(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 527 286**

(51) Int. CI.:

A61K 9/16 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2005 E 05779049 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.10.2014 EP 1742616**

(54) Título: **Microesferas de liberación sostenida y métodos de fabricación y uso de las mismas**

(30) Prioridad:

30.04.2004 US 566887 P
28.01.2005 US 647878 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.01.2015

(73) Titular/es:

ABRAXIS BIOSCIENCE, LLC (100.0%)
11755 WILSHIRE BOULEVARD, 20TH FLOOR
LOS ANGELES, CA 90025, US

(72) Inventor/es:

WOO, BYUNG HO;
DAGAR, SUMEET H. y
YANG, KANG YONG

(74) Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

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

Microesferas de liberación sostenida y métodos de fabricación y uso de las mismas

Campo de la invención

La invención pertenece, entre otras cosas, a composiciones y métodos para fabricar microesferas de liberación sostenida y al producto, un sistema de liberación de microesferas para la liberación sostenida de un agente activo, producido de este modo. Las microesferas de la invención comprenden un polímero biodegradable e incorporan un agente modificador de la liberación para efectuar la liberación sostenida de los agentes activos. De acuerdo con el método de la invención, los agentes modificadores de la liberación se solubilizan preferentemente en una fase orgánica en la que el polímero biodegradable y el agente activo se disuelven de forma homogénea. Más preferentemente, la invención se refiere a un método de una composición y a una emulsión de aceite en agua para preparar microesferas que incorporan un agente activo y un agente modificador de la liberación.

Antecedentes de la invención

Los sistemas de liberación de fármaco biodegradables (por ejemplo, que incluyen microcápsulas, microesferas, nanocápsulas, nanopartículas e implantes biodegradables) se usan para liberar fármacos durante un periodo extendido de tiempo. Los sistemas de liberación biodegradables a menudo se preparan usando poliésteres biodegradables tales como poli (ε-caprolactona), poli(ε-caprolactona-co-ácido DL-láctico), poli(e-caprolactona-co-ácido glicólico), poli(ácido DL-láctico) y poli(DL-lactida-co-glicolida).

Se ha notificado que la degradación de los poliésteres [por ejemplo, poli (ácido DL-láctico), y poli (DL-lactida-co-glicolida)] procede por escisión hidrolítica no enzimática aleatoria de los enlaces éster mediante un proceso autocatalítico. Los poliésteres biodegradables se degradan lentamente en fragmentos de menor peso molecular ácidas, y en última instancia en monómeros de ácido láctico y ácido glicólico, que se excretan a través de las vías metabólicas normales. Tras la incorporación de los poliésteres en microesferas, los productos de degradación ácidos creados mediante degradación del polímero tienen como resultado un microambiente extremadamente ácido en la microesfera. El microambiente ácido inducida por los productos de degradación de polímeros a menudo desestabiliza y causa deterioro de la actividad biológica de las sustancias activas incorporadas en las microesferas. El documento WO 0074709 divulga microesferas de insulina porcina que contienen bicarbonato sódico.

Por lo tanto, sigue existiendo una necesidad de composiciones y métodos para mejorar la estabilidad de los agentes activos incorporados en las microesferas. La invención proporciona tales composiciones y métodos. Estas y otras ventajas de la presente invención, así como características adicionales de la invención, serán evidentes a partir de la descripción de la invención proporcionada en el presente documento.

Breve sumario de la invención

Entre otras cosas, la presente invención proporciona un método para incorporar agentes modificadores de la liberación y agentes activos (por ejemplo, sustancias farmacológicas) en microesferas biodegradables, así como una formulación para efectuar la liberación sostenida del agente activo, y que protege preferiblemente el agente activo frente a los productos de degradación de la matriz de polímero biodegradable.

Se proporcionan microesferas biodegradables incorporan agentes modificadores de la liberación para liberar agentes activos, y métodos para su preparación y administración. Los agentes modificadores de la liberación incluyen agentes estabilizadores del pH, que son agentes o mezclas de los agentes, que, con su presencia, se resisten a los cambios en el pH después de la adición de pequeñas cantidades de ácido o álcalis. Los agentes modificadores de la liberación empleados comprenden aminoácidos básicos, tales como L-arginina, opcionalmente mezclados con ácidos orgánicos, tales como ácido acético glacial. Las microesferas que incorporan L-arginina muestran una mejor estabilidad del agente activo que comprende las microesferas. En una realización preferida, las microesferas comprenden polímero biodegradable, el agente activo y el agente modificador de la liberación, que se preparan utilizando una técnica de emulsión de aceite en agua (A / Ag). Las microesferas que incorporan un agente modificador de la liberación se pueden utilizar entre otras cosas para mejorar la administración sistémica o local de agente activo en un ser humano o animal durante un período prolongado de tiempo.

La presente invención proporciona un sistema de liberación de microesferas para la liberación sostenida de un agente activo, comprendiendo dicho sistema de liberación un polímero biodegradable, un agente activo y un aminoácido básico, en el que dicho agente activo y aminoácido básico están distribuidos de forma uniforme en y a través de dicha matriz polimérica, en el que dicho aminoácido básico estabiliza dicho agente activo y potencia su liberación sostenida y en el que dicho sistema de liberación comprende un ácido orgánico distribuido de forma uniforme en y a través de dicha matriz polimérica.

La presente invención también proporciona un proceso de preparación de un sistema de liberación de microesferas que comprende:

(a) disolver un polímero biodegradable en un primer disolvente orgánico que es inmiscible en agua para producir una primera mezcla;
(b) disolver un agente activo en un segundo disolvente orgánico que es miscible en agua para producir una segunda mezcla;
(c) producir una tercera mezcla disolviendo por separado un aminoácido básico en (i) un tercer disolvente orgánico que es miscible en agua, o (ii) una mezcla de dicho segundo disolvente orgánico y dicho tercer disolvente orgánico;
(d) mezclar dicha primera mezcla, dicha segunda mezcla y dicha tercera mezcla para preparar una fase orgánica dispersa homogénea;
(e) emulsionar dicha fase dispersa orgánica homogénea en una solución acuosa para producir microgotas; y
(f) retirar dicho primer disolvente orgánico, dicho segundo disolvente orgánico y dicho tercer disolvente orgánico, de dichas microgotas para producir dichas microesferas.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un sistema de liberación de microesferas para la liberación sostenida de un agente activo (tal como se define en el presente documento, por ejemplo, un agente terapéutico y / o de diagnóstico) o bien in vivo o bien in vitro. El sistema de liberación microesferas de acuerdo con la presente invención preferiblemente se puede utilizar para administrar una amplia variedad de agentes activos en diferentes pesos moleculares, tales como esteroides, vacunas, vitaminas, enzimas, analgésicos, antibióticos, antineoplásicos, hormonas y fármacos peptídicos y proteínas por citar algunos.

Las "microesferas" de acuerdo con la invención incluyen nanoesferas; las microesferas tienen generalmente una forma uniforme y preferiblemente varían en tamaño desde aproximadamente 0,1 micrómetros a aproximadamente 500 micrómetros de diámetro, incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,1 micrómetros a aproximadamente 150 micrómetros, especialmente de aproximadamente 1,0 micrómetros a aproximadamente 500 micrómetros, y particularmente de aproximadamente 1,0 micrómetros a aproximadamente 150 micrómetros, dependiendo de las condiciones de fabricación. Las microesferas se pueden emplear como un "sistema de liberación" para liberar el agente activo desde la microesfera (por ejemplo, desde el interior de la microesfera, así como desde el exterior de la microesfera, como para un fármaco asociado a la superficie), cuando se coloca en un medio acuoso apropiado (por ejemplo, como en los fluidos corporales, en un tampón fisiológicamente aceptable, o en cualquier entorno acuoso apropiado). Las microesferas de la invención son ventajosas como sistema de liberación, ya que, entre otras cosas, muestran una estabilidad mejorada y liberan condiciones para el agente activo, en comparación, por ejemplo, a las microesferas descritas anteriormente. Preferiblemente esta liberación se realiza durante un período de tiempo prolongado, proporcionando de ese modo una liberación sostenida del agente activo.

Como se usa en el presente documento, la expresión "liberación sostenida" se refiere a la liberación de un agente activo desde las microesferas de la invención durante un período de tiempo definido o extendido de una manera continua, discontinua, lineal o no lineal. Por ejemplo, la liberación puede ser esencialmente bifásica, por ejemplo, como cuando la liberación incluye una liberación inicial o la denominada "descarga" (incluso una liberación controlada o suprimida que es relativamente baja) de agente activo desde la microesfera, seguida de la liberación relativamente continua del agente activo desde la microesfera con el tiempo. Preferiblemente, la liberación inicial es menor que aproximadamente 50 % del agente activo liberado desde la microesfera en veinticuatro horas, incluso más preferiblemente menos de aproximadamente 40 %, aún más preferiblemente menos de aproximadamente 30 %, y lo más preferiblemente es menor que aproximadamente 25 %. Métodos de medición de la liberación son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Hora et al., Pharm. Res. 7:1190-1194 (1990); Hora et al., Bio/Technology 8:755-758 (1990)). La cantidad precisa de tiempo durante el cual el agente activo continúa liberándose desde las microesferas de la invención depende de las características del agente activo que se va a liberar y de los parámetros utilizados para formar las microesferas, y puede ser más largo que, de aproximadamente la misma longitud que o más corto que el de la liberación a partir de microesferas comparables (por ejemplo, microesferas convencionales) que no contienen el agente modificador de la liberación de la invención, pero, preferiblemente (por ejemplo, dada la velocidad de liberación más lineal) es la misma longitud que, o es más corta que, el de la liberación a partir de microesferas convencionales. Preferiblemente, de acuerdo con la invención, la liberación sostenida es continua, es lineal, y es prolongada (es decir, frente a de corta duración, como en el caso de una descarga inicial pronunciada).

La liberación sostenida de acuerdo con la invención se efectúa mediante la interacción única de los componentes del nuevo sistema de liberación de microesferas novela y principalmente mediante la interacción del agente modificador de la liberación, el polímero biodegradable, y el agente activo que comprende las microesferas. Estos componentes se describen más adelante. En particular, un sistema de liberación de microesferas para la liberación sostenida de un agente activo de acuerdo con la invención comprende un polímero biodegradable, un agente activo, y un agente modificador de la liberación, en el que el agente modificador de la liberación estabiliza el agente activo y mejora su liberación sostenida. El sistema de liberación de microesferas comprende preferiblemente una mezcla homogénea del polímero biodegradable, el agente activo y el agente modificador de la liberación, en particular uno en el que el agente activo y el agente modificador de la liberación estén distribuidos de forma uniforme (por ejemplo, homogéneamente) en y a través de la matriz del polímero biodegradable. . Las microesferas de la invención (por

ejemplo, en comparación con otras microesferas y / o microcápsulas) son de forma óptima de una estructura y composición uniformes.

Agente modificador de la liberación

En particular, el "agente modificador de la liberación" es el componente que estabiliza el agente activo y / o mejora su liberación sostenida desde la microesfera. Hasta cierto punto, estas características pueden fusionarse y convertirse en indistinguibles dado que parecen provenir de un mismo fenómeno subyacente. "Estabilizar" el agente activo significa que el agente activo muestra un aumento de la estabilidad en la presencia del agente modificador de la liberación, o en una microesfera que contiene el agente modificador de la liberación, en comparación con la ausencia del agente modificador de la liberación, o en una microesfera en la que el agente modificador de la liberación no está presente. Sin estar ligado a teoría alguna, el agente modificador de la liberación puede modular, por ejemplo, puede reducir o aumentar la interacción entre el agente activo y el polímero biodegradable. Preferiblemente, el agente modificador de la liberación de la invención reduce la interacción entre el agente activo y el polímero biodegradable. El agente modificador de la liberación de la invención comprende un aminoácido básico, que estabiliza el agente activo y potencia su liberación sostenida, y un ácido orgánico.

