

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 554 527**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/16** (2006.01)  
**A61K 31/192** (2006.01)  
**A61K 31/337** (2006.01)  
**A61K 31/573** (2006.01)  
**A61K 47/44** (2006.01)  
**A61K 47/32** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.01.2007 E 07704121 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.09.2015 EP 1978938**

54 Título: **Proceso para rellenar partículas poliméricas con un fármaco**

30 Prioridad:

**24.01.2006 EP 06250387**

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

**21.12.2015**

73 Titular/es:

**BIOCOMPATIBLES UK LIMITED (100.0%)  
Chapman House Farnham Business Park  
Weydon Lane  
Farnham, Surrey GU9 8QL, GB**

72 Inventor/es:

**LEWIS, ANDREW LENNARD;  
GOREISH, HIND HASSAN SIDAHMED y  
TANG, YIQING**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 554 527 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**

Proceso para rellenar partículas poliméricas con un fármaco

5 La presente invención se refiere a procesos para rellenar perlas poliméricas, para su uso como medio de administración de fármaco, con fármacos. Los procesos permiten el relleno de dichos medios con fármacos susceptibles de cristalización, de manera que se minimiza el efecto de estallido. En un aspecto preferido, las perlas son radio-opacas.

10 La terapia de embolización implica la introducción de un agente en el interior de la vasculatura con el fin de provocar el bloqueo deliberado de un vaso particular. Este tipo de terapia es particularmente útil para el bloqueo de conexiones anormales entre arterias y venas (tales como malformaciones arteriovenosas, o AVM) y también para la oclusión de vasos que alimentan determinados tumores hipervascularizados, con el fin de privar al tejido anormal de alimentación y provocar su necrosis y retracción.

15 El proceso de embolización puede inducir isquemia tumoral o necrosis dependiendo del alcance del mismo. La respuesta de las células tumorales al entorno hipóxico puede tener como resultado una angiogénesis entrante en la cual proliferan nuevos vasos sanguíneos con el fin de compensar la pérdida de flujo hasta el tumor por medio de la embolización. Por tanto, sería deseable combinar la embolización con la administración de agentes que podrían evitar la respuesta angiogénica entrante. Además, puede resultar deseable combinar este efecto con la liberación de otro agente citotóxico o anti-tumoral para provocar la muerte celular en aquellas células que no experimenten muerte por medio de embolización. Existen muchas divulgaciones de agentes embólicos de perlas poliméricas rellenas de agentes terapéuticos, para el tratamiento de tumores sólidos, tales como los documentos WO2004/000548, WO2005/087193, PCB/GB2004/003347 y PCT/GB2005/003431.

20 Los aceites se usan comúnmente en tecnologías de formulación farmacéutica y preparaciones. El aceite de soja se usa comúnmente en FDA Inactive Ingredients Guide (inyecciones IV, cápsulas orales y preparaciones para uso tópico).

25 Lipiodol es un medio de contraste de rayos-X oleoso y yodado en el que se somete a yodización aceite de semilla de adormidera hasta una cantidad de aproximadamente 40 % en peso. Se puede usar en determinadas investigaciones radiológicas en las cuales resulta deseable marcar una estructura viscosa, u otra estructura, directamente con el material radio-opaco sometido a instilación. También resulta apropiado para la introducción en canales estrechos y, por tanto, se puede usar en procedimientos de embolización. Se usa comúnmente en histerosalpinografía diagnóstica (HSG). HGS es una radiografía (o rayos-X) de útero y los conductos de Falopio usada para la detección de problemas ginecológicos, en particular los que afectan a la fertilidad femenina.

30 Lipiodol también se usa para linfografía, que es el examen de nódulos linfáticos y vasos linfáticos, en particular para la diagnosis pronóstica de leucemia y linfoma de Hodgkin y No Hodgkin. También se usa para la detección de trastornos de las glándulas y conductos salivares.

35 Se usa comúnmente de forma extra-oficial en combinación con quimioterapia, es decir, el tratamiento con un agente citotóxico o anti-tumoral, de manera que se administra Lipiodol:quimio emulsión por vía intra-arterial en el tratamiento super-selectivo de carcinoma hepatocelular.

40 Ibuprofeno (IBU) es un fármaco hidrófobo y se sabe que forma muchos tipos de cristales. Las propiedades del cristal de IBU se sabe que afectan a su procesado farmacéutico (Romero, A.J. et al., 1991 Pharma Acta Helv. 66(2), 34-43). La forma de los cristales de IBU depende del disolvente y ésta se puede mejorar por medio de la elección de un disolvente apropiado (Garekani HA, et al., Crystal habit modifications of IBU and their physicomechanical characteristics. Drug Dev Ind Pharm. 27(8): 803-9, 2001).

Los inventores han descrito el uso de microesferas que contienen IBU para tratar fibroides uterinos en el documento WO2004/000698.

45 Otros grupos también han descrito el uso de microesferas para el encapsulado de fármacos. Boudy V et al., en J. Pharm. Clin. 18(1) (1999), preforman microesferas rellenas de indometacina y posteriormente las encapsulan con una mezcla coacervada de etilcelulosa y polisobutileno.

Song C.X et al, en Journal of Controlled Release 43 (1997) 197-212, preparan diversas nanopartículas de poli(ácido láctico-co-glicólico) rellenas de fármaco usando una técnica de evaporación de disolvente/emulsificación.

50 No obstante, hasta la fecha no se ha abordado el problema de la cristalización del fármaco durante el proceso de encapsulado.

La formación de cristales sobre las microesferas embólicas (MS) conduce a un número de desventajas en la fabricación de este producto. Mientras se introduce la mayoría del fármaco en el interior de la MS, parte queda en la superficie de la MS. Estos cristales de la superficie conducen a un mayor efecto de estallido, lo que tiene como resultado una descarga inmediata masiva de una gran dosis de fármaco. Estos cristales también pueden provocar

que las perlas experimenten agregación y agrupación por medio de interacciones hidrófobas, lo cual provoca su adhesión al eje de las jeringas, y haciendo más difícil su administración, aumentando la probabilidad de daño y la tendencia a la obstrucción del catéter durante la administración.

5 Durante la esterilización de perlas-IBU por medio de tratamiento en autoclave a 120 °C durante 15 minutos, parece que el cristal se funde sobre las superficies de las perlas, calentando por encima del punto de fusión de IBU [78 °C], lo cual conduce a la formación de gotas oleosas. Estas gotas son responsables de un proceso de nucleación, lo cual conduce a re-cristalización cuando se abren los viales y se expone el producto al aire. Los cristales causan los problemas indicados anteriormente y conducen al bloqueo del eje y el catéter durante el uso y aumentan el efecto de estallido del fármaco.

10 Se ha demostrado que las propiedades fisicoquímicas de los cristales de IBU se ven afectadas por las condiciones en las cuales tiene lugar la cristalización, y se llevan a cabo esfuerzos para producir composiciones de IBU con excipientes que tengan las propiedades deseadas por medio del control del proceso de formación de cristales. Se apreciaron las alteraciones en los cristales por parte de IBU en presencia de un polímero de Eudragit R S100 (Kachrimanis et al., 1998 Crystallisation conditions and physicomachanical properties of IBU-Eudragit S 100 spherical  
15 crystal agglomerates prepared by solvent-change technique. *Int. J. Pharm.* 173, 61-74). Rasenack et al. (IBU crystals with optimized properties. *Int. J. Pharm.* 245 (1-2): 9-24, 2002) han usado aditivos solubles en agua en un intento de modificar los cristales de IBU. Sugieren que los aditivos pueden interaccionar con el enlace de hidrógeno formado durante el proceso de cristalización de IBU, conduciendo a un cambio en las propiedades de los cristales resultantes. Francesco et al (Polymethacrylates as crystallisation modifiers in monolayer transdermal patches containing IBU. *E.J.P.B.*, 60:61-66, 2005) investigaron el uso de excipientes de bajo peso molecular para la inhibición de la cristalización de IBU en sistemas transdérmicos con el fin de mantener la eficacia y calidad de los parches y prolongar la vida útil del producto. Informaron de que la adición de propilen glicol inhibió la cristalización de IBU durante 50 días y Eudragit E (EUE) y Eudragit RL (EURL) evitaron la cristalización durante más de 12  
20 meses. Campbell et al. presentaron que las condiciones de secado o el curado térmico final evitaban la cristalización. En el documento US 4.832.953, se describió un método para evitar la formación de un hidrato cristalino en una dispersión de un líquido en una matriz no acuosa.

Las propiedades fisicoquímicas de IBU se pueden ver afectadas por la elección de una forma polimórfica apropiada, eligiendo un hábito de cristal apropiado, por medio del uso de técnicas de cristalización especiales, y por medio del uso de una preparación apropiada con excipientes para modificar la formación de cristales y retardar el proceso de  
30 nucleación. Se han usado los lípidos como vehículos para IBU, con el fin de aprovechar la ventaja de los mecanismos metabólicos de la bioquímica de lípidos, para permitir una administración dirigida y reducir la ulcerogenicidad (Lambert DM, 2000. *Eur. J. Pharm. Sci.* 11 Suppl. 2: S15-27).

De acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, se proporciona un proceso en el que se ponen en contacto perlas hinchables de polímero insoluble en agua e insoluble en aceite, con una disolución de fármaco  
35 cristalizante en un disolvente orgánico que es capaz de penetrar en las perlas, de modo que el fármaco se absorbe en el interior de las perlas, caracterizado por que la disolución contiene además un modificador de cristal que inhibe la cristalización del fármaco, en el que el modificador del fármaco se puede mezclar con el disolvente, y está seleccionado entre aceites, glicoles y éteres de glicol, y por que el polímero tiene carga aniónica, en el que los grupos aniónicos están seleccionados entre sulfonato, fosfonato y carboxilato y el polímero es poli(alcohol vinílico) reticulado.  
40

De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona una composición que comprende perlas hinchables de polímero insoluble en aceite e insoluble en agua, un fármaco cristalizante y un modificador de cristal que inhibe la cristalización del fármaco, en el que el fármaco y el modificador de cristal se absorben en el interior de las perlas, el polímero tiene carga aniónica, en el que los grupos aniónicos están seleccionados entre sulfonato, fosfonato y carboxilatos y poli(alcohol vinílico) reticulado, y el modificador de cristal está seleccionado entre aceites, glicoles y éteres de glicol.  
45

En la invención, el fármaco que se usa es generalmente uno que es susceptible a la cristalización, por ejemplo tras la retirada de disolvente, normalmente por medio de evaporación, o tras las etapas de esterilización, cuando puede tener lugar la migración del fármaco absorbido para formar gotas líquidas a temperaturas por encima de la  
50 temperatura de fusión, dando lugar a la formación de una fase metaestable susceptible de cristalización retardada.

Generalmente, los fármacos que forman cristales se conocen por parte de los expertos en la técnica. Una categoría de fármaco para el cual el invento es de particular valor son inhibidores de COX (1 o 2), tales como ibuprofeno. Otra clase de fármacos que incluye dichos fármacos formadores de cristales son los agentes anti-cáncer, por ejemplo paclitaxel. Otra clase de fármacos son corticosteroides, que tienen por ejemplo propiedades anti-inflamatorias,  
55 siendo un ejemplo dexametasona.

En la invención, el polímero que forma las perlas debe ser insoluble en agua e insoluble en aceite. Aunque puede ser biodegradable, de manera que el fármaco se pueda liberar sustancialmente por medio de erosión de la matriz polimérica para liberar el fármaco a partir de la superficie, preferentemente el polímero es sustancialmente bioestable (es decir, no es biodegradable). El polímero es susceptible de hinchamiento en agua. El polímero

susceptible de hinchamiento en agua útil en la invención preferentemente tiene un contenido de agua de equilibrio, cuando experimenta hinchamiento en disolución salina tamponada con fosfato a temperatura ambiente, medido por medio de análisis gravimétrico, dentro del intervalo de 40 a 99 % en peso, preferentemente de 75 a 95 %. La densidad de reticulación debería ser tal que permita el movimiento relativo de las moléculas poliméricas durante la etapa de hinchamiento. Por tanto, las perlas se pueden definir como hinchables y en el comienzo del proceso reivindicado, las perlas deben ser susceptibles de al menos un grado de hinchamiento cuando entran en contacto con los disolventes de hinchamiento. Las perlas pueden experimentar hinchamiento antes del contacto con la disolución de fármaco/disolvente, pero preferentemente no experimentan hinchamiento al comienzo del proceso.

Las perlas son de un tamaño que sea útil en las aplicaciones de administración de fármaco. Aunque se pueden utilizar perlas muy grandes, tal como con un diámetro mayor de 5 mm, preferentemente las perlas tienen un diámetro menor de 2 mm, preferentemente de hasta 1500  $\mu\text{m}$ . Aunque el proceso puede resultar de utilidad para rellenar perlas de tamaño muy pequeño, por ejemplo con un diámetro menor de 10  $\mu\text{m}$ ; por ejemplo incluso tan pequeño como 1  $\mu\text{m}$ , dichas perlas son difíciles de manipular en forma seca, por ejemplo en la forma en la que son susceptibles de hinchamiento. Además, la invención es el mayor beneficio para rellenar perlas de utilidad en embolización. Como tal, las perlas tienen un diámetro dentro del intervalo de 25 a 1500  $\mu\text{m}$ , preferentemente dentro del intervalo de 50 a 1200  $\mu\text{m}$ , por ejemplo dentro del intervalo de 100 a 1200  $\mu\text{m}$ .

