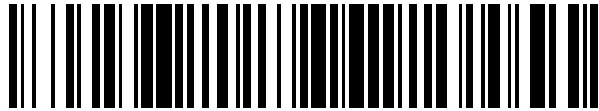


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 908**

51 Int. Cl.:

A61K 9/16

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.10.2002 E 02793162 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2015 EP 1450766**

54 Título: **Microesferas biodegradables de liberación prolongada y su procedimiento de preparación**

30 Prioridad:

10.10.2001 FR 0113031
10.10.2001 ES 200102261

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.07.2015

73 Titular/es:

PIERRE FABRE MEDICAMENT (100.0%)
45, Place Abel Gance
92100 Boulogne-Billancourt, FR

72 Inventor/es:

FERRET, EULALIA;
ASIN, MIGUEL ANGEL;
GARCIA, JÉSUS;
TARIN, PERE;
AROLA, ROSA;
RUTLLAN, MONTSERRAT y
PEREZ, AMADEO

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 541 908 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Microesferas biodegradables de liberación prolongada y su procedimiento de preparación.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de preparación de una composición farmacéutica en la forma de microesferas de liberación prolongada de un principio activo hidrosoluble. La invención tiene asimismo por objeto unas microesferas que se pueden obtener usando este procedimiento, que presentan una liberación continua de principio activo durante un período de más de dos meses, ventajosamente de por lo menos tres meses.

10 Muchas composiciones farmacéuticas, en la forma de microesferas a base de polímeros y copolímeros biodegradables, que contienen unos compuestos farmacológicamente activos, y concebidas para una liberación controlada y prolongada de dichos compuestos, se han descrito en diversos documentos del estado anterior de la técnica. Unas composiciones farmacéuticas de este tipo tienen gran valor para el tratamiento de diversas enfermedades que requieren una liberación prolongada y continua de principio activo.

15 Sin embargo, las formulaciones desarrolladas hasta la fecha para la puesta a punto de este tipo de composiciones adolecen de diversos inconvenientes y pocas alcanzan la etapa de pruebas clínicas.

20 Uno de los mayores problemas asociados a estas formulaciones de liberación prolongada es la liberación de una gran cantidad de principio activo durante las primeras horas después de la administración de la composición farmacéutica. Efecto "burst" o liberación "burst" son términos comúnmente usados con respecto a dicha liberación. Está liberación generalmente da como resultado un aumento brusco de las concentraciones plasmáticas del medicamento, que en muchos casos, da como resultado problemas toxicológicos inaceptables en el ser humano. Esta liberación "burst" también da como resultado una disminución de la duración de la actividad de la composición farmacéutica debido a la liberación rápida y brusca de una gran cantidad de dicho principio activo después de la administración de la composición.

25 Un segundo problema radica en el hecho de que se obtienen generalmente unas tasas de encapsulación poco eficaces usando los procedimientos de microencapsulación convencional, en particular cuando el principio activo es un medicamento soluble en agua.

30 Un tercer problema que debe ser resuelto para desarrollar estas formulaciones, es la inestabilidad de los principios activos de cara a las condiciones rigurosas usadas en la fabricación de las microesferas, tales como unas temperaturas altas o una puesta en contacto prolongada del principio activo con los solventes orgánicos durante la etapa de evaporación del solvente.

35 Se han llevado a cabo diversas pruebas para resolver estos diferentes problemas. De esta manera, unos aditivos tales como los azúcares, los aceites, las ceras, las proteínas, los polímeros, sales o los ácidos se han usado en la preparación de composiciones farmacéuticas en forma de microesferas. Estos aditivos, que actúan como sustancias que retienen el medicamento en la microesfera, permiten aumentar la eficacia del procedimiento de microencapsulación e incluso, eventualmente, proteger el principio activo durante el procedimiento, desempeñando el papel de agentes estabilizantes.

40 Sin embargo, la inclusión de estos aditivos en las microesferas puede conducir a problemas de interacción entre los aditivos y el principio activo o la matriz a base de polímeros, induciendo así unos problemas en materia de toxicología y de actividad farmacológica del medicamento. Adicionalmente, los aditivos, que retienen el principio activo dentro de las microesferas durante el procedimiento de fabricación, tienen una influencia sobre el perfil de liberación del principio activo contenido en las microesferas, pudiendo impedir una liberación continua de dicho principio activo después de la administración de las microesferas.

45 Otros procedimientos de microencapsulación también se han desarrollado en un intento de aumentar la eficacia de la microencapsulación del principio activo dentro de las microesferas, basándose en el uso de mezclas de solventes orgánicos, pero dichos procedimientos conducen a problemas de estabilidad del principio activo durante el procedimiento de fabricación de microesferas.

50 D2 describe la preparación de microesferas biodegradables que contienen ovoalbúmina como proteína modelo. Se pueden utilizar diferentes tipos de polímeros polilactido (PLA) y poli-lactido-co-glicolido (PLGA). Sin embargo, las microesferas obtenidas en D2 presentan un efecto "burst" elevado al cabo de 3-4 días tras su administración.

55 En consecuencia, existía una necesidad de desarrollar un procedimiento para preparar una composición farmacéutica en forma de microesferas a base de polímeros y copolímeros biodegradables, diseñadas para una liberación prolongada de un principio activo hidrosoluble, que no adolece de los inconvenientes de las composiciones descritas en los documentos del estado anterior de la técnica o de las composiciones desarrolladas hasta la fecha.

60 La presente invención satisfará esta necesidad. El solicitante ha descubierto así de manera sorprendente que la

5 elaboración de microesferas, a base de principio activo y de copolímero matricial biodegradable del tipo d,l-lactido-co-glicólido que tiene un peso molecular específico y una relación ácido láctico/ácido glicólico específica, usando un procedimiento rápido de múltiple emulsión/ evaporación de solvente, sin usar ningún aditivo o agente de modulación como es el caso de la patente FR 2 718 642, permitía obtener unas microesferas que presentan una liberación sostenida y continua de principio activo durante un período de más de dos meses, mientras que al mismo tiempo presentan un efecto "burst" limitado. Un procedimiento de encapsulación de este tipo, que emplea unas condiciones suaves y poco agresivas para el medicamento, permite además preservar la estabilidad de dicho medicamento y obtener una distribución homogénea del medicamento dentro de la microesfera obtenida.