La estabilidad puede evaluarse mediante varios medios conocidos en la técnica, pero una medida preferida de la estabilidad de acuerdo con la invención es la pureza o la potencia del agente activo en cualquier momento contenida dentro de un sistema de liberación de microesferas de la invención que también incluye el agente modificador de la liberación, en comparación con la pureza o potencia del agente activo en el momento comparable contenido dentro de un sistema de liberación de microesferas comparable que no incluye el agente modificador de la liberación de la invención. La "pureza" del agente activo como una medida de la estabilidad se puede determinar, por ejemplo, mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) o un método similar. La HPLC permite la separación del agente activo puro de las impurezas, incluyendo, entre otros, los productos de degradación tales que la pureza se pueda cuantificar mediante la determinación del área del pico del agente activo puro en comparación con el área del pico total de la muestra que se está evaluando (por ejemplo, la relación entre agente activo puro y el área total del pico). La "potencia" del agente activo como medida de la estabilidad se puede determinar, por ejemplo, midiendo la cantidad (por ejemplo, cantidad, concentración u otra medida) y / o la actividad biológica del agente activo de acuerdo con cualquier método adecuado conocido por el experto en la técnica.

En la presencia de agente modificador de la liberación (por ejemplo, cuando dicho agente modificador de la liberación comprende las microesferas de la invención), la cantidad del agente activo que interacciona con el polímero biodegradable por medio de cualquier interacción física o química (por ejemplo, interacción hidrófila, hidrófoba, iónica y no iónica, y adsorción, absorción), u otra interacción, dentro de aproximadamente 1 a aproximadamente 24 horas de contacto de las microesferas con un medio acuoso apropiado, preferiblemente es menor que aproximadamente 20 % (por ejemplo, de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 20 %), incluso más preferiblemente es menor que aproximadamente 10 % (por ejemplo, de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 10 %), y más deseablemente es menor de aproximadamente 5 % (por ejemplo, de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 5 %), de la cantidad total de agente activo. Incluso más preferiblemente, la cantidad de agente activo que interacciona con el polímero biodegradable aumenta hasta no más de aproximadamente 30 % después del contacto continuo del agente activo con el polímero biodegradable (por ejemplo, en el sistema de liberación de microesferas de la invención presente en un medio acuoso apropiado) durante un máximo de aproximadamente 7 días. Preferiblemente, el agente modificador de la liberación permite que el agente activo permanezca intacto en presencia del polímero biodegradable en el sistema de liberación de microesferas de la invención. Preferiblemente, en las microesferas de la invención, desde aproximadamente 8 % hasta aproximadamente 100 % de la cantidad inicial del agente activo permanece intacto después de hasta aproximadamente 24 horas del contacto con el polímero biodegradable, y desde aproximadamente 50 % hasta aproximadamente 100 % de la cantidad inicial de los agentes activos permanece intacta después de hasta aproximadamente 7 días del contacto con el polímero biodegradable.

El agente modificador de la liberación del sistema de liberación de microesferas de la invención también "mejora la liberación sostenida" del agente activo. Por esto se entiende que el agente modificador de la liberación de la invención proporciona la liberación controlada, por ejemplo frente a un riesgo, por ejemplo, con una tasa de liberación incontrolable. El agente modificador de la liberación de la invención preferiblemente potencia (es decir, aumenta o incrementa) la liberación sostenida, ya que permite una liberación controlada y más gradual de un agente activo desde las microesferas poliméricas de la invención. En particular, el agente modificador de la liberación de la invención potencia preferentemente la liberación sostenida al permitir que las microesferas de la invención se usen para liberar el agente activo sin una descarga inicial o una liberación rápida del agente activo observado, o, por lo menos, con una reducida descarga/ liberación inicial del agente activo en comparación con la descarga/ liberación inicial observada utilizando microesferas comparables que no contienen el agente modificador de la liberación de la invención. Separado y aparte de cualquier efecto sobre la liberación inicial, preferiblemente el agente modificador de la liberación de la invención potencia la liberación sostenida proporcionando una liberación más lineal del agente activo que desde las microesferas convencionales que no contienen el agente modificador de la liberación. La cantidad de agente activo liberado inicialmente en el período de tiempo de aproximadamente 1 a aproximadamente 24 horas, preferiblemente varía de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 50 % del agente activo total

incorporado en las microesferas, especialmente de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 40 %, incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 30 %, aún incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 25 % y, en otra realización preferida, de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 15 %.

Como se ha indicado anteriormente, el agente modificador de la liberación puede ser un agente estabilizante del pH. El "agente estabilizante del pH" es el componente que mantiene el pH de microesferas de manera que el cambio de pH de la matriz de polímero en el medio acuoso disminuye o se minimiza en presencia del agente estabilizante del pH, o en una microesfera que contiene el agente estabilizante del pH, en comparación con la ausencia del agente estabilizante del pH, o en una microesfera en la que el agente estabilizante del pH está ausente. Por lo tanto, un agente modificador de la liberación que es un agente estabilizante del pH mejora (es decir, aumenta o incrementa) la liberación sostenida en cuanto a que preferiblemente permite el mantenimiento de un pH más estable dentro de la microesfera. Los agentes estabilizantes del pH son agentes o mezclas de agentes que, por su presencia en solución, resisten cambios en el pH después de la adición de pequeñas cantidades de ácidos o álcalis, y, por lo tanto, actúan como los llamados “tampones”. Esta resistencia a un cambio en el pH se conoce como "acción tampón". Los tampones consisten en un ácido débil y su base conjugada, o una base débil y su ácido conjugado. Por lo tanto, en particular, un agente estabilizante del pH (agente modificador de la liberación) comprende preferiblemente una mezcla de ácido y base (en particular ácido y su base conjugada, o base y su ácido conjugado), los llamados "homólogos” ácidos y básicos.

Los agentes modificadores de la liberación (incluyendo los agentes de estabilización del pH) de acuerdo con la invención comprenden aminoácidos básicos, tales como arginina (especialmente L-arginina), que se prefiere. Los agentes modificadores de la liberación de ejemplo incluyen mezclas de arginina y ácidos orgánicos, especialmente ácido acético glacial. La mezcla de ácido acético glacial arginina es la preferida de acuerdo con la invención. Esta mezcla parece ser un agente de estabilización del pH. Otros agentes de estabilización del pH (por ejemplo, tampones) incluyen, entre otros, a agentes o una mezcla de agentes tales como acetato, tartrato, glutamato, citrato, benzoato, lactato, gluconato, fosfato, glicina, leucina, arginina y lisina.

La arginina es un aminoácido básico que es fuertemente alcalino en solución acuosa, y el ácido acético glacial es un ácido débil que es ácido en solución acuosa. La mezcla de arginina y ácido acético glacial forma un tampón capaz de resistir un cambio de pH. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, parece que la incorporación de arginina en las microesferas poliméricas de la invención (especialmente arginina mezclada con ácido acético glacial) neutraliza o tampona los hidrolizados ácidos del polímero, hidrolizados que se cree que estimulan la degradación del activo agente. Como resultado, la arginina (especialmente arginina mezclada con ácido acético glacial) parece proteger el agente activo incorporado frente al impacto nocivo de los fragmentos de polímero ácido presentes en las microesferas. Asimismo, parece que los agentes modificadores de la liberación (por ejemplo, agentes estabilizadores de pH) pueden reducir la interacción iónica entre el resto cargado negativamente relativamente ácido de polímero y cualquier resto relativamente cargado positivamente que pueda existir en el agente activo (por ejemplo, la sustancia farmacológica). Esta interacción iónica a menudo resulta en un lapso de tiempo prolongado entre la liberación por difusión inicial y la liberación del fármaco mediada por erosión. Por lo tanto, de nuevo sin desear quedar ligado a teoría alguna, parece que en algunas situaciones, los agentes modificadores de la liberación (por ejemplo, agentes estabilizadores de pH) interaccionan con el polímero (en lugar de que el polímero interaccione con el agente activo) y, de ese modo, reducir o prevenir la interacción polímero / agente activo. En consecuencia, y con independencia de si este es el mecanismo real, los agentes modificadores de la liberación (por ejemplo, los agentes estabilizadores de pH) permiten la liberación más gradual y / o controlada del agente activo (por ejemplo, sustancia farmacológica) a partir de las microesferas poliméricas de la invención.

Se sabe en la técnica que la arginina puede usarse como agente terapéuticamente significativo (por ejemplo, para la cicatrización de heridas; véase, por ejemplo, Arana et al, Biomed. Pharmacother., 58(10):588-597 (2004)), como agente estabilizante crioprotector o en microesferas (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 6.287.587), o formar por sí misma una microesfera reticulada (véase, por ejemplo, Chui et al., J. Microencapsulation, 14(1):51-61 (1997)). Tales usos terapéuticos conocidos de arginina o bien requieren cantidades relativamente grandes de arginina con el fin de lograr el efecto deseado, y / o no tienen el agente activo y la arginina uniformemente distribuidos en y a través de una matriz polimérica (especialmente una matriz polimérica de microesferas). La presente invención difiere de la técnica entre otras cosas en que la inclusión de una pequeña cantidad de arginina u otro agente modificador de la liberación (incluyendo arginina en mezcla con ácido acético glacial) en las microesferas de acuerdo con la invención es sorprendentemente capaz de modificar la liberación de agente activo desde las microesferas. En particular, la arginina u otro agente modificador de la liberación (incluyendo arginina en mezcla con ácido acético glacial) se emplean preferiblemente en las presentes microesferas de la invención en una cantidad reducida sobre la arginina usada en estas otras aplicaciones. A saber, preferentemente arginina, otro agente modificador de la liberación el homólogo básico de un agente estabilizante del pH se incluye en una cantidad (p / p) de menos de aproximadamente 1 %, más preferiblemente en una cantidad (p / p) de menos de aproximadamente el 0,7 %, menos de aproximadamente 0,8 %, o menos de aproximadamente 0,9 %. Incluso más preferiblemente, la arginina, otro agente modificador de la liberación o el homólogo básico del agente estabilizante del pH preferiblemente está contenido dentro de las microesferas en una cantidad (p / p) que varía de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 0,7 %, especialmente en una cantidad (p / p) de aproximadamente 0,55 %, aproximadamente

0,60 %, aproximadamente 0,65 % o aproximadamente 0,7 %. Preferentemente, el homólogo ácido de un agente estabilizante del pH, tal como ácido acético glacial, se incluye en una cantidad (p / p) de menos de aproximadamente 5 %, más preferiblemente en una cantidad (p / p) de menos de aproximadamente 3 %, de menos de aproximadamente 3,5 %, o de menos de aproximadamente 4,0 %. Incluso más preferiblemente, el homólogo ácido del agente estabilizante del pH está contenido dentro de las microesferas en una cantidad (p / p) que varía de aproximadamente 1 % a aproximadamente 4 %, especialmente en una cantidad (p / p) de aproximadamente 1,5 %, aproximadamente 2,0 %, aproximadamente 2,5 % o aproximadamente 3,0 %.

La arginina está disponible principalmente en cualquiera de las dos conformaciones químicas, por ejemplo, la base libre de arginina, o como su sal, por ejemplo, clorhidrato de arginina. La base libre de arginina y su sal clorhidrato son solubles en agua. En comparación, ambos son prácticamente insolubles en disolventes orgánicos. En particular, la arginina clorhidrato es sólo ligeramente soluble en alcohol caliente. Para preparar microesferas utilizando la técnica de emulsión de aceite en agua (A / Ag), preferiblemente se prepara una fase de aceite que comprende un polímero biodegradable, el agente activo y el agente modificador de la liberación, por ejemplo, L-arginina disuelta en un pequeño volumen de disolvente orgánico. Por lo tanto, la cantidad eficaz de la arginina se solubiliza de manera óptima en un pequeño volumen de disolvente orgánico, tal como metanol acidificado con ácido acético o un ácido orgánico débil como el ácido acético glacial, o tales como ácido acético glacial solo. La solución de arginina en un disolvente orgánico deseablemente se mezcla a continuación con una solución que comprende el polímero biodegradable y un agente activo (por ejemplo, sustancia farmacológica) para formar una fase dispersa homogénea. La fase dispersa homogénea se emulsiona preferiblemente en una solución de tensioactivo acuoso para formar una emulsión de A / Ag.

