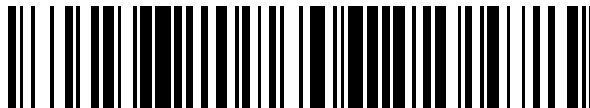


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 571 855**

51 Int. Cl.:

A61K 9/66 (2006.01)

A61K 9/16 (2006.01)

A61K 38/09 (2006.01)

A61K 38/31 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.05.2007 E 07746488 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.03.2016 EP 2015737**

54 Título: **Procedimiento de preparación de microesferas de liberación sostenida que tienen una mejor dispersabilidad e inyectabilidad**

30 Prioridad:

11.05.2006 KR 20060042462

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

27.05.2016

73 Titular/es:

**PEPTRON CO., LTD. (50.0%)
385-19 Doryong-dong, Yuseong-gu
305-340 Daejeon, KR y
DAEWOONG PHARMACEUTICAL CO., LTD.
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**LEE, HEE-YONG;
KIM, JUNG-SOO;
SHIN, EUN-HO;
KIM, SEONG-KYU;
SEOL, EUN-YOUNG;
BAEK, MI-JIN;
BAEK, MI-YOUNG;
CHAE, YEON-JIN y
CHOI, HO-IL**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 571 855 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

Procedimiento de preparación de microesferas de liberación sostenida que tienen una mejor dispersabilidad e inyectabilidad

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a un procedimiento de preparación de microesferas de liberación sostenida que comprenden un polímero biodegradable como vehículo y un fármaco. Dichas microesferas son una formulación de liberación sostenida inyectable, que permiten la liberación sostenida y uniforme de un fármaco a fin de mantener su actividad biológica en el cuerpo después de su inyección subcutánea o intramuscular.

Técnica anterior

- 10 Para encapsular agentes bioactivos en microesferas de polímeros para su liberación sostenida se han usado una serie de estrategias. La mayoría de ellas se basan en la separación de fases (Patente de Estados Unidos 4.673.595, EP 52.510), la criopulverización después de extrusión por fusión (Patente de Estados Unidos 5.134.122, 5.192.741, 5.225.205, 5.431.348, 5.439.688, 5.445.832 y 5.776.885), la evaporación de una emulsión doble (ag/ac/ag, agua/aceite/agua) (Patente de Estados Unidos n.º 4.652.441, 4.711.782, 4.954.298, 5.061.492, 5.330.767, 15 5.476.663, 5.480.656, 5.611.971, 5.631.020 y 5.631.021), la evaporación de una emulsión simple (ac/ag, aceite/agua) (Patente de Estados Unidos n.º 4.389.330 y 5.945.126; Shameem M, Lee Hee Yong, DeLuca PP, AAPS PharmSci, 1 (3) artículo 7, 1999; Kostanski J.W., Pharm. Dev. Tech. 5, 585-596, 2000), y el secado por pulverización (IE920956).

- 20 La encapsulación por separación de fases es un procedimiento para preparar microesferas en el que un polímero biodegradable se disuelve en una cantidad excesiva de un disolvente orgánico, tal como cloruro de metileno, y se añade un fármaco disuelto en una pequeña cantidad de agua a la solución de polímero con agitación. A continuación se añade aceite de silicona a la mezcla de polímero-fármaco a una velocidad constante para formar microesferas embrionarias, y se añade una cantidad excesiva de un no disolvente, tal como triclorofluorometano, a la solución para extraer el disolvente orgánico de las microesferas embrionarias. Las microesferas solidificadas se recuperan por filtración y se secan a presión. Sin embargo, el procedimiento de separación de fases es problemático por lo 25 siguiente. Puesto que por secado a presión no se extrae de manera suficiente el disolvente tóxico, tal como cloruro de metileno, el disolvente residual reduce la estabilidad de las formulaciones, y también puede ser perjudicial para la salud cuando se administra al cuerpo. Además, el uso excesivo del no disolvente, tal como freón, hexano, heptano, ciclohexano, y triclorofluorometano, para la solidificación de las microesferas embrionarias no es rentable en la 30 producción en masa y provoca una grave contaminación ambiental.

- Por el contrario, la criopulverización después de la extrusión por fusión permite un uso mínimo de disolventes tóxicos. Este procedimiento es un procedimiento para preparar microesferas en el que una mezcla de un polímero biodegradable y un fármaco se extruye en estado fundido a través de un extrusor a una alta temperatura y se pulveriza a baja temperatura. La mezcla de polímero biodegradable-fármaco se puede obtener mezclando 35 homogéneamente un polímero y un fármaco en un disolvente, tal como cloruro de metileno, con un agitador, y extrayendo el disolvente orgánico con un evaporador rotatorio o un secador de vacío, o por crio-molienda a baja temperatura y tamizado del polvo y mezcla de los dos polvos finos. Este último caso no tiene el problema del disolvente residual tóxico, ya que no emplea un disolvente tóxico durante la preparación de las microesferas. Sin embargo, el procedimiento para la preparación de las micropartículas no excluye la posibilidad de una interacción 40 entre el polímero y el fármaco y la desnaturalización del fármaco debido a la alta temperatura y la alta presión después de la extrusión en estado fundido, y la desnaturalización del fármaco debido al calor generado localmente durante la criopulverización. Este procedimiento también es difícil de usar para preparar microesferas que tengan un tamaño uniforme, y que por lo tanto sean fáciles de inyectar.

- 45 Los dos procedimientos para preparar las microesferas, además de los problemas del disolvente residual, la dificultad en la producción en masa y la desnaturalización del fármaco, tienen otra desventaja en el sentido de que el polímero biodegradable usado para la liberación sostenible del fármaco es no hidrófilo y por lo tanto mal dispersable en una suspensión acuosa para inyección.

- Habitualmente se ha aplicado la evaporación de una emulsión doble de agua en aceite en agua (ag/ac/ag) para 50 encapsular fármacos hidrófilos, tales como péptidos o proteínas, en microesferas poliméricas. En este procedimiento de ag/ac/ag, un fármaco hidrófilo se disuelve en agua, y esta fase acuosa se dispersa en una fase orgánica que contiene un polímero biodegradable para proporcionar una emulsión primaria (agua en aceite). Esta emulsión primaria se dispersa de nuevo en una fase acuosa secundaria que contiene un emulsionante. Habitualmente, en la encapsulación de fármacos lipófilos, se ha usado la evaporación de la emulsión simple (aceite en agua (ac/ag)). En este procedimiento de ac/ag, un fármaco y un polímero biodegradable se disuelven simultáneamente en una mezcla 55 de disolventes orgánicos adecuados (por ejemplo, metanol y cloruro de metileno), y la solución resultante se dispersa en una fase acuosa. En ambos procedimientos de evaporación de la emulsión, a medida que el disolvente orgánico se extrae por extracción o evaporación durante la dispersión del polímero en una fase acuosa, el polímero reduce su solubilidad y por tanto solidifica para formar microesferas. En estos procedimientos, el factor técnico

importante es la eficiencia de encapsulación de los fármacos bioactivos.

La mayoría de los fármacos hidrófilos se fugan en grandes cantidades cuando se dispersan en una fase acuosa, dando lugar a una baja eficiencia de encapsulación. Para resolver este problema, Okada et al., emplearon materiales como la gelatina en la preparación de microesferas basándose en la evaporación de una emulsión doble.

