

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 572 948**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/381** (2006.01)  
**A61K 9/50** (2006.01)  
**A61K 9/14** (2006.01)  
**A61P 25/16** (2006.01)  
**A61K 9/16** (2006.01)  
**A61K 47/34** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.11.2011 E 11843219 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.03.2016 EP 2642993**

54 Título: **Composiciones de rotigotina o sales farmacéuticamente aceptables de rotigotina**

30 Prioridad:

**25.11.2010 CN 201010576447**

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

**03.06.2016**

73 Titular/es:

**SHAN DONG LUYE PHARMACEUTICAL CO., LTD.  
(100.0%)  
No. 9 Baoyuan Road, Laishan District  
Yantai, Shandong 264003, CN**

72 Inventor/es:

**LI , YOUXIN;  
WANG, AIPING;  
LIU, WANHUI;  
SUN, KAOXIANG;  
LI , JUN y  
SUN, LIFANG**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 572 948 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

Composiciones de rotigotina o sales farmacéuticamente aceptables de rotigotina

La divulgación se refiere a una composición de rotigotina, o a las sales farmacéuticamente aceptables de rotigotina.

5 Debido al efecto del primer paso del hígado, la biodisponibilidad oral de la rotigotina es baja (aproximadamente el 1 %-5 %), y por tanto la rotigotina no es adecuada para la administración por vía oral. Actualmente, el primer parche transdérmico para tratar la enfermedad de Parkinson, un parche transdérmico con la marca registrada Neupro® desarrollado por Schwarz Pharma AG, está en el mercado en Alemania, Gran Bretaña, Australia, etc. Sin embargo, durante el uso de ese producto puede formarse rotigotina cristalizada. Para resolver este problema, se emplean almacenamiento en la cadena de frío y distribución a una temperatura de 2-8 °C, y cada prescripción no debe ser superior a un mes para evitar la cristalización, lo que aparentemente aumentará la dificultad de los pacientes para usar ese producto.

10 El documento CN1762495A desvela una formulación en microesferas que comprende rotigotina y materiales auxiliares de polímero degradable. La formulación en microesferas de rotigotina como se desvela en el documento CN1762495A puede lograr el efecto de liberación sostenida de acción prolongada, pero puede producirse un problema de liberación rápida. Como se muestra en la Fig. 17 (prueba *in vivo*, con una tasa de carga de fármaco del 8 %), Fig. 12 (prueba *in vivo*, con una tasa de carga de fármaco del 20 %) y Fig. 20 (prueba *in vivo*, con una tasa de carga de fármaco del 40 %) del documento CN1762495A, cuando la tasa de carga de fármaco es del 20 % o 40 %, el efecto de liberación rápida es obvio. También puede observarse de la Fig. 20 (prueba *in vivo*, con una tasa de carga de fármaco del 40 %) y la Fig. 19 (prueba *in vivo*, con una tasa de carga de fármaco del 40 %) del documento CN1762495A que la cantidad liberada de rotigotina dentro de un día en la prueba *in vitro* se correlaciona con la liberación rápida del fármaco en la prueba *in vivo*. Para la misma carga de fármaco, cuanto mayor sea la cantidad liberada en la prueba *in vitro*, más fármaco se liberará rápidamente *in vivo*.

15 Como una enfermedad degenerativa relacionada con la edad, la enfermedad de Parkinson empeora progresivamente al aumentar la edad del paciente. De este modo, la dosificación administrada también debe aumentarse gradualmente durante el tratamiento. Cuando se tratan pacientes con enfermedad de Parkinson en el periodo progresivo, la toma de dosis diaria del fármaco necesitará aumentarse significativamente. Así, cuando se tratan pacientes con enfermedad de Parkinson en el periodo progresivo con microesferas de rotigotina, la tasa de carga de fármaco del componente activo no debe ser demasiado baja. De otro modo, para lograr el mismo efecto terapéutico que las microesferas que tienen una mayor tasa de carga de fármaco, las microesferas que tienen una menor tasa de carga de fármaco tendrían que administrarse en una cantidad relativamente mayor, que puede producir dolor a los pacientes. Sin embargo, si la tasa de carga de fármaco de las microesferas es demasiado alta, cuando se administra a pacientes, el fármaco puede experimentar una repentina liberación, que puede producir sobredosis de fármaco.

20 La materia que no queda englobada en el alcance de las reivindicaciones no forma parte de la invención presentemente reivindicada.

25 La presente divulgación se refiere a una composición de rotigotina, o a las sales farmacéuticamente aceptables de rotigotina, que reduce sustancialmente la liberación rápida del fármaco. La presente invención proporciona una composición de microesferas que comprende rotigotina, o las sales farmacéuticamente aceptables de rotigotina; al menos una poli(lactida-co-glicolida) (PLGA); y al menos un ácido graso, en la que la rotigotina o su sal farmacéutica es el 20-40 %, la al menos una PLGA es el 57,5-72,5 % y el al menos un ácido graso es el 2,5-7,5 % en peso con respecto al peso total de la composición.

30 En algunas realizaciones, el diámetro de partícula de las microesferas puede ser de aproximadamente 1-250 micrómetros, por ejemplo, de aproximadamente 10-200 micrómetros.

35 En un ejemplo, la rotigotina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, puede ser aproximadamente el 25-35 %, aproximadamente el 25-30 %, aproximadamente el 20-30 %, aproximadamente el 20-35 %, aproximadamente el 25-40 %, aproximadamente el 30-35 %, aproximadamente el 30-40 %, o aproximadamente el 35-40 % en peso con respecto al peso total de la composición. En otro ejemplo, la rotigotina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma puede ser aproximadamente el 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, o el 40 % en peso con respecto al peso total de la composición.

40 En algunas realizaciones, la al menos una PLGA puede comprender dos, tres, cuatro, o cinco tipos diferentes de polímeros de PLGA, que pueden ser diferentes, por ejemplo, en peso molecular y/o relación de polimerización. En un ejemplo, la al menos una PLGA es aproximadamente el 57,5-72,5 %, aproximadamente el 60-72,5 %, aproximadamente el 60-70 %, o aproximadamente el 62,5-67,5 % en peso con respecto a la cantidad total de la composición. En otro ejemplo, la al menos una PLGA es aproximadamente el 57,5 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 62,5 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 67,5 %, aproximadamente el 70 % o aproximadamente el 72,5 % en peso con respecto a la cantidad total de la composición.



aproximadamente 20.000-30.000 Da, aproximadamente 20.000-25.000 Da, aproximadamente 25.000-35.000 Da, aproximadamente 25.000-30.000 Da o aproximadamente 30.000-35.000 Da.

