Horas	0	1	3	5	7	24	48	72	144
Cantidad liberada (%)	0	15	21	23	25	27	28	30	30

- 10 Como puede apreciarse en la Tabla XV, la formulación de hialuronato de bencilo liberó la hGH sólo ligeramente después de 5 horas, y sólo se liberó el 30 % de la hGH cargada en 144 horas. Por lo tanto, la mayor parte de la hGH en la formulación de hialuronato de bencilo está unida a la matriz de hialuronato de bencilo y no se libera.

Se dispersó la anterior formulación de hialuronato de bencilo en aceite de semilla de algodón, y la dispersión resultante se administró a ratas enanas a una dosis de hGH de 300 µg por rata. Se determinó la ganancia media de peso, y los resultados expresados en ganancia de peso acumulativa se muestran en la Tabla XVI.

- 15

Tabla XVI

	Día	1	2	3	4	5	6	7
Formulación								
Control		1,2	2,3	3,6	5,7	6,6	7,3	8,2
Formulación de Ácido Hialurónico - Éster de Bencilo		3,6	2,7	5,4	6,3	7,1	8,4	8,0

- 20 Como puede apreciarse en la Tabla XVI, la formulación de hialuronato de bencilo no muestra ningún efecto significativo después del día 1. Aunque se ha descrito la invención con respecto a las anteriores formas de realización específicas, debería reconocerse que los expertos en la técnica pueden realizar varias modificaciones y cambios en la invención que también entrarían en el alcance de la invención según se define mediante las reivindicaciones anexas.

## REIVINDICACIONES

1. Una micropartícula lipófila con un tamaño medio de partícula que varía entre 0,1 y 200  $\mu\text{m}$ , que comprende del 1 al 99,999 % en peso de una sustancia lipófila, ácido hialurónico o una sal inorgánica del mismo, y un principio activo seleccionado de entre el grupo que consiste en un fármaco proteico o peptídico y un antígeno, en la que la micropartícula lipófila se prepara mediante la disolución del principio activo en una disolución acuosa, que contiene ácido hialurónico o una sal inorgánica del mismo, y opcionalmente, otros componentes, añadiendo una sustancia tensioactiva lipófila y secando por pulverización la disolución resultante.
2. La micropartícula lipófila de la reivindicación 1, en la que el tamaño medio de partícula está en el intervalo de entre 1 y 50  $\mu\text{m}$ .
3. La micropartícula lipófila de la reivindicación 1, en la que el fármaco está seleccionado de entre el grupo que consiste en la hormona de crecimiento humana, la hormona de crecimiento bovina, la hormona de crecimiento porcina, la hormona liberadora de la hormona de crecimiento, el péptido liberador de la hormona de crecimiento, el factor estimulante de las colonias de granulocitos, el factor estimulante de las colonias de granulocitos y macrófagos, el factor estimulante de las colonias de macrófagos, eritropoyetina, la proteína morfogenética ósea, interferón, insulina, atriopentina-III, un anticuerpo monoclonal, el factor de necrosis tumoral, el factor activador de los macrófagos, interleucina, el factor degenerador tumoral, el factor de crecimiento insulinoide, el factor de crecimiento epidérmico, el activador tisular del plasminógeno y la urocinasa.
