(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 536 235**

(51) Int. CI.:

A61K 38/22 (2006.01)
A61K 38/26 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/16 (2006.01)
A61K 9/50 (2006.01)
A61K 47/34 (2006.01)
A61K 31/573 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2004 E 11180259 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015 EP 2409707**

(54) Título: **Dispositivo polimérico de liberación prolongada**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.05.2015

(73) Titular/es:

ALKERMES PHARMA IRELAND LIMITED (50.0%)
Connaught House, 1 Burlington Road
Dublin 4, IE y
AMYLIN PHARMACEUTICALS, LLC (50.0%)

(72) Inventor/es:

WRIGHT, STEVEN G.;
CHRISTENSON, TROY;
YEOH, THEAN Y.;
RICKEY, MICHAEL E.;
HOTZ, JOYCE M.;
KUMAR, RAJESH;
COSTANTINO, HENRY R.;
SMITH, CHRISTINE;
LOKENSGORD, DAVID y
ONG, JOHN

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

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

Dispositivo polimérico de liberación prolongada

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Numerosas proteínas y péptidos, denominadas colectivamente en la presente polipéptidos, exhiben actividad biológica *in vivo* y son útiles como medicamentos. Muchas enfermedades o afecciones requieren la administración de un nivel prolongado de medicamento para proporcionar los efectos profilácticos y/o terapéuticos más eficaces. Los niveles prolongados se logran a menudo mediante la administración de polipéptidos biológicamente activos mediante inyecciones subcutáneas frecuentes, lo que a menudo conlleva niveles fluctuantes del medicamento y un cumplimiento terapéutico deficiente por parte del paciente.

Como una alternativa, se puede emplear el uso de materiales biodegradables tales como polímeros, que encapsulan el medicamento como un sistema de suministro prolongado. El uso de polímeros biodegradables, por ejemplo, en forma de micropartículas o microportadores, puede proporcionar una liberación prolongada de un medicamento utilizando la biodegradabilidad intrínseca del polímero para controlar la liberación del medicamento y proporcionar de esta manera un nivel prolongado más constante del medicamento y un mejor cumplimiento terapéutico por parte del paciente.

Sin embargo, estos dispositivos de liberación prolongada pueden exhibir a menudo liberaciones iniciales bruscas elevadas del medicamento y una liberación mínima más tarde, lo que conlleva niveles séricos del fármaco fuera del intervalo terapéutico y/o una biodisponibilidad deficiente del medicamento. Además, la presencia del polímero, las temperaturas fisiológicas y la respuesta corporal a la composición de liberación prolongada puede provocar la alteración del medicamento (p. ej., degradación, agregación) e interferir de esta manera con el perfil de liberación deseado para el medicamento.

El documento WO 03/020245 describe la liberación prolongada de micropartículas de exendina-4 que comprenden sacarosa y tampón.

Además, los métodos utilizados para generar composiciones de liberación prolongada pueden conllevar una pérdida de la actividad del medicamento debido a la inestabilidad del medicamento y los efectos de degradación de los pasos del procesamiento. Los efectos de degradación son particularmente problemáticos cuando el medicamento es un polipéptido.

Por lo tanto, se necesita un medio para administrar polipéptidos biológicamente activos de manera prolongada donde la cantidad de polipéptido que se suministre esté en los niveles terapéuticos y mantenga la actividad y potencia durante el periodo de liberación deseado. Aunque se está desarrollando mucho trabajo para abordar estos problemas, se requieren soluciones novedosas.

COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

La presente divulgación se refiere a una composición para la liberación prolongada de un polipéptido biológicamente activo, que comprende un polímero biocompatible que tiene el polipéptido biológicamente activo dispersado en él de modo que esté presente de un 3% (p/p) a un 10% (p/p) del peso de la composición y sacarosa dispersada en él de modo que esté presente en un 2% (p/p) del peso de la composición, donde el polipéptido biológicamente activo es exendina-4, donde el volumen de poro total de la composición es de 0.1 mL/g o menos según se determina utilizando porosimetría por intrusión de mercurio y donde la composición está exenta de tampones y de sales de desestabilización salina.

La invención se refiere al descubrimiento de que se pueden lograr perfiles de liberación superiores (tales como aquellos caracterizados por una relación de la $C_{máx}$ respecto a la C_{prom} de aproximadamente 3 o menos) con una formulación que contiene pocos componentes optimizando la relación del aceite de silicona respecto al polímero en el proceso de fabricación para lograr de esta manera un volumen de poro bajo. Esta invención se refiere a composiciones para la liberación prolongada de agentes, tales como polipéptidos biológicamente activos, y métodos para generar y utilizar tales composiciones para la liberación prolongada de polipéptidos biológicamente activos. Las composiciones de liberación prolongada de esta invención comprenden un polímero biocompatible, un agente, tal como un polipéptido biológicamente activo y un azúcar. El polipéptido y el azúcar se dispersan en el polímero. El polipéptido y el azúcar se pueden dispersar independientemente o, de manera más preferida, conjuntamente. La composición de liberación prolongada proporciona un perfil de liberación deseable y constante. En una realización particular, el perfil se caracteriza por tener una relación de la $C_{máx}$ respecto a la C_{prom} de aproximadamente 3 o menos. El polipéptido biológicamente activo es exendina-4. El azúcar es sacarosa.

La composición de liberación prolongada comprende un polímero biocompatible, un agente, tal como un polipéptido biológicamente activo y un azúcar donde la composición tiene un volumen de poro total de aproximadamente 0.1 mL/g o menos. El volumen de poro total se determina utilizando porosimetría por intrusión de mercurio.

La composición de liberación prolongada está constituida esencialmente, o como alternativa, por un polímero biocompatible, exendina-4 con una concentración de aproximadamente un 3% p/p y sacarosa con una concentración de un 2% p/p. El polímero biocompatible es preferentemente un polímero de poli lactida coglicólido.

La invención también incluye un método para generar composiciones para la liberación prolongada de agentes biológicamente activos, tales como polipéptidos, que comprende generar una mezcla combinando una fase acuosa que comprende agua, un agente, tal como un polipéptido hidrosoluble, y un azúcar con una fase oleosa que comprende un polímero biocompatible y un disolvente para el polímero; generar una emulsión agua-en-aceite, por ejemplo, sonicando u homogeneizando la mezcla; añadir aceite de silicona a la mezcla para generar micropartículas embrionarias; transferir las micropartículas embrionarias a un disolvente de desactivación para endurecer las micropartículas; recoger las micropartículas endurecidas; y secar las micropartículas endurecidas. En una realización particular, el aceite de silicona se añade en una cantidad suficiente para lograr una relación del aceite de silicona respecto al disolvente del polímero de aproximadamente 1.5:1. Además, o como alternativa, el polímero está presente en la fase oleosa en aproximadamente un 10% p/p o menos.

La composición de esta invención se puede administrar a un ser humano, o a otro animal, por inyección, implantación (p. ej., por vía subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intracraneal e intradérmica), administración a membranas mucosas (p. ej., por vía intranasal, intravaginal, intrapulmonar o por medio de un supositorio), o suministro *in situ* (p. ej., por enema o un pulverizado en aerosol).

Cuando se haya incorporado una hormona a la composición de liberación prolongada, particularmente exendina-4, la composición se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz para tratar a un paciente que padece diabetes *mellitus*, tolerancia alterada a la glucosa (TAG), obesidad, trastorno cardiovascular (CV) o cualquier otro trastorno que se pueda tratar mediante uno de los polipéptidos o derivados anteriores, análogos o agonistas de estos.

La utilización de un azúcar en las composiciones de liberación sostenida de la invención mejora la biodisponibilidad del polipéptido biológicamente activo incorporado, p. ej., péptidos antidiabéticos o glucorreguladores y minimiza pérdidas de actividad debidas a la inestabilidad y/o interacciones químicas entre el polipéptido y otros componentes contenidos o utilizados para generar la composición de liberación prolongada a la vez que mantiene un perfil de liberación excelente.

Las ventajas de las formulaciones de liberación prolongada tal y como se describen en la presente incluyen un mayor cumplimiento terapéutico por parte del paciente y aceptación al eliminar la necesidad de una administración repetitiva, un mayor beneficio terapéutico al eliminar fluctuaciones en la concentración del agente activo en los niveles sanguíneos al proporcionar un perfil de liberación deseable y una disminución potencial de la cantidad total del polipéptido biológicamente activo necesaria para proporcionar un beneficio terapéutico al reducir estas fluctuaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La FIG. 1 es un gráfico que muestra la relación entre el diámetro de poro promedio y la liberación *in vitro* para las composiciones de liberación prolongada descritas en la presente (S. A. = Sulfato de amonio).

La FIG. 2 es un gráfico que muestra el efecto de la porosidad en la liberación *in vitro* de exendina-4 desde las micropartículas y el impacto que las condiciones del proceso, concretamente la relación del aceite de silicona respecto al diclorometano, tienen en la porosidad de las micropartículas generadas.

Las FIGS. 3A-3B son barridos de SEM criogénico para formulaciones de micropartículas seleccionadas descritas en la presente.

Las FIGS. 4A-4D son barridos de SEM criogénico para formulaciones de micropartículas seleccionadas descritas en la presente.

La FIG. 5 es una representación gráfica del % de etanol y diclorometano residuales frente a la Tg para las formulaciones de micropartículas descritas en la presente.

La FIG. 6 es una curva farmacocinética representativa (concentración, pg/mL frente al tiempo, los días con inserción muestran las concentraciones durante el primer día) para la Formulación 2-1 (3% de exendina-4 y 2% de sacarosa), Formulación 1 (3% de exendina-4 sola) y Formulación 4 (3% de exendina-4 y 0.5% de sulfato de amonio).

La FIG. 7 es un gráfico del perfil de liberación *in vivo* para las tres Formulaciones de micropartículas 2, 2-1 y 2-2.

La FIG. 8 es un gráfico de los datos farmacocinéticos para las Formulaciones de micropartículas 5-1, 5-2 y 5-3.

La FIG. 9 es un gráfico que ilustra la relación entre los parámetros del proceso y el tamaño de la emulsión interna que se logra con el proceso.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Esta invención se refiere a composiciones para la liberación prolongada de polipéptidos biológicamente activos, y métodos para generar y utilizar dichas composiciones, para los polipéptidos biológicamente activos de liberación prolongada. Las composiciones de liberación prolongada de esta invención comprenden un polímero biocompatible, un agente, tal como un polipéptido biológicamente activo, y un azúcar. El agente y el azúcar se dispersan en el polímero biocompatible independientemente o, de manera más preferida, conjuntamente. En una realización particular, la composición de liberación prolongada se caracteriza por un perfil de liberación que tiene una relación de la concentración máxima sérica ($C_{máx}$) respecto a la concentración sérica promedio (C_{prom}) de aproximadamente 3 o menos. Tal como se emplean en la presente, los término “un” y “uno/a” se refieren a uno/a o más.

El agente

El agente es exendina-4.