10 El principio físico de emulsión múltiple para encapsular principios activos hidrosolubles se ha descrito particularmente en la patente US nº 3.523.906. En general, en un procedimiento de este tipo por emulsión múltiple W/O/W y evaporación del solvente, el principio activo hidrosoluble se solubiliza en primer lugar en la fase interna de una primera emulsión W/O, y posteriormente, en segundo lugar, esta primera emulsión se emulsiona a su vez en una fase acuosa externa.

15 El solicitante ha descubierto, sorprendentemente, que el uso de un agente osmótico en la etapa de emulsificación de la primera emulsión en la fase acuosa externa permitía obtener una eficacia de encapsulación particularmente alta aumentando el contenido de principio activo encapsulado dentro de la matriz polimérica, e influenciar el tamaño de las microesferas.

20 El objeto de la presente invención, relativo a un procedimiento de encapsulación rápida, muy eficaz y poco agresivo para el principio activo, permite así obtener unas microesferas, a base de principio activo hidrosoluble y de copolímero matricial del tipo d,l-lactido-co-glicólido, que presentan una liberación sostenida y continua de principio activo durante un período de más de dos meses, preferentemente de por lo menos tres meses, presentando al mismo tiempo un efecto "burst" pequeño durante horas siguientes a la administración de la composición.

25 La presente invención tiene así por objeto un procedimiento para preparar una composición farmacéutica en forma de microesferas con liberación prolongada de un principio activo hidrosoluble, caracterizado por que comprende la sucesión de las siguientes etapas:

- 30
- disolver el principio activo en una cantidad apropiada de agua, estando dicha disolución del principio activo realizada sin la adición de ninguna sustancia que retenga el principio activo, ni de agente estabilizador de la emulsión y sin ninguna operación destinada a aumentar la viscosidad,
- 35
- emulsificar la solución acuosa de principio activo así obtenida con una solución de un copolímero matricial d,l-lactido-co-glicólido de peso molecular medio comprendido entre 40000 y 80000 y que tiene una proporción ácido láctico/ácido glicólico comprendida entre 50/50 y 80/20, disuelto en un hidrocarburo clorado, que resulta en una primera emulsión homogénea y microfina, siendo el tamaño de dicha emulsión ventajosamente inferior a 1 μm ,
- 40
- emulsificar dicha primera emulsión así obtenida en una fase acuosa externa, que contiene de 0,1 a 0,5% en peso de polisorbato 80, de 1 a 25% en peso de polivinilpirrolidona, y de 0,1 a 10% en peso de manitol o de cloruro de sodio,
- 45
- extraer-evaporar el solvente para obtener unas microesferas, que se recuperan después de la filtración, del lavar y secar.

50 Otras características y ventajas surgirán con la lectura de la descripción detallada siguiente, en particular en base a algunos ejemplos de realización particulares.

El principio activo hidrosoluble que se puede usar en el contexto del procedimiento según la presente invención se escoge ventajosamente de entre grupo constituido por los péptidos, las proteínas, las vacunas, los antibióticos, los antidepresivos, los analgésicos, los antiinflamatorios y los citostáticos. Aún más ventajosamente según la presente invención, el principio activo es 5-OxoPro-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-ProNH₂ o una de sus sales. Este principio activo es un análogo de la hormona GnRH con actividad agonista.

60 En el contexto del procedimiento según la presente invención, la primera etapa de disolución del principio activo en agua para formar una fase acuosa interna se lleva a cabo sin la adición de ninguna sustancia que retenga el principio activo, ni de agente estabilizador de la emulsión, y sin ninguna operación destinada a aumentar la viscosidad. Ventajosamente, según la presente invención, el principio activo se disuelve en la fase acuosa interna sin ningún aditivo o adyuvante.

65 Las concentraciones usadas en la fase acuosa interna en el contexto de la presente invención dependen de la solubilidad en agua del principio activo, de las características de dicho principio activo y de la duración deseada de liberación que se desea obtener. Ventajosamente según la presente invención, el principio activo está presente a una concentración de entre 0,01 y 95% en peso, ventajosamente entre 0,5 y 40% en peso, con relación al peso total

de la fase acuosa interna.

La formación de la primera emulsión se puede realizar en particular usando un aparato de ultrasonidos o un homogeneizador.

5 El copolímero matricial que se puede usar según la presente invención, para preparar microesferas por W/O/W debe poder de ser solubilizado en un solvente volátil apropiado, tal como los alcanos halogenados. Ventajosamente según la presente invención, el solvente es un hidrocarburo clorado tal como el cloruro de metileno, el cloroformo, el cloroetano, el dicloroetano o el tricloroetano. Aún más ventajosamente según la presente invención, el hidrocarburo clorado es el cloruro de metileno.

10 El copolímero matricial de d,l-lactido-co-glicólido que se puede usar en el procedimiento según la presente invención tiene las ventajas acumuladas de ser insoluble en agua, de ser biodegradable (dicho copolímero es absorbido sin acumularse en los órganos vitales y finalmente se elimina completamente), de ser biocompatible con el organismo y de ser tolerado perfectamente por el mismo, y finalmente, de tener una respuesta inflamatoria mínima.

15 En el contexto del procedimiento según la presente invención, la solución del copolímero matricial de d,l-lactido-co-glicólido se obtiene disolviendo el copolímero en un hidrocarburo clorado tal como el cloruro de metileno, sin la adición de ningún agente de modulación de liberación. En efecto, se ha descubierto que el uso de un agente de modulación de liberación no era apropiado para la fabricación de microesferas concebidas para una liberación durante un período de tiempo de más de dos meses.

20 La selección efectuada en el copolímero, con un peso molecular específico y una relación específica ácido láctico/ácido glicólico, combinada con el hecho de no usar un agente de modulación de liberación en el procedimiento objeto de la presente invención, presenta así la ventaja de obtener unas microesferas que presentan una liberación sostenida y continua de principio activo durante un período de más de dos meses, preferentemente de por lo menos tres meses, presentando al mismo tiempo un efecto "burst" limitado durante las horas siguientes a la administración de la composición.