Aunque la arginina (por ejemplo, mezclada con ácido acético glacial) se prefiere para su uso en el sistema de liberación de microesferas de la invención, otros aminoácidos básicos (por ejemplo, y sus sales) también se pueden usar como agentes modificadores de la liberación, ya sea solos, o mezclados con un homólogo ácido. Particularmente preferidos para su uso son los aminoácidos que son compatibles con los otros componentes de las microesferas (por ejemplo, con el polímero biodegradable que se trata a continuación) y son fisiológicamente aceptables. Estos otros aminoácidos incluyen, entre otros, aminoácidos básicos tales como lisina e histidina. Otros aminoácidos neutros y ácidos también pueden usarse como agentes adicionales. Adicionalmente, los polipéptidos naturales o sintéticos y macromoléculas que contienen al menos un solo residuo de aminoácido básico o un residuo de aminoácido ácido se pueden emplear como un agente modificador de la liberación adicional. Además, las bases orgánicas, tales como trietilamina, dietanolamina y N-metilglucamina, opcionalmente se pueden emplear como un agente modificador de la liberación. Los agentes modificadores de la liberación de acuerdo con la invención se pueden usar por separado o en combinación apropiada. Además, tales agentes modificadores de la liberación son capaces de reducir la interacción entre el polímero biodegradable y el agente activo.

Además, aunque se prefiere usar ácido acético glacial en el sistema de liberación de microesferas de la invención, también se pueden usar otros ácidos orgánicos e inorgánicos (por ejemplo, y sus sales) como agente estabilizante del pH (o el homólogo ácido del mismo), especialmente ácidos que son compatibles con los otros componentes de las microesferas (por ejemplo, con el polímero biodegradable que se trata a continuación) y son fisiológicamente aceptables. Tales otros ácidos incluyen, entre otros, ácidos orgánicos débiles (tales como, por ejemplo, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido láctico, ácido glicólico, ácido glutámico y ácido benzoico). También se refiere a ácidos inorgánicos (tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido nítrico, ácido carbónico, y ácido sulfúrico). Estos compuestos estabilizante del pH se pueden usar por separado o en combinación (por ejemplo, combinados y / o en combinación con su homólogo básico).

Huelga decir, y un experto ordinario en la técnica lo entendería, que el pH de las microesferas también se puede ajustar por, y se ve afectado por, los agentes estabilizadores del pH. El pH de las microesferas sin agentes estabilizante del pH incluidos necesariamente puede variar dependiendo de la composición de microesferas. Por ejemplo, las microesferas preparadas con una gran cantidad de agente activo básico pueden mostrar un pH más alto que las microesferas preparadas con un agente activo ácido. Además, el pH puede variar con la concentración o la cantidad del fármaco activo empleado, los monómeros ácidos contenidos en el polímero, y la acidez intrínseca de polímero en sí. Sin embargo, con el uso de agentes de estabilización del pH, el pH de la microesfera puede controlarse mediante la inclusión de diferentes cantidades y / o diferentes especies de ácido y / o base. Ejemplos de microesferas que contienen octreotida como agente activo y arginina con ácido acético glacial como agentes estabilizadores del pH mantienen el pH entre aproximadamente 3 y aproximadamente 5, pH al cual la octreotida mantiene mejor estabilidad que a niveles de pH inferiores o superiores. El pH objetivo de la microesfera en consecuencia se puede ajustar para proporcionar el pH óptimo para asegurar la estabilidad del agente activo. Por ejemplo, con un agente activo que es estable dentro de un intervalo de pH neutro, se puede usar un agente estabilizante del pH que tiene una capacidad de tamponamiento en el intervalo de pH neutro (por ejemplo, fosfato). Del mismo modo, con un agente activo que es estable dentro de un intervalo de pH muy bajo (por ejemplo, pH < 3), se puede usar un agente estabilizante del pH que tiene una capacidad de tamponamiento a pH < 3,0 (por ejemplo, tampón glicina-HCl).

Polímero biodegradable

Otro componente clave del sistema de liberación de microesferas de la invención es el polímero. Según la invención, un "polímero" es, preferiblemente, un polímero biodegradable, especialmente un poliéster. Ejemplos de monómeros usados para formar un poliéster de este tipo incluyen, entre otros, ácido láctico (ácido alfa-hidroxipropiónico), ácido glicólico (ácido alfa-hidroxiacético), un ácido ε-capriónico, un ácido ε-caproico, p-dioxanona, oxilato alquileno, cicloalquileno, succinato alquileno, y 3-hidroxi-butirato. Los poliésteres mencionados anteriormente son particularmente adecuados para los métodos y composiciones de la presente invención debido a su característica de baja toxicidad humana baja y biodegradabilidad virtualmente completa.

Preferidos de tales poliésteres para su uso en el presente documento son los ácidos poliglicólico (PGA) y poliláctico (PLA) ácidos, y los copolímeros de ácido glicólico y ácido láctico (por ejemplo, ácido D, L-láctico) (PLGA). Estos polímeros están disponibles en una variedad de pesos moleculares, y el peso molecular apropiado para proporcionar la velocidad de liberación deseada para el agente activo en cuestión puede determinarlo fácilmente un experto ordinario en la técnica. Así, por ejemplo, para el PLA, un peso molecular adecuado preferiblemente es del orden de aproximadamente 2.000 a 250.000 daltons. Para PLGA, los pesos moleculares adecuados deseablemente varían desde aproximadamente 5.000 a aproximadamente 200.000 daltons, preferiblemente de aproximadamente 7.000 a aproximadamente 150.000 daltons, y más preferiblemente de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 100.000 daltons. En una realización particularmente preferida de acuerdo con la invención, el polímero comprende preferiblemente un peso molecular de aproximadamente 12.000 a aproximadamente 50.000 daltons.

Si un copolímero tal como PLGA se utiliza para formar las microesferas, una variedad de proporciones ácido láctico:ácido glicólico son aplicables en el presente documento, y la relación es en gran medida una cuestión de elección, dependiendo en parte de la tasa de degradación deseada. Por ejemplo, un polímero PLGA 50:50, que contiene un 50 % de D,L-lactida y 50 % de glicolida, proporcionarán un copolímero de reabsorción rápida, mientras que la relación 75:25 de PLGA se degrada más lentamente, y 85:15 y 90:10, aún más lentamente , debido al incremento del componente de lactida. Es fácilmente evidente que una relación adecuada de lactida: glicolida la determina fácilmente un experto en la técnica basándose en la naturaleza del trastorno a tratar. Por otra parte, las mezclas de microesferas con diferentes relaciones lactida: glicolida se pueden emplear en las formulaciones de la invención con el fin de lograr la cinética de liberación deseada.

Preferentemente, de acuerdo con la invención, el polímero biodegradable es un copolímero de ácido láctico y ácido glicólico (es decir, es un copolímero PLGA) con proporciones unitarias que van de 40:60 a 75:25, y especialmente con proporciones de unidades que van desde 50 : 50 (es decir, es 50:50 de copolímero de poli (D, L-lactida-co-glicolida o PLGA), o es una mezcla de polímeros separados de ácido láctico y ácido glicólico.

Los anteriores ejemplos de polímeros adecuados para uso en la presente invención son, por supuesto, fácilmente disponibles comercialmente (por ejemplo, en Boehringer Ingelheim, Alemania y Birmingham Polymers, Inc., Birmingham, AL), o se pueden obtener mediante reacciones de polimerización de condensación a partir de los monómeros adecuados o, comonómeros u oligómeros. Por ejemplo, homopolímeros y copolímeros de ácidos glicólico y láctico se pueden preparar mediante poli-condensación directa o por reacción de los monómeros de glicolida y lactida (véase, por ejemplo, Gilding et al., "Biodegradable Polymers for Use in Surgery--Polyglycolic/Poly(lactic acid) Homo- and Copolymers: 1", Polymer, 20,1459 (1979), y Tabata et al., J. Biomed. Mater. Res., 22, 837-858 (1988)).

Agente activo

Otro componente clave del sistema de liberación de microesferas de la invención es el agente activo. Como se usa en el presente documento, un "agente activo" se refiere a un agente que tiene una actividad diagnóstica o terapéutica. En consecuencia, un agente activo puede incluir un marcador detectable (por ejemplo, un marcador radiactivo) que es útil para identificar la ubicación del agente liberado *in vivo*. Los agentes activos también incluyen agentes terapéuticos que son útiles para tratar una enfermedad, trastorno o afección (por ejemplo, son los denominados sustancias biológicamente activas o agentes fisiológicamente activos). Preferiblemente, el agente activo se selecciona del grupo que consiste en péptidos, proteínas, lípidos, polisacáridos, y ácidos nucleicos. Incluso más preferiblemente, la sustancia biológicamente activa es un péptido o proteína.

Los agentes activos de la invención típicamente se pueden dividir además en categorías en base a la actividad del agente o al tipo de enfermedad, trastorno o afección que se está tratando. Algunas categorías generales de agentes activos (por ejemplo, agentes fisiológicamente activos o sustancias biológicamente activas) que se pueden utilizar en la presente invención incluyen, entre otros, analgésicos, anestésicos, agentes antialérgicos, agentes antiarrítmicos, antibióticos, anticuerpos, anticoagulantes, agentes antidemencia, antidepresivos, antipsicóticos, agentes antidiabéticos, agentes antiinfecciosos, agentes antiinflamatorios, antígenos, antineoplásicos, antipiréticos, agentes antitumorales, agentes antiulcerosos, agentes antivirales, carbohidratos y polisacáridos, cardiotónicos, agentes quimioterapéuticos, agentes que disminuyen el colesterol, conjugados o complejos de pequeñas moléculas y proteínas o mezclas de los mismos, citoquinas, enzimas, factores de crecimiento, hematopoyéticos, hormonas, diuréticos hipotensores, agentes inmunológicos y adyuvantes, agentes inmunomoduladores, agentes neuroactivos,

nucleótidos y ácidos nucleicos, agentes farmacéuticos sintéticos orgánicos o inorgánicos, agentes terapéuticos para la osteoporosis, agentes psicotrópicos, agentes psicotrópicos, trombopoyéticos, vacunas, agentes vasoactivos, virus y partículas víricas, y similares.

Los agentes activos de la invención incluyen agentes de proteínas o péptidos (colectivamente, "agentes peptídicos"), así como agentes no proteicos o no peptídicos (colectivamente, los "agentes no peptídicos"). Los diversos agentes peptídicos para su uso en el presente documento incluyen no sólo las proteínas o péptidos de origen natural en sí mismos, sino también derivados farmacológicamente activos y análogos de los mismos. Ejemplos de agentes no peptídicos incluyen las siguientes categorías no limitantes de agentes: (a) nucleótidos y ácidos nucleicos; (b) carbohidratos y polisacáridos; (c) virus y partículas víricas; (d) conjugados o complejos de moléculas pequeñas y proteínas, o mezclas de los mismos; y (e) agentes farmacéuticos naturales o sintéticos orgánicos o inorgánicos (por ejemplo, los denominados fármacos).

Los agentes peptídicos preferidos (agentes activos) incluyen, entre otros, hormonas peptídicas, citoquinas, factores de crecimiento, factores que actúan sobre la sistema cardiovascular, factores que actúan sobre los sistemas nerviosos central y periférico, factores que actúan sobre electrolitos humorales y sustancias orgánicas humorales, factores que actúan sobre los huesos y esqueleto, factores que actúan sobre el sistema gastrointestinal, factores que actúan sobre el sistema inmunológico, factores que actúan sobre el sistema respiratorio , factores que actúan sobre los órganos genitales, enzimas, y similares.

Ejemplos de agentes activos de acuerdo con la invención se exponen de la siguiente manera.

Ejemplos de hormonas incluyen, entre otros, insulina, la hormona del crecimiento, hormona paratiroidea, hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH), hormona adrenocorticotrópica (ACTH), amilina, oxitocina, hormona luteinizante, acetato de nafarelina, acetato de leuprolida, hormona estimulante del folículo, glucagón, prostaglandinas, PGE1, PGE2 y otros factores que actúan sobre los órganos genitales y sus derivados, análogos y congéneres, y similares.