5 En algunas realizaciones, la segunda PLGA tiene un peso molecular de aproximadamente 45.000-70.000 Da, aproximadamente 50.000-65.000 Da, aproximadamente 55.000-60.000 Da, aproximadamente 45.000-65.000 Da, aproximadamente 45.000-60.000 Da, aproximadamente 45.000-55.000 Da, aproximadamente 45.000-50.000 Da, aproximadamente 50.000-70.000 Da, aproximadamente 50.000-55.000 Da, aproximadamente 60.000-65.000 Da, aproximadamente 60.000-70.000 Da, aproximadamente 45.000-75.000 Da, aproximadamente 50.000-75.000 Da, aproximadamente 55.000-75.000 Da, aproximadamente 60.000-75.000 Da, aproximadamente 65.000-75.000 Da o aproximadamente 70.000-75.000 Da.

10 En algunas realizaciones, la relación de peso de la primera PLGA y la segunda PLGA puede ser aproximadamente 90:10 a 10:90, aproximadamente 85:15 a 15:85, aproximadamente 80:20 a 20:80, aproximadamente 75:25 a 25:75, aproximadamente 70:30 a 30:70, aproximadamente 65:35 a 35:65, aproximadamente 60:40 a 40:60 o aproximadamente 55:45 a 45:55.

15 En algunas realizaciones, la primera PLGA se elige de PLGA 7525 4A y PLGA 7525 5A, y la segunda PLGA es PLGA 5050 2,5A.

En algunas realizaciones, la relación de peso de la primera PLGA y la segunda PLGA es aproximadamente 50:50.

En algunas realizaciones, la rotigotina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma es aproximadamente el 20-40 %, la cantidad de la primera PLGA y la segunda PLGA es aproximadamente el 57,5-72,5 %, y el ácido graso es aproximadamente el 2,5-7,5 % con respecto al peso total de la composición.

20 En algunas realizaciones, la rotigotina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma es aproximadamente el 20-40 %, la cantidad de la primera PLGA y la segunda PLGA es aproximadamente el 57,5-72,5 %, y el ácido graso es aproximadamente el 2,5 % con respecto al peso total de la composición.

25 En algunas realizaciones, la rotigotina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma es aproximadamente el 30 %, la cantidad de la primera PLGA y la segunda PLGA es aproximadamente el 62,5-67,5 %, y el ácido graso es aproximadamente el 2,5-7,5 % con respecto al peso total de la composición.

En algunas realizaciones, la rotigotina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma es aproximadamente el 30 %, la cantidad de la primera PLGA y la segunda PLGA es aproximadamente el 67,5 %, y el ácido graso es aproximadamente el 2,5 % con respecto al peso total de la composición.

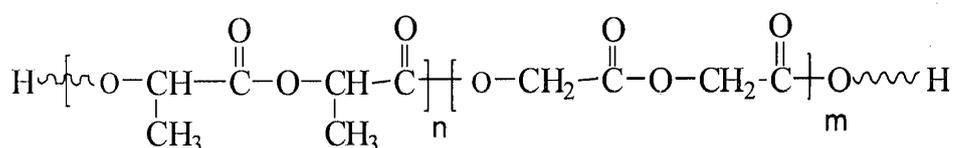
30 La composición como se desvela en el presente documento puede proporcionar una liberación sostenida de acción prolongada del compuesto, tal como rotigotina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma. Por ejemplo, una preparación de microesferas que comprende rotigotina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, PLGA, y un ácido graso puede reducir el efecto de baja liberación de fármaco que puede producirse después de que la preparación de microesferas se administre durante 1-4 días y mientras tanto tienen efecto de liberación rápida reducido. Las microesferas preparadas como se desvela en el presente documento también proporcionan buena conformidad lote a lote. También puede reducirse significativamente la variación de las concentraciones de fármaco en sangre entre animales individuales.

35 La composición como se desvela en el presente documento puede reducir el efecto de liberación rápida, especialmente cuando el compuesto, tal como la rotigotina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, es superior al 20 % en peso con respecto al peso total de la composición. El porcentaje en peso del compuesto, tal como rotigotina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, con respecto al peso total de la composición, también se denomina en el presente documento "tasa de carga de fármaco".

La composición como se desvela en el presente documento, libera el fármaco establemente a largo plazo sin liberación rápida significativa, logrando así el fin de la liberación sostenida de acción prolongada.

45 La PLGA como se desvela en el presente documento también se conoce como poli(lactida-co-glicolida), que es un copolímero de lactida/glicolida. La relación de polimerización de lactida con respecto a glicolida dentro de la poli(lactida-co-glicolida) puede ser cualquier relación apropiada. Por ejemplo, la relación de polimerización de lactida con respecto a glicolida puede ser de aproximadamente 95:5 a 5:95, tal como de aproximadamente 75:25 a 25:75.

La PLGA puede representarse por la siguiente estructura:



en la que  $n$  es cero o un número entero positivo, y  $m$  es cero o un número entero positivo, pero  $n$  y  $m$  no pueden ser cero al mismo tiempo. La PLGA como se desvela en el presente documento puede modificarse adicionalmente químicamente.

5 Las microesferas, como se desvelan en el presente documento, son de un tipo de matriz que comprende un fármaco disuelto y/o disperso homogéneamente a lo largo de una matriz de polímero.

10 Las microesferas, como se desvelan en el presente documento, pueden oscilar en tamaño de aproximadamente 1-250  $\mu\text{m}$  tal como aproximadamente 10-240  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 20-230  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 40-210  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 50-200  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 60-190  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 70-180  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 80-170  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 90-160  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 100-150  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 110-140  $\mu\text{m}$ , o aproximadamente 120-130  $\mu\text{m}$ . Por ejemplo, las microesferas, como se desvelan en el presente documento, pueden ser de aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240 o 250  $\mu\text{m}$ .

15 Las microesferas, como se desvelan en el presente documento, pueden prepararse por cualquier método convencional en la materia, que incluye, pero no se limitan a, un método de secado por pulverización, un método de volatilización de disolvente o un método de extracción por pulverización.

20 Cuando las microesferas se preparan por el método de volatilización de disolvente, el compuesto, tal como rotigotina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, la PLGA y el ácido graso se disuelven primero en un disolvente orgánico para preparar una fase orgánica. Se prepara una fase acuosa continua a partir de materiales auxiliares de polímero farmacéuticos solubles en agua. La fase orgánica se inyecta entonces en la fase acuosa continua a través de un tubo pequeño para formar una mezcla, que se emulsiona bajo agitación mecánica vigorosa o agitación ultrasónica para formar microesferas. A continuación, el disolvente orgánico se evapora, y las microesferas resultantes se filtran y se secan. Si fuera necesario, las microesferas también pueden tratarse posteriormente por lavado, clasificación, etc., según un método convencional, secarse por secado a vacío o liofilizarse, y finalmente subenvasarse.