25 Las concentraciones del polímero disuelto en la solución orgánica de cloruro de metileno dependen del principio activo y de la velocidad de liberación deseada. Ventajosamente según el procedimiento objeto de la presente invención, el copolímero matricial está presente a una concentración de entre 5 y 50% en peso, con relación al peso total de la solución constituida por el copolímero disuelto en el hidrocarburo clorado.

30 Según el procedimiento objeto de la presente invención, la fase acuosa externa contiene un agente tensioactivo que es el polisorbato 80, un agente aumentador de viscosidad que es la polivinilpirrolidona y un agente osmótico que es el manitol o el cloruro de sodio, la fase acuosa externa contiene así una solución de polisorbato 80, de polivinilpirrolidona y de manitol o de cloruro de sodio. Ventajosamente según la presente invención, la fase acuosa externa contiene una solución de polisorbato 80, de polivinilpirrolidona y de cloruro de sodio.

35 El agente tensioactivo está presente a una concentración de entre 0,1 y 0,5% en peso, el agente aumentador de viscosidad está presente a una concentración de entre 1 y 25% en peso y el agente osmótico está presente a una concentración de entre 0,1 y 10% en peso, con relación al peso total de la fase acuosa externa. La composición de la fase acuosa externa es determinante para la formación de la segunda emulsión (emulsificación de la primera emulsión), y es en consecuencia, determinante para la fabricación de las microesferas. De esta manera contribuye a la estabilización rápida de las microesferas, influencia la eficacia de encapsulación de los principios activos, y constituye un factor esencial para controlar el tamaño de las microesferas finales y su morfología.

40 Durante la etapa de extracción-evaporación del solvente, el solvente se elimina rápidamente a temperatura ambiente y bajo presión atmosférica, según un sistema de evaporación continuo constituido por una pendiente de longitud adecuada, sobre la cual fluye en capa fina la suspensión de microesferas.

45 Dicho sistema de evaporación continua del solvente orgánico, que aumenta y favorece el contacto entre la emulsión y el aire, permite obtener una estabilización rápida de la matriz polimérica, lo cual tiene por efecto aumentar la estabilización del principio activo atrapando al mismo tiempo un alto porcentaje de dicho principio dentro de las microesferas (eficacia de encapsulación), y producir una evaporación rápida del solvente, lo cual tiene por efecto reducir el tiempo total de realización del procedimiento. La estabilización rápida de la matriz polimérica obtenida en esta etapa de extracción-evaporación del solvente orgánico también permite obtener una distribución homogénea de la sustancia activa en toda la microesfera (permitiendo así obtener una baja concentración de principio activo encapsulado cerca de la superficie de la microesfera), contribuyendo así a disminuir el fenómeno de liberación "burst", después de la administración de las microesferas. Adicionalmente, el hecho de utilizar el procedimiento a temperatura ambiente y bajo presión atmosférica permite evitar problemas tales como la alteración de los productos termolábiles o la ruptura de las microesferas cuando se usa el vacío en la etapa de extracción-evaporación.

50 De manera más detallada, el procedimiento de fabricación de las microesferas según la presente invención, comprende las etapas siguientes:

Se disuelve una cierta cantidad de principio activo en un volumen de agua. Esta solución se emulsiona, usando un aparato de ultrasonidos por ejemplo, en un volumen de cloruro de metileno que contiene un copolímero polilactido-co-glicólico) de peso molecular medio de entre 40000 y 80000 daltons y que tiene una proporción entre ácido láctico y ácido glicólico de entre 50/50 y 80/20. La primera emulsión que resulta de ello debe ser microfina y homogénea, permitiendo así diseminar el principio activo por toda la matriz polimérica, asegurando la reproducibilidad de diversos lotes, sin necesidad de usar agentes tensioactivos ni otros adyuvantes. Una vez que se ha formado la primera emulsión, se emulsiona a su vez en una fase externa, constituida por una solución acuosa de polisorbato 80 como agente de superficie, por polivinilpirrolidona como agente aumentador de viscosidad y por manitol o NaCl como agente osmótico, bajo agitación durante un corto período de tiempo. Después de esta etapa, la doble emulsión se diluye con agua, y se hace pasar posteriormente la suspensión, bajo condiciones controladas, por un sistema de evaporación continua constituido por una pendiente de longitud adecuada, sobre la cual fluye en capa fina la suspensión de microesferas. Este sistema permite favorecer el contacto entre la emulsión y la atmósfera, lo cual reduce la duración de evaporación del solvente orgánico, y aumentar la estabilización del principio activo. Las microesferas obtenidas de esta manera se recuperan posteriormente por filtración, se lavan con agua y se secan por liofilización.

Las microesferas obtenidas según el procedimiento objeto de la presente invención son unas microesferas con un alto contenido de principio activo, que permiten la liberación continua *in vivo* del medicamento durante un período de más de dos meses, preferentemente de por lo menos 3 meses, con un efecto "burst" pequeño, después de la administración parenteral de las microesferas.

La presente invención tiene asimismo por objeto las microesferas que se pueden obtener mediante la utilización del procedimiento según la presente invención, que presentan una liberación continua de principio activo durante un período de más de dos meses, ventajosamente durante un período de por lo menos tres meses.

Ventajosamente según la presente invención, el principio activo está presente a una concentración de entre 0,5 y 20% en peso, ventajosamente entre 5 y 15% en peso, con relación al peso total de las microesferas.

Ventajosamente según la presente invención, las microesferas son de un tamaño inferior a 250 μm , aún más ventajosamente inferior a 90 μm . Este tamaño es adecuado para la administración de las microesferas.

Las microesferas según la presente invención se administran ventajosamente por vía parenteral, aún más ventajosamente en la forma de inyecciones intramusculares, subcutáneas o intraarteriales, o en el sitio de un tumor. Para una administración adecuada, las microesferas se dispersan preferentemente en un medio acuoso estándar con agentes dispersantes y agentes isotonzantes.