En la invención, se pretende que el término perla abarque partículas de todas las formas, por ejemplo formas de vástago, cubo, irregulares y formas no uniformes. No obstante, la invención es del mayor beneficio cuando las perlas son esféricas, esferoidales o con forma de microgránulos, o con forma de disco. En las partículas no esféricas, tal como los microgránulos, esferoides o discos, preferentemente la dimensión máxima no es más de tres veces el diámetro mínimo, y preferentemente es menor que dos veces el diámetro mínimo, por ejemplo alrededor de 1,5 o menos. Las limitaciones de tamaño mencionadas anteriormente se determinan por medio de ensayo de una muestra de las perlas hinchables en condiciones en las cuales las perlas se hinchan hasta el equilibrio en disolución salina tamponada con fosfato a temperatura ambiente, y los tamaños se miden usando un microscopio óptico.

Los materiales son de particular utilidad para la formación de composiciones para su uso en embolización. Preferentemente, las composiciones se proporcionan con una especificación de tamaño de partícula que define la dispersión de diámetros. Preferentemente, las perlas se clasifican con intervalos de tamaño calibrados para la embolización precisa de los vasos. Preferentemente, las partículas tienen un tamaño, cuando se equilibran en disolución salina tamponada con fosfato a temperatura ambiente, dentro del intervalo de 100 a 1500  $\mu\text{m}$ , más preferentemente dentro del intervalo de 100 a 1200  $\mu\text{m}$ . Los intervalos calibrados pueden comprender perlas que tienen diámetros con un ancho de banda de aproximadamente 100 a 300  $\mu\text{m}$ . Los intervalos de tamaño pueden ser por ejemplo de 100 a 300  $\mu\text{m}$ , de 300 a 500  $\mu\text{m}$ , de 500 a 700  $\mu\text{m}$ , de 700 a 900  $\mu\text{m}$  y de 900 a 1200  $\mu\text{m}$ .

Otro tipo de polímero que se puede usar para formar la matriz insoluble en agua y apta para hinchamiento en agua es poli(alcohol vinílico) reticulado usando agentes de reticulación de tipo aldehído tal como glutaraldehído. Para dichos productos, el poli(alcohol vinílico) (PVA) se puede convertir en iónico proporcionando grupos iónicos colgantes por medio de reacción de un compuesto que contiene un grupo funcional iónico con los grupos hidroxilo. Los ejemplos de grupos funcionales apropiados para la reacción con los grupos hidroxilo son agentes acilantes, tales como ácidos carboxílicos o sus derivados, u otros grupos ácidos que pueden formar ésteres.

La composición de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención comprende perlas hinchables de polímero insoluble en aceite e insoluble en agua, en la que el polímero tiene carga aniónica, en la que los grupos aniónicos están seleccionados entre poli(alcohol vinílico) reticulado con sulfonato, fosfonato y carboxilato

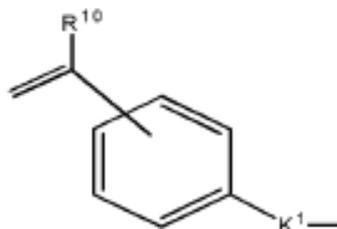
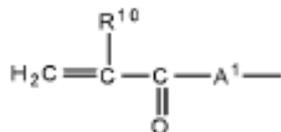
La invención es de particular valor cuando la matriz polimérica se forma a partir del macrómero de poli(alcohol vinílico), que tiene más de un grupo colgante etilénicamente insaturado por molécula, por medio de polimerización por radicales de los grupos etilénicos. Preferentemente, el macrómero de PVA se copolimeriza con monómeros etilénicamente insaturados que, por ejemplo, incluyen un monómero no iónico y/o un monómero iónico que incluye un monómero aniónico.

El macrómero de PVA se puede formar, por ejemplo, dotando el polímero de PVA, de peso molecular apropiado tal como dentro del intervalo de 1000 a 500.000 D, preferentemente de 10.000 a 100.000 D, de grupos vinílicos o acrílicos. Los grupos acrílicos colgantes se pueden proporcionar, por ejemplo, haciendo reaccionar ácido acrílico o metacrílico con PVA para formar enlaces de éster a través de algunos de los grupos hidroxilo. Otros métodos para unir grupos vinílicos capaces de polimerizar sobre el poli(alcohol vinílico) se describen, por ejemplo, en el documento US 4.978.713 y, preferentemente, el documento US 5.508.317 y el documento US 5.583.163. El macrómero formado de este modo comprende una cadena principal de poli(alcohol vinílico) a la cual se une, por medio de un enlace de acetal cíclico, un resto de (alc)acrilaminoalquilo. El Ejemplo 1 describe la síntesis de un ejemplo de dicho macrómero conocido por medio del nombre aprobado nelfilcon B. Preferentemente, los macrómeros de PVA tienen de aproximadamente de 2 a 20 grupos etilénicos colgantes por molécula, por ejemplo de 5 a 10.

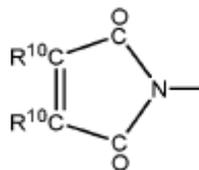
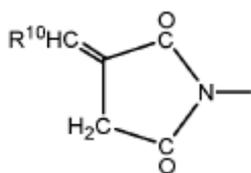
Cuando los macrómeros de PVA se copolimerizan con monómeros etilénicamente insaturados que incluyen un monómero iónico, el monómero iónico preferentemente tiene la fórmula general I

Y<sup>1</sup>BQ<sup>1</sup>

en la que Y<sup>1</sup> está seleccionado entre



CH<sub>2</sub>=C(R<sup>10</sup>)-CH<sub>2</sub>-O-, CH<sub>2</sub>=C(R<sup>10</sup>)-CH<sub>2</sub> OC(O)-, CH<sub>2</sub>=C(R<sup>10</sup>)OC(O)-, CH<sub>2</sub>=C(R<sup>10</sup>)-O-,  
 CH<sub>2</sub>=C(R<sup>10</sup>)CH<sub>2</sub>OC(O)N(R<sup>11</sup>)-, R<sup>12</sup>OOCCR<sup>10</sup>=CR<sup>10</sup>C(O)-O-, R<sup>10</sup>CH=CHC(O)-O-,  
 R<sup>10</sup>CH=C(COOR<sup>12</sup>)CH<sub>2</sub>-C(O)-O-,



5 y

en la que:

R<sup>10</sup> es hidrógeno o un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>;

R<sup>11</sup> es hidrógeno o un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>;

R<sup>12</sup> es hidrógeno o un grupo alquilo C<sub>1-4</sub> o BQ<sup>1</sup> en la que B y Q<sup>1</sup> son como se define a continuación;

10 A<sup>1</sup> es -O- o NR<sup>11</sup>;

K<sup>1</sup> es un grupo -(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>OC(O)-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>C(O)O-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>OC(O)O-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>NR<sup>13</sup>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>NR<sup>13</sup>C(O)-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>C(O)NR<sup>13</sup>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>NR<sup>13</sup>C(O)O-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>OC(O)NR<sup>13</sup>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>NR<sup>13</sup>C(O)NR<sup>13</sup>- (en la que los grupos R<sup>13</sup> son iguales o diferentes), -(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>O-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup> u opcionalmente en combinación con B, un enlace de valencia y r es de 1 a 12 y R<sup>13</sup> es hidrógeno o un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>;

15 B es un alcanodiilo lineal o ramificado, oxalqueno, alcanodiiloxaalcanodiilo una cadena de alcanodiiloligo(oxaalcanodiilo) que contiene opcionalmente uno o más átomos de flúor y que incluye cadenas perfluoradas o, si Q<sup>1</sup> o Y<sup>1</sup> contiene un átomo de carbono ligado a B un enlace de valencia; y

Q<sup>1</sup> es un grupo aniónico.

20 Un grupo Q<sup>1</sup> puede ser, por ejemplo, un grupo carboxilato, sulfonato o fosfato. El monómero se puede polymerizar como ácido libre o en forma de sal. Preferentemente, el valor de pK<sub>a</sub> del ácido conjugado es menor de 5.

En el monómero de fórmula general I preferentemente Y<sup>1</sup> es un grupo CH<sub>2</sub>=CR<sup>10</sup>COA<sup>1</sup> - en la que R<sup>10</sup> es H o metilo, preferentemente metilo, y en la que A<sup>1</sup> es preferentemente NH. Preferentemente, B es un grupo alcanodiilo de 1 a 12, preferentemente de 2 a 6 átomos de carbono. Dichos monómeros son monómeros acrílicos.

25 Se pueden incluir por ejemplo el monómero no iónico en el monómero de diluyente monomérico etilénicamente insaturado. Dicho monómero puede ser útil para controlar el valor de pK<sub>a</sub> de los grupos ácidos, para controlar la naturaleza hidrófila o hidrófoba del producto, para proporcionar regiones hidrófobas en el polímero, o simplemente para actuar como diluyente inerte. Los ejemplos de monómero diluyente no iónico son, por ejemplo, (alc)acrilatos de alquilo y (alc)acrilamidas, especialmente los compuestos que tienen grupos alquilo con 1 a 12 átomos de carbono, hidroxilo, y (alc)acrilatos de alquilo y (alc)acrilamidas con sustitución de hidroxilo, vinil lactamas, estireno y otros monómeros aromáticos.

30

En la matriz polimérica, preferentemente la cantidad de anión está dentro del intervalo de 0,1 a 10 meq g<sup>-1</sup>, preferentemente al menos 1,0 meq g<sup>-1</sup>. Los aniones preferidos proceden de ácidos fuertes.

5 Cuando se copolimeriza el macrómero de PVA con otros monómeros etilénicamente insaturados, la proporción en peso de macrómero de PVA con respecto al otro monómero está preferentemente dentro del intervalo de 50:1 a 1:5, más preferentemente dentro del intervalo de 20:1 a 1:2. En el monómero etilénicamente insaturado, preferentemente el monómero aniónico está presente en una cantidad dentro del intervalo de 10 a 100 % en moles, preferentemente al menos 25 % en moles.

10 El polímero reticulado se puede formar como tal en forma de partículas, por ejemplo por medio de polimerización en gotas de monómero en una fase dispersada en un vehículo inmiscible continuo. Se conocen ejemplos de polimerizaciones apropiadas de agua en aceite para producir partículas que tienen el tamaño deseado, cuando se hinchan. Por ejemplo, el documento US 4.224.427 describe procesos para la formación de perlas esféricas uniformes (microesferas) de hasta 5 mm de diámetro, por medio de dispersión de monómeros solubles en agua en una fase continua de disolvente, en presencia de agentes de suspensión. Los estabilizadores y los tensioactivos pueden estar presentes para proporcionar control sobre el tamaño de las partículas en fase dispersada. Tras la polimerización, se recuperan las microesferas reticuladas por medios conocidos, y se lavan y opcionalmente se esterilizan. Preferentemente, las partículas, por ejemplo microesferas, se hinchan en un líquido acuoso, y se clasifican de acuerdo con su tamaño.

20 En el método de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, el disolvente orgánico es capaz de disolver el fármaco y penetrar en las perlas. En dicha realización preferida, se selecciona para que sea capaz de disolver el fármaco. Es posible que el propio disolvente actúe como modificador de cristal y, además, debería quedar retenido en el producto relleno, en cuyo caso se puede usar el disolvente en una cantidad menor que la requerida para la penetración o relleno hasta el equilibrio. No obstante, es preferible que el disolvente se use en exceso para lograr facilidad de manipulación. Tras el período de contacto durante el relleno del fármaco, las perlas que se pueden hinchar y el exceso de disolvente se pueden separar uno de otro, el disolvente, junto con el fármaco no introducido y el inhibidor de cristalización en exceso. Generalmente, dichas técnicas de separación apropiadas implican técnicas de separación sólido-líquido tales como centrifugación y/o filtración. Generalmente, esto viene seguido de evaporación del disolvente adicional, por ejemplo sometiendo las perlas a mayor temperatura y/o menor presión. Cuando se usan dichas técnicas de evaporación, el modificador de cristal debe ser suficientemente no volátil para que no sea retirado hasta un alcance que resulte perjudicial.

30 En un proceso preferido, las perlas rellenas secas, tras la retirada del exceso de disolvente orgánico, se ponen en contacto con un licor de almacenamiento acuoso, preferentemente en un exceso tal que se produce la penetración de las perlas, y preferentemente se hinchan hasta el equilibrio y está presente una fase continua de licor de perla extra en la cual las perlas se suspenden o pueden experimentar suspensión. Preferentemente, mientras se produce la suspensión en dicho licor de almacenamiento acuoso, las perlas se esterilizan por medio de calentamiento del recipiente en el que se produce la suspensión, por ejemplo a una temperatura de al menos 90 °C, más preferentemente al menos 100 °C, preferentemente durante un período de tiempo de al menos 5 segundos, más preferentemente por medio de calentamiento a una temperatura de 121 °C en un autoclave, durante un período de al menos 15 minutos.