25 En los procesos anteriores, el disolvente orgánico puede ser aquel con volatilidad suficiente, bajo residuo y bajo punto de ebullición. Por ejemplo, el disolvente orgánico puede ser diclorometano, cloroformo, acetato de etilo, éter dietílico o cualquier combinación de los mismos. Los materiales auxiliares de polímero farmacéuticos solubles en agua usados para formar la fase acuosa continua pueden elegirse de, pero no se limitan a, poli(alcohol vinílico), carboximetilcelulosa de sodio, polivinilpirrolidina, polimetacrilato de sodio, poli(acrilato de sodio), y cualquier combinación de los mismos.

30 Las cantidades de compuesto, tales como rotigotina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, poli(lactida-co-glicolida) y ácido graso en el disolvente orgánico, no están particularmente limitadas, a condición de que puedan disolverse en el disolvente orgánico. Por ejemplo, la poli(lactida-co-glicolida) y el ácido graso pueden ser aproximadamente el 1-30 % (peso/volumen), tal como aproximadamente el 5-25 % (peso/volumen) o aproximadamente el 10-20 % (peso/volumen), en el disolvente orgánico.

35 Cuando la fase acuosa continua se prepara a partir de poli(alcohol vinílico), carboximetilcelulosa de sodio, polivinilpirrolidina, polimetacrilato de sodio, poli(acrilato de sodio), o cualquier combinación de los mismos, no hay límites especiales a la concentración de estos materiales auxiliares de polímero. Por ejemplo, la concentración de estos materiales auxiliares de polímero puede ser el 0,01-12,0 % (peso/volumen), tal como el 0,01-10,0 % (peso/volumen), tal como el 0,1-5 % (peso/volumen), en la fase acuosa basándose en su solubilidad en agua.

40 Cuando la fase orgánica se inyecta en la fase acuosa y se agita vigorosamente para formar las microesferas, la relación de volumen de la fase acuosa con respecto a la fase orgánica debe ser lo suficientemente grande como para dispersar suficientemente la fase orgánica en la fase acuosa para formar las microesferas con tamaño de partícula suficientemente pequeño y buena uniformidad. Pero si la cantidad de la fase acuosa es superior a la necesaria, el tratamiento posterior puede complicarse, aumentando así el coste. Por ejemplo, la relación de volumen de la fase orgánica con respecto a la fase acuosa puede ser aproximadamente 1:4 a 1:100, tal como aproximadamente 1:5, aproximadamente 1:10, aproximadamente 1:20, aproximadamente 1:30, aproximadamente 1:40, aproximadamente 1:50, aproximadamente 1:60, aproximadamente 1:70, aproximadamente 1:80, aproximadamente 1:90 o aproximadamente 1:100.

45 Las microesferas también pueden prepararse por un método de secado por pulverización. Por ejemplo, el compuesto, tal como la rotigotina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, la PLGA y otros excipientes se disuelven en un disolvente orgánico suficientemente para preparar una solución orgánica. La solución orgánica se filtra y se seca por un método de secado por pulverización convencional para formar microesferas. Si fuera necesario, las microesferas también pueden tratarse posteriormente lavando, clasificando, etc., según un método convencional y después subenvasarse.

50 Cuando las microesferas se preparan por el método de secado por pulverización anterior, el disolvente orgánico puede elegirse de, pero no se limita a, diclorometano, cloroformo, acetato de etilo, dioxano, éter dietílico, acetona, tetrahidrofurano, ácido acético glacial, y cualquier combinación de los mismos.

Cuando se prepara la fase orgánica, no hay límites especiales a la cantidad de PLGA en el disolvente orgánico, a condición de que la PLGA pueda disolverse en el disolvente orgánico. Por ejemplo, la concentración de PLGA puede ser aproximadamente el 1-30 % (peso/volumen), tal como aproximadamente el 5-25 % (peso/volumen) o aproximadamente el 10-20 % (peso/volumen).

- 5 Las microesferas también pueden prepararse por un método de extracción por pulverización. Cuando las microesferas se preparan por el método de extracción por pulverización, el compuesto, tal como la rotigotina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, la PLGA y otros excipientes se disuelven suficientemente en un disolvente orgánico A (en el que pueden disolverse el compuesto, tal como la rotigotina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, la PLGA y el ácido graso) para preparar una solución orgánica.
- 10 Entonces, la solución orgánica se pulveriza en agua o un disolvente orgánico B (en el que la rotigotina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, la PLGA y el ácido graso tienen solubilidad limitada) y se extraen para formar microesferas. Si fuera necesario, las microesferas también pueden tratarse posteriormente lavando, clasificando, etc., según método convencional, y entonces subenvasarse.

- 15 El disolvente orgánico A puede ser al menos uno elegido de diclorometano, cloroformo, acetato de etilo, dioxano, éter dietílico, acetona, tetrahidrofurano, benceno, tolueno y ácido acético glacial. El disolvente orgánico B puede ser al menos uno elegido de metanol, etanol, propanol, isopropanol, éter de petróleo, alcano y parafina líquida.

- No hay límites especiales a la cantidad de PLGA en el disolvente orgánico A, a condición de que la PLGA pueda disolverse en el disolvente orgánico A. Por ejemplo, la concentración de PLGA en el disolvente orgánico A puede ser aproximadamente del 1-30 % (peso/volumen), tal como aproximadamente del 5-25 % (peso/volumen) o
- 20 aproximadamente del 10-20 % (peso/volumen).

Con el fin de mejorar la uniformidad del tamaño de partícula de las microesferas formadas y por comodidad de manipulación, puede preferirse el método de secado por pulverización con respecto al método de volatilización de disolvente y el método de extracción por pulverización. Sin embargo, para reducir la liberación inicial, puede preferirse el método de volatilización de disolvente.

- 25 Después de la preparación, las microesferas pueden someterse a clasificación del tamaño de partícula, limpieza, secado y subenvasado según una dosificación predeterminada para preparar inyecciones en polvo. Si el tamaño de partícula es de uniformidad suficiente, puede eliminarse la etapa de clasificación del tamaño de partícula.