Los siguientes ejemplos (estudios *in vivo* e *in vitro*) se dan de manera ilustrativa y no limitativa de la presente invención.

40 **Ejemplo 1 (comparativo)**

Se prepararon lotes de microesferas a base de acetato de 5-OxoPro-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-ProNH₂ según el procedimiento de fabricación descrito en la publicación *Advanced Drug Delivery Reviews*, 28, (1997), 43-70, que difiere del procedimiento objeto de la presente invención. La fabricación de las microesferas se realizó disolviendo una cantidad apropiada de principio activo en agua, y después mediante una puesta en emulsión de la solución acuosa de principio activo así obtenida, con una solución de un polilactido (100% de lactido) de peso molecular medio de 15000, en cloruro de metileno. La puesta en emulsión se llevó a cabo con un agitador, con agitación vigorosa. Una vez que se formó la primera emulsión W_1/O , se emulsionó a su vez para obtener una emulsión $W_1/O/W_2$, con una solución acuosa de alcohol polivinílico (0,25%) usando un mezclador de alta velocidad. La doble emulsión que resulta de ello se agitó posteriormente durante varias horas para evaporar el solvente orgánico. Las microesferas posteriormente se lavaron, se recuperaron por centrifugación y se liofilizaron. La carga final de las microesferas con medicamento fue de 9 a 11% en peso.

Las principales diferencias entre las microesferas obtenidas según el procedimiento descrito en el documento del estado anterior de la técnica mencionado anteriormente y las obtenidas según el procedimiento objeto de la presente invención radican en:

- 60 - la selección del polímero. En el Ejemplo 1 el polímero usado es un polilactido (100% de lactido) de peso molecular medio de 15000. Éste es un polímero estándar, según ese documento, para una liberación prolongada de acetato de 5-OxoPro-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-ProNH₂ durante un período de tres meses;
- 65 - la composición de la fase acuosa externa constituida por un alcohol polivinílico (0,25%) en el Ejemplo 1;
- el sistema de evaporación del solvente orgánico. En el Ejemplo 1, la doble emulsión se agita durante varias

horas.

Ejemplo 2

5 Según el procedimiento de fabricación objeto de la presente invención, el acetato de 5-OxoPro-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-ProNH₂ se disuelve en agua, y la solución acuosa de principio activo se emulsiona posteriormente, usando un aparato de ultrasonidos, en una solución de cloruro de metileno que contiene 15% de un copolímero de d,l-lactido-co-glicólido, teniendo este copolímero un peso molecular medio de 63000 daltons (viscosidad inherente de aproximadamente 0,6 dl/g) y una proporción entre ácido láctico y ácido glicólico de 75/25. Una vez que la primera emulsión se ha formado, se emulsiona a su vez con una solución acuosa constituida por 0,25% de polisorbato 80, por 7% de polivinilpirrolidona y por 5% de manitol, con agitación, usando un agitador con hélice de palas. Después de esta etapa, se hace pasar la doble emulsión, bajo condiciones atmosféricas, por un sistema evaporador continuo constituido por una pendiente de longitud adecuada, sobre la cual fluye en capa fina la suspensión de microesferas. Usando dicho sistema evaporador, el solvente orgánico se evapora rápidamente, dando como resultado la estabilización rápida de la matriz polimérica. Las microesferas se recuperan finalmente por filtración, se lavan con agua y después se secan bajo liofilización. La carga final de medicamento en las microesferas es de 9 a 11% en peso.

Ejemplo 2 bis

20 Se elaboraron unas microesferas según el procedimiento descrito en el Ejemplo 2, usando 5% de cloruro de sodio en la fase acuosa externa como agente osmótico, en lugar de 5% de manitol.

Ejemplo 3

25 El estudio de la liberación *in vitro* de acetato de 5-OxoPro-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-ProNH₂ a partir de las microesferas preparadas según los Ejemplos 1 y 2 se realizó en un tampón fosfato.

30 Se suspendieron 25 mg de cada formulación en forma de microesferas en un medio de liberación compuesto por 5 ml de tampón fosfato (pH = 7,4), y posteriormente se agitaron (rotación) durante 4 días a 37°C. En diferentes instantes, la cantidad de péptido liberado se midió por cromatografía en fase líquida a alta presión (HPLC).

35 Los resultados de este estudio se dan en la Tabla 1. Demuestran que la composición preparada de acuerdo con el procedimiento objeto de la presente invención (Ejemplo 2) presenta una liberación "burst" que es muy inferior a la liberación "burst" de las composiciones preparadas según el procedimiento del estado anterior de la técnica del Ejemplo 1. De esta manera, 4 días después del inicio del estudio, las microesferas del Ejemplo 2 han liberado únicamente 3,4% de la cantidad total de péptido presente en las microesferas, mientras que las microesferas del Ejemplo 1 han liberado hasta 22,6% del mismo.

40 Tabla 1

Tiempo	% de liberación de péptido	
	Ejemplo 1	Ejemplo 2
1 día	13,4%	1,0%
2 días	16,7%	1,4%
4 días	22,6%	3,4%

Ejemplo 4

45 El estudio de la liberación *in vivo* de acetato de 5-OxoPro-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-ProNH₂ a partir de las microesferas preparadas según los Ejemplos 1, 2 y 2 bis se realizó en ratas.

50 Para este estudio, los tres tipos de microesferas (Ejemplos 1, 2 y 2 bis) se pusieron en suspensión en un excipiente acuoso estándar, antes de ser administrados a las ratas de manera subcutánea en una región dorsal rasurada previamente. La dosis administrada a cada animal es de 3,6 mg de acetato de 5-OxoPro-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-ProNH₂ microencapsulado. Se sacrificaron algunas ratas tres días después de la administración, mientras que otras se sacrificaron siete días después de la administración. Una vez que las ratas murieron, se extirpó posteriormente el sitio de inyección se y se recuperaron posteriormente las microesferas restantes a nivel del sitio de inyección, con el tejido conectivo contiguo. Entonces, se extrajo el acetato de 5-OxoPro-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-ProNH₂ restante, y se cuantificó después por cromatografía en fase líquida a alta presión (HPLC).