4. La micropartícula lipófila de la reivindicación 1, en la que el antígeno se obtiene a partir de: uno o más patógenos seleccionados de entre el grupo que consiste en adenovirus de tipo 4 y 7, el virus de la hepatitis A, el virus de la hepatitis B, el virus de la hepatitis C, el virus de la gripe A y B, el virus de la encefalitis japonesa B, el virus del sarampión, el virus de las paperas, el virus de la rubéola, el virus de la polio, el virus de la rabia, el virus de la varicela, el virus de la fiebre amarilla y el virus de la inmunodeficiencia humana; uno o más patógenos seleccionados de entre el grupo que consiste en *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi*, *Eshcherichia coli* enterotoxigénica, *Haemophilus influenza* de tipo b, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria meningitidis* A y C, *Neisseria meningitidis* B, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas cepacia*, *Salmonella typhi*, *Shigella* spp., *Streptococcus pneumoniae* y *Vibrio cholerae*; uno o más patógenos seleccionados de entre el grupo que consiste en *Coccidioides immitis*, *Leishmania* sp. y *Plasmodium* sp.; uno o más patógenos responsables de las enfermedades seleccionadas de entre el grupo que consiste en carbunco sintomático bovino, fiebre epidémica bovina, carbunco bovino, enfermedad de Akabane bovina, fiebre aftosa bovina, mamitis bovina, inflamación nasotraqueal infecciosa bovina, diarrea vírica bovina, gastroenteritis infecciosa bovina, cólera porcina, diarrea epidémica porcina, gastritis atrófica porcina, enfermedad porcina causada por pavovirus, enteritis porcina causada por rotavirus, enfermedad de Newcastle en pollos, enfermedad de Marek en pollos, encefalomiелitis en pollos, rabia, moquillos canino, enteritis canina causada por parvovirus y hepatitis infecciosa canina, siendo el antígeno un antígeno atenuado, inactivado o recombinante; o ADN, ARN, plásmido, ADN u oligonucleótido de CpG extraído del patógeno.
5. La micropartícula lipófila de la reivindicación 1, en la que la sustancia lipófila está seleccionada de entre el grupo que consiste en un lípido, un derivado lipídico, un ácido graso, un derivado de un ácido graso, una cera y una mezcla de los mismos.
6. La micropartícula lipófila de la reivindicación 5, en la que el lípido es lecitina, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol o fosfatidilserina, y el derivado lipídico es araquidoil fosfatidilcolina o estearoil fosfatidilcolina.
7. La micropartícula lipófila de la reivindicación 5, en la que el ácido graso es ácido mirístico, ácido palmítico o ácido esteárico, y el derivado de un ácido graso es estearato de glicerilo, palmitato de sorbitano, estearato de sorbitano, monooleato o polisorbato de sorbitano.
8. La micropartícula lipófila de la reivindicación 1, en la que la sal inorgánica del ácido hialurónico es hialuronato de sodio, hialuronato de potasio, hialuronato de amonio, hialuronato de calcio, hialuronato de magnesio, hialuronato de cinc o hialuronato de cobalto.
9. La micropartícula lipófila de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente un excipiente soluble en agua.
10. La micropartícula lipófila de la reivindicación 9, en la que el excipiente soluble en agua está seleccionado de entre el grupo que consiste en un carbohidrato, una proteína, un aminoácido, un ácido graso, una sal inorgánica, un tensioactivo, polietilenglicol y una mezcla de los mismos.
11. Una formulación en dispersión preparada mediante la dispersión de la micropartícula lipófila de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 9 en un medio lipófilo.
12. La formulación en dispersión de la reivindicación 11, en la que el medio lipófilo es un aceite comestible, un aceite mineral, escualeno, escualano, aceite de hígado de bacalao, mono, di o triglicéridos, o una mezcla de los mismos.
13. La formulación en dispersión de la reivindicación 12, en la que el aceite comestible es aceite de maíz, aceite de