- La composición desvelada en el presente documento puede usarse en la preparación de inyecciones en polvo. Las inyecciones en polvo pueden convertirse en inyecciones *in situ* cuando estén en uso. Las inyecciones en polvo pueden prepararse directamente a partir de la composición, tal como en una forma de microesfera, como se desvela en el presente documento, y mezclarse uniformemente con un inyectable de carboximetilcelulosa de sodio antes de uso. Las inyecciones en polvo también pueden prepararse mezclando la composición, tal como en una forma de microesfera, como se desvela en el presente documento, con una cantidad apropiada de carboximetilcelulosa de sodio, manitol, glucosa, etc. Una cantidad apropiada de agua purificada puede añadirse a la misma antes de uso
- 30 para preparar un inyectable.
- 35

- La composición desvelada en el presente documento puede ser útil en un método para tratar una enfermedad asociada a receptores de dopamina y/o enfermedad de Parkinson que comprende administrar una cantidad eficaz de la composición como se desvela en el presente documento a un sujeto en necesidad de la misma. Por ejemplo, el método puede comprender administrar una composición que comprende rotigotina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma en una cantidad de aproximadamente el 20-35 % en peso con respecto al peso total de la composición, al menos un ácido graso en una cantidad de aproximadamente el 2,5-10 % en peso con respecto al peso total de la composición, y al menos una PLGA en una cantidad de aproximadamente el 55-77,5 % en peso con respecto a la cantidad total de la composición, en el que la composición está en una forma de microesferas. En otro ejemplo, el método puede comprender administrar una composición que comprende rotigotina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma en una cantidad de aproximadamente el 30 % en peso con respecto al peso total de la composición, al menos un ácido graso en una cantidad de aproximadamente el 2,5 % en peso con respecto al peso total de la composición, y al menos una PLGA, tal como una primera PLGA y una segunda PLGA, como se desvela en el presente documento, en una cantidad de aproximadamente el 67,5 % en peso con respecto a la cantidad total de la composición, en el que la composición está en una forma de microesferas.
- 40
- 45

- 50 La composición, como se desvela en el presente documento, puede administrarse parenteralmente a un sujeto en necesidad de la misma. Por ejemplo, la composición puede administrarse mediante inyección intramuscular, inyección subcutánea, inyección intradérmica, inyección intraperitoneal, etc. Para facilitar la administración, la composición como se desvela en el presente documento puede administrarse mediante inyección intramuscular o inyección subcutánea.

- 55 La composición, como se desvela en el presente documento, puede administrarse a intervalos de al menos aproximadamente dos semanas, tales como aproximadamente tres semanas, aproximadamente cuatro semanas, aproximadamente cinco semanas, etc.

**Breve descripción de los dibujos**

- La Fig. 1 es el diagrama de liberación *in vitro* de las microesferas (con una tasa de carga de fármaco teórica del 20 %) que comprende una única PLGA preparada en el Ejemplo 1, en el que  $\Delta$  representa la cantidad diariamente liberada y  $\blacksquare$  representa la cantidad liberada acumulada.
- 5 La Fig. 2 es el diagrama de liberación *in vitro* de las microesferas (con una tasa de carga de fármaco teórica del 25 %) que comprende una única PLGA preparada en el Ejemplo 2, en el que  $\Delta$  representa la cantidad diariamente liberada y  $\blacksquare$  representa la cantidad liberada acumulada.
- La Fig. 3 es el diagrama de liberación *in vitro* de las microesferas (con una tasa de carga de fármaco teórica del 30 %) que comprende una única PLGA preparada en el Ejemplo 3, en el que  $\Delta$  representa la cantidad diariamente liberada y  $\blacksquare$  representa la cantidad liberada acumulada.
- 10 La Fig. 4 es el diagrama de liberación *in vitro* de las microesferas (con una tasa de carga de fármaco teórica del 35 %) que comprende una única PLGA preparada en el Ejemplo 4, en el que  $\Delta$  representa la cantidad diariamente liberada y  $\blacksquare$  representa la cantidad liberada acumulada.
- La Fig. 5 es el diagrama de liberación *in vitro* de las microesferas (con una tasa de carga de fármaco teórica del 40 %) que comprende una única PLGA preparada en el Ejemplo 5, en el que  $\Delta$  representa la cantidad diariamente liberada y  $\blacksquare$  representa la cantidad liberada acumulada.
- 15 La Fig. 6 muestra las curvas de concentración *in vivo* de las microesferas preparadas en el Ejemplo 3 y Ejemplo 8, en el que  $\blacklozenge$  representa la curva de fármaco liberado-tiempo *in vivo* de las microesferas (PLGA 7525 4A) preparadas en el Ejemplo 3 y  $\blacktriangle$  representa la curva de fármaco liberado-tiempo *in vivo* de las microesferas (que contienen 2,5 % de ácido esteárico y PLGA 7525 4A) preparadas en el Ejemplo 8.
- 20 La Fig. 7 es el diagrama de liberación *in vitro* de las microesferas (con una tasa de carga de fármaco teórica del 20 %) que comprende una única PLGA y ácido esteárico preparadas en el Ejemplo 6, en el que  $\Delta$  representa la cantidad diariamente liberada y  $\blacksquare$  representa la cantidad liberada acumulada.
- La Fig. 8 es el diagrama de liberación *in vitro* de las microesferas (con una tasa de carga de fármaco teórica del 25 %) que comprende una única PLGA y ácido esteárico preparadas en el Ejemplo 7, en el que  $\Delta$  representa la cantidad diariamente liberada, y  $\blacksquare$  representa la cantidad liberada acumulada.
- 25 La Fig. 9 es el diagrama de liberación *in vitro* de las microesferas (con una tasa de carga de fármaco teórica del 30 %) que comprende una única PLGA y ácido esteárico preparadas en el Ejemplo 8, en el que  $\Delta$  representa la cantidad diariamente liberada y  $\blacksquare$  representa la cantidad liberada acumulada.
- 30 La Fig. 10 es el diagrama de liberación *in vitro* de las microesferas (con una tasa de carga de fármaco teórica del 35 %) que comprende una única PLGA y ácido esteárico preparadas en el Ejemplo 9, en el que  $\Delta$  representa la cantidad diariamente liberada y  $\blacksquare$  representa la cantidad liberada acumulada.
- La Fig. 11 es el diagrama de liberación *in vitro* de las microesferas (con una tasa de carga de fármaco teórica del 40 %) que comprende una única PLGA y ácido esteárico preparadas en el Ejemplo 10, en el que  $\Delta$  representa la cantidad diariamente liberada y  $\blacksquare$  representa la cantidad liberada acumulada.
- 35 La Fig. 12 es el diagrama de liberación *in vitro* de las microesferas que comprenden 2,5 % de ácido octanoico (C8) preparadas en el Ejemplo 11, en el que  $\Delta$  representa la cantidad diariamente liberada y  $\blacksquare$  representa la cantidad liberada acumulada.
- La Fig. 13 es el diagrama de liberación *in vitro* de las microesferas que comprenden 2,5 % de ácido lignocérico (C24) preparadas en el Ejemplo 12, en el que  $\Delta$  representa la cantidad diariamente liberada y  $\blacksquare$  representa la cantidad liberada acumulada.
- 40 La Fig. 14 es el diagrama de liberación *in vitro* de las microesferas que comprenden 0,5 % de ácido esteárico, preparadas en el Ejemplo 13, en el que  $\Delta$  representa la cantidad diariamente liberada y  $\blacksquare$  representa la cantidad liberada acumulada.
- 45 La Fig. 15 es el diagrama de liberación *in vitro* de las microesferas que comprenden 1 % de ácido esteárico, preparadas en el Ejemplo 14, en el que  $\Delta$  representa la cantidad diariamente liberada y  $\blacksquare$  representa la cantidad liberada acumulada.
- La Fig. 16 es el diagrama de liberación *in vitro* de las microesferas que comprenden 5 % de ácido esteárico, preparadas en el Ejemplo 15, en el que  $\Delta$  representa la cantidad diariamente liberada y  $\blacksquare$  representa la cantidad liberada acumulada.
- 50 La Fig. 17 es el diagrama de liberación *in vitro* de las microesferas que comprenden 10 % de ácido esteárico, preparadas en el Ejemplo 16, en el que  $\Delta$  representa la cantidad diariamente liberada y  $\blacksquare$  representa la cantidad liberada acumulada.
- La Fig. 18 es el diagrama de liberación *in vitro* de las microesferas que comprenden 15 % de ácido esteárico, preparadas en el Ejemplo 17, en el que  $\Delta$  representa la cantidad diariamente liberada y  $\blacksquare$  representa la cantidad liberada acumulada.
- 55 La Fig. 19 es el diagrama de la curva de fármaco-tiempo *in vivo* de las microesferas que comprenden PLGA 5050 2,5A.
- La Fig. 20 es el diagrama de liberación *in vitro* de las microesferas que comprenden dos PLGA con pesos moleculares diferentes (7525 4A: 5050 2,5A = 95:5) preparadas en el Ejemplo 18, en el que  $\Delta$  representa la cantidad diariamente liberada, y  $\blacksquare$  representa la cantidad liberada acumulada.
- 60 La Fig. 21 es el diagrama de liberación *in vitro* de las microesferas que comprenden dos PLGA con pesos moleculares diferentes (7525 4A: 5050 2,5A = 50:50) preparadas en el Ejemplo 19, en el que  $\Delta$  representa la cantidad diariamente liberada, y  $\blacksquare$  representa la cantidad liberada acumulada.
- 65 La Fig. 22 es el diagrama de liberación *in vitro* de las microesferas que comprenden dos PLGA con pesos