5 Este material aumenta la viscosidad de una emulsión primaria y reduce la velocidad de difusión de un fármaco (un derivado de LHRH) en una emulsión secundaria, dando como resultado la mejora de la encapsulación de fármacos (Okada, H. y Toguchi, H., Crit. Rev. Ther.). Del mismo modo, el procedimiento de evaporación de una emulsión simple también puede mejorar la encapsulación de fármacos aumentando adecuadamente la concentración de un polímero biodegradable (PLGA) disuelto en una fase de disolvente orgánico. Normalmente, las microesferas preparadas por evaporación de una emulsión doble son más porosas que las preparadas por evaporación de una emulsión simple, y por lo tanto presentan mayores áreas de superficie, lo que da lugar a una velocidad de liberación inicial del fármaco relativamente alta.

10 Sin embargo, los procedimientos de evaporación de una emulsión simple y doble para la preparación de microesferas, al igual que el procedimiento de separación de fases, tienen las siguientes desventajas: dificultad en la extracción de un disolvente orgánico usado para disolver un polímero biodegradable, dificultad en los procedimientos de producción en masa debido a cambios en la tasa de extracción del disolvente, reacciones alérgicas a la gelatina usada para aumentar la viscosidad de una emulsión primaria, posibilidad de que un fármaco se desnaturalice y pierda su actividad debido a la alta fuerza de cizallamiento aplicada para la fabricación de pequeñas microesferas durante la preparación de la emulsión primaria, encapsulación limitada de fármacos, y similares.

15 El procedimiento de secado por pulverización también se ha usado para la preparación de partículas finamente atomizadas. En este procedimiento, por lo general, a una boquilla se le suministra una solución de un material a secar, o una suspensión o emulsión en la que se disuelven homogéneamente un polímero biodegradable y un fármaco, se pulveriza a través de la boquilla, y se expone a aire caliente para evaporar el disolvente usado. En particular, en el caso de la preparación de microesferas de liberación sostenida, las tasas de liberación del fármaco de las microesferas preparadas dependen en gran medida de la composición o del contenido del polímero biodegradable, el tipo o el contenido de aditivo, la composición del disolvente, y similares. Además de los parámetros de procesamiento anteriores, se pueden emplear otros parámetros que afectan a la morfología, tamaño o propiedades de las microesferas para controlar las tasas de liberación de los fármacos, parámetros que incluyen el tipo de boquilla de pulverización a través del cual se pulveriza una solución de pulverización (por ejemplo, un tipo que atomiza gotas con aire comprimido, un tipo que atomiza gotas usando la fuerza centrífuga cuando una solución de pulverización fluye hacia un disco que gira a alta velocidad, un tipo que atomiza gotas usando ondas ultrasónicas generadas cuando vibra un vibrador, etc.), la tasa de suministro de una solución de pulverización, y la temperatura, la cantidad suministrada y la tasa de suministro de aire seco. Además, el procedimiento de secado por pulverización, a diferencia de otros procedimientos para preparar microesferas de liberación sostenida, es ventajoso porque proporciona un procedimiento continuo, lo que facilita la producción de microesferas y por lo tanto la conversión de una producción a pequeña escala a una producción a gran escala.

20 Aunque el procedimiento de secado por pulverización tiene la ventaja de permitir la producción de microesferas a gran escala, tiene las desventajas siguientes. El disolvente usado no se extrae suficientemente solo mediante secado por pulverización. El disolvente residual provoca un problema sobre la estabilidad del polímero biodegradable durante el almacenamiento a largo plazo, que da lugar a cambios en los perfiles de liberación del fármaco de las microesferas. Otra desventaja de este procedimiento es que, puesto que los polímeros biodegradables usados para la encapsulación de fármacos son en su mayoría no hidrófilos, las microesferas preparadas no se suspenden bien y por lo tanto son difíciles de administrar con precisión.

25 Como se ha descrito anteriormente, la mayoría de los procedimientos convencionales de preparación de microesferas de liberación sostenida emplean un disolvente tóxico, y tienen problemas que incluyen el residuo del disolvente tóxico usado, un tamaño no adecuado de las microesferas para su inyección, mala capacidad de suspensión de las microesferas, y la dificultad de su producción en masa.

30 Los presentes inventores pretenden proporcionar un procedimiento para preparar microesferas de polímero biodegradable cargadas con fármaco bioactivo, que sean fáciles de producir en masa, resolviendo los problemas antes mencionados.

35 El documento WO 2004/112752 desvela procedimientos para la preparación de formulaciones mixtas de microesferas de liberación sostenida que contienen polímeros biodegradables y fármacos peptídicos, en las que las microesferas se dispersan en una solución que contiene un excipiente de dispersión tal como manitol y se liofiliza.

Divulgación de la invención

55 Problema técnico

Por tanto un objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para la preparación de microesferas de liberación sostenida que comprenden un polímero biodegradable como vehículo y un fármaco bioactivo, las microesferas que son fáciles de producir en masa y que no contienen un disolvente tóxico residual, lo cual es un

problema en los procedimientos convencionales de preparación de microesferas de liberación sostenida, que tiene una alta eficiencia de encapsulación de fármacos, y que tiene un tamaño uniforme adecuado para su inyección.

Solución técnica

5 Los presentes inventores llevaron a cabo estudios intensivos y comprobaron que cuando se suspenden microesferas que se obtienen mediante secado por pulverización de una solución, suspensión o emulsión que contiene un polímero biodegradable, un fármaco y un disolvente, en una solución acuosa que contiene alcohol polivinílico para extraer el disolvente residual, las microesferas presentan una mejora en su capacidad de suspensión e inyectabilidad y una elevada eficiencia de encapsulación del fármaco sin nada de disolvente tóxico residual, lo que da lugar a la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

Los objetos anteriores y otros objetos, características y ventajas de la presente invención se entenderán más claramente a partir de la siguiente descripción detallada tomada junto con los dibujos adjuntos, en los que:

15 La Figura 1 muestra las tasas de dispersión/extracción e inyectabilidad de microesferas preparadas en el Ejemplo de preparación 1 de acuerdo con la presente invención en una solución acuosa, en las que, después de llevar a cabo un ensayo de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo de ensayo 1, se midieron las tasas de extracción de microesferas en cada tubo (panel a) y la desviación en cada tubo para la tasas de extracción media (panel b);

20 La Figura 2 muestra las concentraciones de testosterona en suero en ratas SD macho (n = 5) que se inyectaron por vía subcutánea como se describe para el Ejemplo de ensayo 5 con una sola dosis de microesferas cargadas con leuprorelina preparadas en el Ejemplo de preparación 8; y

La Figura 3 muestra las concentraciones de octreotida en suero en ratas SD macho (n = 6), que se inyectaron por vía subcutánea como se describe para el Ejemplo de ensayo 6 con una sola dosis de microesferas cargadas con octreotida preparadas en el Ejemplo de preparación 9.

Mejor modo para realizar la invención

25 La presente invención se refiere a un procedimiento de preparación de microesferas de liberación sostenida, en el que una solución, suspensión o emulsión que contiene un polímero biodegradable, un fármaco seleccionado entre un péptido y una proteína, y un disolvente se seca por pulverización, y las microesferas obtenidas de este modo se dispersan en una solución acuosa que contiene alcohol polivinílico, con lo que el disolvente residual se extrae más fácilmente y se mejora la capacidad de suspensión de las microesferas en su administración.

30 En detalle, la presente invención se refiere a un procedimiento de preparación de microesferas de liberación sostenida que tienen una alta eficiencia de encapsulación del fármaco, casi nada de disolvente residual, y una mejor capacidad de suspensión, disolviendo y secando por pulverización un polímero biodegradable y un fármaco, la suspensión de las microesferas obtenidas de este modo en una solución acuosa en la que se disuelve el alcohol polivinílico, y la recuperación, lavado y liofilización de las microesferas.