oliva, aceite de cártamo, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, aceite de girasol o una mezcla de los mismos.

14. La formulación en dispersión de la reivindicación 11, en la que el medio lipófilo comprende adicionalmente un agente dispersante o un conservante.

5 15. La formulación en dispersión de una cualquiera de las reivindicaciones 11 y 14, que se usa para inyección o para administración oral.

16. Una formulación en emulsión de aceite en agua que comprende un medio de inyección acuoso y la formulación dispersante de la reivindicación 11

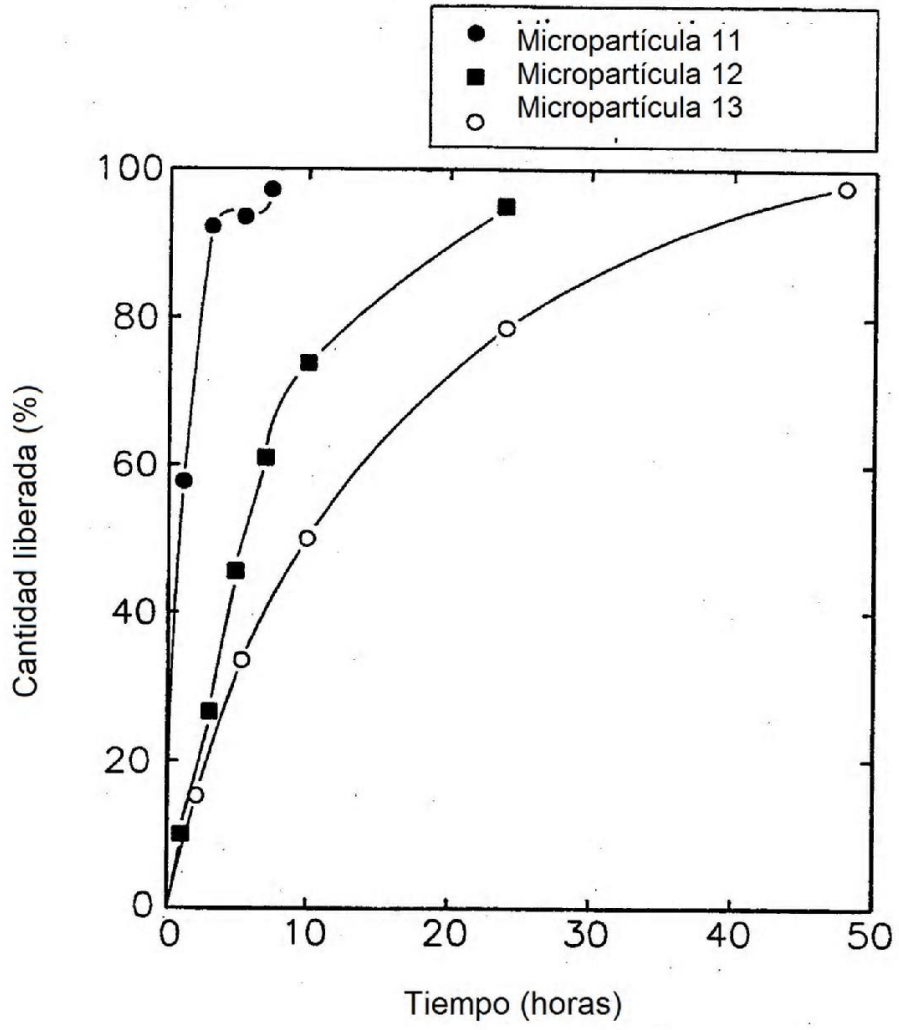
10 17. La formulación en emulsión de aceite en agua de la reivindicación 16, en la que el medio de inyección acuoso es agua destilada o una disolución tamponada.

18. La formulación en emulsión de aceite en agua de la reivindicación 16, en la que el principio activo es un antígeno y el medio de inyección acuoso comprende adicionalmente un segundo antígeno.

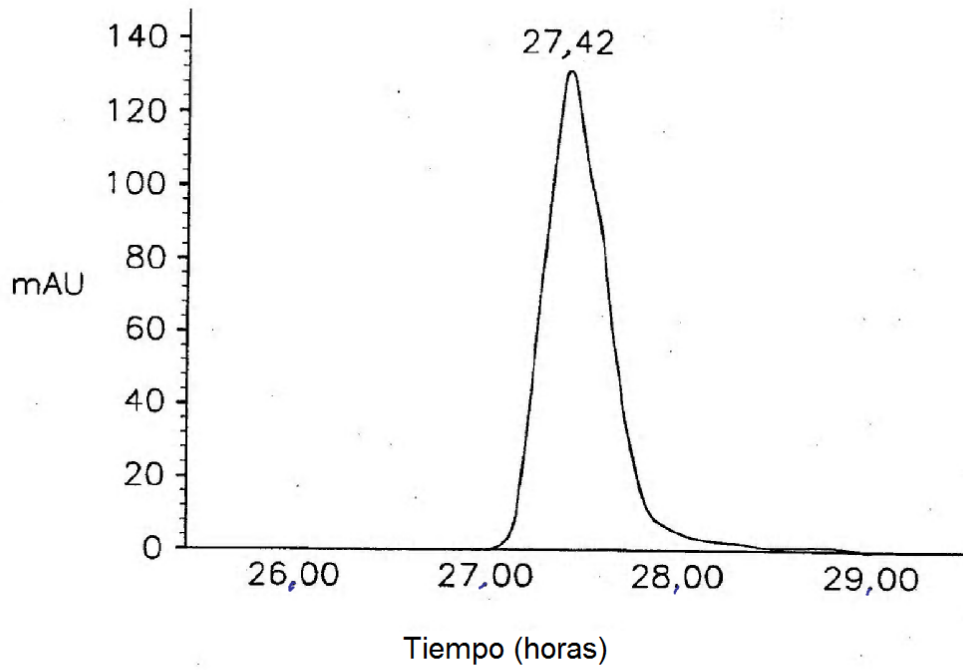
19. Una formulación en aerosol que comprende la micropartícula lipófila de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