moleculares diferentes (7525 4A: 5050 2,5A = 5:95) preparadas en el Ejemplo 20, en el que  $\Delta$  representa la cantidad diariamente liberada, y  $\blacksquare$  representa la cantidad liberada acumulada.

La Fig. 23 es el diagrama de liberación *in vitro* de las microesferas que comprenden ácido esteárico (1 %) y dos PLGA con pesos moleculares diferentes (7525 4A: 5050 2,5A = 50:50) preparadas en el Ejemplo 21, en el que  $\Delta$  representa la cantidad diariamente liberada, y  $\blacksquare$  representa la cantidad liberada acumulada.

La Fig. 24 es el diagrama de liberación *in vitro* de las microesferas que comprenden ácido esteárico (2,5 %) y dos PLGA con pesos moleculares diferentes (7525 4A: 5050 2,5A = 50:50) preparadas en el Ejemplo 22, en el que  $\Delta$  representa la cantidad diariamente liberada, y  $\blacksquare$  representa la cantidad liberada acumulada.

La Fig. 25 es el diagrama de liberación *in vitro* de las microesferas que comprenden ácido esteárico (7,5 %) y dos PLGA con pesos moleculares diferentes (7525 4A: 5050 2,5A = 50:50) preparadas en el Ejemplo 23, en el que  $\Delta$  representa la cantidad diariamente liberada, y  $\blacksquare$  representa la cantidad liberada acumulada.

La Fig. 26 es el diagrama de liberación *in vitro* de las microesferas que comprenden ácido esteárico (10 %) y dos PLGA con pesos moleculares diferentes (7525 4A: 5050 2,5A = 50:50) preparadas en el Ejemplo 24, en el que  $\Delta$  representa la cantidad diariamente liberada, y  $\blacksquare$  representa la cantidad liberada acumulada.

La Fig. 27 es el diagrama de liberación *in vitro* de las microesferas que comprenden ácido octanoico (2,5 %) y dos PLGA con pesos moleculares diferentes (7525 4A: 5050 2,5A = 50:50) preparadas en el Ejemplo 25, en el que  $\Delta$  representa la cantidad diariamente liberada, y  $\blacksquare$  representa la cantidad liberada acumulada.

La Fig. 28 es el diagrama de liberación *in vitro* de las microesferas que comprenden ácido lignocérico (2,5 %) y dos PLGA con pesos moleculares diferentes (7525 4A: 5050 2,5A = 50:50) preparadas en el Ejemplo 26, en el que  $\Delta$  representa la cantidad diariamente liberada, y  $\blacksquare$  representa la cantidad liberada acumulada.

La Fig. 29 es el diagrama de liberación *in vitro* de las microesferas que comprenden ácido esteárico (2,5 %) y dos PLGA con pesos moleculares diferentes (7525 4A: 5050 2,5A = 95:5) preparadas en el Ejemplo 27, en el que  $\Delta$  representa la cantidad diariamente liberada, y  $\blacksquare$  representa la cantidad liberada acumulada.

La Fig. 30 es el diagrama de liberación *in vitro* de las microesferas que comprenden ácido esteárico (2,5 %) y dos PLGA con pesos moleculares diferentes (7525 4A: 5050 2,5A = 5:95) preparadas en el Ejemplo 28, en el que  $\Delta$  representa la cantidad diariamente liberada, y  $\blacksquare$  representa la cantidad liberada acumulada.