Los polipéptidos biológicamente activos tal y como se utilizan en la presente se refieren de manera colectiva a proteínas y péptidos biológicamente activos y a las sales farmacéuticamente aceptables de estos, que están en su forma molecular biológicamente activa cuando se liberan *in vivo*, y por lo tanto poseen las propiedades terapéuticas, profilácticas y/o diagnósticas *in vivo* deseadas. Normalmente, el polipéptido tiene un peso molecular comprendido entre 500 y 200 000 Dalton.

La exendina-4 es un polipéptido de 39 aminoácidos. La secuencia de aminoácidos de la exendina-4 puede encontrarse en la patente de los EE. UU. N.º 5 424 286 emitida a nombre de Eng el 13 de junio de 1995, que se incorpora a la presente por referencia. AC2993 y la exenatida son sinónimos del término exendina-4. Se ha demostrado que la exendina-4 estimula la secreción de insulina en seres humanos y animales en presencia de concentraciones elevadas de glucosa sanguínea pero no durante periodos de concentraciones bajas de glucosa sanguínea (hipoglucemia). También se ha demostrado que suprime la secreción de glucagón, ralentiza el vaciado gástrico y afecta a la ingesta de alimentos y al peso corporal, así como también otras acciones. Como tal, la exendina-4 y los análogos y agonistas de esta pueden ser útiles en el tratamiento de la diabetes *mellitus*, TAG, obesidad, etc.

La cantidad de polipéptido biológicamente activo, que está contenido dentro de la matriz polimérica de una composición de liberación prolongada es una cantidad terapéutica, diagnóstica o profilácticamente eficaz que el experto en la técnica puede determinar teniendo en cuenta factores tales como el peso corporal, afección que se va a tratar, tipo de polímero utilizado y velocidad de liberación desde el polímero.

La cantidad de polipéptido variará dependiendo del efecto deseado, potencia del agente, niveles de liberación planeados y el intervalo de tiempo a lo largo del cual se liberará el polipéptido. Se obtuvieron perfiles de liberación superiores cuando el agente, p. ej., exendina-4, se añadió en aproximadamente un 3% p/p.

El azúcar

Se obtuvieron perfiles de liberación excelentes incorporando un 2% (p/p) de sacarosa.

Como alternativa, se puede hacer referencia a la cantidad de azúcar presente en la composición de liberación prolongada en forma de una relación ponderal con el agente o el polipéptido biológicamente activo. En una realización particularmente preferida, la relación del polipéptido (exendina-4) respecto al azúcar (sacarosa) es de aproximadamente 3:2 (p/p).

También se pueden utilizar combinaciones de dos o más azúcares. La cantidad de azúcar, cuando se emplea una combinación, es la misma que los intervalos mencionados anteriormente.

Cuando el polipéptido es exendina-4, el azúcar es preferentemente sacarosa, manitol o una combinación de estos.

El polímero

Los polímeros adecuados para generar la composición de liberación prolongada de esta invención son polímeros biocompatibles que pueden ser polímeros biodegradables o no biodegradables o mezclas o copolímeros de estos. Un polímero es biocompatible si el polímero y cualesquiera productos de degradación del polímero son atóxicos para el receptor y no poseen tampoco efectos no deseados ni dañinos significativos en el cuerpo del receptor tal como una reacción inmunológica sustancial en el sitio de inyección.

Biodegradable, tal y como se define en la presente, significa que la composición se degradará o erosionará *in vivo* para generar especies químicas o unidades más pequeñas. La degradación puede tener lugar, por ejemplo,

mediante procesos enzimáticos, químicos y físicos. Los polímeros biodegradables, biocompatibles adecuados incluyen, por ejemplo, polilactidas, poliglicólidos, poli(lactida-co-glicólidos), ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, policarbonatos, poliesteramidas, polianhídridos, poliaminoácidos, poliortoésteres, polidioxanonas, polialquilenalquilatos, copolímeros o polietilenglicol y poliortoéster, poliuretano biodegradable, mezclas de estos y copolímeros de estos.

Los polímeros no biodegradables biocompatibles adecuados incluyen polímeros no biodegradables seleccionados a partir del grupo constituido por poliacrilatos, polímeros de acetatos de vinilo-etileno y otros acetatos de celulosa sustituidos con acilo, poliuretanos no degradables, poliestirenos, cloruro de polivinilo, fluoruro de polivinilo, polivinilimidazol, poliolefinas clorosulfonadas, óxido de polietileno, mezclas de estos y copolímeros de estos.

Un experto en la técnica puede determinar los pesos moleculares aceptables para los polímeros utilizados en esta invención teniendo en cuenta factores tales como la velocidad de degradación del polímero deseada, las propiedades físicas tales como la resistencia mecánica, química del grupo terminal y velocidad de disolución del polímero en el disolvente. Normalmente, un intervalo aceptable de peso molecular es de aproximadamente 2000 Dalton a aproximadamente 2 000 000 Dalton. En una realización preferida, el polímero es un polímero o copolímero biodegradable. En una realización más preferida, el polímero es una poli(lactida-co-glicólido) (en lo sucesivo “PLG”) con una relación lactida:glicólido de aproximadamente 1:1 y un peso molecular de aproximadamente 10 000 Dalton a aproximadamente 90 000 Dalton. En una realización aún más preferida, el peso molecular de la PLG utilizada en la presente invención tiene un peso molecular de aproximadamente 30 000 Dalton a aproximadamente 70 000 Dalton tal como de aproximadamente 50 000 a aproximadamente 60 000 Dalton.

Las PLG pueden poseer grupos terminales de tipo ácido o grupos terminales bloqueados, tales como los que se pueden obtener esterificando el ácido. Se obtuvieron resultados excelentes con una PLG con un grupo terminal de tipo ácido.

Los polímeros también pueden seleccionarse basándose en la viscosidad intrínseca del polímero. Las viscosidades intrínsecas adecuadas incluyen de aproximadamente 0.06 a 1.0 dL/g, tal como de aproximadamente 0.2 a 0.6 dL/g, más preferentemente entre aproximadamente 0.3 y 0.5 dL/g. Se escogen como polímeros preferidos los que se degradarán entre 3 y 4 semanas. Pueden adquirirse polímeros adecuados de Alkermes, Inc. con el nombre comercial Medisorb® tales como los comercializados como 5050 DL 3A o 5050 DL 4A. También se podrán utilizar las PLG Resomer® de Boehringer Ingelheim, tales como Resomer® RG503 y 503H.

La composición de liberación prolongada de esta invención se puede generar con muchas formas tales como una película, una bolita, un cilindro, un disco o una micropartícula. Una micropartícula, tal y como se define en la presente, comprende un componente polimérico que tiene un diámetro de menos de aproximadamente un milímetro y que tiene un polipéptido biológicamente activo dispersado o disuelto en él. Una micropartícula puede tener una forma esférica, no esférica o irregular. Normalmente la micropartícula tendrá un tamaño adecuado para la inyección. Un intervalo de tamaño normal para las micropartículas es de 1000 micras o menos. En una realización particular, las micropartículas tienen un diámetro comprendido entre aproximadamente uno y aproximadamente 180 micras.

Excipientes adicionales

Aunque es posible que se puedan añadir excipientes adicionales a las formulaciones de la invención reclamada, tal y como se sabe en la técnica, un descubrimiento sorprendente de la presente invención es que se puede lograr un perfil de liberación excelente con la formulación simple descrita en la presente. Los excipientes adicionales de este tipo pueden incrementar o disminuir la velocidad de liberación del agente. Los ingredientes que pueden incrementar sustancialmente la velocidad de liberación incluyen agentes que forman poros y excipientes que facilitan la degradación del polímero. Por ejemplo, la velocidad de hidrólisis del polímero se incrementa en un pH no neutro. Por lo tanto, se puede añadir un excipiente ácido o básico como un ácido inorgánico o una base inorgánica a la solución polimérica, usada para generar las micropartículas, para alterar la velocidad de erosión del polímero. Los ingredientes que pueden disminuir sustancialmente la velocidad de liberación incluyen excipientes que disminuyen la hidrosolubilidad del agente.

Una realización preferida de las formulaciones de liberación prolongada descritas está constituida esencialmente por el polímero biocompatible, el agente y el azúcar. Con “está constituido/a” esencialmente por” se quiere dar a entender la ausencia de ingredientes que incrementan sustancialmente la velocidad de liberación del agente activo a partir de la formulación. Los ejemplos de excipientes adicionales que no se esperaría que incrementaran o disminuyeran sustancialmente la velocidad de liberación del agente incluyen agentes activos adicionales e ingredientes inertes.

En otra realización más, la formulación está constituida por el polímero biocompatible, el agente y el azúcar. Con “está constituido/a por” se quiere dar a entender la ausencia de componentes o ingredientes diferentes de aquellos enumerados y de niveles residuales de materiales de partida, disolventes, etc. del proceso.

Constituyó un descubrimiento sorprendente que los agentes tamponantes tales como acetato, citrato, fosfato u otro tampón biológicamente compatible no eran necesarios en la fase acuosa para lograr una formulación de liberación prolongada con el agente, p. ej., exendina-4, con una biodisponibilidad de buena a excelente. También constituyó un descubrimiento sorprendente que las sales de desestabilización salina no eran necesarias para controlar las liberaciones bruscas del agente, p. ej., exendina-4. Como tales, las composiciones de la invención también incluyen composiciones, tal y como se ha descrito en la presente, en ausencia sustancial (o total) de tampón y/o sales de desestabilización salina.

Como alternativa, o de manera adicional, la composición de liberación prolongada de la invención tiene una porosidad baja. En este tipo de realizaciones, la composición de liberación prolongada comprende un polímero biocompatible, un polipéptido biológicamente activo y un azúcar donde la composición tiene un volumen de poro total de aproximadamente 0.1 mL/g o menos. En una realización específica, el volumen de poro total se determina utilizando porosimetría por intrusión de mercurio, p. ej., según se describe más detalladamente posteriormente.

Administración

Las composiciones de la invención se pueden administrar de acuerdo con métodos conocidos de manera general en la técnica. La composición de esta invención se puede administrar a un paciente (p. ej., un ser humano que necesite el agente) o a otro animal mediante inyección, implantación (p. ej., por vía subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intracraneal e intradérmica), administración a membranas mucosas (p. ej., por vía intranasal, intravaginal, intrapulmonar o por medio de un supositorio) o suministro *in situ* (p. ej., mediante un enema o un pulverizado en aerosol).

La composición de liberación prolongada se puede administrar utilizando cualquier programación posológica que logre los niveles terapéuticos deseados durante el periodo de tiempo deseado. Por ejemplo, se puede administrar la composición de liberación prolongada y monitorizar al paciente hasta que los niveles del fármaco que se está suministrando vuelvan a los valores iniciales. Tras el regreso a los valores iniciales, se puede administrar de nuevo la composición de liberación prolongada. Como alternativa, la administración posterior de la composición de liberación prolongada puede tener lugar antes de alcanzar los niveles correspondientes a los valores iniciales en el paciente.

Por ejemplo, cuando se haya incorporado una hormona a la composición de liberación prolongada, particularmente exendina-4, se administra la composición en una cantidad terapéuticamente eficaz para tratar a un paciente que padezca diabetes *mellitus*, TAG, obesidad, un trastorno cardiovascular (CV) o cualquier otro trastorno que se pueda tratar mediante uno de los polipéptidos anteriores o derivados, análogos o agonistas de estos.