60 Los resultados de este estudio se dan en la Tabla 2. Se puede observar que, 3 días después, las microesferas del Ejemplo 1 ya liberan 35,3% de la cantidad total de péptido presente en las microesferas, mientras que las microesferas del Ejemplo 2 únicamente liberan 20,6%.

Tabla 2

Tiempo	% de péptido liberado		
	Ejemplo 1	Ejemplo 2	Ejemplo 2 bis
3 días	35,3%	20,6%	25,9%
7 días	41,6%	29,5%	-

Se puede concluir así que los resultados de este estudio *in vivo* concuerdan con los resultados obtenidos *in vitro* (Ejemplo 3) y demuestran que las formulaciones preparadas de acuerdo con el procedimiento de la presente invención presentan una liberación "burst" sustancialmente menor que la liberación "burst" de las composiciones preparadas de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 1 del estado anterior de la técnica del ejemplo 1.

Ejemplo 5

Para completar los resultados precedentes (Ejemplos 3 y 4), se llevó a cabo un estudio profundizado de la liberación *in vivo* de principio activo durante las primeras 24 horas después de la administración de las microesferas.

En esta prueba, el contenido sérico de acetato de 5-OxoPro-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-ProNH₂ se evaluó en ratas por cromatografía en fase líquida - espectrometría de masa-espectrometría de masa (LC/SM/SM), después de la administración subcutánea de las formulaciones en forma de microesferas preparadas según los Ejemplos 1 y 2. De esta manera, se inyectaron 3,6 mg de acetato de 5-OxoPro-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-ProNH₂ encapsulado en las ratas y, en diferentes momentos después de la administración, se tomaron muestras de sangre para estimar el contenido de acetato de 5-OxoPro-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-ProNH₂ en el suero.

Los resultados de este estudio se dan en la Figura 1. De esta manera, una hora después de la administración de las microesferas del Ejemplo 1, la concentración de péptido en el suero es de 107,8 µg/l, mientras que para las microesferas del Ejemplo 2, la concentración de péptido en el suero es de 51,8 µg/l. Después de 2, 3, 4, 8 y 24 horas, las microesferas del Ejemplo 1 presentan, respectivamente, unas concentraciones séricas de 103,7, 50,1, 30,3, 9,5 y 3,8 µg/l, mientras que las microesferas del Ejemplo 2 presentan, respectivamente, unos valores de 28,0, 5,5, 4,5, 9,3 y 1,0 µg/l.

De esta manera, los resultados de este estudio están de acuerdo con los resultados obtenidos para los Ejemplos 3 y 4, ya que se constata que las microesferas del Ejemplo 2 liberan menos péptido durante las primeras 24 horas (efecto "burst") que las microesferas del Ejemplo 1. Se puede concluir que cuando las microesferas contienen la matriz polimérica según la presente invención, y cuando se fabrican usando el procedimiento según la presente invención, presentan una liberación "burst" que es sustancialmente inferior a las microesferas preparadas de acuerdo con el procedimiento del estado anterior de la técnica, después de la administración *in vivo*.

Ejemplo 6

Se estudió el perfil completo de liberación de acetato de 5-OxoPro-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-ProNH₂ a partir de las microesferas preparadas según el Ejemplo 2 en unas ratas. El propósito del estudio es demostrar que, después del fenómeno de liberación "burst" (que tiene lugar sistemáticamente, pero que es relativamente bajo con respecto a las microesferas descritas en el estado anterior de la técnica), las microesferas obtenidas según el procedimiento de la presente invención liberan el péptido en continuo durante un período de varios meses.

De manera similar al Ejemplo 4, las microesferas son puestas en suspensión en un vehículo acuoso estándar para su administración subcutánea a nivel de una zona dorsal previamente rasurada. La dosis administrada a cada animal es de 3,6 mg de acetato de 5-OxoPro-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-ProNH₂ encapsulado.

En diversos momentos durante un período de tres meses, se sacrificaron unos grupos de ratas, se extirpó el sitio de inyección, y después se recuperaron las microesferas restantes a nivel del sitio, con el tejido conjuntivo contiguo. Se extrajo entonces el acetato de 5-OxoPro-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-ProNH₂ restante a nivel del sitio de inyección y después se cuantificó por cromatografía en fase líquida a alta presión (HPLC).

Los resultados de este estudio se dan en la Figura 2. Muestran así que las microesferas liberan el péptido continuamente durante un período de tiempo de por lo menos tres meses.

Ejemplo 7

Se realizó en este caso el estudio de la actividad biológica *in vivo* del acetato de 5-OxoPro-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-ProNH₂ microencapsulado en unas microesferas preparadas según el Ejemplo 2 y Ejemplo 2 bis.

El acetato de 5-OxoPro-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-ProNH₂ es un análogo agonista poderoso de la hormona LH-RH, que estimula la secreción de las gonadotropina por la hipófisis y la esteroidogénesis en los órganos genitales en dosis agudas. Sin embargo, cuando se administra crónicamente, éste produce, paradójicamente, unos efectos

inhibidores agonistas sobre la gonadotropina hipofisaria y la esteroidogénesis testicular y ovárica. Una administración inicial de acetato de 5-OxoPro-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-ProNHEt provoca un aumento brusco de las tasas séricas de gonadotropinas y de hormonas sexuales, pero en el caso de una exposición continua al medicamento, estas tasas de hormonas disminuyen sustancialmente hasta que llegan por debajo de los valores iniciales de base, después de varios días de administración, y este fenómeno persiste durante el tratamiento.

En consecuencia, para verificar que la baja liberación "burst" de las formulaciones fabricadas según los Ejemplos 2 y 2 bis no altera su actividad farmacológica, se inyectaron 3,6 mg de acetato de 5-OxoPro-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-ProNHEt microencapsulado en estas microesferas mediante administración subcutánea a unas ratas y, en diversos momentos después de la administración, se tomaron unas muestras de sangre para estimar la testosterona sérica mediante dosificación radioinmunitaria.