La Fig. 31 es el diagrama de la curva de fármaco-tiempo *in vivo* de las microesferas que comprenden ácido esteárico (2,5 %) y dos PLGA con pesos moleculares diferentes en relaciones de peso diferentes, en el que  $\blacklozenge$  representa el diagrama de la curva de fármaco-tiempo *in vivo* de las microesferas (7525 4A: 5050 2,5A = 50:50) (2,5 % de ácido esteárico),  $\blacktriangle$  representa el diagrama de la curva de fármaco-tiempo *in vivo* de las microesferas (7525 4A: 5050 2,5A = 70:30) (2,5 % de ácido esteárico),  $-$  representa el diagrama de la curva de fármaco-tiempo *in vivo* de las microesferas (7525 4A: 5050 2,5A = 80:20) (2,5 % de ácido esteárico), y  $\blacksquare$  representa el diagrama de la curva de fármaco-tiempo *in vivo* de las microesferas (7525 4A: 5050 2,5A = 90:10) (2,5 % de ácido esteárico).

La Fig. 32 es el diagrama de correlación *in vitro-in vivo* de las microesferas de rotigotina preparadas en el Ejemplo 22.

La Fig. 33 es el diagrama de liberación *in vitro* de 5 lotes de microesferas preparadas en el Ejemplo 3.

La Fig. 34 es el diagrama de liberación *in vitro* de 5 lotes de microesferas preparadas en el Ejemplo 8.

La Fig. 35 es el diagrama de liberación *in vitro* de 5 lotes de microesferas preparadas en el Ejemplo 14.

La Fig. 36 es el diagrama de liberación *in vitro* de 5 lotes de microesferas preparadas en el Ejemplo 16.

La Fig. 37 es el diagrama de liberación *in vitro* de 5 lotes de microesferas preparadas en el Ejemplo 11.

La Fig. 38 es el diagrama de liberación *in vitro* de 5 lotes de microesferas preparadas en el Ejemplo 12.

## Ejemplos

La presente divulgación se ilustra adicionalmente con los siguientes ejemplos no limitantes.

### 45 Ejemplo 1 Microesferas que comprenden una única PLGA (con una tasa de carga de fármaco teórica del 20 %) (Ejemplo de referencia)

Se pesaron 0,3104 g de rotigotina y 1,2083 g de PLGA 7525 4A y se disolvieron en 7,5 ml de diclorometano con agitación para preparar una mezcla. La mezcla se añadió a 750 ml de solución acuosa al 0,5 % de PVA por una bomba peristáltica (100 rpm) con agitación (1200-2000 rpm), que se emulsionó durante 2 min. Entonces, la velocidad de agitación se redujo y el disolvente se evaporó durante 5 h. La solución obtenida se filtró con tamiz de 1200 de malla para recoger las microesferas. Las microesferas retenidas sobre el tamiz de 1200 de malla se lavaron con agua purificada durante 3-5 veces, se liofilizaron y se filtraron con tamiz de 100 de malla para preparar las microesferas finales.

### 55 Ejemplo 2 Microesferas que comprenden una única PLGA (con una tasa de carga de fármaco teórica del 25 %) (Ejemplo de referencia)

Las microesferas de rotigotina se prepararon a partir de 0,3752 g de rotigotina y 1,1291 g de PLGA 7525 4A según el método del EJEMPLO 1.

**Ejemplo 3 Microesferas que comprenden una única PLGA (con una tasa de carga de fármaco teórica del 30 %) (Ejemplo de referencia)**

Las microesferas de rotigotina se prepararon a partir de 0,4522 g de rotigotina y 1,0511 g de PLGA 7525 4A según el método del EJEMPLO 1.

5 **Ejemplo 4 Microesferas que comprenden una única PLGA (con una tasa de carga de fármaco teórica del 35 %) (Ejemplo de referencia)**

Las microesferas de rotigotina se prepararon a partir de 0,5268 g de rotigotina y 0,9790 g de PLGA 7525 4A según el método del EJEMPLO 1.

10 **Ejemplo 5 Microesferas que comprenden una única PLGA (con una tasa de carga de fármaco teórica del 40 %) (Ejemplo de referencia)**

Las microesferas de rotigotina se prepararon a partir de 0,6043 g de rotigotina y 0,9019 g de PLGA 7525 4A según el método del EJEMPLO 1.

**Ejemplo 1 de prueba**

15 Las pruebas de liberación *in vitro* se llevaron a cabo para las microesferas preparadas en los EJEMPLOS 1-5 simulando la condición *in vivo*.

**Condición de prueba: temperatura: 37±0,5 °C, velocidad de rotación: 50 rpm**

20 **Condición cromatográfica y protocolo de idoneidad del sistema:** Se usó sílice unida a estearilo como carga. Se usaron 0,3 % de ácido fosfórico-acetonitrilo (66:34) como fase móvil, en la que se preparó 0,3 % de ácido fosfórico diluyendo 3 ml de ácido fosfórico con agua hasta el volumen final de 1000 ml. La temperatura de la columna fue 35 °C. La longitud de onda de detección fue 223 nm. La resolución entre el pico de rotigotina y los otros picos debe cumplir los requisitos. El número de platos teórico calculados por el pico de rotigotina fue superior a 10000.

25 Método de prueba: Ensayos según la prueba de liberación de fármaco (Farmacopea China 2005, vol. II, Apéndice X D). Se dispusieron 3 alícuotas de 6 mg de las microesferas en un tubo de centrifuga con un tapón (10 ml), respectivamente. Al tubo de centrifuga se añadieron 9 ml de un medio de liberación de tampón fosfato que contenía 0,2 % de SDS. Después de agitar hasta la suspensión, cada tubo de centrifuga se dispuso en un agitador de baño de agua a 37±0,5 °C y se vibró a una velocidad de 50±3 rpm. Después de 3 h, 1 d, 2 d, 4 d, 6 d, 8 d, 10 d, 12 d, 14 d, 16 d, 18 d y 20 d, respectivamente, los tubos de centrifuga se sacaron. A 5-8 °C, los tubos de centrifuga se centrifugaron a una velocidad de rotación de 3600 rpm durante 10 min. Entonces se tomaron 6 ml de sobrenadante de cada tubo de centrifuga y se usaron como solución de prueba, y se añadieron 6,0 ml de un medio de liberación de tampón fosfato a la misma temperatura al tubo de centrifuga. Después de agitar hasta la suspensión, el tubo de centrifuga se colocó de nuevo en un agitador de baño de agua y se vibró. La solución de prueba anterior se analizó por HPLC, y la cantidad liberada acumulada se calculó según el método convencional externo. Bajo pH 7,4, los datos de liberación *in vitro* se muestran en la Tabla 1, y las curvas de liberación *in vitro* se muestran en las Figs. 1-5.