35 En un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de preparación de una microesfera de liberación sostenida, que comprende la pulverización de una solución, suspensión o emulsión que contiene un polímero biodegradable, un fármaco y un disolvente en una cámara seca y su secado con aire seco para extraer el disolvente; y la dispersión de las microesferas secas por pulverización en una solución acuosa que contiene alcohol polivinílico para extraer el disolvente residual y mejorar la dispersabilidad de la microesfera, en la que el fármaco se selecciona entre un péptido y una proteína.

40 El término "polímero biodegradable", como se usa en el presente documento, se refiere a un polímero que se degrada lentamente cuando se administra en el cuerpo, y por lo tanto no es perjudicial para el cuerpo. Ejemplos de dichos polímeros incluyen polilactida (PLA), poliglicolida (PGA) y sus copolímeros, poli(lactida-co-glicolida) (PLGA), poliortoéster, polianhídrido, ácido polihidroxibutírico, policaprolactona, polialquilcarbonato, y sus derivados.

45 El término "fármaco", como se usa en el presente documento, incluye péptidos que tienen actividades biológicas, tales como agentes anticancerosos, antibióticos, antipiréticos, analgésicos, agentes antiinflamatorios, expectorantes antitusivos, sedantes, agentes antiulcerosos, antidepresivos, agentes antialérgicos, agentes antidiabéticos, agentes antihiperlipidémicos, agentes antituberculosos, agentes hormonales, agentes metabólicos óseos, inmunoinhibidores, inhibidores de la angiogénesis, anticonceptivos, y agentes similares a las vitaminas. En particular, se prefieren fármacos peptídicos o proteicos biológicamente activos. Ejemplos de oligopéptidos que tienen actividades biológicas incluyen la insulina, somatostatina y sus derivados, la hormona del crecimiento, prolactina, hormona adrenocorticotrópica, hormona estimulante de melanocitos, hormona liberadora de tirotropina y sus sales y derivados, hormona estimulante del tiroides, hormona luteinizante, hormona estimulante del folículo, vasopresina y sus derivados, oxitocina, calcitonina, hormona paratiroidea, glucagón, gastrina, secretina, pancreozimina, colesticquinina, angiotensina, lactógeno placentario humano, gonadotropina coriónica humana, y encefalina y sus derivados. Ejemplos de polipéptidos incluyen endorfina, interferón (de tipo α , de tipo β , de tipo γ), interleucina, tuftsin, timopoyetina, timosina, timostimulina, factor tímico humoral (THF), factor tímico sérico y sus derivados,

factor de necrosis tumoral, factor estimulante de colonias (CSF), motilina, dinorfina, bombesina, neurotensina, bradiquinina, ceruleína, uroquinasa, asparaginasa, calicreína, sustancia P, factor de crecimiento nervioso, factor de coagulación sanguíneo VIII y IX, lisozima, polimixina B, colistina, gramicidina, bacitracina, péptido estimulante de la síntesis de proteínas, polipéptido intestinal vasoactivo, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor liberador de la hormona del crecimiento, proteína morfogenética ósea, factor de crecimiento epidérmico, y eritropoyetina.

En la presente invención, se usa la solución acuosa que contiene alcohol polivinílico para extraer de manera más efectiva el disolvente residual del interior de las microesferas inmediatamente después del secado por pulverización y para dispersar mucho las microesferas en una solución de inyección después de su administración. Esta solución acuosa se extrae con una etapa de lavado adicional, y finalmente permanece en las microesferas en una cantidad inferior al 1 %. Además, cuando las microesferas se suspenden en la solución acuosa de alcohol polivinílico para extraer el disolvente residual, la velocidad de extracción del disolvente residual se puede controlar alterando la temperatura de la suspensión. Al utilizar esta función, después de la producción a pequeña escala, el disolvente residual se puede extraer en un corto periodo de tiempo a temperatura ambiente. Tras la producción a gran escala, la suspensión se mantiene a baja temperatura para extraer el disolvente residual a una velocidad lenta, evitando de este modo el deterioro de los productos debido a un tiempo de manipulación prolongado de grandes cantidades de productos.

En una etapa de dispersión adicional, el contenido de alcohol polivinílico en la solución acuosa preferentemente es del 0,01 al 20 % (p/v), y más preferentemente del 0,05 al 10 % (p/v). El alcohol polivinílico tiene un peso molecular de 3000 a 300.000, preferentemente de 5000 a 100.000, y tiene una velocidad de hidratación del 75 % al 95 %. La cantidad de alcohol polivinílico que queda en la superficie de las microesferas preferentemente es del 0,02 al 1 % (p/v), y más preferentemente del 0,05 al 0,5 % (p/v).

El término "disolvente", como se usa en el presente documento, se refiere a un material que es capaz de disolver un polímero biodegradable y/o un fármaco. Los expertos en la materia pueden seleccionar un disolvente adecuado según el tipo de polímero biodegradable. Se prefiere el ácido acético glacial.

La presente invención incluye una etapa de dispersión de microesferas en una solución acuosa de alcohol polivinílico para mejorar la dispersabilidad de las microesferas. La etapa de dispersión se realiza durante un minuto aproximadamente o superior para alcanzar los efectos máximos. El tiempo de dispersión preferido es 5 minutos o superior.

En una solicitud de patente presentada antes de la presente invención (solicitud de patente coreana 10-2003-0023130), los presentes inventores mejoraron la eficiencia de encapsulación y los perfiles de liberación de fármacos de microesferas mediante la disolución homogénea de un polímero biodegradable y un fármaco usando un disolvente no tóxico y el secado por pulverización de la solución resultante, y sugirieron un procedimiento de secado por pulverización para facilitar la producción en masa de las microesferas. Este procedimiento de secado por pulverización tiene ventajas, incluyendo la facilidad de producción en masa, el bajo contenido de disolvente residual, la alta eficiencia de encapsulación de fármacos y unos perfiles de liberación del fármaco ideales, pero tiene inconvenientes que incluyen la dificultad en la dispersión y suspensión de microesferas de liberación sostenida obtenidas mediante secado por pulverización en una solución de inyección debido a la ausencia de hidrofilia de un polímero contenido en las microesferas, y el requisito de una etapa adicional para extraer el disolvente residual para asegurar la estabilidad de las microesferas tras su almacenamiento a largo plazo. Por lo tanto, los presentes inventores pretenden resolver estos inconvenientes en la presente invención.