Otras afecciones que se pueden tratar administrando la composición de liberación prolongada de la invención incluyen la diabetes de tipo I y tipo II que se pueden tratar con una composición de liberación prolongada a la que se ha incorporado insulina. Además, cuando el polipéptido incorporado es FSH o análogos de este la composición de liberación prolongada se puede utilizar para tratar la infertilidad. En otros casos, la composición de liberación prolongada se puede utilizar para tratar esclerosis múltiple cuando el polipéptido incorporado es interferón beta o una muteína de este. Como se puede advertir, la composición de liberación prolongada se puede utilizar para tratar una enfermedad que responda a la administración de un polipéptido concreto.

En una realización adicional, la composición de liberación prolongada de la presente invención se puede administrar conjuntamente con un corticoesteroide. La administración conjunta de la composición de liberación prolongada de la invención con un corticoesteroide puede incrementar adicionalmente la biodisponibilidad del polipéptido biológicamente activo de la composición de liberación prolongada. La administración conjunta de un corticoesteroide combinado con composiciones de liberación prolongada se describe detalladamente en la solicitud de patente de los EE. UU. 60/419 430 titulada "Method of Modifying the Release Profile of Sustained Release Compositions" de Dasch *et al*.

Los corticoesteroides, tal y como se definen en la presente, se refieren a agentes antiinflamatorio esteroides también denominados glucocorticoides.

Los corticoesteroides adecuados incluyen, sin carácter limitante, 21-Acetoxipregnenolona, Alclometasona, Algestona, Amcinonida, Beclometasona, Betametasona, Budesonida, Cloroprednisona, Clobetasol, Clobetasona, Clocortolona, Cloprednol, Corticosterona, Cortisona, Cortivazol, Deflazacort, Desonida, Desoximetasona, Dexametasona, Disflorasona, Diflucortolona, Difluprednato, Enoxolona, Fluazacort, Flucloronida, Flumetasona, Flunisolida, Acetónido de Flucinolona, Fluocinonida, Fluocortin Butilo, Flucortolona, Fluorometolona, Acetato de Fluperolona, Acetato de Fluprednideno, Fluprednisolona, Flurandrenolida, Propionato de Fluticasona, Formocortal, Halcinonida, Propionato de Halobetasol, Halometasona, Acetato de Halopredona, Hidrocortamato, Hidrocortisona, Etabonato de Loteprednol, Mazipredona, Medrisona, Meprednisona, Metilprednisolona, Furoato de Mometasona, Parametasona, Prednicarbato, Prednisolona, Dietilamino-acetato - Prednisolona 25, Fosfato sódico de Prednisolona, Prednisona, Prednival, Prednilideno, Rimexolona, Tixocortol, Triamcinolona (todas las formas), por ejemplo, Acetónido de Triamcinolona, Éster metílico del ácido 21-oico del Acetónido de Triamcinolona, Benetónido de

Triamcinolona, Hexacetónido de Triamcinolona, Diacetato de Triamcinolona, mezclas y sales farmacéuticamente aceptables de estos y cualquier otro derivado y análogo de estos.

En una realización, el corticoesteroide se puede incorporar conjuntamente a la composición de liberación prolongada que comprende el polímero biocompatible y el agente polipeptídico biológicamente activo incorporados a ella.

En otra realización, el corticoesteroide se puede incorporar independientemente a un segundo polímero biocompatible. El segundo polímero biocompatible puede ser el mismo o diferente del primer polímero biocompatible al que se ha incorporado el agente polipeptídico biológicamente activo.

En otra realización más, el corticoesteroide puede estar presente en un estado no encapsulado pero mezclado con la composición de liberación prolongada. Por ejemplo, el corticoesteroide puede estar solubilizado en el vehículo utilizado para suministrar la composición de liberación prolongada. Como alternativa, el corticoesteroide puede estar presente como un sólido suspendido en un vehículo apropiado. Además, el corticoesteroide puede estar presente como un polvo que está mezclado con la composición de liberación prolongada.

Se sobreentiende que el corticoesteroide está presente en una cantidad suficiente para incrementar la biodisponibilidad del polipéptido biológicamente activo desde la composición de liberación prolongada. Un incremento en la biodisponibilidad se refiere a un incremento en la biodisponibilidad del polipéptido biológicamente activo desde la composición de liberación prolongada cuando se administra conjuntamente con un corticoesteroide en comparación con la administración en ausencia de un corticoesteroide a lo largo de un periodo de tiempo que comienza dos días después de la administración y finaliza al final del ciclo de liberación de la formulación particular.

Tal y como se utiliza en la presente, el término paciente se refiere a un ser humano, tal como un ser humano que necesite el agente o método diagnóstico, profiláctico o terapéutico.

Tal y como se define en la presente, una liberación prolongada de un polipéptido biológicamente activo es una liberación del polipéptido desde la composición de liberación prolongada de la invención que ocurre a lo largo de un periodo que es superior al periodo durante el cual una cantidad biológicamente significativa del polipéptido estaría disponible tras la administración directa de una solución del polipéptido. Se prefiere que una liberación prolongada sea una liberación que ocurra a lo largo de un periodo de al menos aproximadamente una semana, tal como al menos aproximadamente dos semanas, al menos aproximadamente tres semanas o al menos aproximadamente cuatro semanas. La liberación prolongada puede ser una liberación continua o discontinua, con velocidades de liberación relativamente constantes o variables. La continuidad de liberación y el nivel de liberación puede verse afectado por el tipo de composición polimérica utilizada (p. ej., relaciones entre los monómeros, peso molecular, composición del bloque y combinaciones variables de los polímeros), polipéptido añadido y/o selección de excipientes para producir el efecto deseado.

Tal y como se emplea en la presente, una cantidad terapéuticamente eficaz, una cantidad profilácticamente eficaz o una cantidad diagnósticamente eficaz es la cantidad de la composición de liberación sostenida necesaria para suscitar la respuesta biológica deseada tras la administración.

La $C_{máx}$, tal y como se emplea en la presente, es la concentración sérica máxima de fármaco que ocurre durante el periodo de liberación que se monitoriza.

La C_{prom}, tal y como se emplea en la presente, es la concentración sérica promedio de fármaco que se obtiene al dividir el área bajo la curva (AUC) del perfil de liberación por la duración de la liberación.

Se prefiere que la relación de la $C_{máx}$ respecto a la C_{prom} sea de aproximadamente 3 o menos. Este perfil es particularmente deseable en los polipéptidos antidiabéticos o glucorreguladores, tales como los descritos anteriormente. Una relación de aproximadamente 3 o menos puede proporcionar una C_{prom} en un intervalo terapéutico a la vez que evita efectos secundarios del fármaco adversos que pueden ser el resultado de relaciones más elevadas.

La biodisponibilidad, como término utilizado en la presente, se refiere a la cantidad de agente terapéutico que alcanza el sistema circulatorio. La biodisponibilidad se puede definir como el Área Bajo la Curva (AUC) calculada para el perfil de liberación de un polipéptido particular durante el periodo de tiempo que comienza tras la administración y finaliza en un punto temporal predeterminado. Como se sobreentiende en la técnica, el perfil de liberación se genera representando gráficamente los niveles séricos de un agente biológicamente activo en un sujeto (eje Y) en puntos temporales predeterminados (eje X). La biodisponibilidad se presenta a menudo en términos de % de biodisponibilidad, que es la biodisponibilidad que se logra con un polipéptido particular tras la administración de una composición de liberación prolongada dividida por la biodisponibilidad que se logra con un polipéptido particular tras la administración intravenosa de la misma dosis del fármaco multiplicado por 100.

Se puede confirmar una modificación del perfil de liberación mediante la monitorización farmacocinética apropiada del suero del paciente para determinar la presencia del agente polipeptídico biológicamente activo. Por ejemplo, se

puede utilizar un estudio con anticuerpos específicos (p. ej., ELISA e IRMA), como se sabe en la técnica, para determinar la concentración de ciertos agentes polipeptídicos biológicamente activos en el suero del paciente. En la presente se describe un ejemplo de un estudio de este tipo para la exendina-4.

Se puede utilizar la monitorización farmacodinámica del paciente para monitorizar los efectos terapéuticos del agente en el paciente con el fin de confirmar que el agente liberado mantiene la actividad biológica. Se pueden seleccionar métodos para monitorizar los efectos farmacodinámicos basándose en el agente polipepídico biológicamente activo que se está administrando utilizando técnicas totalmente disponibles.

Fabricación

Existe constancia de varios métodos mediante los cuales se pueden generar las composiciones de liberación prolongada (matrices de polímero/polipéptido biológicamente activo) de la invención, particularmente composiciones que tienen una porosidad baja tales como las descritas en la presente. En los Ejemplos Prácticos se exponen procedimientos detallados para algunos métodos de formación de micropartículas. En una realización preferida, el método de la invención para generar una composición para la liberación prolongada de un polipéptido biológicamente activo incluye generar una mezcla combinando una fase acuosa que comprende agua, un agente, tal como un polipéptido hidrosoluble y un azúcar con una fase oleosa que comprende un polímero biocompatible y un disolvente para el polímero; formar una emulsión de agua-en-aceite; añadir un agente de coacervación, por ejemplo, aceite de silicona, aceite vegetal o aceite mineral a la mezcla para formar micropartículas embrionarias; transferir las micropartículas embrionarias a un disolvente de desactivación para endurecer las micropartículas; recoger las micropartículas endurecidas; y secar las micropartículas endurecidas. Este proceso se denomina generalmente en la presente proceso de agua-aceite-aceite (A/A/A).

Preferentemente, el polímero puede estar presente en la fase oleosa con una concentración que esté comprendida entre aproximadamente un 3% p/p y aproximadamente un 25% p/p, preferentemente, entre aproximadamente un 4% p/p y aproximadamente un 15% p/p, tal como entre aproximadamente un 5% p/p y aproximadamente un 10% p/p. En la presente se obtienen resultados excelentes utilizando una concentración de un 6% p/p de PLG en la fase oleosa.

El polímero se combina generalmente con un disolvente para el polímero. Cuando el polímero es una PLG, tal como las que se prefieren en la presente, se añade el polímero a un disolvente para PLG. Este tipo de disolventes son muy conocidos en la técnica. Un disolvente preferido es el diclorometano.

Se añaden el agente y el azúcar a la fase acuosa, preferentemente a la misma fase acuosa. La concentración del agente es preferentemente de 10 a 100 mg/g, preferentemente entre 50 y 100 mg/g. La concentración de azúcar es preferentemente de 10 a 50 mg/g y de 30 a 50 mg/g.

A continuación se mezclan las dos fases para formar una emulsión. Se prefiere que la emulsión se forme de tal manera que el tamaño de la microgota de la emulsión interior sea inferior a aproximadamente 1 micra, preferentemente inferior a aproximadamente 0.7 micras, más preferentemente inferior a aproximadamente 0.5 micras, tal como aproximadamente 0.4 micras. Se pueden utilizar sonicadores y homogeneizadores para formar una emulsión de este tipo.