Los resultados de este estudio se dan en la Figura 3. Los resultados muestran así un perfil de testosterona sérica apropiada: un aumento brusco durante los primeros días, seguida de una supresión de la concentración plasmática de testosterona, y demuestran así una actividad biológica correcta del péptido liberado a partir de la formulación según la presente invención.

El objeto de los Ejemplos 8 a 10 es mostrar las diferentes ventajas que presentan las microesferas preparadas de acuerdo con el procedimiento objeto de la presente invención con respecto a las microesferas preparadas según el procedimiento descrito en la patente FR 2 718 642. Las principales diferencias que existen entre la presente invención y la invención descrita en la patente FR 2 718 642 son las siguientes:

- En el procedimiento de la presente invención no se usa ningún agente de modulación de liberación.
- Adición de manitol o de NaCl, como agente osmótico, en la fase acuosa externa en la cual se emulsifica la primera emulsión.
- Selección de un intervalo de peso molecular (40000 a 80000) y de una proporción ácido láctico/ácido glicólico (50/50 a 80/20) del copolímero d,l-lactido-co-glicólido (PLGA) en la presente invención.

Ejemplo 8: Efecto del agente de modulación de la liberación sobre la liberación *in vitro*

Se prepararon unas microesferas según el procedimiento de fabricación descrito en el Ejemplo 2, usando como fase orgánica, una solución de cloruro de metileno que contiene 30% de un copolímero de d,l-lactido-co-glicólido que tiene un peso molecular medio de 34000 daltons (viscosidad inherente de aproximadamente 0,4 dl/g) y una proporción entre ácido láctico y ácido glicólico de 50/50, así como varias cantidades (Ejemplos 8.1, 8.2 y 8.3) de un poli(d,l-lactido) que tiene un peso molecular medio de 2000 daltons (PLA 2000).

- Ejemplo 8.1: 0% de PLA 2000.
Ejemplo 8.2: 2,5% de PLA 2000.
Ejemplo 8.3: 5% de PLA 2000.

La fase acuosa externa es una solución acuosa compuesta por 0,25% de polisorbato 80, por 4% de polivinilpirrolidona y por 5% de manitol.

La liberación inicial *in vitro* de acetato de 5-OxoPro-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-ProNHEt a partir de las microesferas preparadas según los Ejemplos 8.1, 8.2 y 8.3 se realiza en un tampón fosfato.

Se pusieron en suspensión 25 mg de cada formulación en un medio de liberación compuesto por 5 ml de tampón fosfato (pH = 7,4), y posteriormente se agitaron (rotación) durante 7 días a 37°C. En diversos instantes, la cantidad de péptido liberado se midió por cromatografía en fase líquida a alta presión (HPLC). Los resultados se dan en la siguiente Tabla 3.

Tabla 3

Tiempo Días	Péptido liberado en %		
	Ejemplo 8.1	Ejemplo 8.2	Ejemplo 8.3
2 días	1,1%	1,1%	1,6%
4 días	1,7%	2,7%	2,9%
7 días	3,7%	11,8%	18,3%

Los resultados muestran, para estos tres casos 8.1, 8.2 y 8.3, una liberación "burst" muy pequeña y muestran que el agente de modulación de liberación tiene un efecto de aceleración de la liberación del principio activo, incluso a concentraciones bajas (2,5%) de PLA, indicando que el uso de este agente puede no ser adecuado para la fabricación de microesferas concebidas para una liberación prolongada (durante un período de tres meses).

Ejemplo 9: Efecto del agente de modulación de liberación sobre el perfil farmacodinámico y selección del polímero para una liberación prolongada durante tres meses

5 Se estudió el efecto de la composición polimérica de las microesferas sobre la liberación del principio activo en un estudio farmacodinámico llevado a cabo en unas ratas. Las microesferas se prepararon según el procedimiento de fabricación descrito en el Ejemplo 2, usando diversos tipos de polímero:

Ejemplo 9.1

10 Mezcla de 97,5% de un copolímero d,l-lactido-co-glicólido que tiene un peso molecular medio de 34000 daltons y una proporción entre ácido láctico y ácido glicólico de 50/50, y de 2,5% de un poli(d,l-lactido) que tiene un peso molecular medio de 2000 daltons (agente de modulación de liberación).

Ejemplo 9.2

Copolímero d,l-lactido-co-glicólido que tiene un peso molecular medio de 34000 daltons y una proporción entre ácido láctico y ácido glicólico de 50/50.

Ejemplo 9.3

Copolímero de d,l-lactido-co-glicólido que tiene un peso molecular medio de 63000 daltons y una proporción entre ácido láctico y ácido glicólico de 75/25.

25 El estudio de liberación *in vivo* del acetato de 5-OxoPro-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-ProNH₂ a partir de las microesferas se siguió a través de su efecto farmacológico de supresión de las tasas plasmáticas de testosterona.

30 Los resultados de este estudio se dan en la Figura 4. Los resultados confirman de esta manera que la presencia del agente de modulación de liberación acelera la liberación del principio activo, y que el agente de modulación de liberación no puede ser por lo tanto usado en unas formulaciones de liberación muy prolongada (tasas de testosterona suprimidas durante 5 semanas).

35 Los resultados también muestran que un copolímero d,l-lactido-co-glicólido que tiene un peso molecular medio de 34000 daltons y una proporción entre ácido láctico y ácido glicólico de 50/50 puede mantener la supresión de las tasas de testosterona durante 8 semanas, mientras que un copolímero d,l-lactido-co-glicólido que tiene un peso molecular medio de 63000 daltons y una proporción entre ácido láctico y ácido glicólico de 75/25 puede mantener la castración durante por lo menos tres meses.

Ejemplo 10: Efecto de la adición de un agente osmótico a la fase acuosa externa

Formulación 10.1

45 Se prepararon unas microesferas según el procedimiento de fabricación descrito en el Ejemplo 2, usando como fase acuosa externa, una solución compuesta por 0,25% de polisorbato 80 y por 4% de polivinilpirrolidona.