40 Preferentemente, el modificador de cristal es un líquido; es sustancialmente miscible con el disolvente orgánico. Debido a que es preferible retirar el exceso de disolvente con un medio que implique evaporación, preferentemente el modificador de cristal es sustancialmente no volátil en las condiciones de retirada del disolvente. Preferentemente, el modificador de cristal tiene un punto de ebullición de más de 81 °C, más preferentemente un punto de ebullición de más de 90 °C. El material también debería ser estable en las condiciones de esterilización, de forma que dicha etapa sea parte del proceso, como en la realización preferida. El material también se puede seleccionar con respecto a su densidad, de manera que las perlas rellenas sean isoflotantes con el medio de almacenamiento y/o de administración, de manera que queden suspendidas en su disolución de almacenamiento y/o en la mezcla de esta suspensión con el medio de contraste preparada inmediatamente antes de la administración al paciente. En una realización, la densidad del modificador de cristal es ligeramente mayor que la del agua, por ejemplo dentro del intervalo de 1,01 a 1,30 g/ml. Este es el caso, por ejemplo, cuando se usa Lipiodol como modificador de cristal. 45 Alternativamente, en una realización diferente, el modificador de cristal puede ser menos denso que el agua. Se puede usar una mezcla de dos o más ingredientes como modificador de cristal.

55 Ejemplos de materiales miscibles no volátiles son aceites y glicoles o éteres de glicol. Un ejemplo de glicol es glicerol. Los ejemplos de aceites incluyen aceite de soja (densidad de 0,91-0,92 g/ml), aceite de semilla de algodón, aceite de almendra, aceite de girasol (densidad 0,92 g/ml), aceite de semilla de adormidera y aceite mineral (densidad 0,84-0,87 g/ml).

60 En una realización particularmente preferida, el modificador de cristal tiene propiedades útiles como agente de formación de imágenes, por ejemplo es un material radio-opaco, de manera que la administración de la composición a un paciente puede seguirse usando técnicas radiográficas. En una realización altamente preferida de la invención, el modificador de cristal es un material de base oleosa que es radio-opaco, por ejemplo, un aceite yodado, tal como un éster de alquilo inferior de ácido graso yodado, o mezcla, por ejemplo Lipiodol o Etiodol. Lipiodol consiste en

aceite de semilla de adormidera yodado, con parte de estabilizador de aceite no yodado. Contiene alrededor de 38 a 42 % en peso de yodo, parte como derivado de di-yodo y parte como derivado de mono-yodo.

5 En el método de la presente invención, preferentemente el disolvente orgánico está seleccionado entre alcoholes alifáticos C<sub>1-12</sub> monohídricos y está preferentemente seleccionado entre etanol y propanol. Preferentemente, el disolvente debería ser volátil con respecto al modificador de cristal. Por ejemplo, preferentemente debería tener un punto de ebullición menor de 90 °C, más preferentemente menor de 80 °C, con el fin de permitir la retirada en condiciones suaves, por ejemplo, que impliquen evaporación a temperaturas bajas y preferentemente presiones bajas.

10 La invención resulta apropiada para su uso con una amplia variedad de fármacos. El nivel de relleno de fármaco depende de la dosificación deseada y puede seleccionarse por parte de la persona experta en la técnica, basándose en su conocimiento de la actividad del fármaco, las características de liberación a partir de las perlas y la indicación objeto de tratamiento. De igual forma, la concentración de fármaco en la mezcla que se introduce se selecciona de acuerdo con el relleno deseado de fármaco. Preferentemente, la concentración de fármaco en la disolución de relleno está dentro del intervalo de 1 a 1000 mg/ml, preferentemente dentro del intervalo de 10 a 500 mg/ml. Se debe incluir el modificador de cristal en la disolución de relleno en una cantidad tal que el producto final tenga un nivel suficiente de modificador de cristal para modificar la formación de cristales en el grado deseado. Este nivel puede determinarse por la persona experta en la técnica llevando a cabo una serie de ensayos en los cuales se rellenan diferentes niveles de fármaco y modificador de cristal en el tipo específico de polímero y se somete a las etapas de proceso a las que se sometería la composición farmacéutica, con el fin de determinar el nivel mínimo de modificador necesario para llevar a cabo la cristalización del fármaco, es decir, para evitar que tenga lugar la cristalización. Los niveles apropiados de los modificadores de cristal (es decir, los inhibidores de cristalización) están dentro del intervalo de 1 a 99 % peso/peso, basados en la cantidad total de fármaco de las perlas, preferentemente dentro del intervalo de 5 a 50 %.

25 De manera apropiada, la proporción de fármaco:polímero está dentro del intervalo de 10:1 a 1:10, basándose en la materia seca de las perlas (es decir, polímero) preferentemente dentro del intervalo de 2:1 a 1:2.

30 Se ha comprobado que el método de la presente invención es de particular valor para producir perlas rellenas de paclitaxel (PTX), ibuprofeno y dexametasona (DEX). Las perlas rellenas de fármaco-aceite tienen la ventaja de una formación reducida de cristales sobre la superficie de la perla. También se piensa que existe una formación reducida de cristales dentro de las perlas, lo cual proporciona una distribución más homogénea de fármaco en las perlas. La perlas rellenas de PTX pueden actuar como agentes embólicos anti-tumorales, mientras que las perlas rellenas de IBU y Dex pueden tener efectos anti-inflamatorios así como también una potencial actividad anti-tumoral por medio de su modo de acción en la inhibición de COX. Las ventajas de reducir la formación de cristales incluyen: un menor efecto de estallido debido a los cristales de fármacos sobre la superficie de la perla, menor tendencia adhesiva que hace que las perlas se peguen al envase, tal como plásticos usados para las jeringas, menor probabilidad de auto-agregación en el envase y el catéter y, de este modo, mejor capacidad de administración y relleno homogéneo. Adicionalmente, existe la posibilidad de que la presencia del modificador pueda mejorar la estabilidad y, de este modo, la vida útil del producto. El uso de medio de contraste basado en aceite (aceites yodados tales como lipiodol) como modificador de cristal, puede conferir una ventaja adicional con el fin de permitir la visualización de las perlas durante la administración, y potencialmente permitir la trazabilidad de las perlas tras la embolización. Los aceites yodados poseen una densidad mayor que el agua y su uso como modificadores de cristal también aumenta la densidad total de las microesferas rellenas de fármaco, de manera que es posible controlar las propiedades de suspensión de las perlas cuando se colocan en una mezcla de disolución salina:contraste que se usa normalmente para la administración del dispositivo. Lipiodol tiene una densidad de 1.280 g/ml a 15 °C.

45 En la invención, se prefiere el uso de aceites que estén aprobados por FDA como ingredientes activos, y se ha comprobado que estos modifican la formación de cristales de ibuprofeno, paclitaxel y dexametasona. El efecto de reducción de la agregación de las perlas y adhesión a plásticos usados durante la manipulación y administración es una ilustración de las ventajas de la invención. Además, la visualización de las perlas usando radiografía, cuando lipiodol es el modificador de cristal, ha resultado posible y proporciona una combinación significativa de propiedades útiles. El uso de aceite de alta densidad como modificador de cristalización proporcionó la ventaja adicional de que se controló la densidad de las perlas rellenas para que fuera más próxima a la del medio de almacenamiento acuoso, de modo que fuera posible mezclar las perlas rellenas con disolución salina y/o otro medio de contraste, antes de la administración sin sedimentación intermedia. En la invención, por tanto, se pueden administrar las perlas de producto en técnicas normales para embolización, incluyendo opcionalmente suspensión en un medio de contraste adicional para visualización adicional por medio de radiografía.

55 Lo siguiente es una breve descripción de las figuras:

Las Figuras 1A y 1C muestran cristales de ibuprofeno sobre la superficie de perlas usando el Ejemplo Comparativo 1;

Las Figuras 1B y 1D muestran perlas de ibuprofeno tras el relleno usando aceites (Lipiodol)- Ejemplo 1;

- La Figura 2 muestra la distribución de tamaño de perlas de ibuprofeno tras el relleno con diferentes concentraciones de lipiodol, en comparación con el control no relleno como se describe en el Ejemplo 2;
- La Figura 3A-3E son histogramas de distribución de tamaño de perlas rellenas de ibuprofeno tras hidratación usando diferentes volúmenes de agua y 2 ml de disolución salina, en comparación con el control en disolución salina al 0,9 % [w = agua, PBS = disolución salina con tampón de fosfato] - véase Ejemplo 2;
- La Figura 4A muestra el perfil de elución de ibuprofeno usando Lipiodol al 5 % y 30 % para el relleno de las perlas de 700-900  $\mu\text{m}$  en el Ejemplo 2;
- La Figura 4B muestra el perfil de elución de ibuprofeno usando Lipiodol al 5 % y 30 % para el relleno de las perlas de 500-700  $\mu\text{m}$  en el Ejemplo 2;
- La Figura 5 ilustra la compresión de perlas rellenas de ibuprofeno usando Lipiodol al 5 %, 30 % y 70 %, en comparación con los controles no rellenos y perlas rellenas sin aceite (Ejemplo 3);
- La Figura 6A muestra las concentraciones de ibuprofeno eluido en PBS tras el relleno usando diferentes aceites (Ejemplo 6);
- La Figura 6B muestra el % de ibuprofeno eluido a partir de las perlas rellenas usando diferentes aceites (Ejemplo 6);
- La Figura 7 muestra la distribución de tamaño de perlas de 500-700  $\mu\text{m}$  tras el relleno con ibuprofeno usando diferentes aceites (Ejemplo 6);
- La Figura 8 muestra el % de ibuprofeno eluido a partir de diversas perlas rellenas con Ibuprofeno-Lipiodol al 5 % (Ejemplo 7);
- La Figura 9 muestra diversas perlas tras elución de 24 horas. 9A: Bloque de Perlas IBU-Lipiodol al 5 %. 9B: Embosphere IBU-Lipiodol al 5 %. 9C; Contour SE IBU-Lipiodol al 5 % (Ejemplo 7);
- La Figura 10 muestra un Bloque de Perlas rellenas con paclitaxel con Lipiodol (A) Muestra 1. (B) Muestra 2 (Ejemplo 8);
- La Figura 11 muestra Bloque de Perlas rellenas de dexametasona sin Lipiodol. (A) y con Lipiodol al 10 % (B) (Ejemplo 10);
- La Figura 12A muestra Aberlyst relleno con Ibuprofeno-Lipiodol (Ejemplo 11);
- La Figura 12B muestra Amberlite relleno con Ibuprofeno-Lipiodol (Ejemplo 11);
- La Figura 13 muestra el perfil de liberación de paclitaxel a partir de un Bloque de Perlas relleno con Lipiodol-paclitaxel (Ejemplo 9);
- La Figura 14 muestra la localización de Perlas de Ibuprofeno (IBU-BB) y Bloque de Perlas (BB) en la pos-embolización de útero (Ejemplo 12); y
- La Figura 15 muestra el nivel de linfocitos observados alrededor de Perlas de Ibuprofeno (IBU-BB) y Bloque de Perlas (BB) en 1 semana (Ejemplo 12);

Los siguientes ejemplos ilustran la invención:

#### **Ejemplo Comparativo: Preparación de Bloque de Perlas rellenas con IBU (IBU-BB)**

- Se fabricaron perlas rellenas con IBU usando perlas del producto comercialmente disponible BeadBlock™ proporcionado en jeringas estériles de perlas de 2 ml con intervalo de tamaño de 500-700  $\mu\text{m}$ . La producción de dichas perlas se describe en el documento WO2004/000548, Ejemplo 1, como "producto de bajo contenido de AMPS". Brevemente, se suspende una mezcla acuosa de macrómero de poli(alcohol vinílico) que tiene grupos etilénicamente insaturados con enlace acetal y sulfonato de 2-acrilamido-2-metil-propano en una proporción en peso de aproximadamente 12:1, en una fase continua de acetato de butilo que contiene un estabilizador de butirato y acetato de celulosa con un agitador y se polimeriza por medio de radicales usando iniciación redox para formar perlas, que se lavan, secan y tamizan para dar lugar a fracciones de tamaño que incluyen la fracción 500-700  $\mu\text{m}$  y la fracción 700-900  $\mu\text{m}$  usada en los ejemplos posteriores. Se transfirió Bloque de Perlas desde jeringas al interior de viales de vidrio en volúmenes de 2 ml por vial. Posteriormente, se retiró la disolución salina en exceso y se liofilizaron las perlas. Se preparó la solución de IBU/etanol hasta la concentración final requerida. A continuación, se añade 1 ml de disolución a las perlas liofilizadas y se permite el relleno durante 1 hora (en estático). Posteriormente, se retira la disolución de relleno en exceso y se seca la muestra de perlas durante la noche a 45 °C en un horno de vacío. Se añadieron 2 ml de agua a las muestras secas, con el fin de hidratar las perlas (Figura 1A) y posteriormente se esterilizaron por medio de tratamiento en autoclave a 121 °C durante 15 minutos (Figura 1C). La Figura 1C muestra la captación no homogénea de ibuprofeno por parte de las perlas (NB: perlas con grados variables de

opacidades en comparación con 1D) y algunos cristales de fármaco en disolución tras el relleno usando el Ejemplo Comparativo 1.

### **Ejemplo 1: Preparación de microesferas rellenas de IBU-Lipiodol (IBU-LBB)**

5 Se rellenaron las perlas usando el mismo método que en el ejemplo comparativo con dos excepciones. La disolución de relleno estaba formada por Lipiodol al 33 % (L) en disolución de IBU/etanol y se agitaron las muestras de perlas en un conjunto de agitador de placas a 150 rpm durante 1 hora. Se retiró la disolución de relleno en exceso y se secaron las muestras durante la noche en un conjunto de horno a vacío a 50 °C. Posteriormente, se hidrataron las perlas rellenas en 2 ml de agua y se esterilizó la corriente como en el ejemplo comparativo.