Un agente de coacervación, tal como se emplea en la presente, se refiere a cualquier aceite en el que la solución polimérica (polímero y disolvente) no se solubilice fácilmente y, por lo tanto, forme una fase distinta con la solución polimérica. Los agentes de coacervación adecuados para su uso en la presente invención incluyen, sin carácter limitante, aceite de silicona, aceite vegetal y aceite mineral. En una realización particular, el agente de coacervación es aceite de silicona y se añade en una cantidad suficiente para lograr una relación del aceite de silicona respecto al disolvente del polímero de aproximadamente 0.75:1 a aproximadamente 2:1. En una realización particular, la relación de aceite de silicona respecto al polímero es de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1.5:1. En una realización preferida, la relación de aceite de silicona respecto al polímero es de aproximadamente 1.5:1.

Se añade la mezcla resultante a un desactivador, que comprende un componente que no es disolvente polimérico. Los componentes que no son disolventes poliméricos son generalmente muy conocidos en la técnica. Un desactivador particularmente preferido comprende un sistema de disolvente heptano/etanol.

El fármaco sólido también puede encapsularse utilizando una versión modificada del proceso descrito anteriormente. Este proceso modificado se puede denominar sólido/aceite/aceite (S/A/A).

Por ejemplo, se suspendió exendina-4 sólida en diclorometano que contenía un 6% de PLG y se sonicó durante aproximadamente cuatro minutos en hielo. Se llevó a cabo un procesamiento posterior de manera análoga al del método A/A/A.

A continuación se describirá la invención adicional y específicamente mediante los siguientes ejemplos.

EJEMPLIFICACIONES DE LA PREPARACIÓN DE MICROPARTÍCULAS I

Se prepararon las composiciones de liberación prolongada descritas en la presente mediante un proceso de separación de fases. El proceso general se describe a continuación para micropartículas que contienen exendina-4 y sacarosa para un lote con un tamaño de 1 kg.

A. Formación de una emulsión de agua-en-aceite interna

Se creó una emulsión de agua-en-aceite con la ayuda de un homogeneizador. Los homogeneizadores adecuados incluyen un homogeneizador Megatron en línea MT-V 3-65 F/FF/FF, Kinematica AG, Suiza. Se preparó la fase acuosa de la emulsión disolviendo exendina-4 y excipientes tales como sacarosa en agua. La concentración del fármaco en la solución resultante puede ser de aproximadamente 50 mg/g a aproximadamente 100 mg/g. Por ejemplo, cuando el fármaco es exendina-4, la concentración de fármaco en la solución puede ser de aproximadamente 30 a aproximadamente 60 g por 600 g de agua. En una realización particular, se disolvieron 50 g de exendina-4 y 20 g de sacarosa en 600 g de agua para irrigación (WFI, por sus siglas en inglés). Las cantidades especificadas enumeradas anteriormente representan una adición nominal sin ajuste para compensar la concentración del contenido del péptido específica para el lote de exendina-4 utilizado. La fase oleosa de la emulsión se preparó disolviendo el polímero PLGA (p. ej., 930 g de DL4A PLGA 50:50 purificado (Alkermes, Inc) en diclorometano (14.6 kg o un 6% p/p).

A continuación se añadió la fase acuosa a la fase oleosa para formar una emulsión grosera con un mezclador aéreo durante aproximadamente tres minutos. A continuación se homogeneizó la emulsión grosera a aproximadamente 10 000 rpm a temperatura ambiente. Esto conllevó un tamaño de microgota de la emulsión interna de menos de 1 micra. Se sobreentiende que la formación de la emulsión interna se puede lograr utilizando cualquier medio adecuado. Los medios adecuados para la formación de una emulsión incluyen, sin carácter limitante, la homogeneización tal y como se ha descrito anteriormente y sonicación.

B. Formación del coacervado

Se realizó a continuación un paso de coacervación añadiendo aceite de silicona (21.8 kg de Dimeticona, NF, 350 cs) a la emulsión interna a lo largo de un periodo de tiempo de aproximadamente cinco minutos. Esto es equivalente a una relación de 1.5:1, aceite de silicona respecto al diclorometano. El diclorometano de la solución polimérica se reparte en el aceite de silicona y comienza a precipitar el polímero alrededor de la fase acuosa que contiene exendina-4, lo que provoca la microencapsulación. Las microesferas embrionarias formadas de esta manera son suaves y requieren un endurecimiento. Frecuentemente, se permite que las microesferas embrionarias reposen durante un periodo de tiempo corto, por ejemplo, de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 5 minutos antes de proceder al paso de endurecimiento de las microesferas.

C. Endurecimiento y lavado de las microesferas

A continuación se transfirieron las microesferas embrionarias inmediatamente a una mezcla de disolventes de heptano/etanol. El volumen de la mezcla de heptano/etanol necesaria se puede determinar en función del tamaño del lote de microesferas, normalmente una relación 16:1 de diclorometano respecto a los disolventes heptano/etanol. En el presente ejemplo, se utilizaron aproximadamente 210 kg de heptano y 23 kg de etanol en un tanque agitado y enfriado a 3 ºC. Esta mezcla de disolventes endureció las microesferas al extraer más diclorometano de las microesferas. Este paso de endurecimiento también se puede denominar desactivación. Después de ser desactivadas durante 1 hora a 3 ºC, la mezcla de disolventes se decanta y se añade heptano nuevo (13 kg) a 3 ºC y se mantiene durante 1 hora para eliminar el aceite de silicona, etanol y diclorometano residuales en la superficie de las microesferas o se bombea directamente al paso de recogida.

D. Secado y recogida de las microesferas

Al final del paso de desactivación o de decantación/lavado, se transfirieron las microesferas y se recogieron en un Filtro Pharmasep de Sweco de 12”/Secador Modelo PH 12Y6. El filtro/secador utiliza una rejilla filtradora de recogida multicapa de 20 micras y se conecta a un motor que hace vibrar la rejilla filtradora durante la recogida y el secado. Se realizó un lavado final con heptano (6 kg a 3 ºC) para garantizar una transferencia en línea máxima y para eliminar cualquier exceso de aceite de silicona. A continuación se secaron las microesferas al vacío con una purga constante de nitrógeno gaseoso con una velocidad controlada de acuerdo con la siguiente programación: 6 horas a 3 ºC; una rampa de 6 h hasta 41 ºC; y 84 horas a 41 ºC.

Tras finalizar el secado, se descargaron las microesferas en un recipiente de recogida, se tamizaron a través de un tamiz de 150 µm y se almacenaron a aproximadamente -20 ºC hasta el rellenado.

Para todas las formulaciones de micropartículas que se prepararon en la presente, la cantidad de polipéptido, por ejemplo, exendina-4 y excipientes presentes en las formulaciones preparadas se expresa como un % (p/p) basado

en el peso final de la composición de liberación prolongada. El % (p/p) es un porcentaje nominal, excepto donde se indica.

PREPARACIÓN DE MICROPARTÍCULAS II

A. Formación de la emulsión agua-en-aceite interna

Se creó una emulsión de agua-en-aceite con la ayuda de un sonicador. Los sonicadores adecuados incluyen Vibracell VCX 750 con un cabezal de sonda CV33, Sonics and Materials Inc., Newtown, CT. La fase acuosa de la emulsión se preparó disolviendo exendina-4 y excipientes tales como sacarosa en agua. La concentración del fármaco en la solución resultante puede ser de aproximadamente 50 mg/mL a aproximadamente 100 mg/mL. Por ejemplo, cuando el fármaco es exendina-4, la concentración de fármaco en la solución puede ser de aproximadamente 3.28 g a aproximadamente 6.55 g por 65.5 g de agua. En una realización particular, se disolvieron 5.46 g de exendina-4 y 2.18 g de sacarosa en 65.5 g de agua para irrigación o WFI. Las cantidades especificadas enumeradas anteriormente representan un exceso de un 4% respecto a la adición objetivo con el fin de compensar las pérdidas tras la esterilización por filtración de los componentes. Se preparó la fase oleosa de la emulsión disolviendo el polímero PLGA (p. ej., 97.7 g de DL4A PLGA 50:50 purificado (Alkermes, Inc.)) en diclorometano (1539 g o 6% p/v).

A continuación se añadió la fase acuosa a la fase oleosa a lo largo de un periodo de aproximadamente tres minutos mientras se sonicaba a una amplitud de un 100% a temperatura ambiente. Se bombeó la fase acuosa a través de un tubo de acero inoxidable de ¼" con un extremo de un tubo de HPLC de 1" (DI = 20/1000") con 5 psig, añadido por debajo de la sonda de sonicación dentro de la zona de sonicación. A continuación se agitó el reactor de 1400 a 1600 rpm, con una sonicación adicional a una amplitud de un 100% durante 2 minutos, seguido por un periodo de funcionamiento de 30 segundos y a continuación 1 minuto más de sonicación. Esto dio como resultado un tamaño de las microgotas de la emulsión interna inferior a 0.5 micras. Se sobreentiende que la formación de la emulsión interna se puede lograr utilizando cualquier medio adecuado. Los medios adecuados para la formación de la emulsión incluyen, sin carácter limitante, sonicación tal y como se ha descrito anteriormente y homogeneización.

B. Formación del coacervado

Se realizó a continuación un paso de coacervación añadiendo aceite de silicona (2294 g de Dimeticona, NF, 350 cs) a la emulsión interna a lo largo de un periodo de tiempo de aproximadamente tres a cinco minutos. Esto es equivalente a una relación de 1.5:1, aceite de silicona respecto al diclorometano. El diclorometano de la solución polimérica se reparte en el aceite de silicona y comienza a precipitar el polímero alrededor de la fase acuosa que contiene exendina-4, lo que provoca la microencapsulación. Las microesferas embrionarias formadas de esta manera son suaves y requieren un endurecimiento. Frecuentemente, se permite que las microesferas embrionarias reposen durante un periodo de tiempo corto, por ejemplo, de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 5 minutos antes de proceder al paso de endurecimiento de las microesferas.

C. Endurecimiento y lavado de las microesferas

A continuación se transfirieron las microesferas embrionarias inmediatamente a una mezcla de disolventes de heptano/etanol. El volumen de la mezcla de heptano/etanol necesaria se puede determinar en función del tamaño del lote de microesfera. En el presente ejemplo, se utilizaron aproximadamente 22 kg de heptano y 2448 g de etanol en un tanque agitado (de 350 a 450 rpm) enfriado a 3 ºC. Esta mezcla de disolventes endureció las microesferas al extraer más diclorometano de las microesferas. Este paso de endurecimiento también se puede denominar desactivación. Después de ser desactivadas durante 1 hora a 3 ºC, la mezcla de disolventes se decanta y se añade heptano nuevo (13 kg) a 3 ºC y se mantiene durante 1 hora para eliminar el aceite de silicona, etanol y diclorometano residuales en la superficie de las microesferas.

D. Secado y recogida de las microesferas

Al final del paso de lavado, se transfirieron las microesferas y se recogieron en una rejilla filtradora multicapa de 20 micras y diámetro de 6" dentro de la cámara de secado con forma de cono que actúa como filtro frontal (*dead-end*). Se realizó un lavado final con heptano (6 kg a 4 ºC) para garantizar una transferencia en línea máxima. A continuación se secaron las microesferas con una purga constante de nitrógeno gaseoso con una velocidad controlada de acuerdo con la siguiente programación: 18 horas a 3 ºC; 24 h hasta 25 ºC; 6 horas a 35 ºC; y 42 horas a 38 ºC.