En la patente de Estados Unidos n.º 5.622.657 se desvela un procedimiento convencional de preparación de microesferas mediante secado por pulverización usando dos boquillas. Para mejorar la dispersabilidad de las microesferas poliméricas, que son propensas a adherirse entre sí o agregarse cuando se preparan mediante secado por pulverización, la invención citada proporciona un procedimiento de revestimiento de microesferas poliméricas cargadas con fármaco con un agente que previene la agregación usando dos o más boquillas, en el cual se pulverizan a la vez por separado desde diferentes boquillas una solución de polímero que contiene una sustancia biológicamente activa y una solución acuosa de un agente para prevenir la agregación de las micropartículas. Un procedimiento similar se describe en la patente coreana n.º 0177309, procedimiento que se caracteriza por la pulverización de una dispersión en la que un agente de dispersión soluble en agua se disuelve en la dirección opuesta a la dirección de pulverización de una solución de polímero biodegradable que contiene un ingrediente activo y la dirección del flujo de aire seco con el fin de recubrir una parte o todas las micropartículas de liberación sostenida con el agente de dispersión soluble en agua. Las invenciones citadas están destinadas a impedir que las microesferas se agreguen mediante la pulverización de una solución acuosa para prevenir la agregación de las microesferas inmediatamente después de la formación de las microesferas usando secado por pulverización, pero tiene las desventajas siguientes. Puesto que las microesferas están recubiertas con un agente que previene la agregación inmediatamente después de secarlas por pulverización, el disolvente tóxico usado para la disolución de un polímero para la preparación de la microesferas permanece en las microesferas en grandes cantidades. Además, cuando las microesferas se suspenden en una solución de inyección para su administración, se usa una cantidad en exceso de un agente dispersante. Además, los agentes que previenen la agregación usados en las invenciones citadas, tales como hidroxipropilcelulosa, carboximetilcelulosa, glicina, alanina, gelatina y colágeno, no mejoran su capacidad de suspensión en una solución de inyección o su inyectabilidad, lo que resulta en dosis no uniformes.

Por otra parte, con el fin de mejorar la fluidez de los gránulos para la preparación de comprimidos o partículas de fármacos y mejorar la solubilidad de los fármacos, un agente dispersante soluble en agua, tal como hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, y alcohol polivinílico, se puede secar por pulverización junto con una fármaco para que esté contenido en la preparación resultante en una cantidad del 4-19 % en peso aproximadamente (D. Ermis, A. Yuksel, Preparation of spray-dried microspheres of indomethacin and examination of the effects of coating on dissolution rates, J. Microencapsulation, vol. 16, No. 3, 3,315-324(1999)). En la bibliografía, para mejorar la solubilidad de fármacos poco solubles en agua se usan agentes dispersantes solubles en agua, disolviendo de ese modo los fármacos en unas pocas horas, y aumentando la fluidez de las partículas de fármaco, lo que facilita su procesamiento, tal como la formación de comprimidos. El alcohol polivinílico se ha registrado como sustancia que puede producir cáncer cuando se administra por vía parenteral en animales, y por lo tanto se debe controlar su cantidad residual (Carcinogenic Studies on Water-Soluble and Insoluble Macromolecules, Archives of Pathology, 67, 589-617, 1959). Los presentes inventores comprobaron que cuando se pulveriza alcohol polivinílico, suspendido en una solución de polímero, como se ha descrito en la bibliografía anteriormente, aumenta el contenido de alcohol polivinílico, que es difícil de degradar en el cuerpo, y aumenta enormemente la liberación inicial del fármaco. Dicha alta liberación inicial del fármaco puede causar efectos secundarios, y puede dar lugar a una menor duración de la liberación del fármaco, con lo cual no se garantizan efectos terapéuticos adecuados.

Los presentes inventores prepararon microesferas en las que además se extrae el disolvente residual y que tienen una mejor inyectabilidad, mediante un procedimiento que comprende la preparación de microesferas usando un procedimiento de secado por pulverización desarrollado por los presentes inventores antes de la presente invención, suspendiendo las microesferas en una solución acuosa que contiene alcohol polivinílico, y lavando y recuperando las microesferas.

El procedimiento de preparación de microesferas de polímero biodegradables que contienen un fármaco que tiene actividad biológica de acuerdo con la presente invención comprende la preparación de microesferas mediante secado por pulverización, la suspensión de las microesferas obtenidas de este modo en una solución acuosa que contiene alcohol polivinílico, y la recuperación, lavado y secado de las microesferas, que permite la extracción adicional del disolvente residual y mejora la capacidad de suspensión de las microesferas después de su administración, lo que da lugar a una administración exacta de los fármacos y un tratamiento eficaz de las enfermedades.

Con los siguientes ejemplos se puede obtener una mejor comprensión de la presente invención, que se exponen para ilustrar, pero no se deben interpretar como el límite de la presente invención.

Modo para la invención

Ejemplo de preparación 1: Preparación de microesferas y procedimiento posterior usando varios agentes dispersantes

Se prepararon microesferas de PLGA usando un secador por pulverización (Sodeva, Francia) equipado con una boquilla ultrasónica (Sono-Tek, 120 kHz). Se usaron un polímero biodegradable, RG503H (Boehringer-Ingelheim, Alemania), y un fármaco, acetato de leuprorelina (polipéptido Laboratories, Dinamarca). 50 g de RG503H y 2,5 g de acetato de leuprorelina se disolvieron homogéneamente en 500 ml de ácido acético glacial (Yakuri Pure Chemicals, Japón). La solución se transporta a un caudal de 3 ml/min usando una bomba de pistón. La solución transportada se pulverizó en el secador de pulverización a través de una boquilla ultrasónica instalada en la parte superior de un pulverizador, y se secó con aire seco a 200 °C. A continuación, se tomaron microesferas recuperadas de un ciclón en un cierto volumen, se pesaron con precisión, se añadieron a una concentración de 50 mg/ml a una solución acuosa que contiene agua destilada y el 1 % (p/v) de un agente dispersante, y se suspendieron en ella durante una hora a temperatura ambiente usando un agitador magnético. Los agentes dispersantes usados incluían alcohol polivinílico (Sigma, P-8136), polivinilpirrolidona (Sigma, PVP-360), albúmina de suero humano (Sigma, A-1654), polietilenglicol (Yakuri Pure Chemicals, 28123), Tween 80 (Sigma, P -0343), poloxámero (Sigma, P-1300), carboximetilcelulosa de sodio (Sigma, C-5678), gelatina (Sigma, G-6650), glicina (Sigma, G-7126), y manitol (Sigma, M-8429). La suspensión se pasó a través de un filtro de vacío. Las microesferas recogidas de esta manera se lavaron dos veces con agua destilada y se secaron por congelación.

Ejemplo de ensayo 1: Evaluación de las tasas de extracción y la inyectabilidad de microesferas

Las microesferas preparadas en el Ejemplo de preparación 1 se dispersaron en una solución acuosa, y se evaluaron para las tasas de extracción en una jeringuilla y su inyectabilidad. Cada formulación de microesferas se puso en un vaso de precipitados, y se mezcla tres veces con agua destilada a una concentración de 50 mg/ml. Cuando las microesferas se hubieron dispersado homogéneamente usando un agitador magnético, se extrajo con cuidado 1 ml de la dispersión con una jeringa de 1 ml provista de una aguja de calibre 21 (n = 20). Se transfirió 1 ml de la suspensión de microesferas en la jeringa a un tubo de Eppendorff de 1,5 ml y se secaron por congelación. Las microesferas recuperadas en el tubo de Eppendorff se evaluaron para el peso seco, y los resultados se dan en la Tabla 1, a continuación.

Tabla 1

[Tabla 1]

[Tabla] Tasas de extracción de microesferas de acuerdo con el tipo de agentes dispersantes		
Tipo de agentes dispersantes	Tasas de extracción (%)	RSD (%)
Microesferas inmediatamente después del secado por pulverización	11,4	17,9
Agua destilada	22,7	13,4
Alcohol polivinílico	91,5	4,2
Polivinilpirrolidona	51,6	24,4
Albúmina de suero humano	70,1	36,4
Polietilenglicol	66,8	19,0
Tween 80	68,8	30,3
Poloxámero	24,2	56,8
Carboximetilcelulosa sódica	60,9	16,9
Gelatina	75,7	11,0
Glicina	44,7	39,0
Manitol	46,5	25,5

Nota: RSD (desviación típica relativa = [desviación típica del peso de microesferas recuperadas/media] x 100) indica la desviación de la masa recuperada.