10 Las primeras microesferas producidas usando el presente método (IBU-LBB) estaban en forma de suspensión, y fueron perlas de color azul/blanco a simple vista. No se adhieren a los viales de vidrio y no se apreció formación de cristales blancos sobre la superficie de las perlas.

15 Tamaño y Análisis de Imágenes: Se clasificaron las perlas por tamaño usando un microscopio óptico y se visualizaron usando un camcorder Colour View III. Las perlas recuperaron su forma esférica antes de la liofilización, y se vio que eran opacas (azules/blancas a simple vista) con aspecto homogéneo (Figura 1B y 1D). La distribución de tamaño de estas microesferas fue comparable con las perlas de partida (Figura 2).

20 Elución: Se retiró el agua de hidratación y se colocó en un vial de HPLC para determinar la pérdida de fármaco durante la fabricación (neta). Se eluyó cada vial (2 ml de perlas) en 200 ml de PBS durante 24 horas. En momentos predeterminados de tiempo (10, 20, 40, 60 minutos y 2, 4 y 24 horas), se retiró 1 ml de disolución y se colocó en viales de HPLC para determinar el fármaco sometido a elución, la degradación y la pureza. La cantidad de fármaco introducido como relleno en las perlas fue similar a la correspondiente sin adición de Lipiodol. La pureza de IBU fue > 99 %, lo que muestra que no hubo interferencia alguna con IBU. La imagen de las perlas tras la elución mostró perlas opacas que presentaron un aspecto similar a las perlas rellenas con IBU (Figura 1D). Esto sugiere que la captación de Lipiodol por parte de las perlas contribuye al color opaco y no eluye en PBS.

25 Ensayo de Capacidad de Administración: se sometió a ensayo la capacidad de administración de las perlas como en la configuración clínica para el estudio de viabilidad. Se preparó el medio de contraste generando 10 ml de Visipaque 320:Agua 50:50. Se añadieron 9 ml de la mezcla a los viales. Se llevaron a cabo tres inyecciones para cada muestra usando 3 ml y un catéter 2,7 Fr Progreat@.

30 Las perlas IBU-LBB no se agregaron cuando se abrieron los viales y se dispersaron libremente en disolución salina. El ensayo de capacidad de administración de las perlas de 700-900 µm demostró que fueron aptas para administración a partir de un microcatéter 2,7 Progreat 2,7Fr sin problemas.

### **Ejemplo 2: Efecto del medio de hidratación, tipo y volumen usando perlas rellenas con IBU y concentraciones de Lipiodol de 5 % y 30 %**

35 Se llevó a cabo este ejemplo para examinar el grado de captación de agua por parte de las perlas y el efecto del medio de hidratación usado. Se rellenó Bloque de Perlas de tamaño 700-900 µm usando disoluciones de IBU en etanol que contenían Lipiodol al 5 % o al 30 % durante 1 hora usando las mismas técnicas generales del Ejemplo 1. Se retiró la disolución de relleno en exceso y se secaron las muestras durante la noche en un conjunto de horno de vacío a 50 °C. Se hidrataron las muestras usando bien 2 ml de agua, 3 ml de agua o 2 ml de disolución salina y posteriormente vapor esterilizado a 121 °C durante 15 minutos.

40 Se midió el tamaño como se describe en el Ejemplo 1. Las Figuras 3A-3E muestran histogramas de las distribuciones de tamaño. Hubo una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,0001$ ) entre todos los grupos, en comparación con las perlas de control (antes de la liofilización y relleno). No se encontraron diferencias significativas entre el uso de Lipiodol al 5 % en 2 ml de agua y Lipiodol al 30 % en 2 ml de disolución salina ( $p = 0,5158$ ). En ambos casos, los intervalos de tamaño estuvieron dentro de los criterios de aceptación de la distribución de tamaño con un cambio total hacia el tamaño de las perlas más grandes (Figura 2).

#### Elución sobre IBU-LBB 5 % e IBU-LBB 30 % sobre perlas de 500-700 µm y 700-900 µm

45 Como en el Ejemplo 2, se retiró el agua de hidratación y se colocó en un vial de HPLC para determinar la pérdida de fármaco durante la fabricación (neta). Cada vial (2 ml de perlas) se eluyó en 200 ml de PBS durante 24 horas. En momentos de tiempo predeterminados (10, 20, 40, 60 minutos y 2, 4, y 24 horas), se retiró 1 ml de disolución y se colocó en viales de HPLC para determinar el fármaco eluido, la degradación y la pureza. Los resultados demostraron que para el tamaño de perlas de 700-900 µm, no hubo diferencia alguna en la velocidad de elución entre las perlas con Lipiodol al 5 % y las de Lipiodol al 30 %. La Figura 4A muestra que para ambas concentraciones de Lipiodol, > 99 % de la dosis total de IBU se eluye en las primeras 2 horas para tamaños de perlas de 700-900 µm. Similarmente, para el intervalo de 500-700 µm, > 99 % se eluye en las primeras 2 horas, no obstante, hubo un cambio pequeño a una elución más rápida con Lipiodol al 30 % (Figura 4B).

### **Ejemplo 3: Ensayo de Compresión de Perlas de IBU que Contienen Diversas Concentraciones de Lipiodol**

Se rellenó Bloque de Perlas de tamaño de 700-900  $\mu\text{m}$  con disoluciones de IBU en etanol que contenían: Lipiodol al 5 %, 30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 % durante 1 hora. Se retiró la disolución de relleno en exceso y se secaron las muestras durante la noche en un conjunto de horno de vacío a 50 °C. Se hidrataron las muestras usando 2 ml de agua y posteriormente se esterizaron con vapor a 121°C durante 15 minutos.

- 5 La Figura 5 muestra el ensayo de compresión de perlas-IBU con Lipiodol al 5 %, 30 % y 70 %, y demuestra que las perlas de IBU-LBB a todas las concentraciones de Lipiodol son similares al producto comparativo sin Lipiodol y fueron todas más aptas para compresión que Bloque de Perlas cuando se hidrata en agua. Cuando se usó disolución salina para la hidratación de Lipiodol al 30 % IBU-LBB, la compresión fue más elevada que el control no relleno.

#### 10 **Ejemplo 4: Preparación de microesferas rellenas de aceite de girasol**

Se rellenó Bloque de Perlas con disolución de aceite de girasol al 33 %/etanol en lugar de Lipiodol usando la técnica descrita en el Ejemplo 1. Las perlas no capturaron el aceite y cambiaron de color a blanco/azul. Las gotas oleosas resultaron visibles en la fase acuosa a esta concentración. Cuando se observa al microscopio, parecieron similares a las perlas rellenas de IBU (Figura 1D).

#### 15 **Ejemplo 5: Relleno con diferentes concentraciones de Lipiodol sin fármaco para evaluación fluoroscópica**

- Se prepararon estas muestras usando 700-900  $\mu\text{m}$  como se ha descrito para las perlas de IBU/Lipiodol anteriores (Ejemplo 3), sustituyendo la disolución de IBU/Lipiodol por disoluciones de Lipiodol/etanol de las siguientes concentraciones: disoluciones de etanol/Lipiodol al 30 %, 50 %, 70 %, 80 % y 90 %. Para la muestra de Lipiodol al 100 %, se preparó por medio de adición directa de Lipiodol en perlas durante 1 hora. Entonces, se retiró el exceso y posteriormente se lavó una vez de forma rápida con etanol. Se retiró el etanol en exceso, se secó, se hidrató y se esterilizó con vapor como se ha descrito para la perla de IBU/Lipiodol. Se observaron las muestras por medio de fluoroscopia. Las perlas resultaron visibles por medio de rayos-X sin distinción clara entre las diferentes perlas.

#### 20 **Ejemplo 6: Relleno de IBU con diferentes excipientes de aceite**

- Se rellenó Bloque de Perlas de tamaño 500-700  $\mu\text{m}$  con disoluciones de IBU en etanol que contenían: 5 % de los siguientes aceites: Lipiodol, aceite de soja, aceite de semilla de algodón, aceite mineral y aceite de almendra durante 1 hora. Se retiró la disolución de relleno en exceso y se secaron las muestras 2 horas en un conjunto de horno de vacío a 50 °C. Se hidrataron todas las muestras usando agua y posteriormente se esterizaron con vapor a 121 °C durante 15 minutos.

- 30 Todos los viales parecieron similares a simple vista y por medio de análisis de imágenes, independientemente del aceite. Se llevaron a cabo ensayos de elución para los cinco aceites como se describe en el Ejemplo 2. La dosis total eluida en 24 horas fue perlas de 25 mg/ml  $\pm$  5 mg (Figura 6A). Los resultados mostraron un perfil de elución similar para todos los aceites, excepto para el aceite de semilla de algodón, que pareció provocar una velocidad de elución más lenta. Todos los aceites eluyeron 85 % en la primera hora excepto para el aceite de semilla de algodón en el que únicamente había eluido 72 %. En las primeras 4 horas, todas las muestras eluyeron > 99 % del fármaco (Figura 6B).

La diferencia en el tamaño de perla usando todos los aceites no fue estadísticamente significativa, una con respecto a la otra, y con respecto a Lipiodol (Figura 7).

#### 35 **Ejemplo 7: Relleno de otras perlas embolicas comercialmente disponibles**

- 40 Perlas embolicas comercialmente disponibles que incluyen: se rellenaron microesferas de Embosphere (una microesfera de trisacril/gelatina revestida con un producto de colágeno de 700-900  $\mu\text{m}$ , Embogold (producto de diámetro de 300 a 500  $\mu\text{m}$ ), Contour SE (un poli(alcohol vinílico) no iónico y reticulado, producto de diámetro de 500 a 700  $\mu\text{m}$ ) con IBU usando una disolución de carga de IBU/etanol/Lipiodol al 5 % (125 mg/ml). El procedimiento de relleno es como se describe en el Ejemplo 2.

- 45 Visualmente, las perlas no cambiaron de color tras el relleno excepto para Bloque de Perlas, que cambió al color normal azul/blanco. Embosphere mostró elevada tendencia a la adherencia al vial de vidrio mientras Contour SE mostró una gran tendencia a la agregación. Tanto adherencia como agregación se asocian con cristales de IBU sobre la superficie de las perlas. Las imágenes tras la elución mostraron que Embosphere fue ligeramente opaco (Figura 9B) y Embogold fue rojo claro (en comparación con Bloque de Perlas muy opaco (Figura 9A)), lo que indica una menor captación de Lipiodol y además una menor inhibición de la formación de cristales. Contour SE fue opaco pero la mayoría de las perlas formaron grumos encerrados en la cápsula de aceite (Figura 9C). Esto sugiere que el color opaco de perla fue debido a la captación de IBU. La agregación pudo estar provocada por IBU sobre la superficie de las perlas tras la etapa de liofilización. El confinamiento de Contour SE por medio de Lipiodol quedó demostrado por la elución lenta de IBU (Figura 8), mientras que los otros tipos de perla eluyeron > 98 % de IBU en las primeras 2 horas.

#### 55 **Ejemplo 8: Relleno de paclitaxel (PTX) en el interior de Bloque de Perlas de Lipiodol**

5 Se prepararon perlas rellenas de PTX usando el mismo método descrito en el Ejemplo 2. En primer lugar, se separó Bloque de Perlas (500-700  $\mu\text{m}$  y 700-900  $\mu\text{m}$ ) en 2 ml en viales de vidrio. A continuación, se retiró la disolución salina en exceso, y se liofilizaron las perlas. Se preparó la disolución de PTX-Lipiodol-etanol en la concentración final requerida, y posteriormente se añadió a las perlas liofilizadas y se permitió el relleno durante 1 hora en un agitador de placas con 150 rpm. A continuación, se retiró la disolución de relleno en exceso y la perla se secó durante la noche a 45 °C en un horno de vacío. Se añadieron 2 ml de agua a las muestras secas, para hidratar las perlas y posteriormente se esterilizaron con vapor por medio de tratamiento en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

10 Se determinó el contenido de relleno de PTX por medio de DMSO para extraer PTX de relleno por medio de ultrasonidos. Se examinó la disolución sometida a extracción por medio de HPLC, y los resultados se muestran en la Tabla 1 siguiente.

Tabla 1: Eficacia de relleno de PTX en Bloque de Perlas de Lipiodol\*

Muestra	Relleno objetivo (mg)	Relleno Real (mg)	Eficacia de Relleno (%)
1 (500-700 $\mu\text{m}$ )	21,4	2,2	10,2
2 (500-700 $\mu\text{m}$ )	38,8	6,3	16,4
3 (700-900 $\mu\text{m}$ )	21,0	7,4	35,2
4 (700-900 $\mu\text{m}$ )	48,8	16,7	34,2

\* Lipiodol está al 23 % (volumen/volumen) en la disolución de relleno.

#### Ejemplo 9: Elución de PTX a partir de Bloque de Perlas de Lipiodol

15 Se usaron las Muestras 3 y 4 procedentes del Ejemplo 8 para el ensayo de elución de PTX. Se mezclaron 1,2 ml de cada muestra con 200 ml de tampón de PBS en un mezclador de rodillos a temperatura ambiente. En un intervalo de tiempo predeterminado, se retiraron 50 o 100 ml de disolución y se añadieron 50 o 100 ml de PBS nuevo. La Figura 13 muestra el perfil de elución tras el procesado HPLC.