Tras finalizar el secado, se descargaron las microesferas en un recipiente de recogida esterilizado de acero inoxidable/teflón incorporado al cono de secado. Se selló el recipiente de recogida, se retiró del cono de secado y se almacenó a -20 ± 5 ºC hasta el rellenado. Se tomó el material que permaneció en el cono tras el desmontaje para la limpieza para un análisis del contenido del fármaco. La producción fue de aproximadamente 100 gramos de microesferas.

Para todas las formulaciones de micropartículas que se prepararon en la presente, la cantidad de polipéptido, por ejemplo, exendina-4 y excipientes presentes en las formulaciones preparadas se expresa como un % (p/p) basado en el peso final de la composición de liberación prolongada. El % (p/p) es un porcentaje nominal, excepto donde se indica.

POLÍMERO:

A continuación se enuncian ejemplos de polímeros PLG específicos adecuados para su uso. Todos los polímeros empleados en los siguientes ejemplos se exponen en la lista y todos los polímeros presentes en la lista se obtuvieron de Alkermes, Inc. de Cincinnati, OH y se pueden describir de la siguiente manera:

Polímero 2A: Poli(lactida-co-glicólido); relación 50:50 de lactida:glicólido; 12.3 kD P. Mol.; VI=0.15 (dL/g).

Polímero 4A: Poli(lactida-co-glicólido); relación 50:50 de lactida:glicólido; P. Mol. 45-64 kD; VI=0.45-0.47 (dL/g).

PURIFICACIÓN DE PLG: En la técnica existe constancia (remítase, por ejemplo, a Peptide Acylation by Poly(α-Hydroxy Esters) de Lucke *et al*., *Pharmaceutical Research*, Vol. 19, N.º 2, págs. 175-181, febrero de 2002) de que las proteínas y péptidos que se incorporan a las matrices de PLG se pueden alterar de manera no deseada (p. ej., degradadas o modificadas químicamente) como resultado de la interacción con productos de degradación de la PLG o impurezas que permanecen tras la preparación del polímero. Como tales, los polímeros de PLG utilizados en la preparación de la mayoría de las formulaciones de micropartículas descritas en la presente se purificaron antes de la preparación de las composiciones de liberación prolongada utilizando métodos de purificación reconocidos en la técnica.

MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN

Se ha determinado que los siguientes métodos de caracterización son adecuados para identificar micropartículas que proporcionarán un perfil de liberación del agente activo deseable.

SEM

Se utilizó SEM para evaluar el tamaño de las partículas, la forma y las características superficiales de las micropartículas. La obtención de imágenes por SEM se realizó con un sistema Personal SEM® (ASPEX™, LLC). Se depositaron todas las muestras mediante una espátula en portaobjetos de SEM estándar cubiertos con cinta adhesiva de doble cara de carbón. Las muestras se recubrieron con Au mediante bombardeo iónico durante aproximadamente 90 segundos con una corriente de emisión de 18 mA utilizando un Modelo SC 7620 “Mini” para recubrir mediante bombardeo iónico (Energy Beam Sciences). La obtención de todas las imágenes por SEM se realizó utilizando un haz de electrones de 20 KeV en un intervalo de ampliación de aproximadamente 250 a 2500X.

SEM CRIOGÉNICO

Se estudió la sección transversal de las micropartículas utilizando SEM criogénico. Se mezcló la muestra de micropartículas con una solución HISTO PREP® (Fischer) y se guardó en un criostato a -20 ºC durante toda la noche. Las micropartículas endurecidas se montaron en un cubreobjetos de vidrio y a continuación se obtuvieron cortes utilizando un cuchillo metálico. Los cortes de las partículas se montaron en portaobjetos de aluminio, se recubrieron con platino y paladio mediante bombardeo iónico y se observaron con un Microscopio de Barrido Electrónico (Phillips 525M). La observación visual de los cortes proporciona un método para determinar el grado de porosidad de las micropartículas.

MEDIDA DE LA POROSIDAD – INTRUSIÓN DE MERCURIO

Se determinó la distribución volumétrica de los poros en las micropartículas utilizando un modelo SutoPor IV 9500 Porosímetro por Intrusión de Mercurio Moden (Micromeritics, Norcross, GA). Resumiendo, y se forzó mercurio en una cantidad conocida de micropartículas en un penetrómetro aplicando presión en pasos hasta una presión máxima de 60 000 Psia. Se midió el volumen de mercurio que se había introducido en los poros con diversas presiones. Este método cuantifica la distribución de poros en las micropartículas. Es decir, el tamaño de los poros en los que se ha introducido una sustancia es inversamente proporcional a la presión aplicada. El equilibrio de las fuerzas internas y externas en el sistema líquido-sólido-vapor se puede describir mediante la ecuación de Washburn. La relación entre la presión aplicada y el tamaño del poro en el cual se fuerza la entrada de mercurio se describe mediante:

$$D=\frac{-4\gamma\cos\theta}{P}$$

donde:

D = diámetro del poro
γ = tensión superficial (constante)
θ = ángulo de contacto (constante)
P = presión

Por lo tanto, el tamaño del poro en el cual se introducirá el mercurio es inversamente proporcional a la presión aplicada. Asumiendo que todos los poros son cilindros rígidos, el diámetro del poro promedio (D=4V/A) se puede calcular dividiendo el volumen del poro (V=πD2h/4) por el área del poro (A=πDh).

DISOLVENTES RESIDUALES

Se utilizó un único método para la cuantificación de heptano, etanol y diclorometano. El equipo estuvo constituido por un cromatógrafo de gases HP 5890 Serie 2 con una columna Rtx 1301, 30 cm x 0.53 mm. Se disolvieron aproximadamente 130 mg de micropartículas en 10 mL de *N,N*-dimetilformamida. Se utilizó acetato de propilo como patrón interno. Se ajustó la preparación de la muestra de modo que se pudieran cuantificar concentraciones de diclorometano de tan solo un 0.03%.

PREPARACIÓN DE MICROPARTÍCULAS

Se prepararon los lotes de micropartículas expuestos en la Tabla 1 según se ha descrito anteriormente a una escala de 100 gramos utilizando el polímero 4A y una relación de aceite de silicona respecto al diclorometano de 1.5:1 o de 1:1 y el aceite de silicona tuvo una viscosidad de 350 cs. La cantidad de exendina-4 y los excipientes utilizados en la formulación también se exponen en la Tabla 1.

TABLA 1

Lote n.º	**Formulación**	**Liberación brusca *in vitro* (%)**	**Observaciones**
02-019-147(n.º 1)	0% de sacarosa, 0% de SA	0.40	1.5:1 Aceite de Si: $MeCl_2$
02-019-167(n.º 2)	2% de sacarosa (F16)	0.40	1.5:1 Aceite de Si: MeCl2
02-019-160(n.º 2.1)	2% de sacarosa (F16)	0.44	1.5:1 Aceite de Si l: MeCl2
02-019-164(n.º 2-2)	2% de sacarosa (F16)	0.45	1.5:1 Aceite de Si: MeCl2
02-030-08(n.º 2-3)	2% de sacarosa (F16)	0.80	1:1 Aceite de Si: MeCl2
02-030-01(n.º 2-4)	2% de sacarosa (F16)	1.0	1:1 Aceite de Si: MeCl2
02-030-04(n.º 2-5)	2% de sacarosa (F16)	1.1	1:1 Aceite de Si: MeCl2
02-019-136(n.º 3-1)	2% de sacarosa, 0.5% de SA (F14)	1.3	50:50 Desactivación
02-019-115(n.º 3-2)	2% de sacarosa, 0.5% de SA (F14)	2.2	1.5:1 Aceite de Si: MeCl2
02-019-170(n.º 4)	0% de sacarosa, 0.5% de SA	3.8	1.5:1 Aceite de Si: $MeCl_2$
02-019-133A(n.º 3-3)	2% de sacarosa, 0.5% de SA (F14)	12.7	100% Desactivación con heptano
02-019-185(n.º 5) (5% de adición del fármaco)	2% de sacarosa (F17)	0.5	5% de adición del fármaco, 1.5:1 Aceite de Si: $MeCl_2$
02-019-64 (n.º 3-4)	2% de sacarosa, 0.5% de SA (F14)	0.5	1.5:1 Aceite de Si: $MeCl_2$
02-019-10(n.º 3-5)	2% de sacarosa, 0.5% de SA (F14)	1.30	1:1 Aceite de Si: $MeCl_2$
02-001-196(n.º 3-6)	2% de sacarosa, 0.5% de SA (F14)	2.70	1:1 Aceite de Si: $MeCl_2$
02-019-24(n.º 3-7)	2% de sacarosa, 0.5% de SA (F14)	6.70	1:1 Aceite de Si: $MeCl_2$
*TODAS LAS FORMULACIONES TUVIERON UNA ADICIÓN DEL FÁRMACO DE UN 3% CON LA EXCEPCIÓN			

Lote n.º	Formulación	Liberación brusca *in vitro* (%)	Observaciones
DE LA POROSIDAD N.º 5			

El volumen de intrusión total obtenido de la porosimetría por intrusión de mercurio y los diámetros de poro promedio calculados se proporcionan en la TABLA 2. La relación entre el diámetro de poro promedio y la liberación *in vitro* se muestra en la FIG. 1.

TABLA 2

Lot n.º	Volumen del Poro Total (mL/g)	Liberación brusca *in vitro* (%)	Diámetro del poro promedio (µm)
02-019-147(n.º 1)	0.033	0.40	0.0068
02-019-167(n.º 2)	0.035	0.40	0.0069
02-019-160(n.º 2-1)	0.037	0.44	0.0070
02-019-164(n.º 2-2)	0.035	0.45	0.0070
02-030-08(n.º 2-3)	0.036	0.80	0.0070
02-030-01 (n.º 2-4)	0.038	1.0	0.0073
02-030-04(n.º 2-5)	0.039	1.1	0.0074
02-019-136(n.º 3-1)	0.041	1.3	0.0073
02-019-115(n.º 3-2)	0.039	2.2	0.0078
02-019-170(n.º 4)	0.067	3.8	0.0125
02-019-133A(n.º 3-3)	0.513	12.7	0.0277
02-019-64 (n.º 3-4)	0.030	0.5	0.0060
02-019-10(n.º 3-5)	0.060	1.30	0.0090
02-001-196(n.º 3-6)	0.060	2.70	0.0100
02-019-24(n.º 3-7)	0.180	6.70	0.0170

La FIG. 1 muestra el efecto del sulfato de amonio en la liberación inicial *in vitro*. Los datos indican que la liberación inicial *in vitro* se correlaciona con el diámetro del poro de las micropartículas. Las formulaciones hechas con sulfato de amonio mostraron niveles variables de liberación *in vitro* y una porosidad variable a diferencia de las formulaciones sin sulfato de amonio que exhibieron una porosidad y liberación constantes. Durante la fabricación de micropartículas, la presencia de sulfato de amonio en la fase acuosa puede provocar la desestabilización salina de la sustancia farmacológica durante la preparación de la emulsión interna. Las diferencias en el microentorno de los precipitados pueden contribuir a las diferencias en la porosidad y, por lo tanto, la variación en la liberación inicial. El efecto no se observó en formulaciones preparadas sin sulfato de amonio. Las formulaciones con sacarosa y exendina-4 muestran un nivel de liberación inicial más deseable y constante en comparación con formulaciones que tienen exendina-4, sacarosa y sulfato de amonio.