Como es evidente en la Tabla 1, se comprobó que inmediatamente después del secado por pulverización, las microesferas que no se habían sometido a un procedimiento de dispersión y las microesferas que se habían sometido a un procedimiento de dispersión en agua destilada que no contienen agente dispersante, disminuían con respecto a la tasas de extracción y la homogeneidad cuando se extraen en una jeringa y se inyectan desde la jeringa. Entre los diversos agentes dispersantes mencionados en los estudios de la bibliografía, el alcohol polivinílico presentaba las tasas de extracción más altas, seguido de la gelatina, la albúmina de suero humano y Tween 80. La Fig. 1 (panel a) muestra las tasas de extracción y la homogeneidad de microesferas que no se habían sometido a un procedimiento de dispersión o que se habían sometido a un procedimiento de dispersión usando manitol y alcohol polivinílico como agentes dispersantes, cuando una suspensión de microesferas se extrae en una jeringa y se inyecta desde la jeringa en un tubo. La Fig. 1 (panel b) muestra la desviación en cada tubo para la tasas de extracción media en una jeringa cuando las microesferas no se habían sometido a un procedimiento de dispersión o se habían sometido a un procedimiento de dispersión usando alcohol polivinílico como agente dispersante. Como se muestra en la Fig. 1, las microesferas tenían la tasa de extracción más alta y la mejor homogeneidad cuando se someten a un procedimiento de dispersión usando alcohol polivinílico.

Ejemplo de preparación 2: Efecto del tiempo de dispersión para mejorar la dispersabilidad de las microesferas

Se prepararon microesferas de PLGA usando un secador por pulverización (Sodeva, Francia) equipado con una boquilla ultrasónica (Sono-Tek, 120 kHz). Se usaron un polímero biodegradable, RG503H, y un fármaco, acetato de leuprorelina. 40 g de RG503H y 4 g de acetato de leuprorelina se disolvieron homogéneamente en 400 ml de ácido acético glacial. La solución se pulverizó en un secador por pulverización a través de una boquilla ultrasónica con un caudal de 3 ml/min, y se secó con aire seco a 200 °C. A continuación, se tomaron microesferas recuperadas de un ciclón en una cantidad predeterminada, se añadieron a una concentración de 50 mg/ml a una solución acuosa que contiene el 1 % (p/v) de alcohol polivinílico, y se suspendieron en ella durante 1 min, 3 min, 5 min, 10 min, 1 h, 3 h y 6 h a 25 °C usando un agitador magnético. La suspensión se pasó a través de un filtro de vacío. Las microesferas recogidas de este modo se lavaron dos veces con agua destilada, y se secaron por congelación.

Ejemplo de ensayo 2: Evaluación de las tasas de extracción y la inyectabilidad de microesferas

Las microesferas preparadas en el Ejemplo de preparación 2 se dispersaron en una solución acuosa, y se evaluaron para las tasas de extracción en una jeringuilla y su inyectabilidad. Esta prueba se realizó de acuerdo con el mismo procedimiento que en el Ejemplo de ensayo 1, y los resultados se dan en la Tabla 2, a continuación.

Tabla 2

[Tabla 2]

[Tabla] Tasas de extracción de microesferas según el tiempo de dispersión							
	1 min	3 min	5 min	10 min	1 hora	3 horas	6 horas
Tasas de extracción (%)	71,4	80,0	86,1	89,6	89,4	90,2	90,3
RSD (%)	13,6	11,6	7,8	5,5	5,9	4,9	4,8

Como es evidente en la Tabla 2, se observaron unas tasas de extracción elevadas inmediatamente después de que las microesferas se suspendiesen en una solución de alcohol polivinílico. A medida que se prolonga el tiempo de dispersión, las microesferas presentan una mayor tasa de extracción y homogeneidad cuando se extraen en una jeringa y se inyectan desde la jeringa. Sin embargo, después de un cierto tiempo de suspensión, las tasas de extracción y la homogeneidad se mantuvieron a niveles constantes.

Ejemplo de ensayo 3: Medición del contenido de alcohol polivinílico residual

Las microesferas preparadas en el Ejemplo de preparación 2 se evaluaron para el contenido residual de alcohol polivinílico. Este ensayo se realizó modificando un procedimiento descrito en el Journal of Controlled Release, 82 (2002), 105-114, de la siguiente manera. Se pusieron 2 mg de una formulación, pesada con precisión, en un vial de vidrio, se mezcló con 400 μ l de NaOH 0,5 N, y se dejó reaccionar en un horno a 60 °C durante 2-3 horas para que se disolviese por completo (n = 3). La solución, en la que las microesferas se disolvieron completamente, se neutralizó con 180 μ l de HCl 1 N, se suplementó con 600 μ l de ácido bórico 0,65 M y 100 μ l de una solución de I₂/KI (0,05 M/0,15 M), y se dejó reaccionar durante 20 min. A continuación, se midió la absorbancia a 690 nm (UV). Los resultados se dan en la Tabla 3, a continuación.

Tabla 3

[Tabla 3]

[Tabla] Cantidades de alcohol polivinílico residual en función del tiempo de dispersión							
	1 min	3 min	5 min	10 min	1 hora	3 horas	6 horas
Cantidad residual (p/p)	0,02	0,04	0,05	0,07	0,12	0,22	0,38

Como se muestra en la Tabla 3, las cantidades residuales de alcohol polivinílico aumentaron a medida que se incrementaba el tiempo de suspensión en la solución de alcohol polivinílico.

Cuando se tomaron en conjunto los resultados mostrados en las Tablas 2 y 3, la dispersabilidad y las tasas de extracción de las microesferas mejoraron inmediatamente después de que microesferas se suspendiesen y se dispersasen en una solución acuosa de alcohol polivinílico, pero para un efecto óptimo se necesitaba un tiempo de dispersión de 5 minutos aproximadamente o superior. En este caso, la cantidad de alcohol polivinílico que queda en la superficie de las microesferas fue superior al 0,05 % en peso. Este es un factor crítico en la determinación de la tasas de extracción de las microesferas en una jeringa.

Ejemplo de preparación comparativo 1: Preparación de microesferas por co-pulverización con alcohol polivinílico

Se prepararon microesferas de PLGA usando un secador por pulverización (Sodeva, Francia) equipado con una boquilla ultrasónica (Sono-Tek, 120 kHz). Se usaron un polímero biodegradable, RG503H, y un fármaco, acetato de leuprorelina. Para preparar una formulación de microesferas de control, se disolvieron homogéneamente 1,8 g de RG503H y 0,2 g de acetato de leuprorelina en 90 ml de ácido acético glacial. La solución se transporta a un caudal de 1,5 ml/min usando una bomba de pistón. La solución transportada se pulverizó en el secador de pulverización a través de una boquilla ultrasónica instalada en la parte superior de un pulverizador, y se secó con aire seco a 200 °C. A continuación, se tomaron microesferas recuperadas de un ciclón en una cantidad predeterminada, se añadieron a una concentración de 50 mg/ml a una solución acuosa que contiene el 1 % (p/v) de alcohol polivinílico como agente dispersante, y se suspendieron en ella durante 1 h a temperatura ambiente usando un agitador magnético. La suspensión se pasó a través de un filtro de vacío. Las microesferas recogidas de este modo se lavaron dos veces con agua destilada y se secó por congelación.