30

Tabla 1. Los resultados de diferentes tasas de carga de fármaco teóricas

Tasa de carga de fármaco	20 %		25 %		30 %		35 %		40 %	
	Cantidad liberada acumulada (%)	Cantidad diariamente liberada (%)	Cantidad liberada acumulada (%)	Cantidad diariamente liberada (%)	Cantidad liberada acumulada (%)	Cantidad diariamente liberada (%)	Cantidad liberada acumulada (%)	Cantidad diariamente liberada (%)	Cantidad liberada acumulada (%)	Cantidad diariamente liberada (%)
0,125	1,33	1,33	1,63	1,63	2,00	2,00	3,24	3,24	4,97	4,97
1	5,24	5,24	7,19	7,19	9,53	9,53	13,65	13,65	20,45	20,45
2	8,87	3,63	10,18	2,99	13,53	4,00	18,47	4,82	31,14	10,69
4	23,61	7,37	19,55	4,69	22,90	4,68	27,1	4,32	42,30	5,58
6	40,39	8,39	35,48	7,97	40,65	8,88	37,44	5,17	62,32	10,01
8	65,91	12,76	61,06	12,79	63,87	11,61	53,3	7,93	77,80	7,74
10	86,91	10,50	80,66	9,80	75,85	5,99	67,32	7,01	86,18	4,19
12	91,18	2,14	90,72	5,03	86,74	5,44	80,8	6,74	90,86	2,34
14	95,63	2,22	97,85	3,57	94,75	4,01	86,18	2,69	93,79	1,47
16	96,22	0,30	97,99	0,07	98,74	2,00	92,86	3,34	94,56	0,38
18							96,79	1,97		

Las cantidades liberadas de rotigotina en 0,125 días y 1 día se correlacionaron con la liberación rápida del fármaco *in vivo*. Cuanto mayor es la cantidad de liberación *in vitro*, mayor es la liberación rápida *in vivo*.

5 Puede observarse de la Tabla 1 y las Figs. 1-5 que, con la tasa de carga de fármaco de las microesferas aumentada del 20 % al 40 %, la cantidad liberada de rotigotina en 0,125 días aumentó del 1,33 % al 4,97 %, y la cantidad liberada acumulada de rotigotina dentro de 1 día aumentó del 5,24 % al 20,45 %. Es decir, la liberación de fármaco de las microesferas en los momentos de tiempo de 0,125 días y 1 día aumentó significativamente. Puede observarse de la Tabla 1 que, al aumentar la tasa de carga de fármaco, puede aumentarse la liberación rápida de las microesferas de rotigotina *in vivo*.

### Ejemplo 2 de prueba La prueba de liberación *in vivo* de las microesferas de rotigotina

10 Muestra: las microesferas preparadas en el EJEMPLO 3

Tratamiento de la muestra de plasma: Se agitaron 100 µl de una solución de patrón interno (500 ng/ml de diazepam), 100 µl de acetonitrilo : agua (75:25) y 100 µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M durante 2 min usando un agitador con vórtex. Se añadieron 3 ml de reactivo de extracción (n-hexano:diclorometano:isopropanol = 2:1:0,1) a la mezcla, se agitaron durante 10 min usando un agitador con vórtex y se centrifugaron durante 10 min (3600 rmin<sup>-1</sup>). La fase orgánica de la capa superior se puso en otro tubo de ensayo y se secó bajo una corriente de aire comprimido a 15 35 °C. El residuo se disolvió en 100 µl de acetonitrilo : agua (acetato de amonio 1 mM) (75:25). Se tomaron 101 µl de la solución como inyección de muestra, y se registraron los cromatogramas.

Condición cromatográfica: Fase móvil (A): (NH<sub>4</sub>Ac 1 mM) agua (B): acetonitrilo; eluir en gradiente durante 0-0,8 min: B 70~90 %, 0,8~3,5 min: B 90~90 %, 3,5~3,6 min: B 90~70 %, 3,6~7,5 min: B 70~70 %; caudal: 0,35 ml/min; temperatura de la columna: 35 °C; tamaño de muestra: 10 µl.

Condición del espectro de masas

Fuente de iones: Fuente de ionización por pulverización de iones; voltaje de pulverización de iones: 5500 V; temperatura: 500 °C; GS1: 50 psi; GS2: 50 psi; la presión del gas de cortina (CUR) en la fuente: 15 psi; la presión del gas de colisión (CAD): 8 psi; modo de detección de cationes; modo de barrido: monitorización de múltiples reacciones (MRM); el voltaje de DP de rotigotina y diazepam son por separado 50 V y 88 V; CE son por separado 36 V y 47 V; CXP son ambos 10 V; la reacción iónica para el análisis cuantitativo son por separado 316,2/147,1 (rotigotina) y 256,1/167,1 (diazepam).

Creación de la curva de trabajo

Se añadieron 0,2 ml de plasma de blanco a 100 µl de solución patrón de rotigotina y 100 µl de patrón interno (500 ng/ml de diazepam) para preparar muestras de plasma correspondientes a las concentraciones plasmáticas de 0,05, 0,25, 1,00, 2,50, 1,00, 2,50, 5,00 y 12,5 ng/ml, respectivamente. Las muestras de plasma se operaron según "el método de análisis de la muestra de plasma" en la Farmacopea China 2005, vol. II para crear curvas patrón. Usando la concentración de la sustancia que va a examinarse en el plasma como el eje x y usando la relación de área del pico de la sustancia que va a examinarse con respecto a la sustancia de patrón interno como eje y, se creó el cálculo de regresión en las curvas patrón según el método de mínimos cuadrados ponderado ( $W = 1/x^2$ ) para obtener la ecuación de regresión lineal como curva patrón.

Método de prueba

3 perros Beagle sanos, una hembra y dos machos, con un peso corporal de 9-11 kg, se alimentaron con comida y agua potable a voluntad. Las microesferas con una dosis de 5,5 mg/kg de rotigotina se administraron mediante inyección mediante el músculo de los Beagles, y después de la administración a 0 h, 1 h, 3 h, 6 h, 24 h, 48 h, 96 h, 144 h, 192 h, 240 h, 288 h, 336 h, 384 h, 432 h, y 480 h, se muestrearon 3 ml de sangre mediante la vena de la extremidad anterior de los Beagles, se dispuso en un tubo de ensayo heparinizado, se centrifugó durante 10 min a 6000 rpm, separando el plasma, y se guardó a -20 °C. El plasma se analizó según el método analítico anterior, y la liberación *in vivo* se muestra en la Fig. 6. Como se indica en la Tabla 1, la cantidad liberada acumulada de las microesferas preparadas en el EJEMPLO 3 dentro de 0,125 días y 1 día fue del 2,00 % y 9,53 % respectivamente. Puede observarse de la Fig. 6 que hubo una evidente liberación rápida de las microesferas en el cuerpo de los Beagles, entonces el nivel de fármaco en sangre disminuyó; después de 96 h, el nivel de fármaco en sangre aumentó, y después de 192 h, el nivel de fármaco en sangre aumentó a C<sub>máx</sub>. Los niveles de fármaco en sangre a los 0,125 días y 1 día fueron superiores a C<sub>máx</sub>, que indica que hubo una evidente liberación rápida de las microesferas preparadas en el EJEMPLO 3.