La FIG. 2 demuestra además el efecto de la porosidad en la liberación *in vitro* y el impacto que las condiciones del procesamiento, concretamente la relación del aceite de silicona respecto al diclorometano, tiene en la porosidad de las micropartículas formadas. Resumiendo, las formulaciones de micropartículas preparadas utilizando una relación del aceite de silicona respecto al diclorometano de 1:1 (Formulaciones 2-4 y 2-5 de la Tabla 1) tienen una liberación inicial más elevada que las mismas formulaciones preparadas utilizando una relación del aceite de silicona respecto al diclorometano de 1.5:1 (Formulaciones 2, 2-1 y 2-2 de la Tabla 1). La FIG. 2 sugiere que una relación más elevada del aceite de silicona respecto al diclorometano conlleva una porosidad menor lo que conlleva una liberación inicial menor.

SEM CRIOGÉNICA

Se llevaron a cabo análisis por SEM criogénica tal y como se ha descrito anteriormente con las Formulaciones de los tipos 2, 3 y 5 de la Tabla 1. Las FIGS. 3A-3B son barridos de micrografías para formulaciones seleccionadas de tipo 2 (Formulación 2-2, FIG. 3A) y de tipo 5 (5% de exendina-4, 2% de sacarosa, FIG. 3B). Las FIGS. 4A-D son barridos

de micrografías de las Formulaciones 3-4, 3-5, 3-6 y 3-7, respectivamente, de la Tabla 1. De nuevo, en los cortes transversales de SEM criogénica de las FIGS. 4A-D, se puede observar la variación en la porosidad exhibida con el uso de sulfato de amonio que puede contribuir a la variabilidad en la liberación inicial.

NIVELES DE DISOLVENTES RESIDUALES

El nivel de los disolventes residuales en una formulación concreta puede tener un efecto en la Tg de la formulación. Se determinaron los niveles de disolventes residuales para las formulaciones de micropartículas de tipos 2 y 5 de la Tabla 1. Se utilizó un único método para la cuantificación de heptano, etanol y diclorometano. . El equipo estuvo constituido por un cromatógrafo de gases HP 5890 Serie 2 con una columna Rtx 1301, 30 m x 0.53 mm. Se disolvieron aproximadamente 130 mg de micropartículas en 10 mL de *N,N*-dimetilformamida. Se utilizó acetato de propilo como patrón interno. Se ajustó la preparación de la muestra de modo que se pudieran cuantificar concentraciones de diclorometano de tan solo un 0.03%.

La FIG. 5 es una representación gráfica del % de etanol y diclorometano residuales para las formulaciones de los tipos 2 y 5 de la Tabla 1 (3 o 5% de exendina-4, 2% de sacarosa). La FIG. 5 muestra que la Tg desciende según se incrementa la cantidad de disolvente residual.

PREPARACIÓN DE MICROPARTÍCULAS QUE TIENEN UN 3% DE EXENDINA-4 Y UN 2% DE SACAROSA

A la vista de la variación en la porosidad introducida por la presencia de sulfato de amonio en las formulaciones de micropartículas y la identificación de la porosidad como una característica que tiene un efecto significativo en la liberación inicial, no se continuó utilizando sulfato de amonio en investigaciones posteriores.

IMPACTO DEL TAMAÑO DE LAS MICROGOTAS EN LA EMULSIÓN INTERNA

Se realizó el siguiente estudio para determinar el efecto de los parámetros del proceso en la generación de la emulsión interna así como también la estabilidad de la emulsión resultante y la liberación *in vitro* a las 24 horas resultante de microesferas producidas utilizando los diferentes parámetros del proceso. Se generaron emulsiones internas de la fase acuosa y la fase de disolvente por sonicación, tal y como se ha descrito anteriormente a una escala de 100 g, o por homogeneización, utilizando un homogeneizador MT5000 con un generador 36/4 (Kinematica AG, Suiza) con una velocidad baja (10 800 rpm) o una velocidad elevada (21 300 rpm). Tras la generación de la emulsión interna mediante diferentes técnicas, se mantuvieron las emulsiones en el reactor con una agitación suave con un agitador aéreo durante 5, 15 o 60 minutos antes de retirar una alícuota. Tras los tiempos de funcionamiento designados, se procesó adicionalmente la emulsión interna tal y como se ha descrito anteriormente para obtener micropartículas y a continuación se determinó la liberación *in vitro* a las 24 horas para cada lote tal y como se describe posteriormente.

La caracterización del tamaño de las microgotas de la emulsión interna se puede determinar utilizando un analizador del tamaño de las partículas Horiba

Se extrajo una alícuota de la emulsión interna del reactor utilizando una pipeta de vidrio. Utilizando una pipeta de transferencia, se añadieron ~30 gotas de la emulsión interna a ~10 mL de una solución del polímero 4A PLG 50:50 Medisorb® al 6% en un vial de centelleo con tapón de rosca de 20 cc mezclando a continuación. La solución del polímero 4A PLG 50:50 Medisorb® al 6% también se utilizó como la solución blanco de referencia. A continuación se transfirieron aproximadamente 9 mL de esta muestra de la emulsión diluida a un soporte para la muestra Horiba de 10 mL limpio. Se colocó una cobertura en el soporte para la muestra con el fin de evitar la evaporación rápida del disolvente del polímero. La muestra preparada estuvo comprendida en el intervalo de lectura del % de transmisión aceptable de un 0.65%-0.90% según la barra azul (Lamp). Se seleccionó un índice de refracción relativo en un intervalo de 0.94-0.00i en el ajuste del programa. A continuación se midió la muestra mediante un analizador del tamaño de las partículas Horiba tal como el modelo LA 910 para determinar el tamaño de las microgotas. Los datos que correlacionan los parámetros del proceso y el tamaño de la emulsión interna conseguida a lo largo de tiempos de funcionamiento de 5, 15 y 60 minutos así como también los resultados de liberación *in vitro* a las 24 horas resultantes (en paréntesis) se muestran en la Figura 9.

CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROESFERAS

Se caracterizaron las microesferas de exendina-4 de la manera habitual en lo que respecta al contenido del fármaco, tamaño de las partículas, disolventes residuales, liberación *in vitro* inicial y características PK en ratas. Se extrajo el fármaco para obtener una evaluación preliminar de la pureza de la exendina-4 después de la encapsulación en lotes seleccionados.

LIBERACIÓN INICIAL *IN VITRO*

Se determinó la liberación inicial de exendina-4 midiendo la concentración de exendina-4 tras 1 hora en tampón de liberación (HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7.4).

Se colocaron 150±5 mg de microesferas en 5.0 mL de tampón HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7.4 a temperatura ambiente, se agitó vorticialmente durante aproximadamente 30 segundos para suspender la solución y a continuación se colocó en una cámara de aire a 37 ºC durante 1 hora. Después de 1 hora, se retiraron las muestras de la cámara y se invirtieron varias veces para su mezcla, se centrifugaron a continuación a 3500 rpm durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y se analizó inmediatamente por HPLC utilizando las siguientes condiciones: Columna: TSK-GEL®, 7.8 mm x 30 cm, 5 m (TSOH BIOSEP PART n.º 08540); Temperatura del horno de la columna: Ambiente; Temperatura del automuestreador: 6 °C; Caudal: 0.8 mL/minuto; Detección: 280 nm; Volumen de inyección: 10 L; Fase móvil: 35% de acetonitrilo/65% de agua con un 0.1% de TFA/litro (v/v); Tiempo de procesado: aproximadamente 20 minutos. Como patrón se utilizó el principio activo exendina-4, 0.2 mg/mL que se preparó en tampon de acetato 30 mM, pH 4.5.

ESTUDIOS EN ANIMALES

Todos los estudios farmacocinéticos (PK) descritos en la presente se llevaron a cabo en ratas macho adultas Sprague-Dawley que pesaban aproximadamente 500±50 g.

Para la caracterización PK de las formulaciones de micropartículas, cada animal recibió una inyección subcutánea de micropartículas suspendidas en diluyente (3% de carboximetilcelulosa, 0.9% de NaCl, 0.1% de Tween 20) a la región interescapular. Generalmente, la dosis fue de aproximadamente 1.0 mg de exendina-4 por rata en un volumen de inyección de 0.75 mL. Se recogieron muestras sanguíneas mediante la vena lateral de la cola a las 0.5, 2, 4, 6, 10, 24 horas y 2, 4, 7, 10, 14, 17, 21, 24 y 28 días después de la dosis. Las muestras sanguíneas se colocaron inmediatamente en tubos MICROTAINER® que contenían EDTA y se centrifugaron a aproximadamente 14 000 X g durante aproximandamente dos minutos. A continuación se transfirió el plasma a tubos MICROTAINER® sin aditivo y se almacenaron a -70 ºC hasta el momento del ensayo. Se utilizó IRMA para determinar las concentraciones plasmáticas de exendina.

LIBERACIÓN *IN VIVO*-IRMA

El método para cuantificar exendina-4 en plasma en un inmunoensayo sándwich, donde el analito es capturado por el anticuerpo monoclonal en fase sólida EXE4:2-8.4 y se detecta mediante el anticuerpo monoclonal radioyodado GLP-1.3-3. Se cuantificó el recuento unido a partir de una curva de calibración estándar. Este ensayo es específico para la exendina-4 completa o intacta y no detecta exendina-4 (3-39). Una curva estándar típica comprende de 30 pg/mL a 2000 pg/mL dependiendo de la edad del anticuerpo marcador.

LIBERACIÓN *IN VITRO* E *IN VIVO*

Se estudiaron las formulaciones 2, 2-1 y 2-2 (3% de exendina-4 y 2% de sacarosa) para determinar la liberación inicial *in vitro* tal como se ha descrito anteriormente. La liberación *in vitro* fue de un 0.4%, 0.4% y 0.5% respectivamente. Los tres lotes asimismo tuvieron una liberación *in vivo* relativamente baja en el intervalo de $C_{máx}$ de 1154 a 1555 pg/mL el día 0-1. La FIG. 6 es una curva farmacocinética representativa para las formulaciones que tienen un 3% de exendina-4 y un 2% de sacarosa (2-1) y también para un 3% de exendina-4 sola (1) y un 3% de exendina-4 y un 0.5% de sulfato de amonio (4). Se utilizó una relación de aceite de silicona respecto al diclorometano de 1.5:1 y la viscosidad del aceite de silicona fue de 350 cs.

A partir de la FIG. 6 se puede apreciar que las formulaciones que no contienen sulfato de amonio exhiben una liberación inicial más baja. Aunque la formulación que solo tiene exendina-4 mostró una liberación adecuada inicial, la pureza posterior a la encapsulación del fármaco disminuyó en comparación con la formulación que tenía la exendina-4 combinada con sacarosa. La adición de azúcar a las formulaciones disminuye la degradación del agente.