#### Ejemplo 10: Relleno y elución de dexametasona (Dex) usando Lipiodol

20 Se preparó una disolución de relleno (5 mg/ml) en etanol. Usando esta disolución, se rellenaron perlas como se describe en el Ejemplo 1. A modo de control, se rellenaron perlas adicionales con disolución de Dex en etanol sin el uso de Lipiodol.

Las imágenes mostraron que las muestras rellenas sin el uso de Lipiodol no captaron Dex. Los cristales de Dex estuvieron presentes sobre la superficie de las perlas (Figura 11A). La perlas rellenas usando IBU-Lipiodol fueron opacas y no se apreciaron cristales sobre las superficie de las perlas (Figura 11B).

#### 25 Ejemplo 11: Relleno y elución usando perlas diferente

30 Se rellenaron dos tipos de resinas de intercambio iónico (Aberlyst (SIGMA, basada en ácido sulfónico, actividad de intercambio de 1,9 mg/ml) y Amberlite (Sigma, resina de estireno-DVB que contiene un grupo amino cuaternario IRA700 (cloruro) que tiene una capacidad de intercambio total de 1,4 mg/ml, densidad 0,7 mg/ml) con IBU-Lipiodol. El procedimiento de relleno y elución fue como se describió en el Ejemplo 1 usando una disolución que contenía 100 mg/ml de IBU.

La captación de amberlita fue < 1 mg/ml por perla de IBU (Figura 12B). Se rellenó Amberlyst con IBU~ 15 mg/ml (Figura 12A).

#### Ejemplo 12: Uso de una Perla de Embolización que Contiene Ibuprofeno y Aceite de Soja como Inhibidor de Cristalización en Embolización de Arteria Uterina de Oveja

35 Se evaluó el efecto de perlas rellenas de ibuprofeno en pos-embolización durante un período de 12 semanas de la arteria uterina de oveja. La embolización de vasos sanguíneos puede tener como resultado una variedad de efectos secundarios que pueden incluir dolor e inflamación. El objetivo de este Ejemplo fue evaluar la liberación y el efecto de Ibuprofeno, a partir de perlas rellenas con Ibuprofeno que contienen aceite de soja, como inhibidor de cristalización sobre la reacción inflamatoria frente a cuerpo extraño en un modelo arterial uterina en oveja. Se evaluaron los siguientes:

- 40
- Propiedades y distribución de perlas en la red vascular.
  - Efecto de liberación de ibuprofeno/aceite de soja sobre la reacción inflamatoria frente a cuerpo extraño para las perlas embólicas.
  - Nivel de Ibuprofeno presente en la perla con el tiempo.

*Métodos:*

5 El artículo de ensayo de este Ejemplo fue Perlas rellenas con Ibuprofeno ("Perla de Ibuprofeno") que contiene aceite de soja como inhibidor de cristalización como se describe en el Ejemplo 6. Se evaluaron las muestras frente a un control de fabricación de microesferas de Bloque de Perlas no rellenas que se habían procesado de forma similar a la Perla de Ibuprofeno. Se liofilizaron 2 ml de perlas como se ha descrito en el Ejemplo Comparativo 1 y se colocaron en 1 ml de aceite de soja al 10 % en volumen/volumen que contiene etanol y 400 mg de ibuprofeno. Tras el procesamiento como se describe en el Ejemplo 6, el producto final contenía 125 mg de ibuprofeno/ml de perlas hidratadas y ~ 10 mg de aceite de soja como viene determinado por medio de extracción y análisis de HPLC.

10 Se dividieron veinticuatro ovejas Pre-Alpes adultas preparadas hormonalmente y no preñadas en 2 grupos, Bloque de Perlas no rellenas (control, BB; 500-700  $\mu\text{m}$ ) y Perlas rellenas de Ibuprofeno (grupo de ensayo, Perla de Ibuprofeno; 500-700  $\mu\text{m}$ ). Se separó cada grupo en 4 momentos (24 h, semana 1, semana 3 y semana 12) con 3 animales en cada momento.

15 Se llevó a cabo la embolización usando la misma vaina, catéteres y alambres de guía que se usaron en la práctica clínica. Se colocó la vaina vascular 4-Fr en la arteria femoral por medio de la técnica convencional Seldinger en condiciones estériles. Se colocó el catéter de tipo rabo de cerdo (Optitorque Radiofocus; Terumo) a nivel de la bifurcación ilíaca para llevar a cabo aortografía de sustracción digital e identificar las arterias uterinas y ováricas. Se llevó a cabo la cateterización selectiva de la arteria ilíaca interna contralateral y la cateterización super selectiva de la arteria uterina se llevó a cabo usando un catéter con forma de cobra 4-Fr (Radiofocus Angiographic catheter, Terumo). Posteriormente, el radiólogo llevó a cabo la embolización usando el agente embólico seleccionado (Perla de Ibuprofeno o Bloque de Perlas) de acuerdo con la secuencia de aleatorización.

20 Se inyectó lentamente un volumen de 0,5 ml de perlas, suspendidas en una mezcla 50/50 de Vispaque 270 y una disolución salina a una dilución de 1/10, bajo control fluoroscópico. Se consideró embolización completa cuando se administraron 0,5 ml de perlas a cada arteria uterina.

25 Se evaluó la distribución de las perlas en el tejido y se llevó a cabo el examen macroscópico de los órganos. Se estimó la inflamación desde el punto de vista histológico por medio de clasificación semi-cuantitativa de linfocitos por medio de tinción y uso de videoanálisis tras el inmunohistomarcado con anticuerpos-CD a una variedad de células inflamatorias.

*Resultados:*Procedimiento de embolización

30 La administración de perlas resultó excelente en todos los animales. La embolización resultó satisfactoria en todos los animales. Cada animal recibió un total de 0,5 ml de perlas en cada arteria uterina (total 1 ml).

Rendimiento de las perlas

35 La localización de los vasos embolizados en las diferentes zonas uterinas fue estadísticamente diferente entre los 2 productos: la Perla de Ibuprofeno provocó una oclusión ligera mayor en los vasos proximales que Bloque de Perlas ( $p < 0,0001$ ,  $\chi^2$ ) (Figura 14). En la Figura 14, EM indica endometrio, MM miometrio, PMM perimetriado y PX proximal. Se aumentó el diámetro de vaso para la Perla de Ibuprofeno (498  $\mu\text{m}$  vs. 436  $\mu\text{m}$ ,  $p = 0,0001$ ), no obstante no hubo diferencia en el número medio de perlas encontradas en los vasos embolizados.

40 Se observó más necrosis de vasos con la Perla de Ibuprofeno que con Bloque de Perlas a las 24 horas (25,8 % vs. 4,9 %) y 1 semana (32,8 % vs. 4,3 %) después de la embolización, no obstante a las 3 semanas y 3 meses no se apreció necrosis para ningún grupo.

Respuesta inflamatoria

45 Se observaron diferencias menores en los números de neutrófilos y eosinófilos para Bloque de Perlas y la Perla de Ibuprofeno en determinados momentos. Estadísticamente, hubo menos células gigantes para la Perla de Ibuprofeno que para Bloque de Perlas transcurrida 1 semana ( $p = 0,01$ ). A las 24 horas, se observaron pocos linfocitos en ambos grupos, y los niveles no fueron significativamente diferentes. Trascorrida 1 semana, el número de linfocitos fue significativamente menor alrededor de la Perla de Ibuprofeno en comparación con Bloque de Perlas (Figura 15). Trascorridas 3 semanas y 3 meses, el número de linfocitos con la Perla de Ibuprofeno aumentó, pero no fue significativamente diferente de Bloque de Perlas.

50 En algunos cortes histológicos se apreciaron signos de resorción de ambos productos de BB y Perla de Ibuprofeno, con cierta fagocitosis evidente, mayor presencia de células gigantes y presencia continuada de CD4 y CD8. No cabía esperar esto, dadas las observaciones a largo plazo con los agentes de embolización de PVA.

Marcadores CD

5 Se confirmó la reducción de la respuesta inflamatoria por medio de niveles reducidos de células CD-172a positivo en el grupo de Perla de Ibuprofeno trascurrida 1 semana. Además, la adición de un inhibidor de cristalización no tuvo como resultado la infiltración de células T positivo CD8 o células B CD21, lo que indica la ausencia de reacción adversa frente a la formulación optimizada de Perla de Ibuprofeno. Los otros marcadores CD no mostraron diferencia alguna entre los dos grupos. No obstante, el estudio confirmó que no hubo "efecto rebote" a los 3 meses, permaneciendo CD172, CD3 y MHC-II en niveles bajos y sin signos de hipersensibilidad con ausencia de CD21+ o células eosinófilas.

10 Niveles de ibuprofeno

Se identificaron las áreas de tinción específica con el anticuerpo anti-ibuprofeno como aquellas que presentaban un patrón de "retícula". Se observaron niveles elevados de tinción trascurridas 24 horas después de la embolización. El ibuprofeno todavía fue detectable trascurrida 1 semana, pero en niveles mucho más bajos. No se detectó ibuprofeno en las perlas trascurridas 3 semanas y 3 meses después de la embolización.

15 Conclusiones

20 Este Ejemplo confirma que la embolización con Perla de Ibuprofeno puede reducir la respuesta inflamatoria frente a cuerpo extraño de las perlas embólicas. Ibuprofeno puede ser detectado en las perlas hasta una semana después de la embolización pero no a las 3 semanas o más. Además, la reducción de la respuesta inflamatoria en 1 semana no tiene como resultado ningún efecto rebote adverso sobre la respuesta inflamatoria a las 3 semanas y 3 meses después de la embolización. No se apreció efecto in vivo alguno con la inclusión de inhibidor de cristalización de aceite de soja.

## REIVINDICACIONES

- 1.- Un proceso en el que se ponen en contacto perlas hinchables de polímero insoluble en aceite e insoluble en agua con una disolución de un fármaco cristalizable en un disolvente orgánico que es capaz de penetrar en las perlas, de modo que el fármaco se absorbe en el interior de las perlas, caracterizado por que la disolución además contiene un modificador de cristal que inhibe la cristalización del fármaco, en el que el modificador de cristal es miscible con el disolvente y está seleccionado entre aceites, glicoles y éteres de glicol, y por que el polímero tiene carga aniónica, en el que los grupos aniónicos están seleccionados entre sulfonato, fosfonato y carboxilato y el polímero es poli(alcohol vinílico) reticulado.
- 2.- Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el disolvente en exceso se retira de las perlas para producir perlas rellenas secas.
- 3.- Un proceso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que las perlas rellenas secas se ponen en contacto con un licor de almacenamiento acuoso en exceso para que experimenten hinchamiento hasta el equilibrio y posteriormente se esterilizan por medio de calentamiento.
- 4.- Un proceso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el modificador de cristal tiene un punto de ebullición de más de 81 °C.
- 5.- Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el modificador de cristal es un aceite seleccionado entre aceite de soja, aceite de semilla de adormidera, aceite de girasol y aceite mineral.
- 6.- Un proceso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el aceite es yodado.
- 7.- Un proceso de acuerdo con cualquiera reivindicación anterior, en el que el disolvente orgánico es un disolvente volátil, que tiene un punto de ebullición menor que 90 °C.
- 8.- Un proceso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el disolvente está seleccionado entre alcoholes alifáticos C<sub>1-12</sub> monohídricos.
- 9.- Un proceso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que la concentración de fármaco en la disolución está dentro del intervalo de 1 a 1000 mg/ml.
- 10.- Un proceso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que la concentración de modificador de cristal en la disolución está dentro del intervalo de un 1 a un 99 % en peso/peso basado en el fármaco.
- 11.- Un proceso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el polímero se forma por medio de copolimerización de un macrómero de poli(alcohol vinílico) etilénicamente insaturado con un comonomero aniónico etilénicamente insaturado.
- 12.- Un proceso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que al comienzo del proceso las perlas tienen tamaños tales que, cuando se hinchan hasta el equilibrio en disolución salina tamponada con fosfato a 20 °C, el diámetro medio está dentro del intervalo de 50 a 1500 µm.
- 13.- Un proceso de acuerdo con cualquiera reivindicación anterior, en el que el fármaco está seleccionado entre sustancias quimioterapéuticas, anti-inflamatorios, esteroides y analgésicos.
- 14.- Un proceso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el fármaco está seleccionado entre paclitaxel, ibuprofeno y dexametasona.
- 15.- Una composición que comprende perlas hinchables de un polímero insoluble en aceite, insoluble en agua, un fármaco cristalizable y un modificador de cristal que inhibe la cristalización del fármaco en el que el fármaco y el modificador de cristal se absorben en el interior de las perlas, el polímero tiene carga aniónica, en el que los grupos aniónicos están seleccionados entre sulfonato, fosfonato y carboxilato, y es poli(alcohol vinílico) reticulado y el modificador de cristal está seleccionado entre aceites, glicoles y éteres de glicol.
- 16.- Una composición de acuerdo con la reivindicación 15, en la que el modificador de cristal es un aceite o glicol.
- 17.- Una composición de acuerdo con la reivindicación 16, en la que el modificador de cristal es un aceite seleccionado entre aceite de soja, aceite de semilla de adormidera, aceite de girasol y aceite mineral.
- 18.- Una composición de acuerdo con la reivindicación 17, en la que el aceite es yodado.
- 19.- Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, que es estéril y además comprende licor de almacenamiento acuoso en exceso con el que las perlas están en contacto, en el que las perlas se hinchan hasta el equilibrio.