Ejemplos de antibióticos incluyen, entre otros, tetraciclina, aminoglucósidos, penicilinas, cefalosporinas, sulfonamidas, succinato sódico de cloranfenicol, eritromicina, vancomicina, lincomicina, clindamicina, nistatina, anfotericina B, amantidina, idoxuridina, ácido p-aminosalicílico, isoniazida, rifampicina, antinomicina D, mitramicina, daunomicina, adriamicina, bleomicina, vinblastina, vincristina, procarbazina, imidazol, carboxamida, y similares.

Los ejemplos de factores hematopoyéticos o trombopoyéticos incluyen, entre otros, eritropoyetina, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), preparación del factor de proliferación de leucocitos (Leucoprol, Morinaga Milk), trombopoyetina, factor estimulante de la proliferación de plaquetas, factor de proliferación de megacariocitos (factor estimulante), factor VIII, y similares.

Ejemplos de agentes antidemencia incluyen, entre otros, Selegelene.

Ejemplos de agentes antivirales incluyen, entre otros, amantidina e inhibidores de la proteasa.

Ejemplos de agentes antitumorales incluyen, entre otros, doxorubicina , epirubicina, idarubicina, daunorubicina, taxol y metotrexato.

Ejemplos de antipiréticos y analgésicos incluyen, entre otros, aspirina, Motrin®, Ibuprofin, Naprosyn®, Indocin®, acetaminofeno, y similares.

Ejemplos de agentes antiinflamatorios de ejemplo incluyen, entre otros, AINE, aspirina, esteroides, inhibidores de COX-2, dexametasona, hidrocortisona, prednisolona y similares.

Ejemplos de agentes antiulcerosos incluyen, entre otros, famotidina, cimetidina, nizatidina, ranitidina, y sucralfato.

Ejemplos de agentes antialérgicos incluyen, entre otros, antihistamínicos, difenhidramina, loratadina y clorfeniramina.

Ejemplos de antidepresivos y agentes psicotrópicos incluyen, entre otros, litio, amitriptilina, antidepresivos tricíclicos, fluoxetina, Prozac® y paroxetina.

Ejemplos de agentes antipsicóticos ejemplares incluyen RISPERDAL CONSTA ® (risperidona).

Ejemplos de cardiotónicos incluyen digoxina y otros.

Ejemplos de agentes antiarrítmicos incluyen metoprolol y procainamida y otros.

Ejemplos de vasodilatadores incluyen, entre otros, nitroglicerina, nifedipina y dinitrato de isosorbida.

Ejemplos de diuréticos incluyen hidroclorotiazida y furosemida, así como otros.

Ejemplos de agentes antihipertensivos incluyen, entre otros, captoprilo, nifedipina, y atenolol.

Ejemplos de agentes antidiabéticos incluyen, entre otros, glucozida, cloropropamida, metformina e insulina.

Ejemplos de anticoagulantes incluyen, entre otros, warfarina, heparina e hirudina.

Ejemplos de agentes reductores de colesterol incluyen, entre otros, lovastatina, colestiramina, y clofibrato.

Ejemplos de agentes terapéuticos para el tratamiento de la osteoporosis y otros factores que actúan sobre el hueso y el esqueleto incluyen, entre otros, calcio, alendronato, pamidronato , hueso, péptido GLA, hormona paratiroidea y sus fragmentos activos (por ejemplo, osteostatina), péptido de formación y proliferación de huesos relacionado con la histona H4 (por ejemplo, OGP), y otros agentes.

ejemplos de enzimas y de cofactores enzimáticos incluyen, entre otros: pancreasa, L-asparaginasa, hialuronidasa, quimotripsina, tripsina, tPA, estreptoquinasa, uroquinasa, pancreatina, colagenasa, tripsinógeno, quimotripsinógeno, plasminógeno, estreptoquinasa, adenilciclasa y superóxido dismutasa (SOD).

Ejemplos de vacunas incluyen, entre otros, vacunas contra la hepatitis B, MMR (sarampión, paperas y rubéola), y de la polio.

Ejemplos de adyuvantes inmunológicos incluyen, entre otros, adyuvante de Freund, dipéptidos de muramilo, concanavalina A, BCG, y levamisol.

Ejemplos de citoquinas incluyen, entre otras, linfoquinas, monoquinas, factores hematopoyéticos y similares. Linfoquinas y citoquinas útiles en la práctica de la invención incluyen interferones (por ejemplo, interferón alfa, beta y gamma), interleuquinas (por ejemplo, interleuquinas 2 a 11) y similares. Monoquinas útiles en la práctica de la invención incluyen interleuquina-1, factores de necrosis tumoral (por ejemplo, TNF-alfa y beta), factor inhibidor de leucocitos malignos (LIF) y similares.

Los ejemplos de factores de crecimiento incluyen, entre otros, factores de crecimiento nervioso (NGF, NGF-2 / NT-3), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), factor de crecimiento transformante (TGF), factor de crecimiento celular derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y similares.

Los ejemplos de factores típicos que actúan sobre el sistema cardiovascular incluyen, entre otros, factores que controlan la presión arterial, arteriosclerosis, etc., tales como endotelinas, inhibidores de la endotelina y antagonistas de la endotelina, inhibidores de la enzima productora de endotelina vasopresina, renina, angiotensina I, la angiotensina II, angiotensina III, inhibidores de la angiotensina I, antagonistas de los receptores de la angiotensina II, péptido natriurético atrial (ANP), péptido antiarrítmico y similares.

Los ejemplos de factores que actúan sobre los sistemas nerviosos central y periférico incluyen, entre otros, péptidos opioides (por ejemplo, encefalinas, endorfinas), factor neurotrópico (NTF), péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), hormona liberadora de la hormona tiroidea (TRH), sales y derivados de TRH, neurotensina y similares.

Los ejemplos de factores que actúan sobre el sistema gastrointestinal incluyen secretina y gastrina, así como otros.

Los ejemplos de factores que actúan sobre los electrolitos humorales y sustancias orgánicas humorales incluyen, entre otros, factores que controlan la hemaglutinación, los niveles de colesterol en plasma o concentraciones de iones metálicos, tales como calcitonina, apoproteína E hirudina, así como la laminina y la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), que representan ejemplos de factores de adhesión celular.

Los ejemplos de factores que actúan sobre el riñón y el tracto urinario incluyen, entre otros, sustancias que regulan la función del riñón, tales como el péptido natriurético derivado del cerebro (BNP), urotensina y similares.

Los ejemplos de factores típicos que actúan sobre los órganos sensoriales incluyen factores que controlan la sensibilidad de los distintos órganos, como la sustancia P.

Los ejemplos de factores típicos que actúan sobre el sistema inmunológico incluyen, entre otros, factores que controlan la inflamación y las neoplasias malignas, y factores que atacan a microorganismos infecciosos, tales como péptidos quimiotácticos y bradiquininas.

Los ejemplos de factores que actúan sobre el sistema respiratorio incluyen factores asociados con respuestas asmáticas, y similares.

También se incluyen péptidos o proteínas de origen natural, sintetizados químicamente o recombinantes, que pueden actuar como antígenos, tales como el polen de cedro y el polen de ambrosía. Estos factores se administran, ya sea independientemente, acoplados a haptenos o junto con un adyuvante, en las formulaciones de acuerdo con la presente invención.

Particularmente preferidos de acuerdo con la invención es un agente activo seleccionado del grupo que consiste en calcitonina (por ejemplo, especialmente calcitonina de salmón), octreotida, Zoladex® (goserelina), Lupron (leuprolida), hormona de crecimiento humana, y Octastatina. La calcitonina para su uso en la presente invención incluye, preferiblemente, no sólo productos de origen natural tales como calcitonina de salmón, calcitonina humana, calcitonina porcina, calcitonina de anguila y calcitonina de pollo, sino también análogos y variaciones sintéticas de calcitonina.

Microesferas

La presente invención también proporciona un proceso para preparar un sistema de liberación de microesferas como se describe en el presente documento que comprende polímero biodegradable, agente activo y agente modificador de la liberación. Las microesferas de acuerdo con la invención contienen preferiblemente una mezcla homogénea de polímero biodegradable, agente activo y agente modificador de la liberación, en el que estos componentes se distribuyen uniformemente en la matriz polimérica.

El proceso de preparación de acuerdo con la invención comprende preferiblemente las etapas de:

(a) disolver un polímero biodegradable en un primer disolvente orgánico que es inmiscible en agua para producir una primera mezcla;
(b) disolver un agente activo en un segundo disolvente orgánico que es miscible en agua para producir una segunda mezcla;
(c) producir una tercera mezcla disolviendo por separado un aminoácido básico en (i) un tercer disolvente orgánico que es miscible en agua, o (ii) una mezcla de dicho segundo disolvente orgánico y dicho tercer disolvente orgánico;
(d) mezclar la primera mezcla, la segunda mezcla y la tercera mezcla para preparar una fase orgánica dispersa homogénea;
(e) emulsionar la fase dispersa orgánica homogénea para producir microgotas; y
(f) retirar el primer disolvente orgánico, el segundo disolvente orgánico y el tercer disolvente orgánico, de las microgotas para producir las microesferas.

Como se ha indicado anteriormente, el método de la presente invención emplea óptimamente uno o más disolventes orgánicos, que (junto con el polímero biodegradable, agente activo y el agente modificador de la liberación) son preferiblemente farmacéuticamente o farmacológicamente aceptables. Por “farmacéuticamente aceptable” o "farmacológicamente aceptable" se quiere decir un material que no es indeseable biológicamente, o de otro modo indeseable, es decir, el material se puede administrar a un ser o individuo junto con o como parte de las formulaciones de microesferas sin producir ningún efecto biológico indeseado innecesario o sin interaccionar de un modo perjudicial con cualquiera de los otros componentes de la composición farmacéutica en la que está contenido.

De acuerdo con la invención, el "primer disolvente orgánico" en la que el polímero biodegradable se disuelve para producir la primera mezcla preferiblemente es inmiscible en agua, y preferiblemente es un disolvente volátil. Ejemplos de disolventes orgánicos que se pueden emplear incluyen hidrocarburos halogenados (por ejemplo, diclorometano, cloroformo, cloroetano, tricloroetano, tetracloruro de carbono, y similares), éteres de alquilo que tienen 3 o más átomos de carbono (por ejemplo, éter isopropílico), alquilo de ácido carboxílico (que tiene 4 o más átomos de carbono) ésteres (por ejemplo, acetato de butilo), hidrocarburos aromáticos (por ejemplo, benceno, tolueno, xileno), así como otros. Estos disolventes se pueden usar aislados o en combinaciones de los mismos. Se prefieren los hidrocarburos halogenados (por ejemplo, diclorometano, cloroformo, cloroetano, tricloroetano, tetracloruro de carbono, etc.), y, en particular, el diclorometano es especialmente preferido para el primer disolvente orgánico.

Preferentemente, el polímero se disuelve en una pequeña cantidad del primer disolvente orgánico, un reflejo de su peso en la microesfera obtenida en última instancia. Por ejemplo, el polímero biodegradable está presente en las microesferas en una cantidad preferentemente que va desde aproximadamente 0,2 a aproximadamente 10.000 veces (en peso), e incluso van más preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 1.000 veces (en peso) en relación con el peso del agente activo. La cantidad (p / p) de polímero biodegradable en el primer disolvente orgánico es preferiblemente de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 90 %, más preferiblemente de aproximadamente 2 % a aproximadamente 60 %, y más preferiblemente de aproximadamente 5 % a aproximadamente 50 %.

El "segundo disolvente orgánico" en el que se disuelve el agente activo para producir la segunda mezcla deseablemente es miscible en agua, y preferiblemente es un disolvente no volátil. Deseablemente, el segundo

disolvente orgánico también es miscible con el primer disolvente orgánico. El segundo disolvente orgánico incluye, preferiblemente, entre otros, los disolventes metanol, etanol, dimetilacetamida (DMA), tetrahidrofurano (THF), dioxano, dimetilsulfóxido (DMSO), y dimetilformamida (DMF). En una forma de realización preferida, el segundo disolvente orgánico es metanol o etanol.