El perfil de liberación *in vivo* de las tres formulaciones 2, 2-1 y 2-2 comparadas anteriormente, se muestran en la FIG. 7. Estos tres lotes exhibieron una liberación inicial relativamente baja seguida por una “depresión” (niveles séricos bajos entre aproximadamente el día 4 y el día 17) y a continuación una liberación prolongada a lo largo de aproximadamente del día 21 al día 28. La liberación inicial baja y la forma del perfil de liberación fueron similares en las tres formulaciones.

FORMULACIÓN UTILIZANDO UNA RELACIÓN 1:1 DE ACEITE DE SILICONA RESPECTO AL DICLOROMETANO

Se prepararon las formulaciones 2-3, 2-4 y 2-5 de la Tabla 1 (3% de exendina-4, 2% de sacarosa) utilizando una relación 1:1 de aceite de silicona respecto al diclorometano. La liberación inicial fue más elevada para estas formulaciones que para las formulaciones 2, 2-1 y 2-2 de la Tabla 1 (3% de exendina-4, 2% de sacarosa con una relación 1.5:1 de aceite de silicona respecto al diclorometano). Específicamente, las formulaciones con la relación 1.5:1 proporcionaron una liberación inicial promedio de aproximadamente un 0.4%, mientras que las formulaciones con una relación 1:1 proporcionaron una liberación inicial promedio de aproximadamente un 1.0%. Se observó la misma tendencia *in vivo* en ratas con una $C_{máx}$ el día 0-1 de 2288±520 pg/mL para una relación 1:1, mientras que en ratas la $C_{máx}$ el día 0-1 fue de 1300±221 pg/mL para la relación 1.5:1.

INCREMENTO DE LA ADICIÓN DEL FÁRMACO

Un incremento en la adición de exendina-4 hasta un 4% mientras se mantenía la sacarosa en un 2% conllevó una liberación inicial *in vitro* e *in vivo* en el mismo intervalo que para una adición de un 3%.

Se prepararon tres formulaciones del tipo 5 de la Tabla 1 (5% de adición del fármaco, 2% de sacarosa, relación 1.5:1 de aceite de silicona respecto al diclorometano). Los tres lotes, 5-1, 5-2 y 5-3 exhibieron todos ellos una liberación inicial *in vitro* baja comprendida entre un 0.2 y un 0.5%. De manera similar, la $C_{máx}$ *in vivo* de las formulaciones fue sistemáticamente baja y estuvo comprendida entre 467 pg/mL y 1267 pg/mL. La FIG. 8 muestra un gráfico de los datos farmacocinéticos para los tres lotes estudiados. Comparado con el comportamiento de la formulación con un 3% de exendina-4 que tenía un 2% de sacarosa, las formulaciones con un 5% exhibieron niveles séricos más elevados del fármaco a lo largo de aproximadamente el día 1 y el día 2. El resto del perfil de las formulaciones con un 5% fue similar al de las formulaciones con un 3% y tuvieron una depresión y a continuación liberación del fármaco principalmente a lo largo del día 21 al día 28.

REIVINDICACIONES

1. Una composición para la liberación prolongada de un polipéptido biológicamente activo, que comprende un polímero biocompatible que tiene el polipéptido biológicamente activo dispersado en él de modo que esté presente de un 3% (p/p) a un 10% (p/p) del peso de la composición y sacarosa dispersada en él de modo que esté presente en un 2% (p/p) del peso de la composición,
donde el polipéptido biológicamente activo es exendina-4,
donde el volumen de poro total de la composición es de 0.1 mL/g o menos según se determina utilizando porosimetría por intrusión de mercurio
y donde la composición está exenta de tampones y de sales de desestabilización salina.

2. La composición de liberación prolongada de la reivindicación 1, donde el polímero biocompatible se selecciona a partir del grupo constituido por polilactidas, poliglicólidos, poli(lactida-co-glicólidos), ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, policarbonatos, poliesteramidas, polianhídridos, poliaminoácidos, poliortoésteres, polidioxanonas, polialquilenalquilatos, copolímeros de polietilenglicol y poliortoéster, poliuretanos biodegradables, mezclas de estos y copolímeros de estos.

3. La composición de liberación prolongada de la reivindicación 1, donde el polímero biocompatible comprende poli(lactida-co-glicólido).

4. La composición de liberación prolongada de la reivindicación 3, donde el polímero biocompatible es poli(lactida-co-glicólido) 50:50 purificado.

5. La composición de liberación prolongada de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que está en forma de micropartículas.

6. Una composición tal y como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para su uso en el tratamiento de la diabetes de tipo 2.

7. Una composición tal y como se reivindica en la reivindicación 1, que es una composición inyectable para la liberación prolongada de exendina-4, donde la liberación prolongada de exendina-4 tiene lugar a lo largo de un periodo de al menos una semana.

8. La composición inyectable de la reivindicación 7, donde la liberación prolongada del polipéptido glucorregulador tiene lugar a lo largo de un periodo de al menos dos semanas.

9. La composición inyectable de la reivindicación 7, donde la liberación prolongada del polipéptido glucorregulador tiene lugar a lo largo de un periodo de al menos tres semanas.

10. La composición inyectable de la reivindicación 7, donde la liberación prolongada del polipéptido glucorregulador tiene lugar a lo largo de un periodo de al menos cuatro semanas.

11. Una composición tal y como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 7-10 para su uso en el tratamiento de la diabetes de tipo 2.

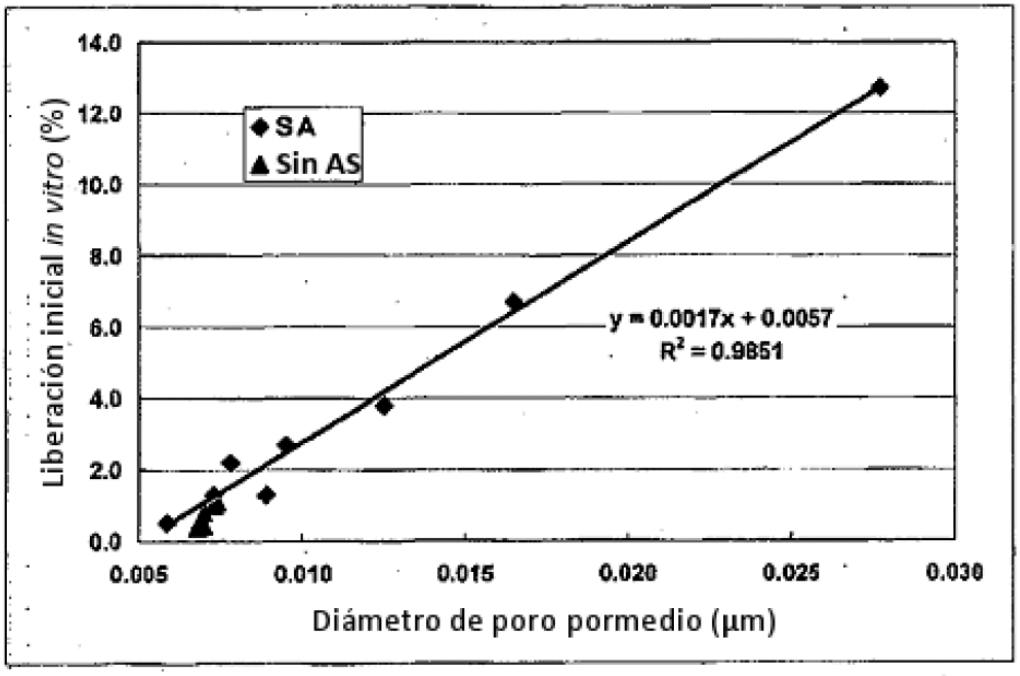
14.0
12.0
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
Liberación inicial in vitro (%)
SA
Sin AS
y = 0.0017x + 0.0057
R² = 0.9851
0.005
0.010
0.015
0.020
0.025
0.030
Diámetro de poro pormedio (µm)

FIG. 1

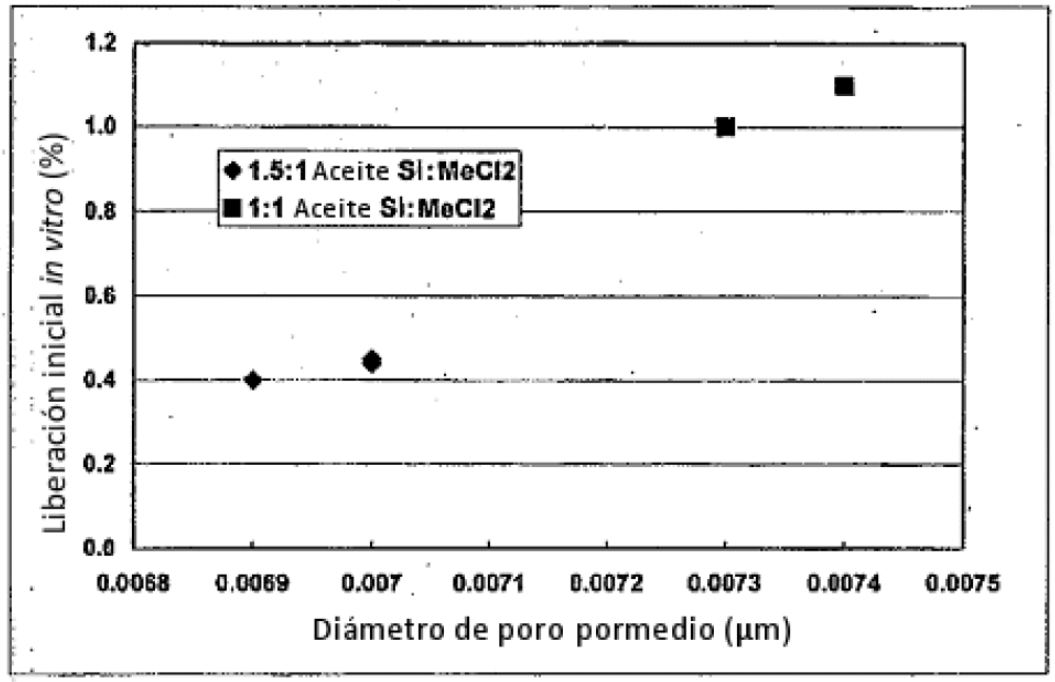
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Liberación inicial in vitro (%)
1.5:1 Aceite Si:MeCl2
1:1 Aceite Si:MeCl2
0.0068
0.0069
0.007
0.0071
0.0072
0.0073
0.0074
0.0075
Diámetro de poro pormedio (µm)