Se preparó una formulación de microesferas comparativa mediante secado por pulverización al mismo tiempo de las microesferas y el alcohol polivinílico con el fin de comparar el efecto de la dispersión del alcohol polivinílico secado por co-pulverización con el de la formulación control. Se disolvieron homogéneamente 1,8 g de RG503H y 0,2 g de acetato de leuprorelina en 90 ml de ácido acético glacial. La solución se transporta a un caudal de 1,5 ml/min usando una bomba de pistón. La solución transportada se pulverizó en el secador de pulverización a través de una boquilla ultrasónica instalada en la parte superior de un pulverizador, y se secó con aire seco a 200 °C, produciendo de este modo una formulación comparativa.

Las formulaciones de microesferas control y comparativa preparadas como se describe anteriormente se dispersaron individualmente en una solución acuosa, y se evaluaron para las tasas de extracción en una jeringuilla y su inyectabilidad. Este ensayo se realizó de acuerdo con el mismo procedimiento que en el Ejemplo de ensayo 1, y se midieron los pesos secos finales de las microesferas en los tubos. Los resultados se dan en la Tabla 4, a continuación. Se determinó la cantidad de alcohol polivinílico residual de cada formulación de microesferas de acuerdo con el mismo procedimiento que en el Ejemplo de ensayo 3.

5 Se llevó a cabo un ensayo de liberación *in vitro*, como sigue. Se pusieron 10 mg de cada formulación de microesferas en un tubo de 1,5 ml, se mezcló con 1 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS), y se incubaron durante 1 h en una incubadora a 37 °C con agitación a 5 rpm usando un agitador rotatorio (SLRM-2M, Seoulin Bioscience). Cada solución de reacción se centrifugó, y el sobrenadante se evaluó para las cantidades del fármaco peptídico liberado de las microesferas usando un detector de fluorescencia (Varian, Cary Eclipse; Ex: 280 nm, Em: 350 nm).

Tabla 4

[Tabla 4]

[Tabla] Dispersabilidad, cantidades residuales de alcohol polivinílico y liberación inicial del fármaco de formulaciones de microesferas control y comparativa				
Formulación	Alcohol polivinílico residual (%)	Liberación inicial del fármaco (%)	Tasas de extracción (%)	RSD (%)
Control	0,13	3,1	75,32	5,62
Comparativa	0,52	15,5	68,18	13,13

10 Como se muestra en la Tabla 4, en comparación con la formulación de microesferas de control que se somete a un procedimiento de dispersión usando alcohol polivinílico, la formulación de microesferas comparativa que no se somete a un procedimiento de suspensión tenía una alta concentración residual de alcohol polivinílico, pero mostraba una disminución de la tasas de extracción y de la homogeneidad cuando se extrae en una jeringa y se inyecta desde la misma, y una tasa de liberación del fármaco inicial alta.

15 **Ejemplo de ensayo 4: Evaluación de las tasas de extracción del disolvente residual según el tiempo de dispersión usando alcohol polivinílico**

20 Se prepararon microesferas en un ciclón y se recuperan del mismo de acuerdo con el mismo procedimiento que en el Ejemplo de preparación 2, y se suspendieron en una solución acuosa de alcohol polivinílico al 1 % a una concentración de 50 mg/ml. Se midieron las tasas de extracción de ácido acético residual en los puntos de tiempo dados mientras la solución acuosa se mantiene a 25 °C. Las concentraciones de ácido acético residual en las microesferas se determinaron como sigue. Las microesferas se disolvieron en cloruro de metileno (Junsei, 34355-0350), suplementado con una solución acuosa de ácido fosfórico al 0,07 % (Sigma, P-6560), y se mezclaron vigorosamente. La mezcla se centrifugó para separar una capa de la solución acuosa de ácido fosfórico. Esta capa se recuperó y se evaluó para la cantidad de ácido acético usando HPLC. Se llevó a cabo una HPLC usando una columna C18 (5 µm, 4,6 x 250 mm, 120A). Se usó una mezcla de gradiente lineal del 5-50 % de metanol (JT Baker, AH230-4) y tampón de fosfato al 0,07 % (pH 3,0) como fase móvil que tiene un caudal de 1,2 ml/min. El ácido acético se detectó a 210 nm (UV), y los resultados se dan en la Tabla 5, a continuación. El contenido de ácido acético residual inmediatamente después preparar las microesferas era del 0,8 % en peso.

Tabla 5

30

[Tabla 5]

[Tabla] Tasas de extracción de disolvente residual según el tiempo de dispersión	
Tiempo (min)	Tasas de extracción del ácido acético (%)
5	20,0
10	34,2
20	44,0
40	54,5
60	61,3
120	73,6
180	87,9

Como se muestra en la Tabla 5, las velocidades de extracción de disolvente residual aumentaron gradualmente con el incremento del tiempo de suspensión de las microesferas en una solución acuosa de alcohol polivinílico para extraer el disolvente residual. El disolvente residual final se mantuvo a menos del 0,1 % en peso.

35

Ejemplo de preparación 3: Preparación de microesferas cargadas con BSA mediante secado por pulverización de una emulsión de tipo W/O que contiene BSA

Se disolvieron 0,5 g de albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma, A-7638) en agua destilada, y se mezclan homogéneamente con una solución preparada disolviendo 9,5 g de RG502H en 95 ml de cloruro de metileno, produciendo de este modo una emulsión de tipo W/O. Mientras la emulsión se mantiene en estado de emulsión usando un agitador, se introdujo en un secador por pulverización (Buchi-191) a un caudal de 3 ml/min. Se suministró aire comprimido a una boquilla para dos fluidos a un caudal de 450 NL/h a gotitas atomizadas secadas por pulverización usando aire seco a 80 °C. Las microesferas recuperadas se suspendieron durante 3 horas en una solución acuosa de alcohol polivinílico al 1 % a una concentración de 50 mg/ml con agitación usando un agitador magnético, se lavaron con agua destilada y se secaron por congelación. Las microesferas preparadas de este modo tenían un tamaño medio de partícula de 5,2 μ m, y la cantidad de alcohol polivinílico que queda en la superficie de las microesferas era del 0,93 % (p/p).

Ejemplo de preparación 4: Preparación de microesferas cargadas con BSA mediante secado por pulverización de una emulsión del tipo S/O que contiene BSA

Se pulverizó finamente 1 g de BSA en un mortero, y se mezcla homogéneamente con una solución preparada disolviendo 9 g de RG502H en 90 ml de cloruro de metileno, produciendo de este modo una emulsión de tipo S/O. Mientras la emulsión se mantiene en estado de emulsión usando un agitador, se introduce en un secador por pulverización (Buchi-191) a un caudal de 3 ml/min. Se suministra aire comprimido en una boquilla para dos fluidos a un caudal de 450 NL/h a gotitas atomizadas secadas por pulverización usando aire seco a 80 °C. Las microesferas recuperadas se suspendieron durante 3 horas en una solución acuosa de alcohol polivinílico al 1 % a una concentración de 50 mg/ml con agitación usando un agitador magnético, se lavaron con agua destilada y se secaron por congelación. Las microesferas preparadas de este modo tenían un tamaño medio de partícula de 5,8 μ m, y la cantidad de alcohol polivinílico que queda en la superficie de las microesferas era del 0,85 % (p/p).