Preferentemente, el agente activo se disuelve en una pequeña cantidad del segundo disolvente orgánico, un reflejo de su peso en la microesfera obtenida en última instancia. Por ejemplo, el agente activo está presente en las microesferas en una cantidad (p / p) que oscila preferiblemente de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 90 %, y más preferiblemente varía de aproximadamente 1 % a aproximadamente 50 %. La cantidad del agente activo en el segundo disolvente orgánico oscila preferiblemente de aproximadamente 0,1 mg / ml a aproximadamente 1000 mg / ml, más preferiblemente de aproximadamente 1 mg / ml a aproximadamente 500 mg / ml, y más preferiblemente de aproximadamente 5 mg / ml a aproximadamente 500 mg / ml.

El "tercer disolvente orgánico" en el que el agente modificador de la liberación se disuelve preferiblemente es miscible en agua, y deseablemente es un disolvente no volátil. Deseablemente, el tercer disolvente orgánico es miscible con el segundo disolvente orgánico. Si el tercer disolvente orgánico no es miscible con agua (o incluso si este disolvente es miscible, pero es de otro modo deseado), una mezcla del segundo disolvente orgánico y el tercer disolvente orgánico se puede utilizar, por ejemplo, en lugar de utilizar el tercer disolvente orgánico solo. El tercer disolvente orgánico incluye preferentemente, entre otros, alcoholes disolventes (por ejemplo, metanol, etanol, alcohol propílico, alcohol isopropílico, y similares), acetona, acetonitrilo y ácido acético (por ejemplo, ácido acético glacial). Preferiblemente, el tercer disolvente orgánico es ácido acético, o una mezcla de ácido acético y metanol. A lo largo de estas líneas, el propio tercer disolvente orgánico en algunos casos podría ser idéntico a, o considerado parte de, el agente modificador de la liberación, por ejemplo, donde el tercer disolvente orgánico comprende el homólogo ácido con un homólogo básico de un agente estabilizante del pH. En una realización preferida, el agente modificador de la liberación es base arginina y la cantidad eficaz de la base de arginina se disuelve preferiblemente en un pequeño volumen de disolvente orgánico, tal como metanol, que óptimamente se ha acidificado con un ácido orgánico débil, tal como ácido acético.

Preferentemente, el agente modificador de la liberación se disuelve en una pequeña cantidad del tercer disolvente orgánico, un reflejo de su peso en la microesfera obtenida en última instancia. Por ejemplo, el agente modificador de la liberación preferiblemente está presente en las microesferas en una cantidad de menos de aproximadamente 1 % (p / p) con respecto a la masa total de las microesferas, más preferiblemente en una cantidad de menos de aproximadamente 0,7 % (p / p), menos de aproximadamente 0,8 % (p / p), o menos de aproximadamente 0,9 % (p / p). Incluso más preferiblemente, la arginina (incluida arginina mezclada con ácido acético glacial), otro agente modificador de la liberación, o el homólogo básico de un agente estabilizante del pH está contenida dentro de las microesferas en una cantidad que varía desde aproximadamente 0,5 % (p / p) a aproximadamente 0,7 % (p / p), especialmente en una cantidad de aproximadamente 0,55 % (p / p), aproximadamente 0,60 % (p / p), aproximadamente 0,65 % (p / p), o aproximadamente 0,7 % (p / p). En términos de su concentración en el disolvente, preferiblemente la cantidad del agente modificador de la liberación varía de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 500 mg / ml. La cantidad del tercer disolvente empleado para la disolución del agente modificador de la liberación es preferiblemente de aproximadamente 0,1 %) (v / v) a aproximadamente 30 % (v / v) en relación con el volumen del segundo disolvente, más preferiblemente de aproximadamente 1 % a aproximadamente 10 % (v / v). Preferentemente, el homólogo ácido de un agente estabilizante del pH, tal como ácido acético glacial, se incluye en una cantidad (p / p) de menos de aproximadamente 5 %, más preferiblemente en una cantidad (p / p) de menos de aproximadamente 3 %, de menos de aproximadamente 3,5 %, o de menos de aproximadamente 4,0 %. Incluso más preferiblemente, el homólogo ácido del agente estabilizante del pH está contenido dentro de las microesferas en una cantidad (p / p) que varía de aproximadamente 1 % a aproximadamente 4 %, especialmente en una cantidad (p / p) de aproximadamente 1,5 %, aproximadamente 2,0 %, aproximadamente 2,5 % o aproximadamente 3,0 %.

El agente modificador de la liberación en la tercera mezcla de disolventes orgánicos (por ejemplo, arginina en ácido acético glacial) se mezcla después la primera y la segunda mezcla que comprende polímero y el agente activo, respectivamente, para formar una fase orgánica dispersa homogénea. La "fase dispersa orgánica homogénea" es una solución límpida en la que los solutos en la solución no se pueden separar por métodos de separación físicos, tales como por centrifugación y filtración convencionales, aunque pueden separarse por ultrafiltración. A la fase orgánica dispersa homogénea, opcionalmente se pueden añadir ácido clorhídrico, ácido cítrico, ácido málico, ácido tartárico, hidróxido sódico, hidróxido potásico y / o otros ácidos como se describe en el presente documento para el ajuste del pH. El pH de la fase orgánica dispersa homogénea (por ejemplo, que es el pH de las microesferas resultantes) varía preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 7, más preferiblemente es un pH de 7 o menos, más preferiblemente el pH varía desde aproximadamente 3 a aproximadamente 6,5 y un pH de aproximadamente 3,0, aproximadamente 3,5, aproximadamente 4,0, aproximadamente 4,5, aproximadamente 5,0, aproximadamente 5,5, aproximadamente 6,0 o aproximadamente 6,5 es particularmente preferido.

La fase dispersa orgánica homogénea se emulsiona preferiblemente en una solución de tensioactivo acuoso para formar una emulsión de aceite en agua (A/Ag). La emulsificación puede llevarse a cabo mediante técnicas de dispersión convencionales, tales como agitación intermitente, mezclado por medio de un mezclador (por ejemplo, agitador de hélice, agitador de turbina, u otro), operación de triturado con coloides, homogeneización mecánica,

ultrasonidos, y similares.

Preferiblemente, la emulsificación se lleva a cabo en una fase continua acuosa que contiene un agente tensioactivo, especialmente alcohol polivinílico (PNA) en agua. Ejemplos de otros emulsionantes que se pueden emplear opcionalmente incluyen tensioactivos aniónicos (por ejemplo, oleato sódico, estearato sódico, lauril sulfato sódico), tensioactivos no iónicos (ésteres de ácidos grasos, por ejemplo, polioxi-etileno-sorbitán [Tween 80 o Tween 60, por ejemplo, de Atlas Powder], derivados de aceite de ricino de polioxietileno-[HCO-60 o HCO-50 de Nikko Químicos], u otros), polivinilpirrolidona, carboximetilcelulosa, lecitina, gelatina y ácido hialurónico. Estos emulsionantes (y / o tensioactivos) se pueden utilizar independientemente o en combinación. La concentración de tensioactivo de acuerdo con la invención afecta al tamaño de las microesferas y se puede ajustar fácilmente por un experto en la técnica. Preferiblemente, la cantidad de tensioactivo (por ejemplo, de manera óptima la cantidad de PNA) oscila entre aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 % (p / v).

La eliminación del disolvente orgánico de la emulsión A / Ag producida se puede llevar a cabo por métodos convencionales. Ejemplos del método de eliminación del disolvente orgánico incluyen, entre otros, secado por pulverización, separación de fases, y secado en agua. Por ejemplo, la eliminación del disolvente orgánico puede llevarse a cabo por evaporación del disolvente orgánico mediante agitación con un agitador de tipo hélice, un agitador magnético, o similar, opcionalmente a presión atmosférica, o reduciendo gradualmente la presión mientras se controla el grado de vacío, por ejemplo mediante el uso de un evaporador rotatorio. Estos métodos son rutinarios.

Preferentemente, de acuerdo con la invención, el disolvente orgánico (por ejemplo, el primer disolvente orgánico, el segundo disolvente orgánico, y / o el tercer disolvente orgánico) se retira por extracción y evaporación, lo que solidifica aún más las microesferas. De manera óptima esto se realiza mediante el aumento de la temperatura de la emulsión (es decir, que ahora comprende microgotas) a desde aproximadamente 30 ºC a aproximadamente 45 ºC, y agitación durante de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 360 minutos. En particular, preferiblemente esto se realiza mediante el aumento de la temperatura desde aproximadamente 40 ºC a aproximadamente 42 ºC, y agitación durante de aproximadamente una hora a aproximadamente 3 horas, más deseablemente durante aproximadamente una hora.

Las microesferas solidificadas contienen el agente activo agente (por ejemplo, sustancia farmacológica) y agente modificador de la liberación (por ejemplo, arginina) opcionalmente se recuperan, por ejemplo, por filtración. Si se desea, las microesferas pueden además secarse al vacío o mediante secado por congelación.

Huelga decir que las características de las microesferas producidas de acuerdo con la invención se pueden alterar durante la preparación manipulando la concentración de polímero, la temperatura de la reacción, el pH, el agente activo y / o la concentración del agente modificador de la liberación, y similares. Un experto ordinario en la técnica conocería tales manipulaciones.

En general, aunque el agente activo se puede cargar en una microesfera preformada de la invención, es preferible que el agente activo que se va a cargar en una microesfera de la invención durante la preparación de la microesfera, especialmente cuando un agente modificador de la liberación se incorpora adicionalmente en la microesfera para estabilizar el agente activo y para mejorar su liberación sostenida.

Formulaciones farmacéuticas

Las microesferas de la invención (es decir, el sistema de liberación de microesferas) comprende opcionalmente una "formulación farmacéutica" que se puede administrar por vía intramuscular, subcutánea o por vía oral en forma de suspensión en vehículo líquido adecuado.

También se hace referencia a un método para tratar una enfermedad, trastorno o afección en un paciente (por ejemplo, un ser humano) en necesidad de tal tratamiento. Este método comprende el uso de la formulación farmacéutica de la invención para administrar un agente activo al paciente. Aunque se puede usar cualquier medio adecuado de administración a un paciente, normalmente y preferentemente el método de la invención para tratar una enfermedad en un paciente implica administrar la formulación farmacéutica a un paciente a través de inyección. Por el término "inyección" se quiere decir que la composición se introduce con fuerza en un tejido diana del paciente. La composición se puede administrar al paciente por cualquier vía adecuada, pero se administra al paciente preferiblemente por vía subcutánea o por vía intramuscular. La formulación farmacéutica de la invención se administra mediante inyección, se puede usar cualquier dispositivo de inyección adecuado. Aunque menos preferidas, pueden usarse otras vías de administración para liberar la composición al paciente. De hecho, aunque se puede usar más de una vía para administrar la formulación de la invención, una vía determinada puede proporcionar una reacción más inmediata y más eficaz que otra vía.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporcionan una formulación farmacéutica y un método de producir la misma. La formulación farmacéutica incluye opcionalmente un recipiente, por ejemplo, que contiene una dosis única de microesferas que contienen un agente activo para tratar una afección que es tratable mediante la liberación sostenida de un agente activo desde las microesferas. El número de microesferas en la dosis única

depende de la cantidad de agente activo presente en cada microesfera y del período de tiempo durante el cual se desea la liberación sostenida. Preferiblemente, se selecciona la dosis única para conseguir la liberación sostenida del agente activo durante un periodo de aproximadamente 1 a aproximadamente 180 días con el perfil de liberación deseado.

También se hace referencia a una composición que contiene una jeringa. La composición incluye una jeringa que contiene una dosis única de microesferas que contienen un agente activo para tratar una afección que es tratable mediante la liberación sostenida del agente activo desde las microesferas; y una aguja unida a la jeringa, donde la aguja tiene un tamaño de orificio que es apropiado para la introducción de las microesferas. La composición que contiene jeringa (u otra composición) también se puede usar en una alternativa a la inyección de la aguja, por ejemplo, microescisión, en el que una corriente de gas se dispara sobre la piel creando pequeños orificios a través de los cuales se puede liberar el agente activo.

Como se ha indicado anteriormente, las microesferas pueden preparase para tener cualidades adecuadas para su liberación por otras vías parenterales y no parenterales, tales como oral, bucal, intratecal, nasal, pulmonar, transdérmica, transmucosa y similares.