20.- Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, en la que la proporción en peso de fármaco:polímero está dentro del intervalo de 10:1 a 1:10.

21.- Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 20, en la que el modificador de cristal está presente dentro del intervalo de 1 a 99 % peso/peso, basado en la cantidad total de fármaco en las perlas.

- 5 22.- Una composición de acuerdo con la reivindicación 15, en la que el polímero tiene las características adicionales definidas en la reivindicación 11, y el fármaco tiene las características adicionales definidas en la reivindicación 13 o 14.

FIG 1A

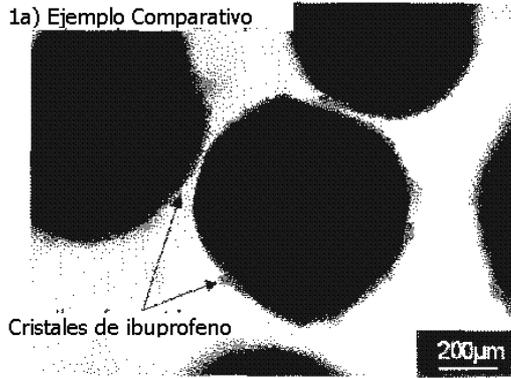


FIG. 1B

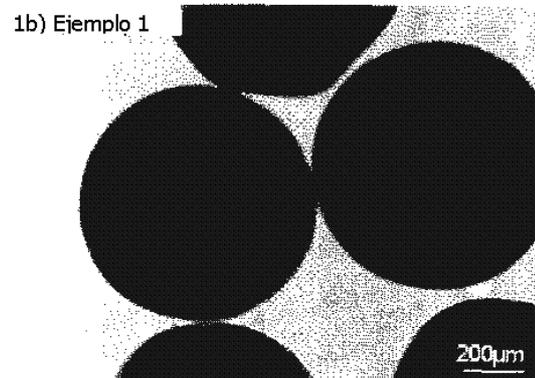


FIG 1C