Ejemplo de preparación 5: Preparación de microesferas cargadas con leuprolelina

Se disolvieron 1 g de acetato de leuprolelina y 9 g de RG502H en 90 ml de ácido acético glacial. La solución se introduce en un secador por pulverización (Buchi-191) a un caudal de 2 ml/min. Se suministra aire comprimido en una boquilla para dos fluidos a un caudal de 500 NL/h a gotitas atomizadas secadas por pulverización usando aire seco a 120 °C. Las microesferas recuperadas se suspendieron durante 3 horas en una solución acuosa de alcohol polivinílico al 1 % a una concentración de 50 mg/ml con agitación usando un agitador magnético, se lavaron con agua destilada y se secaron por congelación. Las microesferas preparadas de este modo tenían un tamaño medio de partícula de 5,1 μ m, y la cantidad de alcohol polivinílico que queda en la superficie de las microesferas era del 0,98 % (p/p).

Ejemplo de preparación 6: Preparación de microesferas cargadas con leuprolelina

Se disolvieron 0,4 g de acetato de leuprolelina y 9,6 g de R202H en 96 ml de ácido acético glacial. La solución se introduce en un secador por pulverización (Sodeva, Francia) a un caudal de 3 ml/min, se pulveriza en una cámara seca usando una boquilla ultrasónica (Sono-Tek, 120 kHz), y se seca usando aire seco a 200 °C. Las microesferas recuperadas se suspendieron durante 3 horas en una solución acuosa de alcohol polivinílico al 1 % a una concentración de 50 mg/ml con agitación usando un agitador magnético, se lavaron con agua destilada y se secaron por congelación. Las microesferas preparadas de este modo tenían un tamaño medio de partícula de 23,4 μ m, y la cantidad de alcohol polivinílico que queda en la superficie de las microesferas era del 0,16 % (p/p).

Ejemplo de preparación 7: Preparación de microesferas cargadas con leuprolelina

Se disolvieron 0,5 g de acetato de leuprolelina y 9,5 g de R202H en 95 ml de ácido acético glacial. La solución se introduce en un secador por pulverización (Sodeva, Francia) a un caudal de 3 ml/min, se pulveriza en una cámara seca usando una boquilla ultrasónica (Sono-Tek, 60 kHz), y se seca usando aire seco a 200 °C. Las microesferas recuperadas se suspendieron durante 3 horas en una solución acuosa de alcohol polivinílico al 1 % a una concentración de 50 mg/ml con agitación usando un agitador magnético, se lavaron con agua destilada y se secaron por congelación. Las microesferas preparadas de este modo tenían un tamaño medio de partícula de 32,6 μ m, y la cantidad de alcohol polivinílico que queda en la superficie de las microesferas era del 0,11 % (p/p).

Ejemplo de preparación 8: Preparación de microesferas cargadas con leuprolelina

Se disolvieron 1,4 g de acetato de leuprolelina, 0,86 g de RG504H y 7,74 g de R202H en 86 ml de ácido acético glacial. La solución se introduce en un secador por pulverización (Sodeva, Francia) a un caudal de 3 ml/min, se pulveriza en una cámara seca usando una boquilla ultrasónica (Sono-Tek, 120 kHz), y se seca usando aire seco a 200 °C. Las microesferas recuperadas se suspendieron durante 90 min en una solución acuosa de alcohol polivinílico al 1 % a una concentración de 50 mg/ml con agitación usando un agitador magnético, se lavaron con agua destilada y se secaron por congelación.

Ejemplo de preparación 9: Preparación de microesferas cargadas con octreotida

Se disolvieron 0,7 g de acetato de octreotida y 9,3 g de RG502H en 186 ml de ácido acético glacial. La solución se introduce en un secador por pulverización (Sodeva, Francia) a un caudal de 3 ml/min, se pulveriza en una cámara seca usando una boquilla ultrasónica (Sono-Tek, 120 kHz), y se seca usando aire seco a 200 °C. Las microesferas recuperadas se suspendieron durante 1 h en una solución acuosa de alcohol polivinílico al 1 % a una concentración de 50 mg/ml con agitación usando un agitador magnético, se lavaron con agua destilada y se secaron por congelación.

Ejemplo de ensayo 5

Las microesferas cargadas con leuprorelina preparadas en el Ejemplo de preparación 8 se suspendieron en una suspensión (0,5 % (p/p) de carboximetilcelulosa de sodio, 5 % (p/p) de manitol, 0,1 % de Tween 80), y se inyecta por vía subcutánea a una sola dosis de 9 mg/kg (acetato de leuprorelina) en ratas SD macho (n = 5, 195 ± 20 g). Se obtuvieron muestras de sangre de las venas de la cola antes de la administración del fármaco, y 30 min, 1 h, 3 h, 6 h y 1, 2, 4 y 7 días después de la administración del fármaco, y cada siete días durante un periodo desde el día 8 a 90. Las ratas se expusieron a las microesferas a una dosis de 100 □/□ (en base al acetato de leuprorelina) 28, 56 y 84 días después de la administración del fármaco con el fin de evaluar la liberación sostenida del fármaco desde las microesferas, y se recogieron muestras de sangre antes de la administración de los fármacos y 3 y 24 horas después de la administración del fármaco. Se llevó a cabo una administración secundaria del fármaco 90 días después de la administración primaria del fármaco, y se recogieron muestras de sangre como se describe para la administración primaria del fármaco. Las muestras de sangre recogidas se pusieron en tubos Eppendorff de 1,5 ml, y se centrifugaron durante 10 min a 4 °C y 12.000 rpm. Los sueros obtenidos se almacenaron a -20 °C. Se midieron los niveles de testosterona en suero usando un kit de radioinmunoensayo (RIA) (DSL-10-4000, Diagnostic System Laboratories, Inc., Webster, Texas, EE.UU.), y los resultados se dan en la Fig. 2. Las tres exposiciones, que se realizaron cada 28 días después de la administración del fármaco, y la administración secundaria del fármaco, que se realizó 90 días después de la administración del fármaco, dieron como resultado la inhibición del aumento de los niveles de testosterona en suero. Estos resultados indican que se libera leuprorelina de forma continua durante el periodo de ensayo de 90 días.

Ejemplo de ensayo 6

Microesferas cargadas con octreotida preparadas en el Ejemplo de preparación 9 se suspendieron en una suspensión (0,5 % (p/p) de carboximetilcelulosa de sodio, 0,6 % (p/p) de manitol), y se inyecta por vía subcutánea a una sola dosis de 5 mg/kg (octreotida) a ratas SD macho (n = 6, 195 ± 20 g). Las muestras de sangre se obtuvieron de venas de la cola antes de la administración del fármaco y 6 horas y 1, 4, 7, 13, 21 y 31 días después de la administración del fármaco. Las muestras de sangre recogidas se pusieron en tubos Eppendorff de 1,5 ml, y se centrifugaron durante 10 min a 4 °C y 12.000 rpm. Los sueros obtenidos se almacenaron a -20 °C. Se midieron las concentraciones de octreotida en suero usando un kit de inmunoensayo enzimático (EIA) (Bachem, S-1275, Peninsula Laboratories Inc., EE.UU.). Los resultados se dan en la Fig. 3. Como se muestra en la Fig. 3, se comprobó que el fármaco octreotida se libera de forma continua durante un periodo de más de dos semanas.