Cuando se utiliza terapéuticamente, independientemente de la vía de administración, las microesferas de la invención se administran en cantidades terapéuticamente eficaces. En general, una "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad eficaz para liberar una cantidad terapéuticamente eficaz de una cantidad de agente activo, por ejemplo, una cantidad de agente activo necesaria para retrasar el inicio de, inhibir la progresión de, o detener por completo la enfermedad, trastorno o afección concreto que se esté tratando, o de otro modo, para proporcionar el resultado biológico deseado. Generalmente, una cantidad terapéuticamente eficaz varía con la edad, estado y sexo del paciente, así como la naturaleza y extensión de la enfermedad, trastorno o afección en el paciente, todo lo cual puede determinarla un experto ordinario en la técnica. La dosificación la puede ajustar el médico individual (o veterinario), particularmente en el caso de cualquier complicación.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de agente activo varía preferiblemente de aproximadamente 0,0001 mg / kg a aproximadamente 1000 mg / kg. Para ciertos agentes activos, la cantidad terapéuticamente eficaz de manera óptima varía de aproximadamente 0,1 microgramos / kg a aproximadamente 1000 microgramos / kg. Para otros agentes activos, la cantidad terapéuticamente eficaz de manera óptima varía de aproximadamente 0,1 miligramos / kg a aproximadamente 1000 miligramos / kg. La cantidad terapéutica eficaz se puede administrar en una o más administraciones de dosis diarias, durante uno o más días, semanalmente, mensualmente, cada dos o tres meses, y similares.

Las microesferas se pueden administrar solas, o en combinación apropiada con otros agentes activos o terapias farmacológicas, como parte de una formulación farmacéutica. Tal formulación farmacéutica puede incluir las microesferas en combinación con cualquier estándar fisiológica y / o farmacéuticamente aceptables que son conocidos en la técnica. Las composiciones de la formulación preferiblemente son estériles y contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de la microesfera en una unidad de peso o volumen adecuada para la administración a un paciente. La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" como se usa en el presente documento significa una o más cargas sólidas o líquidas compatibles, diluyentes o sustancias encapsulantes que son adecuadas para administración a un humano u otro animal. El término "vehículo" denota un ingrediente orgánico o inorgánico, natural o sintético, y combinaciones de los mismos, con los que el ingrediente activo se combina para facilitar la aplicación. Los componentes de la formulación farmacéutica preferiblemente son capaces de mezclarse con los componentes de la presente invención (por ejemplo, el agente activo, el polímero biodegradable, y el agente modificador de la liberación), y entre sí, de tal manera que no hay interacción que perjudique sustancialmente a la eficacia farmacéutica deseada. Vehículo farmacéuticamente aceptable significa además un material no tóxico que es compatible con un sistema biológico tal como una célula, cultivo celular, tejido u organismo. Las características del vehículo dependerán de la vía de administración. Vehículos fisiológicamente y farmacéuticamente aceptables incluyen diluyentes, cargas, sales, tampones, estabilizadores, desecantes, agentes de carga, propulsores, agentes acidificantes, agentes de recubrimiento, solubilizantes, y otros materiales que son bien conocidos en la técnica. Formulaciones de vehículos adecuadas para administración oral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, u otro tipo de administraciones también son bien conocidas, y se pueden encontrar, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co., Easton, PA), así como en otras fuentes.

Las preparaciones para administración parenteral incluyen, entre otras, soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Ejemplos de disolventes incluyen propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo, y similares. Vehículos acuosos incluyen agua, sales y soluciones tampón, tal como solución salina y medios tamponados, soluciones alcohólicas / acuosas y emulsiones o suspensiones, así como otros. Vehículos parenterales incluyen, entre otros, solución salina normal (0,9 % de cloruro sódico), ½ de solución salina normal (cloruro sódico 0,45 %), 5 % de dextrosa en agua, solución lactato de Ringer, dextrosa al 5 % en ½ de solución salina normal con 20 mEq KC1, 5 % de dextrosa en solución lactato de Ringer, dextrosa al 5 % en 1/3 de solución salina normal, 5 % de dextrosa en ½ de solución salina normal, Normosol®-M en 5 % de Dextrosa, Normosol®-R en 5 % de Dextrosa, así como otros. Vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluidos y de nutrientes y reponedores de electrolitos, tales como los basados

en dextrosa de Ringer y similares. Opcionalmente también pueden estar presentes conservantes y otros aditivos, tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, y gases inertes y similares, siempre y cuando estos ingredientes adicionales no afecten perjudicialmente a las propiedades ventajosas de las microesferas. Generalmente, las microesferas se pueden administrar al sujeto (cualquier receptor mamífero) utilizando los mismos modos de administración que actualmente se utilizan para la microesfera y / o terapia de micropartículas en los seres humanos.

Comprendan o no un formulación farmacéutica, las microesferas de la invención son útiles para una amplia variedad de fines de separaciones, de diagnóstico, terapéuticos, industriales, comerciales, cosméticos, y con fines de investigación. Por lo tanto, las microesferas de la invención son útiles para aplicaciones médicas y de diagnóstico, tales como la liberación de fármacos, la vacunación, la terapia génica, y las pruebas de imagen histopatológicas o en el tejido vivo o formación de imágenes de tumores.

Por ejemplo, para fines de diagnóstico *in vivo,* las microesferas pueden incluir una macromolécula tal como una inmunoglobulina o un receptor celular marcado con un marcador detectable. La administración de la microesfera marcada a un paciente crea un agente de imagen para el diagnóstico de un trastorno proliferativo tal como cáncer o una infección, o como una herramienta para la evaluación del éxito de un agente terapéutico en la reducción de la proliferación de una célula u organismo adverso concreto.

Para el diagnóstico *in vitro*, las microesferas que contienen una macromolécula tal como una inmunoglobulina, un receptor celular o sonda de oligonucleótido específica para la célula u organismo en investigación, se puede combinar con una muestra de prueba, separar las microesferas de los componentes no unidos de la muestra, y después, detectar las moléculas unidas mediante métodos convencionales.

Las microesferas además son útiles como agentes terapéuticos y permiten el uso de vías alternativas de administración, por ejemplo, cuando las microesferas incluyen un agente activo que es un fármaco terapéutico, y se administran a un paciente para la liberación sostenida del agente activo al sitio que requiere la terapia. Las microesferas también son útiles como agentes terapéuticos o profilácticos, por ejemplo, cuando las microesferas incluyen una macromolécula que es en sí misma un agente terapéutico o profiláctico, tal como una enzima o inmunoglobulina. La liberación sostenida de tales agentes terapéuticos es particularmente útil para las proteínas o péptidos terapéuticos que tienen semividas cortas que deben administrarse mediante inyección.

Las microesferas, además, son útiles, entre otras cosas, para la purificación de moléculas de una mezcla compleja, como un reactivo para la detección o cuantificación de una molécula específica, o para la producción de moléculas, tales como anticuerpos. Por ejemplo, las microesferas que contienen una macromolécula, tal como una inmunoglobulina, se pueden unir a una columna de cromatografía y utilizarse en cromatografía de inmunoafinidad para separar un ligando de una mezcla compleja. Alternativamente, las microesferas que incluyen una macromolécula marcada o una mezcla de macromoléculas marcadas específicas para diferentes células o biomoléculas, tales como receptores celulares, pueden utilizarse para detectar cambios en el número de células o biomoléculas en respuesta a una afección de ensayo concreta, usando técnicas, por ejemplo, , tales como la citometría de flujo.

Además, las microesferas se pueden usar opcionalmente como adyuvantes para la producción de vacunas en la que las microesferas que contienen antígeno se inyectan en un animal de investigación, tales como un ratón o conejo, para desencadenar una respuesta inmune mejorada para la producción de anticuerpos contra el antígeno.

Usos comerciales adicionales incluyen la formación de partículas enzimáticas para la adición a detergentes, cosméticos, lociones o cremas, tintas y pinturas. Otros usos serán evidentes para un experto en la técnica en vista de la enseñanza proporcionada en el presente documento.

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención (por ejemplo, al mostrar formas particulares de preparación y evaluación de las microesferas de la invención) pero, por supuesto, no deben interpretarse en modo alguno como limitantes de su alcance.

EJEMPLO 1

Este ejemplo describe el efecto de la arginina sobre la interacción entre el polímero biodegradable y la calcitonina de salmón. Para los experimentos descritos en el presente documento, aunque la arginina se combina con ácido acético, por conveniencia en la descripción de los resultados obtenidos, con frecuencia solo se menciona la arginina.

Para estos estudios, 5 ml de la solución de calcitonina de salmón (1 mg / ml) que contenía arginina (0,6 mg / ml) y ácido acético glacial (3 mg / ml) en tampón fosfato 10 mM se preparó y se mezcló con 100 mg de microesferas blanco poli(D,L-lactida-co-glicolida) (PLGA) (muestra de "arginina" muestra). Las microesferas en blanco se prepararon como sigue. En pocas palabras, 2,0 g de 50:50 de polímero poli (D, L-lactida-co-glicolida) (PLGA) que tiene una viscosidad inherente de 0,4 dl / g (Resomer RG503H de Boehringer Ingelheim), se disolvieron en 8,0 g de diclorometano (CH_2Cl_2). A continuación, la solución de polímero se mezcló con 2 ml de metanol. El polímero que

contiene la fase orgánica se dispersa en 400 ml de 0,35 % de alcohol de polivinilo (PNA) disuelto en agua usando un mezclador Silverson de laboratorio. Los disolventes orgánicos se extrajeron y se evaporaron al aumentar la temperatura a 40 ºC y agitación durante 1 hora a esta temperatura. Las microesferas se obtienen por filtración, se lavaron y después se secaron por congelación. El tamaño medio de partícula de volumen de las microesferas obtenidas fue de 39 micrómetros.

Para una muestra comparativa (la muestra “sin arginina”, 5 ml de la solución de calcitonina de salmón (1 mg / ml) en tampón fosfato 10 mM, sin arginina y ácido acético glacial, se preparó y se mezcló con 100 mg de microesferas blanco poli(D,L-lactida-co-glicolida) (PLGA) (muestra de "arginina" muestra). Además, una solución de 2 mg/ml de calcitonina de salmón que contiene arginina (0,6 mg / ml) y ácido acético glacial (3 mg / ml), pero no cualquier microesfera, se preparó como el control para la muestra de "arginina" y un 1 mg / mL de salmón solución de calcitonina, sin arginina y ácido acético glacial, en tampón fosfato 10 mM se preparó como un control para la muestra "sin Arginina".

Las microesferas que contienen muestras de arginina y sin arginina y sus respectivas soluciones de control sin microesferas se almacenaron a 37 ° C. Después de la separación de la solución a partir de las microesferas, la concentración de calcitonina de salmón en la solución separada obtenida a partir de las muestras Arginina y sin Arginina se determinó por HPLC a 1, 3 y 7 días de almacenamiento. La concentración de calcitonina de salmón de las soluciones de control sin microesferas también se determinó en los mismos intervalos. El porcentaje de calcitonina de salmón unida a (o interaccionada con), las microesferas se calcularon utilizando la concentración de calcitonina de salmón reducida en las muestras Arginina y sin Arginina en comparación con las correspondientes soluciones de control sin microesferas. Los resultados se muestran en la **Tabla 1**.

Tabla 1: % calcitonina de salmón que ha interaccionado con microesferas de PLGA

Tiempo (día)	Sin arginina	0,6 mg/ml de Arginina
1	11,1 ± 2,4 %	1,3 ± 1,0 %
3	32,1 ± 5,0 %	1,5 ± 0,5 %
7	57,1 ± 9,3 %	3,4 ± 0,5 %

Como se puede ver en la Tabla 1, la presencia de arginina redujo la interacción entre la calcitonina de salmón y PLGA significativamente en comparación con las muestras sin arginina.

EJEMPLO 2

Este ejemplo describe el efecto de la arginina sobre la estabilidad de calcitonina de salmón.