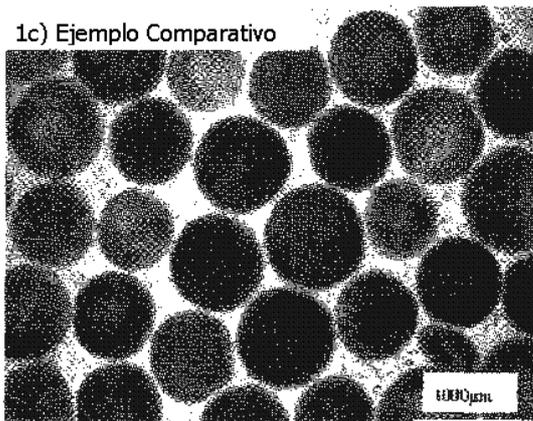


FIG. 1D

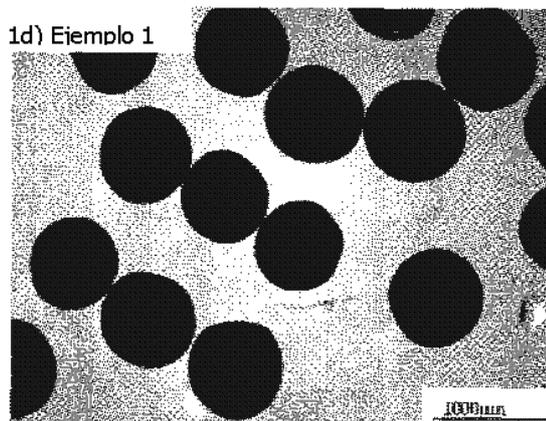


FIG. 2

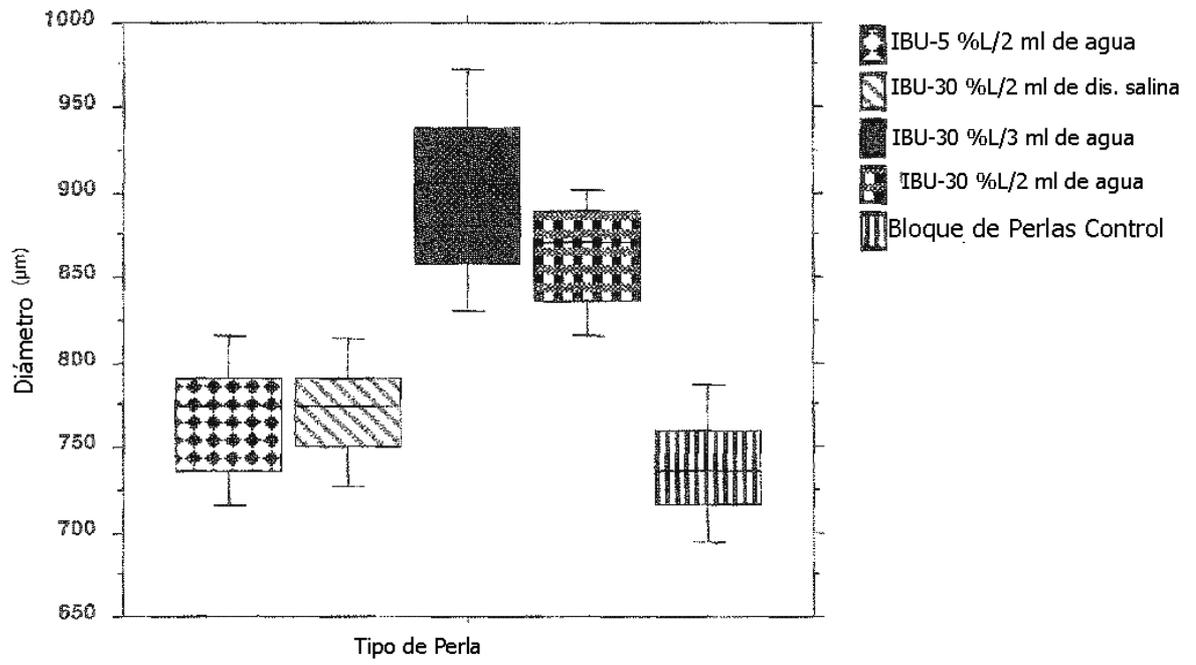


FIG. 3A

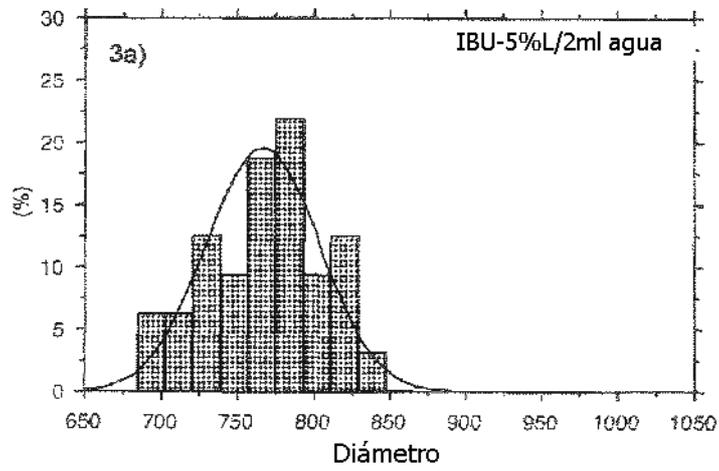


FIG. 3B

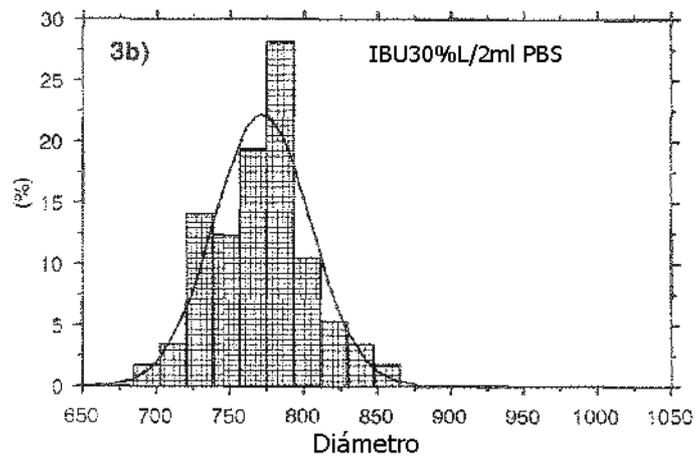


FIG. 3C

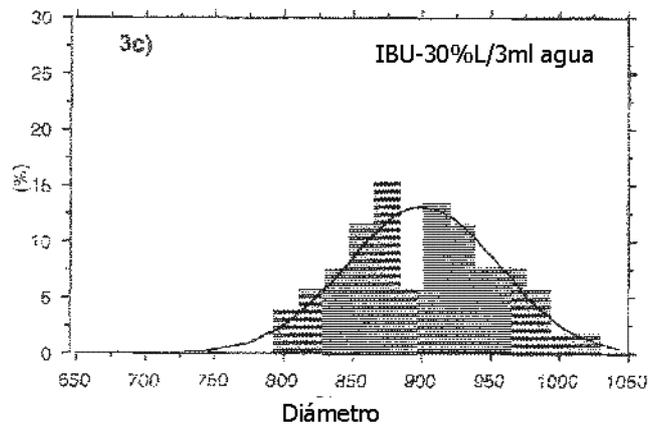


FIG.3D

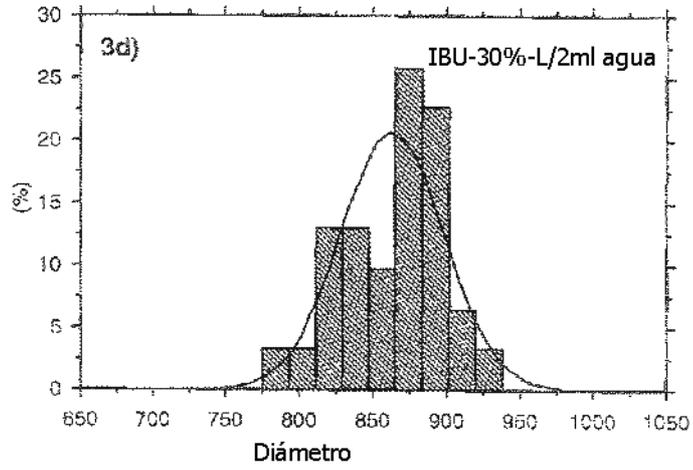


FIG. 3E

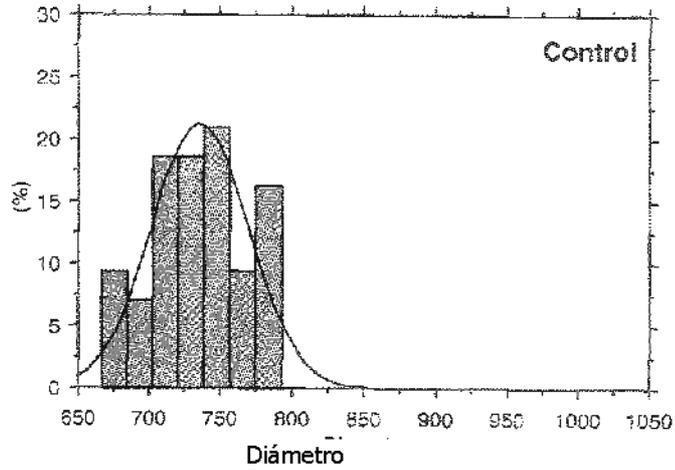


FIG. 4A

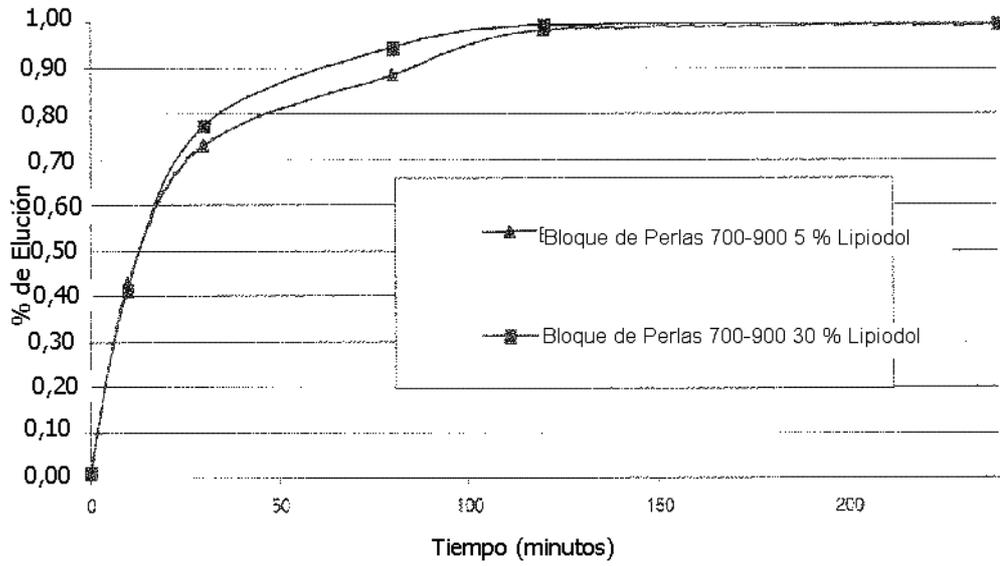


FIG. 4B

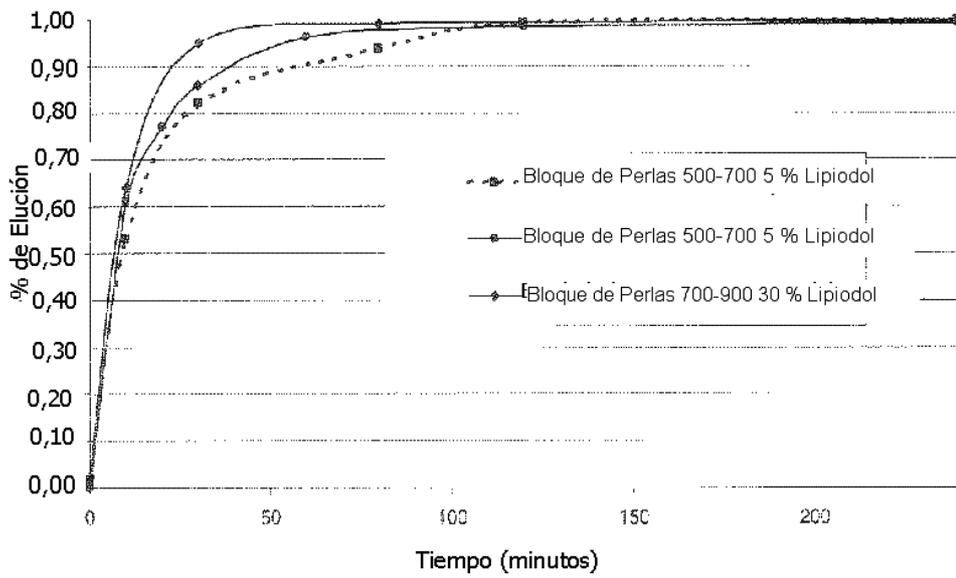


FIG. 5

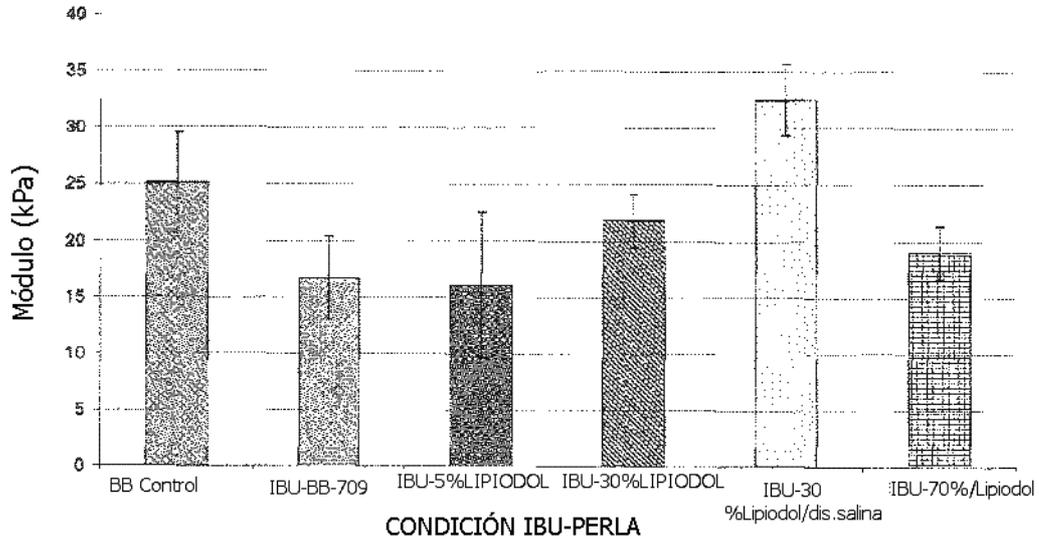


FIG. 6A

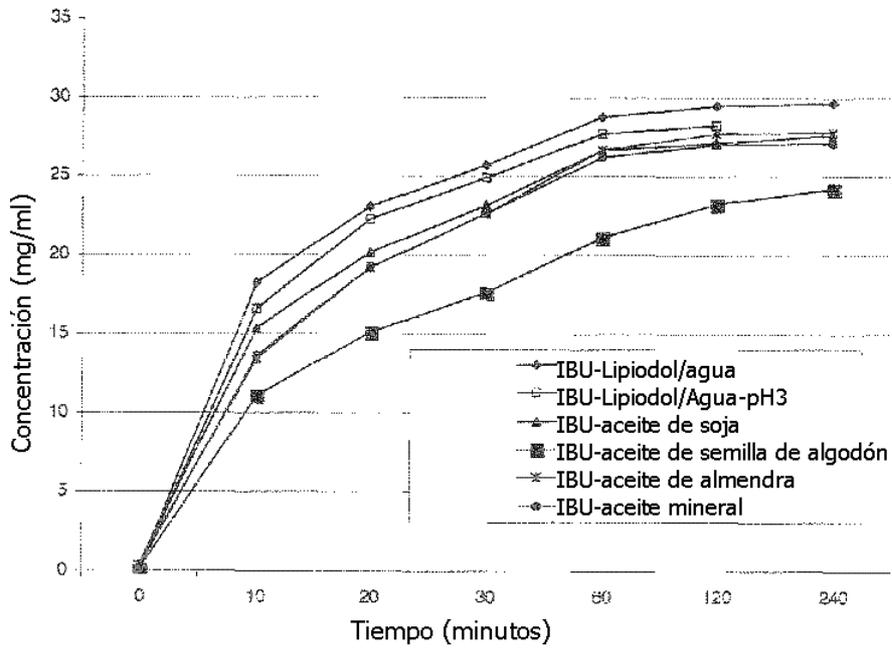


FIG. 6B

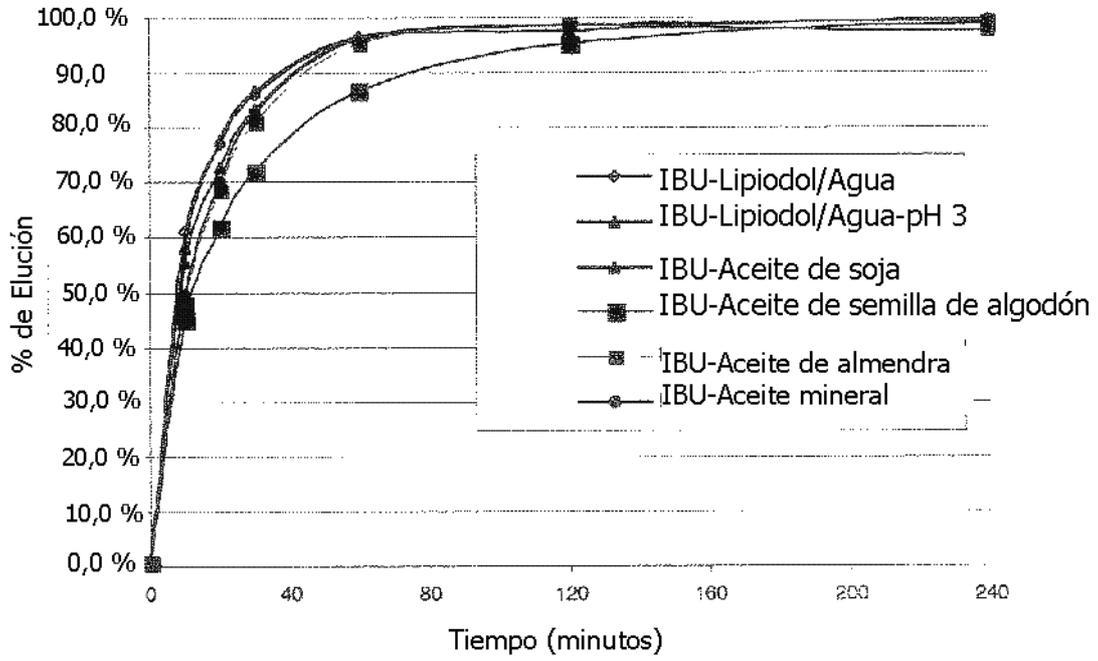


FIG. 7

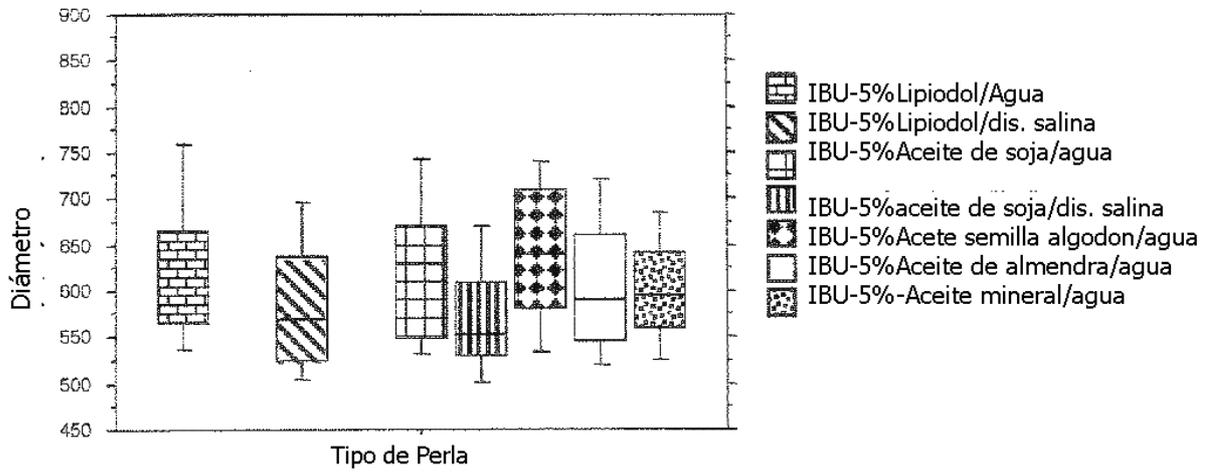


FIG. 8