Aplicabilidad Industrial

Como se ha descrito anteriormente, el procedimiento de preparación de microesferas según la presente invención permite la preparación de microesferas de liberación sostenida que no tienen los problemas de los procedimientos de preparación convencionales de microesferas de liberación sostenida, incluyendo la toxicidad debida al disolvente residual y la mala inyectabilidad. Las microesferas preparadas de acuerdo con la presente invención liberan una concentración eficaz de fármaco de manera sostenida durante un periodo predeterminado cuando se administran al cuerpo, impiden la liberación inicial rápida del fármaco, y reducen la frecuencia de administración requerida del fármaco. Por lo tanto, las presentes microesferas son útiles en el tratamiento de enfermedades.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de preparación de una microesfera de liberación sostenida, que comprende:

5 pulverizar una solución, suspensión o emulsión que contiene un polímero biodegradable, un fármaco y un disolvente en una cámara seca y el secado con aire seco para extraer el disolvente; y dispersar una microesfera secada por pulverización en una solución acuosa que contiene alcohol polivinílico para extraer un disolvente residual y mejorar la dispersabilidad de la microesfera, en la que el fármaco se selecciona entre un péptido y una proteína.

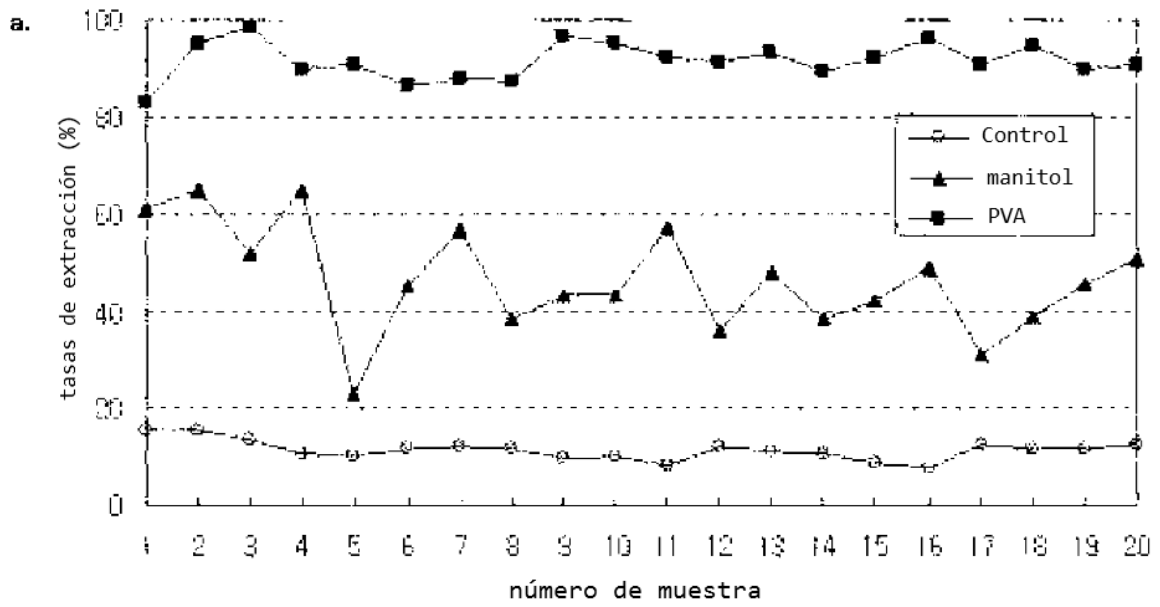
10 2. El procedimiento de preparación de la microesfera de liberación sostenida según la reivindicación 1, en el que el polímero biodegradable es uno o más seleccionados entre el grupo que consiste en polilactida, poliglicolida, poli(lactida-co-glicolida), poliortoéster, polianhídrido, ácido polihidroxibutírico, policaprolactona, polialquilcarbonato, y sus derivados.

3. El procedimiento o la preparación de la microesfera de liberación sostenida según las reivindicaciones 1 o 2, en el que el fármaco se selecciona entre leuprorelina, goserelina, triptorelina, octreotida, y sus sales.

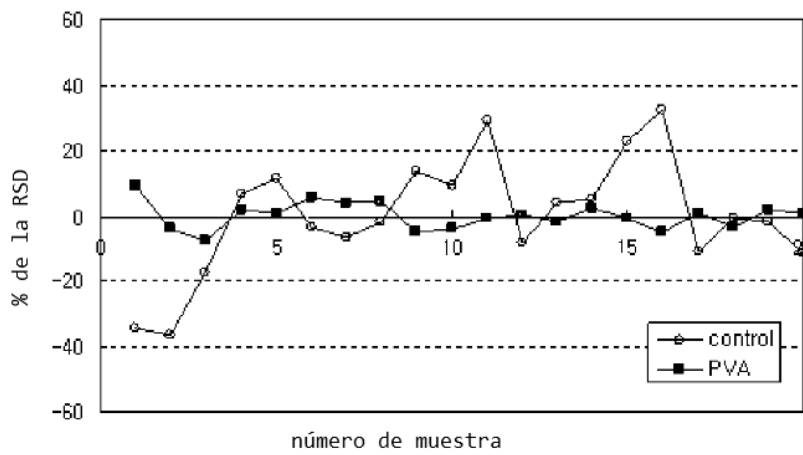
15 4. El procedimiento de preparación de la microesfera de liberación sostenida de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que al dispersar en la solución acuosa que contiene alcohol polivinílico, el alcohol polivinílico se reviste sobre la microesfera de liberación sostenida en una cantidad del 0,02 % al 1,0 % en peso.

5. El procedimiento de preparación de la microesfera de liberación sostenida de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que la etapa de dispersión se realiza durante 5 minutos o superior.

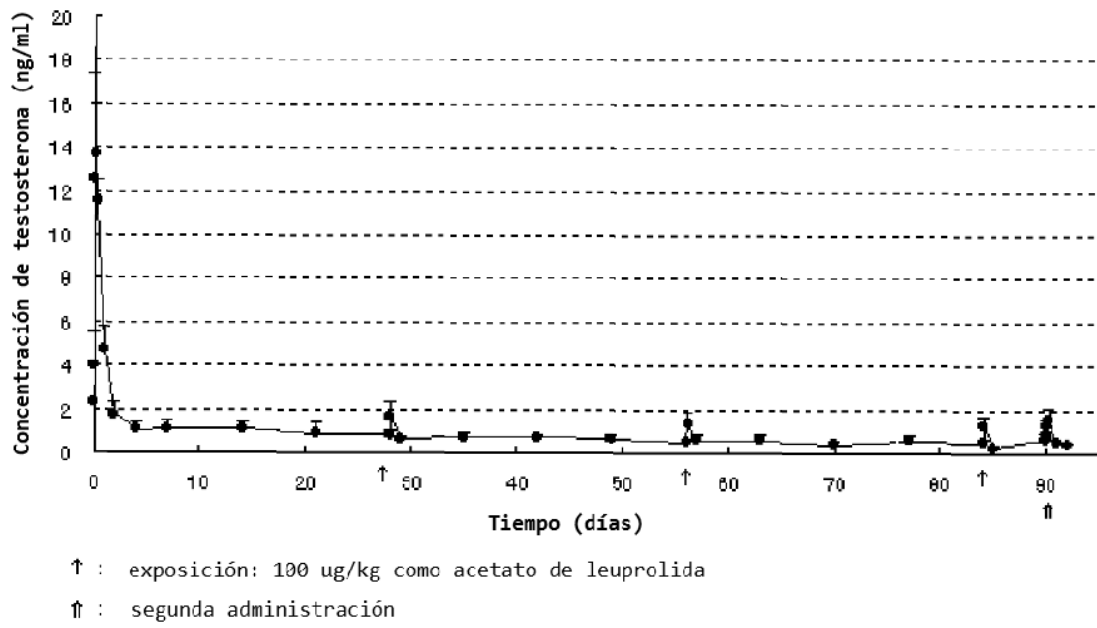
[Fig. 1]



b.



[Fig. 2]



[Fig. 3]