Formulación 10.2

50 Se prepararon unas microesferas según el procedimiento de fabricación descrito en el Ejemplo 10.1, agregando entre 2,5% y 5% de manitol en la fase acuosa externa como agente osmótico.

Formulación 10.3

55 Se prepararon unas microesferas según el procedimiento de fabricación descrito en el Ejemplo 10.1, agregando entre 2,5% y 5% de cloruro de sodio en la fase acuosa externa como agente osmótico.

Los resultados del estudio que muestran la influencia del agente osmótico en la fase acuosa externa se dan en la siguiente Tabla 4:

Tabla 4

Ejemplo	Agente osmótico	Tamaño en µm	Contenido en %
10.1	--	59,3	7,7
10.2	2,5% de manitol	50,4	10,5
10.2	5% de manitol	43,8	10,7
10.3	2,5% de NaCl	39,7	10,7

Ejemplo	Agente osmótico	Tamaño en μm	Contenido en %
10.3	5% de NaCl	32,7	10,4

De esta manera, el tamaño y el contenido de péptido de las microesferas dependen de la presencia del agente osmótico en la fase acuosa externa. La adición de manitol o de NaCl como agente osmótico aumenta la eficacia de encapsulación, es decir el porcentaje de principio activo microencapsulado (contenido). El tipo y la cantidad de agente osmótico agregado también pueden permitir controlar el tamaño de las partículas. En el contexto de la presente invención, el NaCl se usa ventajosamente como agente osmótico, ya que se ha demostrado que bajo condiciones de agitación y de viscosidad idénticas, el cloruro de sodio permite una mayor reducción del tamaño de las partículas que el manitol, sin producir por ello una disminución de la eficacia de encapsulación.

10 **Ejemplo 11: Efecto de la concentración del agente aumentador de viscosidad (agente modificador de viscosidad) presente en la fase acuosa externa, sobre el tamaño de las partículas**

Formulación 11.1

15 Se prepararon unas microesferas según el procedimiento de fabricación descrito en el Ejemplo 2, pero sin principio activo, usando como fase acuosa externa, una solución compuesta por 0,25% de polisorbato 80, 5% de manitol y 6,8% de polivinilpirrolidona.

Formulación 11.2

20 Se prepararon unas microesferas según el procedimiento de fabricación descrito en el Ejemplo 2, pero sin principio activo, usando como fase acuosa externa, una solución compuesta por 0,25% de polisorbato 80, 5% de manitol y 8,0% de polivinilpirrolidona.

25 Los resultados del estudio que muestran la influencia del agente viscosificante en la fase acuosa externa se dan en la siguiente Tabla 5.

Tabla 5

Ejemplo	Agente viscosificante	Tamaño en μm
11.1	6,8% de polivinilpirrolidona	31,3
11.2	8,0% de polivinilpirrolidona	25,4

30 El Ejemplo 10.2 elaborado con una fase acuosa externa compuesta por 0,25% de polisorbato 80, 5% de manitol y 4% de polivinilpirrolidona, permitía obtener un tamaño de partícula de 43,8 μm . Aumentando la concentración de agente viscosificante, se puede constatar que se obtiene una disminución notable del tamaño de las partículas, como se muestra en la Tabla 5 anterior. De esta manera, el tamaño de las microesferas depende de la presencia del agente viscosificante en la fase acuosa externa, y de su concentración.

35

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para preparar una composición farmacéutica en forma de microesferas de liberación prolongada de un principio activo hidrosoluble, caracterizado por que comprende la sucesión de las siguientes etapas:
- 5 - disolver el principio activo en una cantidad de agua apropiada, estando dicha disolución del principio activo realizada sin la adición de ninguna sustancia que retenga el principio activo, ni de ningún agente estabilizador de la emulsión y sin ninguna operación destinada a aumentar la viscosidad,
 - 10 - emulsificar la solución acuosa del principio activo obtenido de esta manera con una solución de un copolímero matricial d,l-lactido-co-glicólido de peso molecular medio comprendido entre 40000 y 80000 y que tiene una proporción ácido láctico/ácido glicólico comprendida entre 50/50 y 80/20, disuelto en un hidrocarburo clorado, que conduce a una primera emulsión homogénea y microfina;
 - 15 - emulsificar dicha primera emulsión así obtenida en una fase acuosa externa que contiene de 0,1 a 0,5% en peso de polisorbato 80, de 1 a 25% en peso de polivinilpirrolidona, y de 0,1 a 10% en peso de manitol o de cloruro de sodio,
 - 20 - extraer-evaporar el solvente para obtener unas microesferas que se recuperan después de filtración, lavado y secado.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que el principio activo se selecciona de entre el grupo constituido por los péptidos, las proteínas, las vacunas, los antibióticos, los antidepresivos, los analgésicos, los antiinflamatorios y los citostáticos.
- 25 3. Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado por que el principio activo es el 5-OxoPro-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-ProNH₂ o una de sus sales.
- 30 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el principio activo está presente a una concentración comprendida entre 0,01 y 95% en peso, ventajosamente entre 0,5 y 40% en peso, con respecto al peso total de la fase acuosa interna.
- 35 5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el hidrocarburo clorado es el cloruro de metileno.
- 40 6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el copolímero matricial está presente a una concentración comprendida entre 5 y 50% en peso, con respecto al peso total de la solución constituida por el copolímero disuelto en el hidrocarburo clorado.
- 45 7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que, durante la etapa de extracción-evaporación del solvente, el solvente se elimina rápidamente a temperatura ambiente y bajo presión atmosférica, según un sistema de evaporación continuo constituido por una pendiente de longitud adecuada sobre la cual fluye en capa fina la suspensión de microesferas.
- 50 8. Microesferas susceptibles de ser obtenidas mediante la realización del procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que presentan una liberación continua de principio activo durante un período de más de dos meses, ventajosamente durante un período de por lo menos tres meses.
- 55 9. Microesferas según la reivindicación 8, caracterizadas por que el principio activo está presente a una concentración comprendida entre 0,5 y 20% en peso, ventajosamente entre 5 y 15% en peso, con respecto al peso total de las microesferas.
10. Microesferas según una de las reivindicaciones 8 y 9, caracterizadas por que su tamaño es inferior a 250 μm , ventajosamente inferior a 90 μm .
11. Microesferas según una de las reivindicaciones 8 a 10, caracterizadas por que se administran por vía parenteral, ventajosamente en forma de inyecciones intramusculares, subcutáneas o intrarteriales, o en el sitio donde se encuentra un tumor.