La estabilidad de calcitonina de salmón en las muestras de arginina y sin arginina del Ejemplo 1 se determinó mediante HPLC. La estabilidad en porcentaje se determinó como el área del pico de la calcitonina de salmón dividido por el área total del pico obtenido para la disolución. Los resultados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2: % de estabilidad de calcitonina de salmón

Tiempo (día)	Sin arginina	0,6 mg/ml de Arginina
1	80,4 ± 1,5 %	95,2 ± 0,6 %
3	55,4 ± 2,6 %	94,5 ± 0,5 %
7	20,7 ± 3,4 %	92,4 ± 0,5 %

Como se puede ver en la Tabla 2, la calcitonina de salmón fue bien protegida por la arginina, según lo confirmado por su mayor estabilidad en presencia de arginina en comparación con los de las muestras sin arginina. Estos resultados son consistentes con la degradación del péptido que se produce en las muestras sin arginina.

EJEMPLO 3

Este ejemplo describe la preparación y caracterización de microesferas de PLGA cargadas con calcitonina de salmón que contienen arginina.

Para estos estudios, 0,942 g de 50:50 de polímero poli (D, L-lactida-co-glicolida) (PLGA) que tiene una viscosidad inherente de 0,4 dl / g (Resomer RG503H de Boehringer Ingelheim), se disolvieron en 3,740 g de diclorometano (CH_2Cl_2). La arginina (2 g) se disolvió en 10 ml de ácido acético glacial. El acetato de calcitonina de salmón (60,52 mg) se disolvió en 1 ml de metanol. La solución de polímero se mezcló con la solución de calcitonina de salmón, y después se mezcló con 30 µl de la solución de arginina. La fase orgánica que contiene arginina, calcitonina de salmón y polímero se dispersó en 400 ml de 0,35 % de alcohol de polivinilo (PNA) disuelto en agua usando un mezclador Silverson de laboratorio. Los disolventes orgánicos se extrajeron y se evaporaron al aumentar la temperatura a 42 ºC y agitación durante 1 hora a esta temperatura. Las microesferas se obtuvieron por filtración, se lavaron y después se secaron por congelación. El tamaño medio de partícula de volumen de las microesferas obtenidas fue de 60 micrómetros. El contenido de calcitonina de salmón fue 4,02 %, y la eficiencia de carga de ka calcitonina de salmón fue del 79,8 %. El contenido de arginina fue de 0,61 % y la eficiencia de carga de la arginina

fue 102,0 %

EJEMPLO 4 (Ejemplo Comparativo)

Este ejemplo describe la preparación y caracterización de microesferas de PLGA cargadas con calcitonina de salmón sin arginina.

Para estos estudios, 0,942 g de 50:50 de polímero poli (D, L-lactida-co-glicolida) (PLGA) que tiene una viscosidad inherente de 0,4 dl / g (Resomer RG503H de Boehringer Ingelheim), se disolvieron en 3,760 g de diclorometano (CH_2Cl_2). El acetato de calcitonina de salmón (59,65 mg) se disolvió en 1 ml de metanol. La solución de polímero se mezcló con la solución de calcitonina de salmón. La fase orgánica que contiene calcitonina de salmón y polímero se dispersó en 400 ml de 0,35 % de alcohol de polivinilo (PNA) disuelto en agua usando un mezclador Silverson de laboratorio. Los disolventes orgánicos se extrajeron y se evaporaron al aumentar la temperatura a 42 ºC y agitación durante 1 hora a esta temperatura. Las microesferas se obtuvieron por filtración, se lavaron y después se secaron por congelación. El tamaño medio de partícula de volumen de las microesferas fue de 52 micrómetros. El contenido de calcitonina de salmón fue 4,70 %, y la eficiencia de carga de ka calcitonina de salmón fue del 95,1 %.

EJEMPLO 5

Este ejemplo describe la liberación in vitro de las microesferas cargadas con calcitonina de salmón que contienen arginina en comparación con las microesferas cargadas con calcitonina de salmón sin arginina.

Para estos estudios, aproximadamente 10 mg de las microesferas cargadas con calcitonina de salmón preparadas como se describe en los Ejemplos 3 y 4 se dispersaron en 1 ml de medio de liberación *in vitro*, tampón acetato 10 mM, pH 4,0, a 37 ºC. A intervalos de tiempo predeterminados, los tubos de muestra se retiraron de la incubadora de 37 ºC y se centrifugaron para separar las microesferas separadas y liberar medio. Las microesferas separadas se disolvieron en 90 % de acetonitrilo y el péptido total restante en las microesferas se determinó por HPLC. Los datos se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3: % de liberación acumulativa in vitro de la calcitonina de salmón

Tiempo (día)	Sin arginina	Cargada con 0,6 % de arginina
0	0,0	0,0
1	5,7	2,3
3	16,1	7,8
7	15,7	7,3
14	21,4	33,5
21	25,9	72,2
28	86,7	83,2
42	99,4	95,5

Como se puede ver en la Tabla 3, las microesferas cargadas con arginina mostraron menor liberación inicial entre 0 y 7 días en comparación con las microesferas sin arginina. A esto le siguió una liberación sostenida más lineal entre 7 y 42 días a partir de las microesferas cargadas de arginina en comparación con las microesferas sin arginina. Las microesferas cargadas de arginina dieron una liberación in vitro más gradual de las microesferas sin arginina.

EJEMPLO 6

Este ejemplo describe la estabilidad peptídica en las microesferas.

La estabilidad de la calcitonina de salmón en las microesferas preparadas como se describe en los Ejemplos 3 y 4 se evaluó durante la liberación *in vitro*, como se ha descrito en el Ejemplo 5. Para estos estudios, se dispersaron aproximadamente 10 mg de microesferas en tampón acetato 10 mM, pH 4,0, a 37 ºC. A intervalos de tiempo predeterminados, los tubos de muestra se retiraron de la incubadora de 37 ºC y se centrifugaron para separar las microesferas separadas y liberar medio. Las microesferas separadas se disolvieron en 90 % de acetonitrilo y la estabilidad de la calcitonina de salmón se determinó por HPLC mediante la comparación de la pureza de la calcitonina de salmón en cualquier punto de tiempo a la pureza en el tiempo cero. Los datos se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4: % de estabilidad relativa de la calcitonina de salmón

Tiempo (día)	Sin arginina	Cargada con 0,6 % de arginina
0	100,0	100,0
1	91,5	96,0
3	87,9	95,4
7	83,5	91,9
14	89,3	94,5

Como se muestra a partir de los datos de la Tabla 4, las microesferas cargadas con arginina mostraron una mayor estabilidad de la calcitonina de salmón en comparación con las microesferas sin arginina. Las microesferas cargadas con arginina estabilizaron el péptido incorporado en la matriz de polímero durante la liberación *in vitro*.

EJEMPLO 7

Este ejemplo describe el cambio de la propiedad física del polímero PLGA causado por la interacción entre la arginina y el polímero.

La temperatura de transición vítrea (Tv) de las microesferas de PLGA cargadas con arginina se determinó para evaluar el efecto de la carga arginina sobre la propiedad física de la matriz de polímero PLGA mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC). Las microesferas de PGLA cargadas con 0,6 % de arginina se calentaron desde 25 ºC a 100 ºC a 5 ºC / min, y el termograma se analizó para determinar la transición vítrea. Las microesferas de PLGA sin arginina blanco también se analizaron como la muestra comparativa. Se observó una Tv de 56,1 ºC para las microesferas cargadas de arginina. En comparación, se observó una Tv de 51,1 ºC para las microesferas sin arginina.

El hecho de que las microesferas cargadas con arginina mostraron un temperatura de transición 5 ºC superior en comparación con las microesferas blanco confirma que tiene lugar una interacción entre arginina y el polímero PLGA en las microesferas. Esto sugiere además que el agente modificador de la liberación modula la interacción entre el polímero y el agente activo. Específicamente, esto sugiere que cuando está presente el agente modificador de la liberación en las microesferas, el agente modificador de la liberación interacciona con el polímero de PLGA en lugar de que el agente activo interaccione con el polímero, y por lo tanto el agente modificador de la liberación reduce la interacción de agente activo con el polímero.

EJEMPLO 8

Este ejemplo describe la preparación y caracterización de las microesferas de PLGA cargadas con octreotida que contienen el agente modificador de la liberación (arginina con ácido acético glacial).

En dos estudios separados, 0,948 g (estudio 1) o 0,946 g (estudio 2) de 50:50 de polímero poli (D, L-lactida-co-glicolida) (PLGA) que tiene una viscosidad inherente de 0,4 dl / g (Resomer RG503H de Boehringer Ingelheim), se disolvieron en 3,853 g (estudio 1) o 3,874 g (estudio 2) de diclorometano CH_2Cl_2. La arginina (2 g) se disolvió en 10 ml de ácido acético glacial. El acetato de octreotida (58,98 mg, estudio 1; 57,61 mg estudio 2) se disolvió en 1 ml de metanol. La solución de polímero se mezcló con la solución de octreotida y después se mezcló con 30 µl de la solución de arginina. La fase orgánica que contiene arginina, ácido acético glacial, octreotida y polímero se dispersó en 200 ml de 0,35 % de alcohol de polivinilo (PNA) disuelto en agua usando un mezclador Silverson de laboratorio. Los disolventes orgánicos se extrajeron y se evaporaron al aumentar la temperatura a 42 ºC y agitación durante 1 hora a esta temperatura. Las microesferas se obtuvieron por filtración, se lavaron y después se secaron por congelación. El tamaño medio de partícula de volumen de las microesferas fue de 41 µm (estudio 1) o 49 µm (estudio 2). El contenido de octreotida era 4,31 % (estudio 1) o 4,3 % (estudio 2), y la eficiencia de carga de octreotida era de 84,5 % (estudio 1).

EJEMPLO 9 (Ejemplo Comparativo)

Este ejemplo describe la preparación y caracterización de microesferas de PLGA cargadas con octreotida que no contienen ningún agente modificador de la liberación.

Para estos estudios, 0,950 g de 50:50 de polímero poli (D, L-lactida-co-glicolida) (PLGA) que tiene una viscosidad inherente de 0,4 dl / g (Resomer RG503H de Boehringer Ingelheim), se disolvieron en 3,802 g de diclorometano (CH_2Cl_2). El acetato de octreotida (57,69 mg) se disolvió en 1 ml de metanol. La solución de polímero se mezcló con la solución de octreotida y después se mezcló con 30 µl de la solución de ácido acético glacial. La fase orgánica se dispersó en 100 ml de 0,35 % de alcohol de polivinilo (PNA) disuelto en agua usando un mezclador Silverson de laboratorio. Los disolventes orgánicos se extrajeron y se evaporaron al aumentar la temperatura a 42 ºC y agitación durante 1 hora a esta temperatura. Las microesferas se obtuvieron por filtración y se lavaron y se secaron. El contenido de octreotida fue del 3,27 %.

EJEMPLO 10

Este ejemplo describe el pH frente a perfil de estabilidad del fármaco activo diana de ejemplo, acetato de octreotida.

Para este estudio, se incubaron soluciones de acetato de octreotida de 0,2 mg/ml en diferentes tampones de pH (resistencia iónica del tampón = ~50 mM) a 70 ºC. En diversos momentos designados, la concentración de la octreotida se determinó usando HPLC. Se calculó la tasa de degradación frente al tiempo (Kobs) y se representó gráficamente. Basándose en los resultados obtenidos (presentada en la Tabla 5 a continuación), el acetato de octreotida parece relativamente estable entre un pH de 3,0 y 5,0.