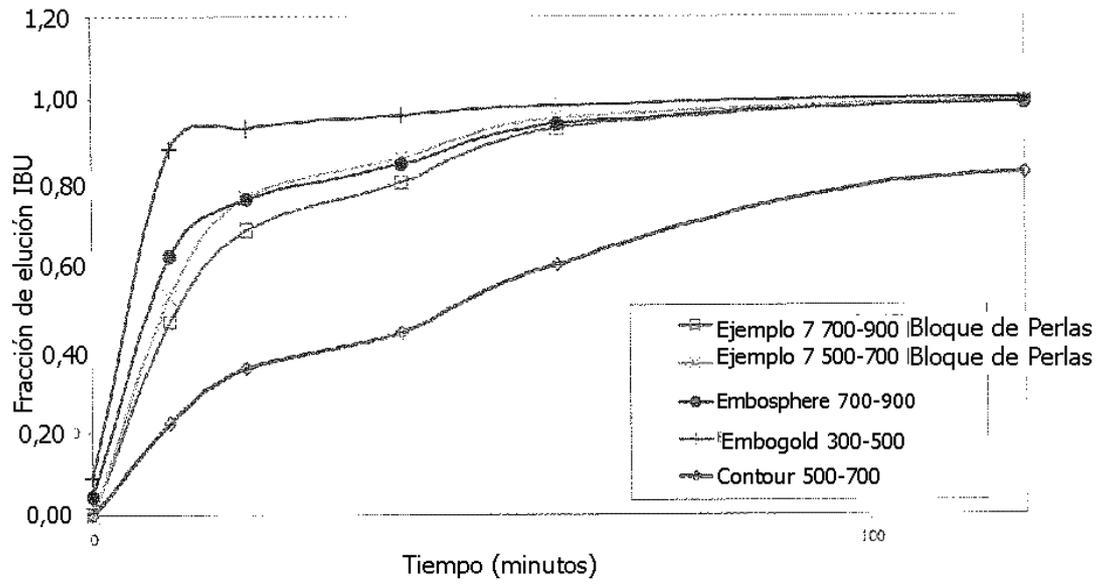


FIG. 9A

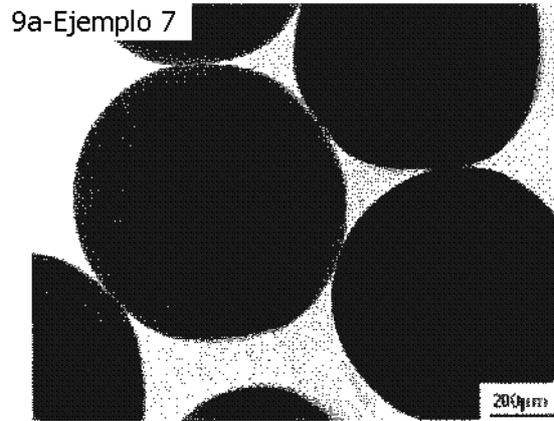


FIG. 9B

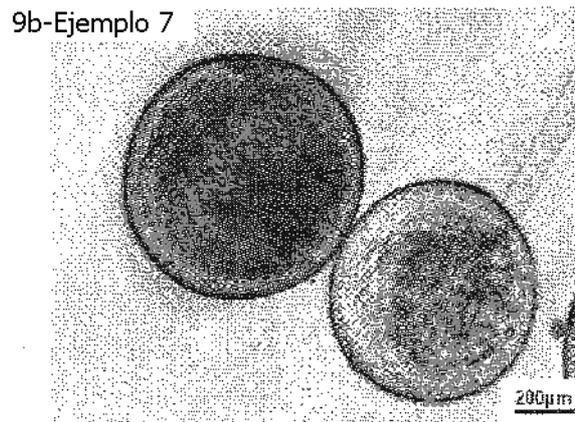


FIG. 9C

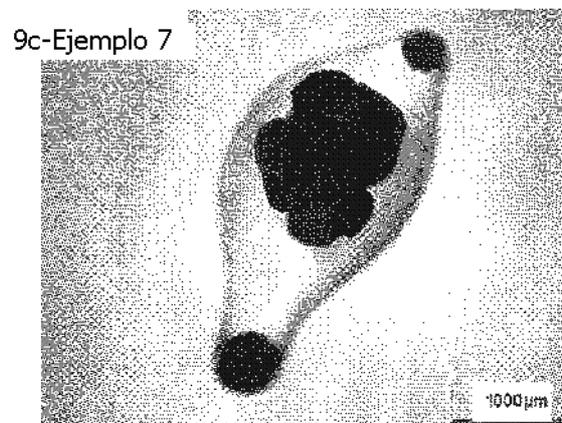


FIG. 10A

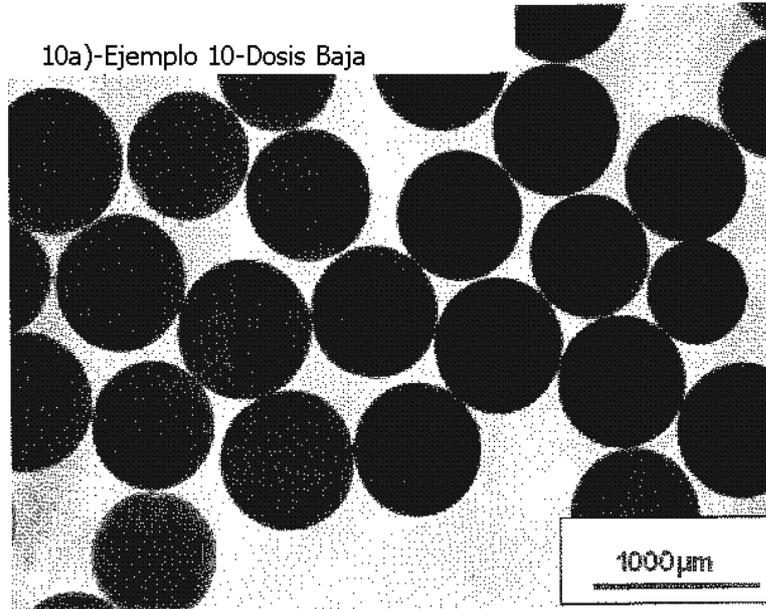


FIG. 10B

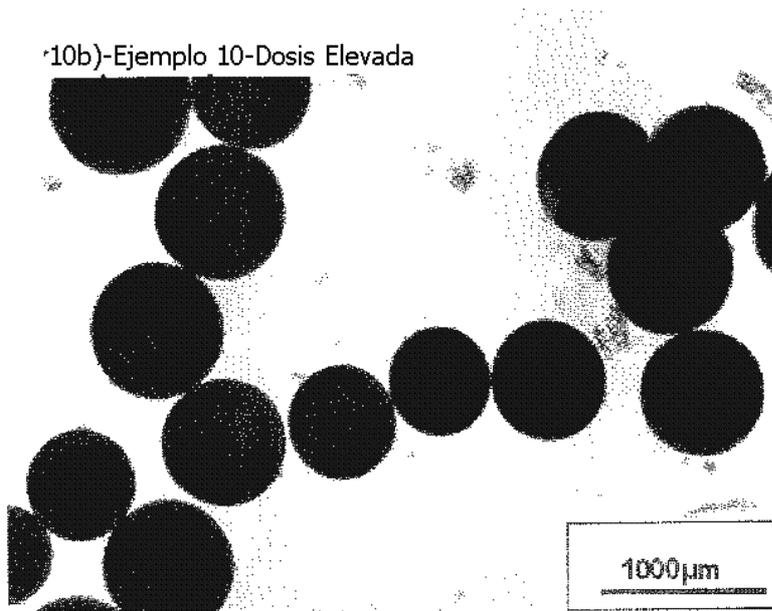


FIG. 11A

11a)-Ejemplo 11-Dex IBloque de Perlas

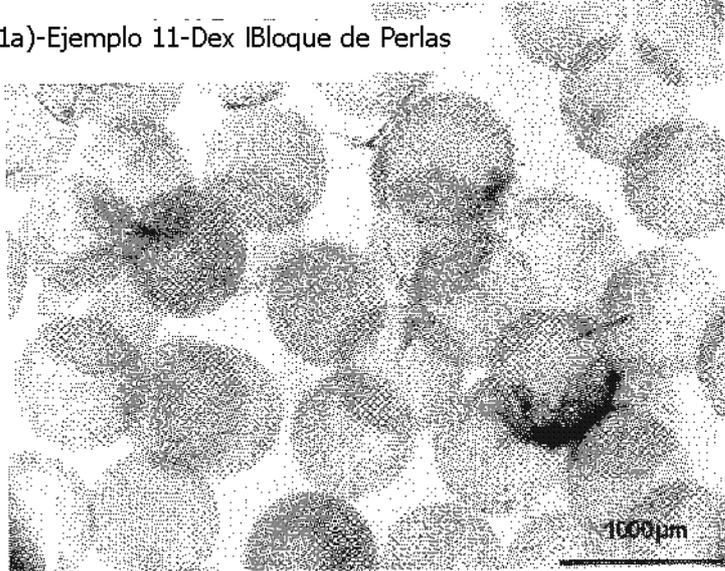


FIG. 11B

11b)-Ejemplo 11-Dex-Lipiodol

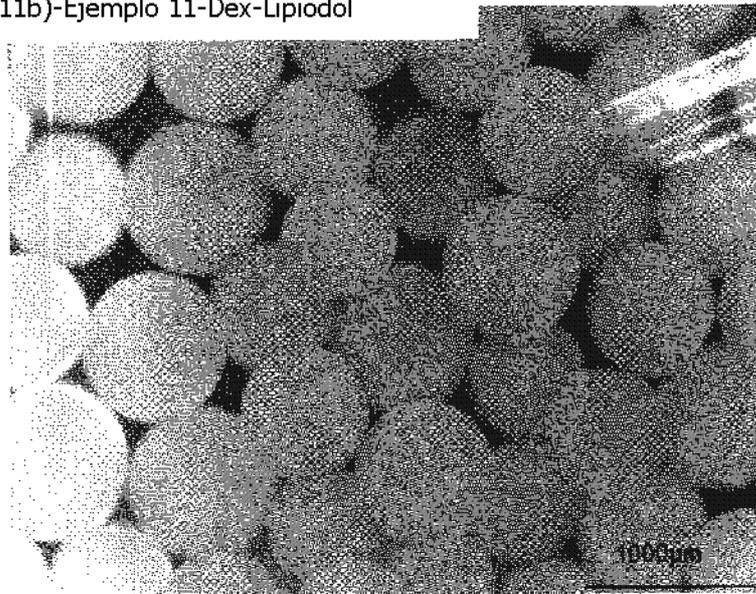


FIG. 12A

12a)-Ejemplo 12

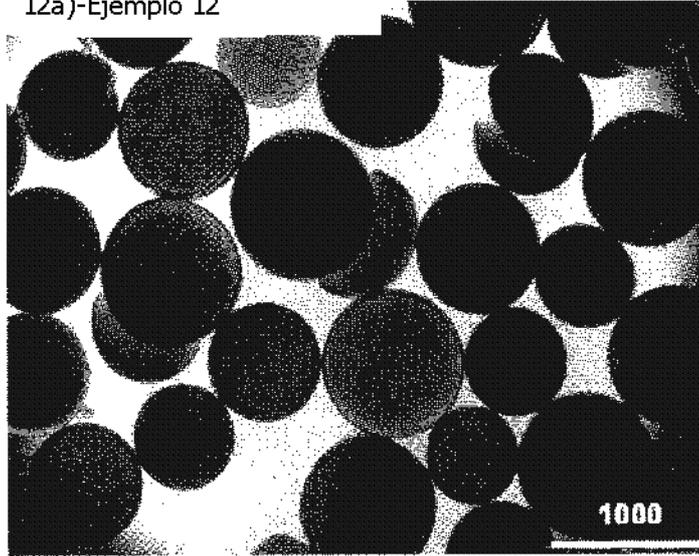


FIG. 12B

12b)-Ejemplo 12

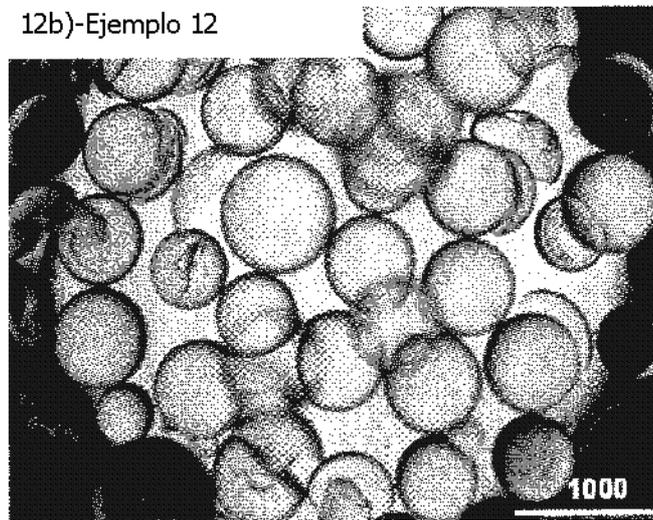


FIG. 13

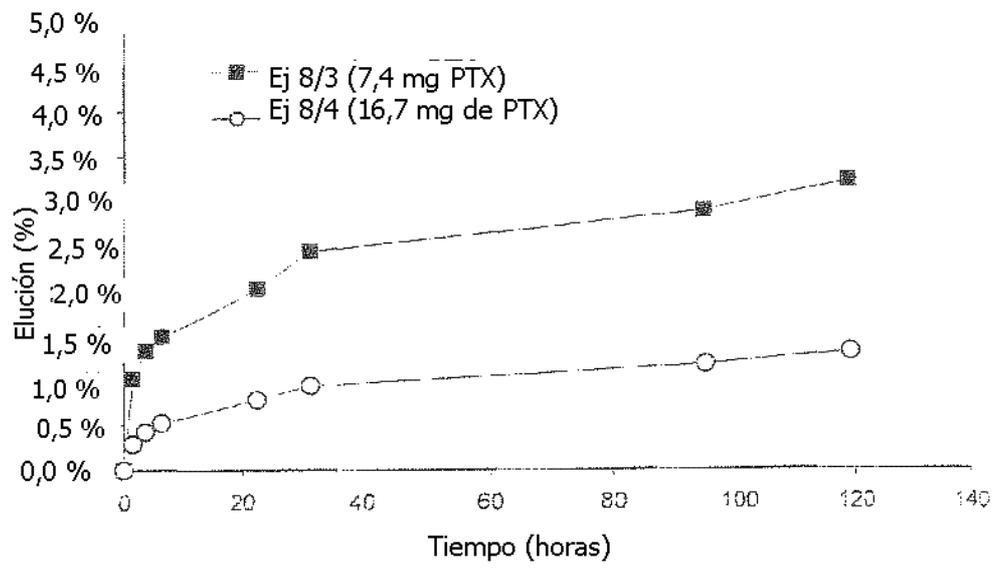


FIG. 14

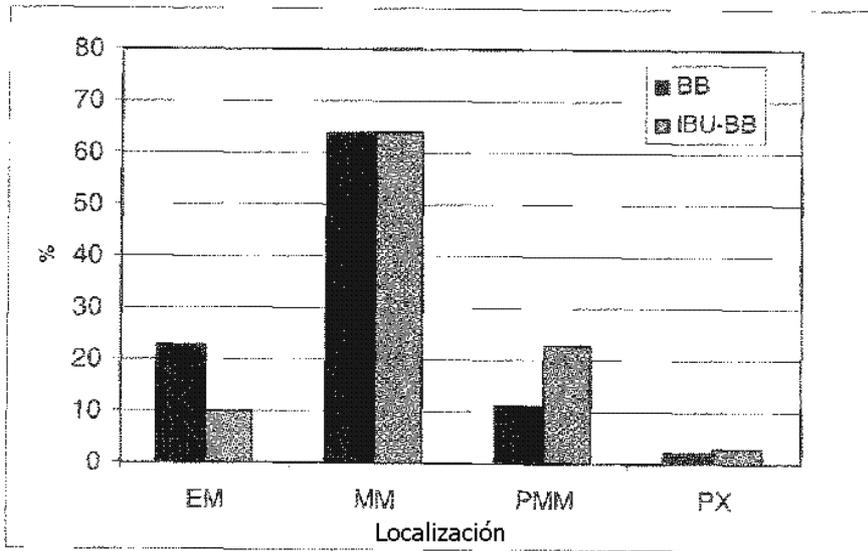


FIG. 15