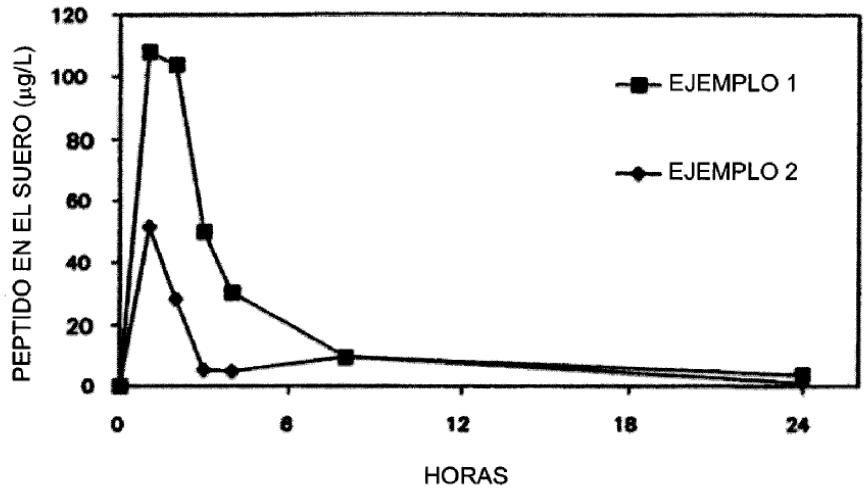


FIG. 1

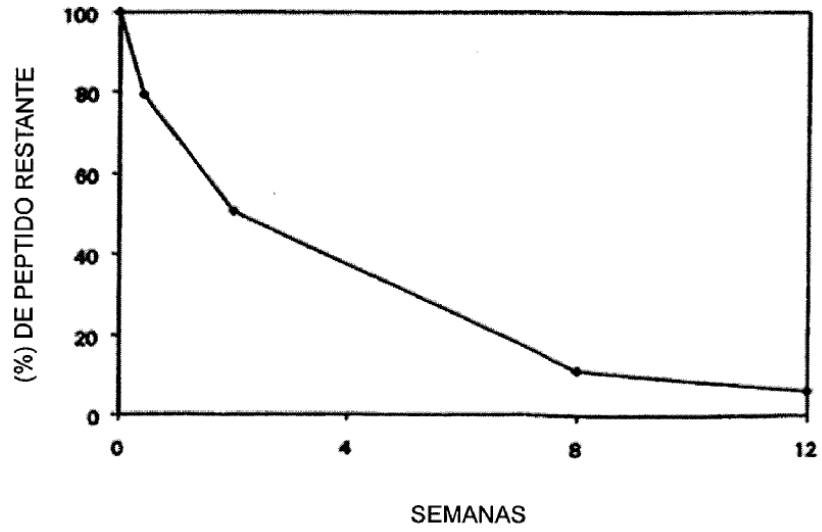


FIG. 2

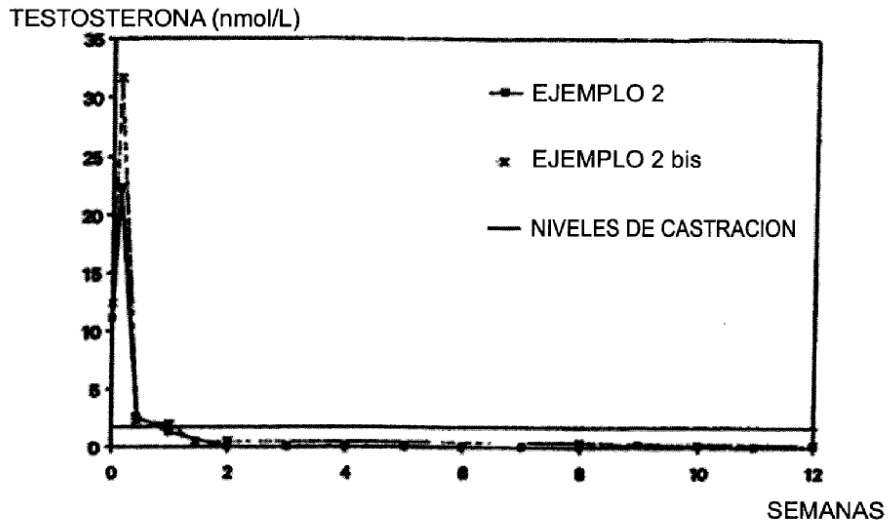


FIG. 3

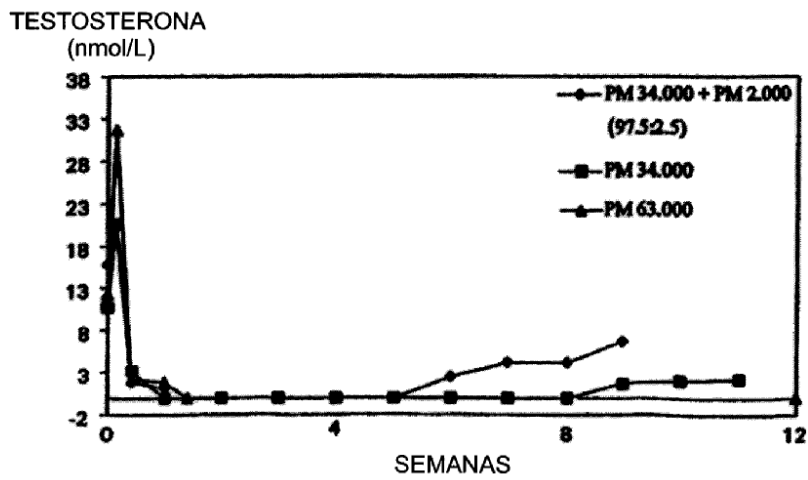


FIG. 4