Tabla 5: Estabilidad acelerada de soluciones de octreotida en diferentes pH

pH / tampones	Ensayo de octreotida	Tiempo			
		0 horas	24 horas	48 horas	69 horas
pH 2,0, Glicina-HCl	mg/ml (% de estabilidad)	0,1965 (100,00)	0,1651 (84,02)	0,1425 (72,52)	0,1303 (66,31)
pH 3,0, Glicina-HCl	mg/ml (% de estabilidad)	0,2214 (100,00)	0,2136 (96,48)	0,2050 (92,59)	0,2004 (90,51)
pH 4,0, Arginina-Acetato	mg/ml (% de estabilidad)	0,1911 (100,00)	0,1860 (97,33)	0,1784 (93,35)	0,1741 (91,10)
pH 5,0, Arginina-Acetato	mg/ml (% de estabilidad)	0,2027 (100,00)	0,1975 (97,43)	0,1848 (91,17)	0,1819 (89,74)
pH 6,0, Fosfato	mg/ml (% de estabilidad)	0,1934 (100,00)	0,1738 (89,87)	0,1434 (74,15)	0,1276 (65,98)
pH 7,0, Fosfato	mg/ml (% de estabilidad)	0,2047 (100,00)	0,1638 (80,02)	0,1247 (60,92)	0,1056 (51,59)
pH 8,0, Fosfato	mg/ml (% de estabilidad)	0,1906 (100,00)	0,0793 (41,61)	0,0369 (19,36)	0,0280 (14,69)

EJEMPLO 11

Este ejemplo describe el perfil de pH del extracto acuoso de las microesferas de octreotida que contienen el agente modificador de la liberación (arginina y ácido acético glacial), y el perfil de pH del medio de liberación in vitro se incubó a 55 ºC con 10 mg de microesferas/ml. Este ejemplo también describe el perfil de pH del extracto acuoso de las microesferas de octreotida que no contienen ningún agente modificador de la liberación, y el perfil de pH del medio de liberación *in vitro*. En este ejemplo se comparan, además, los perfiles de pH obtenidos para las microesferas de octreotida que contienen o no contienen ningún agente modificador de la liberación.

Para estos estudios, se prepararon 50 mg de microesferas cargadas con acetato de octreotida que contienen el agente modificador de la liberación como se describe en el Ejemplo 8, y las microesferas cargadas con acetato de octreotida que no contienen el agente modificador de la liberación se prepararon como se describe en el Ejemplo 9. Las microesferas se incubaron en 5 ml de agua purificada a 55 ºC. El medio de liberación se separó de las microesferas en diversos momentos designados, y las microesferas restantes se lavaron con agua. Se midió el pH del medio de liberación. Además, el extracto acuoso de las microesferas se preparó disolviendo las microesferas restantes utilizando 2 ml de diclorometano y extrayendo con 5 ml de agua purificada. Se midió el pH del extracto acuoso, que representa el pH de las microesferas. El perfil de pH del medio de liberación y el extracto acuoso de las microesferas se obtuvo representando el tiempo frente al pH. Los datos obtenidos se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6: Los perfiles de pH de los medios de liberación y extractos de microesferas para las microesferas que contienen o no contienen un agente modificador de la liberación

Microesfera	Muestra	Tiempo			
		0 días	1 días	2 días	4 días
Cargada con 0,6 % de arginina	(Medio liberado) extracto de microesfera	(5,67) 5,06	(3,55) 4,02	(3,24) 3,63	(2,54) 3,47
Sin arginina	(Medio liberado) extracto de microesfera	(5,69) 6,61	(3,61) 4,41	(3,09) 3,68	(2,47) 3,06

Como se puede ver en la Tabla 6, con respecto a las microesferas cargadas con acetato de octreotida que contienen el agente modificador de la liberación, el pH del medio de liberación de las microesferas disminuyó rápidamente a partir de un pH de aproximadamente 5,7 a un pH de aproximadamente 3,6 dentro de las primeras 24 horas, y se disminuyó además hasta un pH de aproximadamente 2,5 por 4 días. Este cambio rápido y pronunciado probablemente se debió a los productos de degradación ácidos de polímero PLGA. En contraste, el cambio de pH del extracto acuoso de las microesferas que contienen el agente modificador de la liberación fue relativamente mínimo durante el mismo transcurso de tiempo. Específicamente, el extracto acuoso se redujo de un pH de aproximadamente 5,0 hasta un pH de aproximadamente 4,0 en las primeras 24 horas, y adicionalmente se redujo a un pH de aproximadamente 3,5 por 4 días.

Como también puede verse en la Tabla 6, con respecto a las microesferas cargadas con acetato de octreotida que no contienen el agente modificador de la liberación, el perfil de su medio de liberación fue muy similar al perfil obtenido para el medio de liberación de las microesferas cargadas con acetato de octreotida que contienen el agente modificador de la liberación. Específicamente, para las microesferas que no contienen el agente modificador de la liberación, el pH disminuyó rápidamente a partir de un pH de aproximadamente 5,7 a un pH de aproximadamente 3,6 en las primeras 24 horas, y adicionalmente se redujo a un pH de aproximadamente 2,5 por 4 días, probablemente debido a los productos de degradación ácidos del polímero PLGA. En comparación, el cambio de pH

del extracto acuoso de las microesferas que no contienen el agente modificador de la liberación fue mucho mayor que la observada para el extracto acuoso de las microesferas cargadas con acetato de octreotida que contienen el agente modificador de la liberación. Específicamente, el pH disminuyó drásticamente desde aproximadamente 6,6 a aproximadamente 4,5 en las primeras 24 horas, y adicionalmente se redujo a un pH de aproximadamente 3,0 por 4 días.

Estos resultados confirman que el cambio mínimo de pH en el extracto acuoso de las microesferas que contienen el agente modificador de la liberación parece deberse a los beneficios del agente modificador de la liberación empleada. Este agente modificador de la liberación, una mezcla de arginina y ácido acético glacial, por lo tanto, parece funcionar como un agente estabilizante del pH. El pH se mantuvo dentro del intervalo de pH de estabilidad óptima del agente activo diana, acetato de octreotida, es decir, a un pH de entre 3,0 y 5,0. En contraste distinto, para las microesferas que no contienen el agente modificador de la liberación el pH comenzó fuera del intervalo óptimo (es decir, un pH de aproximadamente 6,6) y disminuyó rápidamente.

EJEMPLO 12

Este ejemplo describe la cuantificación de la liberación *in vitro* de las microesferas cargadas con octreotida que contienen un agente modificador de la liberación (arginina y ácido acético glacial) en comparación con las microesferas cargadas con octreotida que no contienen ningún agente modificador de la liberación.

Para estos estudios, aproximadamente 50 mg de microesferas se dispersaron en 5 ml de agua purificada (el medio de liberación) a 55 ºC. Los tubos de muestra se retiraron de la incubadora de 55 ºC en varios momentos designados, y se centrifugaron para separar las microesferas y liberar el medio. La concentración de octreotida liberada de las microesferas se determinó mediante HPLC, y se calculó como el % de liberación. Los datos obtenidos se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7: % de liberación acumulativa *in vitro* de octreotida

Tiempo (día)	Cargada con 0,6 % de arginina	Sin arginina
0	0	0
0,04	1,0	39,7
1	11,1	49,8
2	27,9	86,6
4	93,3	97,5

Como se puede ver en la Tabla 7, para las microesferas que no contienen el agente modificador de la liberación, se observó una descarga muy rápida, hasta 40 % de liberación dentro de aproximadamente una hora, liberación de aproximadamente 50 % en el día 1, liberación de aproximadamente el 87 % el día 2, y aproximadamente 100 % de liberación para el Día 4. En comparación, para las microesferas que contienen el agente modificador de la liberación, la liberación fue constante y prolongada, sin una descarga inicial importante. Específicamente se observó una liberación de aproximadamente el 10 % para el Día 1, una liberación de aproximadamente 30 % para el día 2, y la liberación de aproximadamente el 95 % para el día 4.

REIVINDICACIONES

1. Un sistema de administración de microesferas para la liberación sostenida de un agente activo, comprendiendo dicho sistema de liberación un polímero biodegradable, un agente activo y un aminoácido básico, en el que dicho agente activo y el aminoácido básico se distribuyen de forma uniforme en y a través de dicha matriz de polímero,
en el que dicho aminoácido básico estabiliza dicho agente activo y potencia su liberación sostenida, y en el que dicho sistema de liberación comprende además un ácido orgánico distribuido de forma uniforme en y a través de dicha matriz de polímero.

2. El sistema de suministro de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho polímero biodegradable se selecciona de ácido poliláctico, ácido poliglicólico y copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico.

3. El sistema de liberación de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde dicho agente activo es un agente terapéutico.

4. El sistema de liberación de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde dicho agente activo es un agente diagnóstico.

5. El sistema de liberación de acuerdo cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde dicho agente activo se selecciona de péptidos, proteínas, lípidos, polisacáridos, y ácidos nucleicos.

6. El sistema de suministro de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde dicho agente activo se selecciona de hormonas, antibióticos, antineoplásicos, anestésicos, antipsicóticos, anticoagulantes, agentes vasoactivos, agentes neuroactivos, agentes inmunomoduladores, antivirales, anticuerpos y antígenos.

7. El sistema de liberación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde dicho agente activo es un péptido.

8. El sistema de liberación de acuerdo cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde dicho agente activo se selecciona de calcitonina de salmón, leuprolida y octreotida.

9. El sistema de liberación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde dicho agente activo es risperidona.

10. El sistema de liberación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde dicho agente activo es goserelina.

11. El sistema de liberación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde dicho aminoácido básico es L-arginina.

12. El sistema de liberación de acuerdo con la reivindicación 11, donde dicho sistema de liberación comprende adicionalmente ácido acético glacial distribuido de forma uniforme en y a través de dicha matriz de polímero.

13. El sistema de liberación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde la cantidad de dicho aminoácido básico está entre 0,5 % a 0,7 % (p/p).

14. El sistema de liberación de acuerdo con la reivindicación 13, en el que la cantidad de dicho aminoácido básico es de 0,60 % (p/p).

15. El sistema de liberación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde dicho agente activo es leuprolida.

16. Una composición farmacéutica para inyección que comprende el sistema de liberación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

17. Un proceso para preparar un sistema de liberación de microesferas, que comprende:

(a) disolver un polímero biodegradable en un primer disolvente orgánico que es inmiscible en agua para producir una primera mezcla;
(b) disolver un agente activo en un segundo disolvente orgánico que es miscible en agua para producir una segunda mezcla;
(c) producir una tercera mezcla disolviendo por separado un aminoácido básico en (i) un tercer disolvente orgánico que es miscible en agua, o (ii) una mezcla de dicho segundo disolvente orgánico y dicho tercer disolvente orgánico;
(d) mezclar dicha primera mezcla, dicha segunda mezcla y dicha tercera mezcla para preparar una fase

orgánica dispersa homogénea;
(e) emulsionar dicha fase dispersa orgánica homogénea en una solución acuosa para producir microgotas; y
(f) retirar dicho primer disolvente orgánico, dicho segundo disolvente orgánico y dicho tercer disolvente orgánico, de dichas microgotas para producir dichas microesferas.

18. El proceso de acuerdo con la reivindicación 17, donde la emulsificación se lleva a cabo en una fase continua acuosa que comprende un tensioactivo.

19. El proceso de acuerdo con la reivindicación 17, donde la emulsificación se lleva a cabo en una fase continua acuosa que comprende alcohol polivinílico en agua.

20. El proceso de acuerdo con la reivindicación 17, donde dicho primer disolvente orgánico, dicho segundo disolvente orgánico y dicho tercer disolvente orgánico se eliminan mediante extracción y evaporación.

21. El proceso de acuerdo con la reivindicación 17, donde dicho primer disolvente orgánico, dicho segundo disolvente orgánico y dicho tercer disolvente orgánico se eliminan mediante el aumento de la temperatura de dichas microgotas a de 30 ºC a 45 ºC, y agitanado durante 30 minutos a 360 minutos.

22. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 21, que comprende además la recuperación de dichas microesferas.

23. El proceso de acuerdo con la reivindicación 22, donde dichas microesferas se recuperan por filtración.

24. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 23, donde dicho sistema de liberación de microesferas es una formulación farmacéutica para inyección.

25. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 23, donde dicho primer disolvente comprende diclorometano o cloroformo.

26. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 23, donde dicho segundo disolvente comprende metanol o etanol.

27. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 23, donde dicho tercer disolvente comprende ácido acético y metanol.

28. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 27, donde dicho polímero biodegradable se selecciona de ácido poliláctico, ácido poliglicólico, y copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico.

29. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 28, donde dicho agente activo es como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 10.

30. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 29, donde dicho sistema de liberación es como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12.

31. El proceso de acuerdo con la reivindicación 17, donde dicho aminoácido básico en la etapa (c) está en una mezcla con un ácido orgánico y en el que la cantidad de dicho aminoácido básico comprende de 0,1 a 1,0 % (p/p) de dicho sistema de liberación de microesferas.