FIG. 2

FIG. 3A FIG. 3B

FIG. 4A FIG. 4B FIG. 4C FIG. 4D

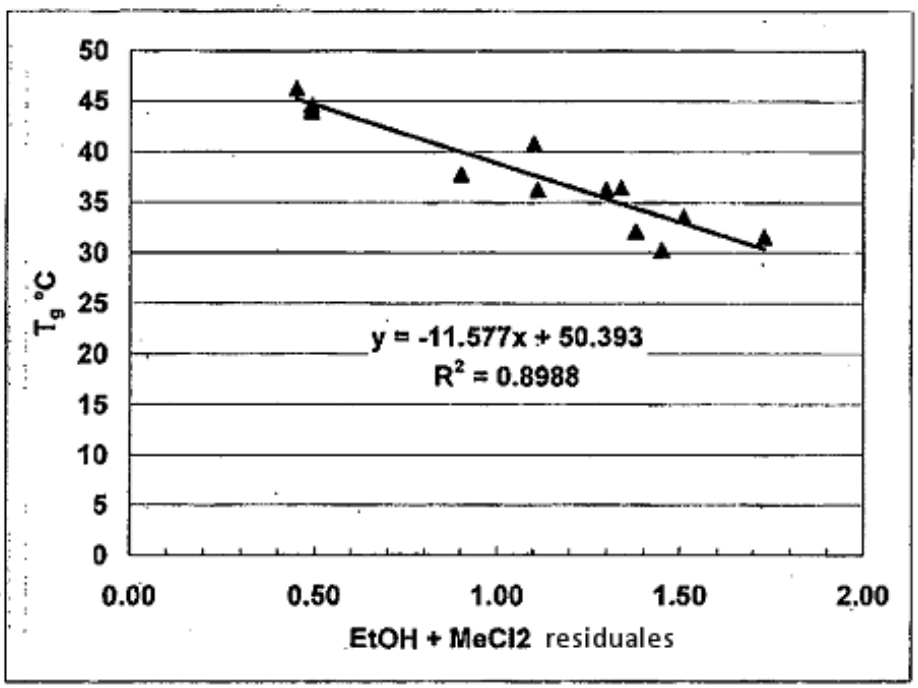
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
T_g °C
y = -11.577x + 50.393
R^2 = 0.8988
0.00
0.50
1.00
1.50
2.00
EtOH + MeCl2 residuales

FIG. 5

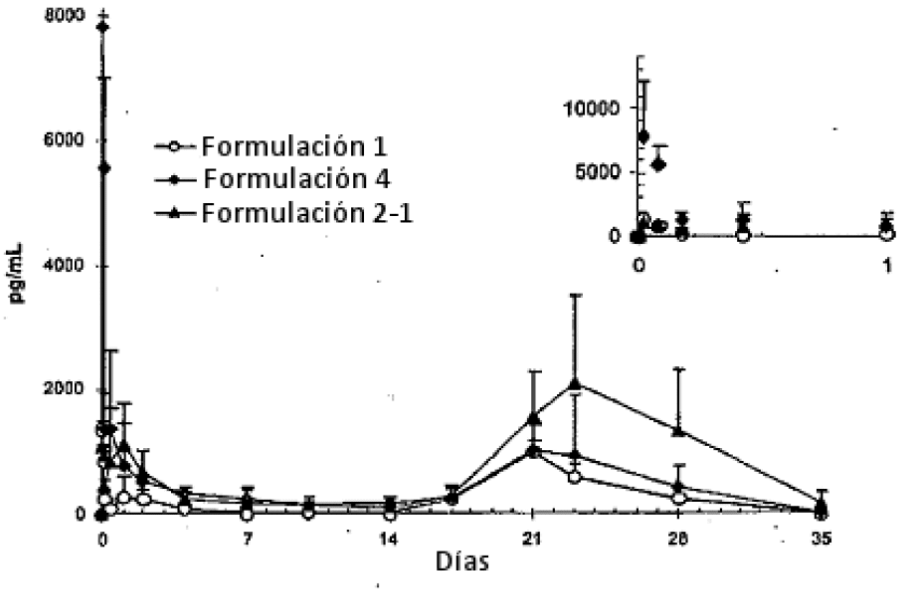
8000
6000
4000
2000
0
pg/mL
Formulación 1
Formulación 4
Formulación 2-1
10000
5000
0
0
1
0
7
14
21
28
35
Días

FIG. 6

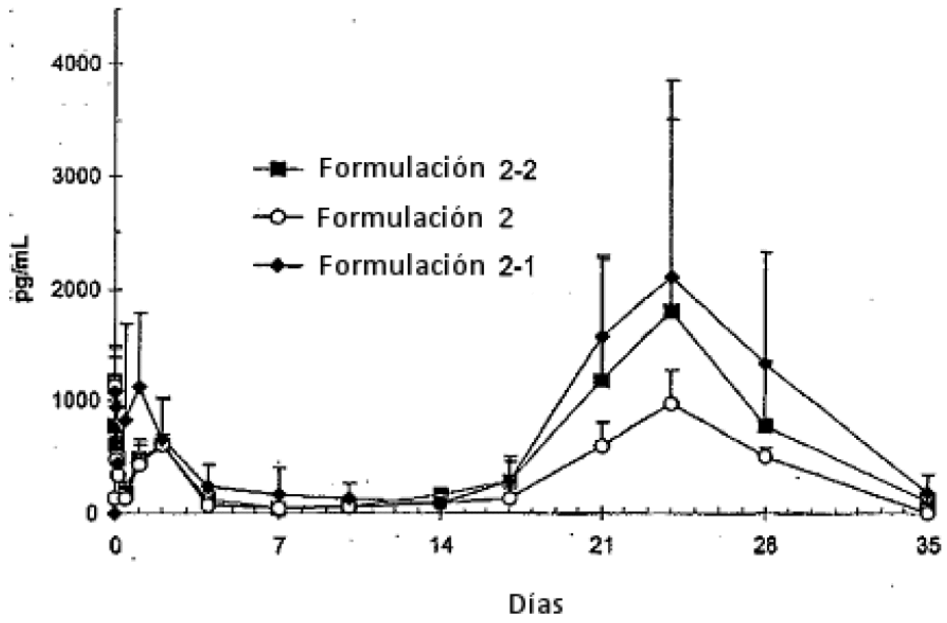
4000
3000
2000
1000
0
pg/mL
0
7
14
21
28
35
Días
Formulación 2-2
Formulación 2
Formulación 2-1

FIG. 7

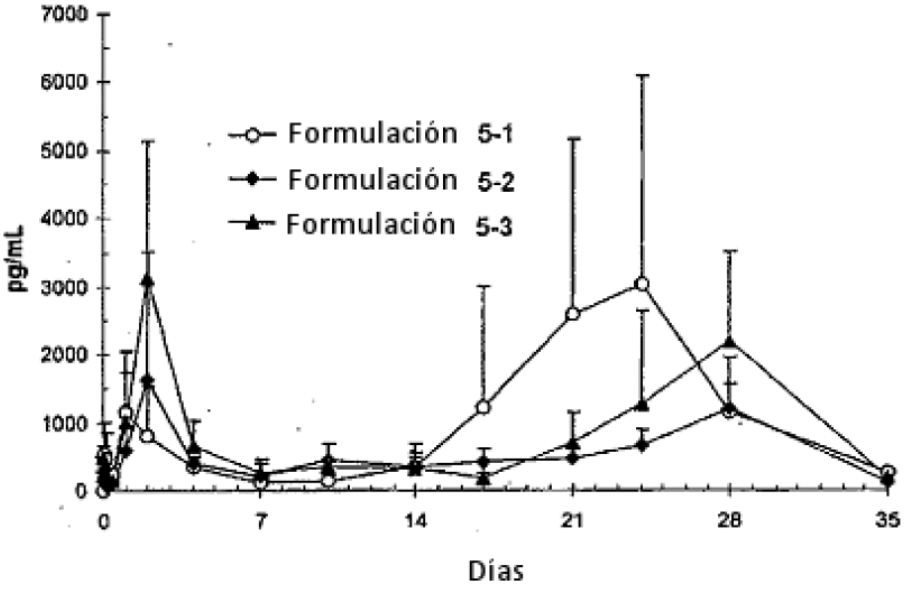
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
pg/mL
Formulación 5-1
Formulación 5-2
Formulación 5-3
0
7
14
21
28
35
Días

FIG. 8

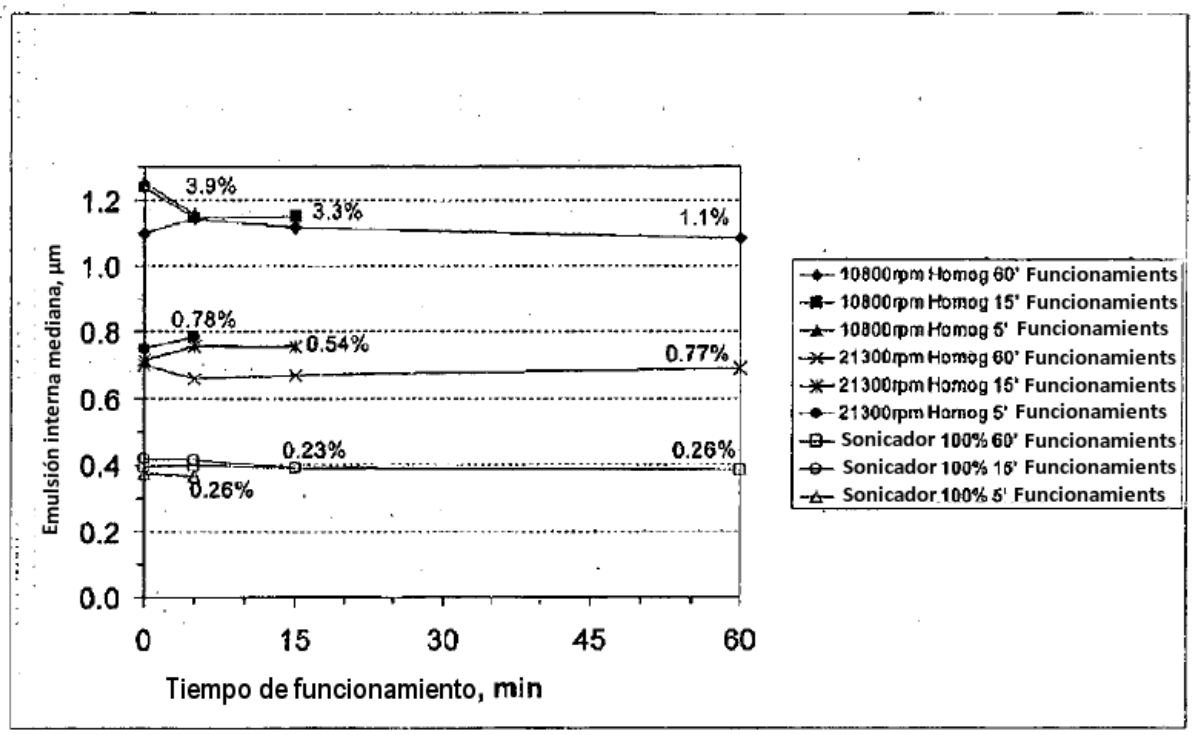
Emulsión interna mediana, µm
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
15
30
45
60
Tiempo de funcionamiento, min
3.9%
3.3%
1.1%
0.78%
0.54%
0.77%
0.23%
0.26%
0.26%
10800rpm Homog 60' Funcionamients
10800rpm Homog 15' Funcionamients
10800rpm Homog 5' Funcionamients
21300rpm Homog 60' Funcionamients
21300rpm Homog 15' Funcionamients
21300rpm Homog 5' Funcionamients
Sonicador 100% 60' Funcionamients
Sonicador 100% 15' Funcionamients
Sonicador 100% 5' Funcionamients

FIG. 9