15

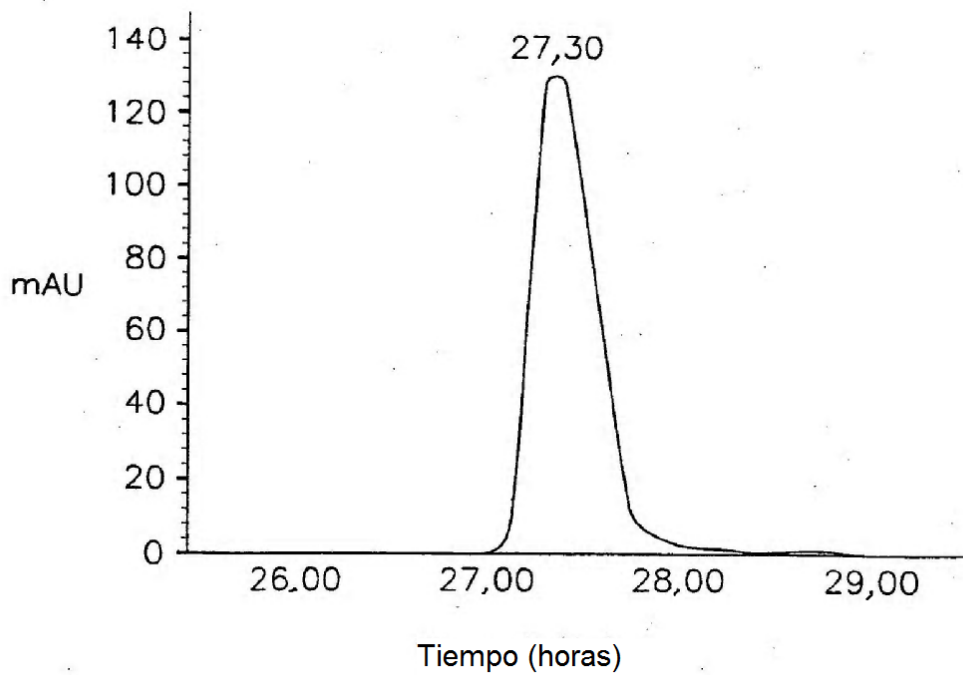
**FIG. 1**



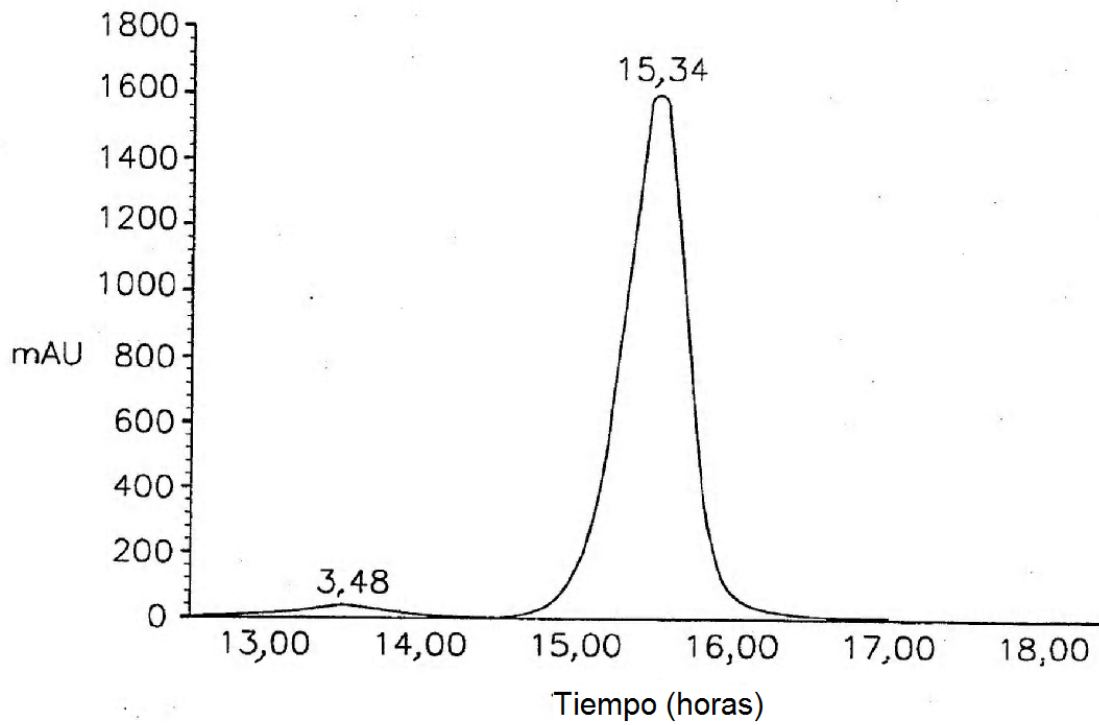
**FIG.2A**



**FIG.2B**



**FIG. 3A**



**FIG. 3B**