### Ejemplo 6 Microesferas que comprenden una única PLGA y ácido esteárico (con una tasa de carga de fármaco teórica del 20 %) (Ejemplo de referencia)

Las microesferas de rotigotina se prepararon a partir de 0,3104 g de rotigotina, 1,1603 g de PLGA 7525 4A y 0,0370 g de ácido esteárico según el método del EJEMPLO 1.

**Ejemplo 7 Microesferas que comprenden una única PLGA y ácido esteárico (con una tasa de carga de fármaco teórica del 25 %)**

Las microesferas de rotigotina se prepararon a partir de 0,3712 g de rotigotina, 1,0891 g de PLGA 7525 4A y 0,0379 g de ácido esteárico según el método del EJEMPLO 1.

5 **Ejemplo 8 Microesferas que comprenden una única PLGA y ácido esteárico (con una tasa de carga de fármaco teórica del 30 %)**

Las microesferas de rotigotina se prepararon a partir de 0,4522 g de rotigotina, 1,0136 g de PLGA 7525 4A y 0,0371 g de ácido esteárico según el método del EJEMPLO 1.

10 **Ejemplo 9 Microesferas que comprenden una única PLGA y ácido esteárico (con una tasa de carga de fármaco teórica del 35 %)**

Las microesferas de rotigotina se prepararon a partir de 0,5258 g de rotigotina, 0,9790 g de PLGA 7525 4A y 0,0374 g de ácido esteárico según el método del EJEMPLO 1.

**Ejemplo 10 Microesferas que comprenden una única PLGA y ácido esteárico (con una tasa de carga de fármaco teórica del 40 %)**

15 Las microesferas de rotigotina se prepararon a partir de 0,6083 g de rotigotina, 0,8619 g de PLGA 7525 4A y 0,0367 g de ácido esteárico según el método del EJEMPLO 1.

**Ejemplo 3 de prueba**

20 Las pruebas de liberación *in vitro* se llevaron a cabo para las microesferas preparadas en los EJEMPLOS 6-10 según el método del EJEMPLO 1 de prueba. Los datos de liberación *in vitro* se muestran en la Tabla 2, y las curvas de liberación *in vitro* se muestran en las Figs. 7-11.

Tabla 2. Los resultados de ensayo de diferentes tasas de carga de fármaco teóricas que contienen ácido esteárico

Tasa de carga de fármaco	20 % (Ácido esteárico 2,5 %)		25 % (Ácido esteárico 2,5 %)		30 % (Ácido esteárico 2,5 %)		35 % (Ácido esteárico 2,5 %)		40 % (Ácido esteárico 2,5 %)	
	Cantidad liberada acumulada (%)	Cantidad diariamente liberada (%)	Cantidad liberada acumulada (%)	Cantidad diariamente liberada (%)	Cantidad liberada acumulada (%)	Cantidad diariamente liberada (%)	Cantidad liberada acumulada (%)	Cantidad diariamente liberada (%)	Cantidad liberada acumulada (%)	Cantidad diariamente liberada (%)
0,125	0,51	0,51	0,64	0,64	0,84	0,84	2,24	2,24	3,58	3,58
1	2,84	2,84	3,19	3,19	3,35	3,35	6,27	6,27	10,29	10,29
2	5,77	2,93	6,24	3,05	6,64	3,28	10,49	4,22	25,14	14,85
4	17,02	5,63	14,34	4,05	16,12	4,74	20,12	4,82	39,27	7,07
6	35,39	9,19	30,99	8,33	31,00	7,44	33,44	6,66	55,68	8,21
8	60,97	12,79	53,52	11,27	58,82	13,91	53,3	10	72,89	8,61
10	81,24	10,14	75,23	10,86	74,63	7,91	67,32	7,01	82,34	4,73
12	89,75	4,26	86,24	5,51	85,60	5,48	82,68	7,68	89,51	3,59
14	92,45	1,35	90,95	2,36	92,50	3,45	88,53	2,93	92,97	1,73
16	95,29	1,42	94,64	1,85	96,63	2,06	92,49	1,98	95,26	1,15
18	97,65	1,18			98,20	0,79	95,28	1,40	96,34	0,54

Los datos en la Tabla 2 se compararon con los datos en la Tabla 1. Con ácido esteárico, para las microesferas de rotigotina que tienen tasas de carga de fármaco del 20 %-40 %, la cantidad liberada de rotigotina en 0,125 días se redujo del 1,33 %-4,97 % al 0,51 %-3,58 %, y la cantidad liberada acumulada de rotigotina dentro de 1 día se redujo del 5,24 %-20,45 % al 2,84 %-10,29 %. Esto indica que la adición de ácido esteárico puede reducir eficazmente el efecto de liberación rápida.

5

**Ejemplo 4 de prueba Prueba de liberación *in vivo* de microesferas de rotigotina**

Muestra: las microesferas preparadas en el EJEMPLO 8

Las pruebas farmacocinéticas *in vivo* se llevaron a cabo según el método del EJEMPLO 2 de prueba. La liberación se muestra en la Fig. 6. Puede observarse de la Fig. 6 que, después de añadir ácido esteárico, el efecto de liberación rápida se redujo, sin embargo, las cantidades de liberación de fármaco en 1-4 días fueron bajas.

10

**Ejemplo 11 Microesferas que comprenden ácido octanoico y una única PLGA**

Las microesferas de rotigotina se prepararon a partir de 0,4520 g de rotigotina, 1,0119 g de PLGA 7525 4A y 0,0371 g de ácido octanoico (2,5 %) según el método del EJEMPLO 1.

**Ejemplo 12**

15

**Microesferas que comprenden Ácido lignocérico y una única PLGA**

Las microesferas de rotigotina se prepararon a partir de 0,4489 g de rotigotina, 1,0130 g de PLGA 7525 4A y 0,0373 g de ácido lignocérico (2,5 %) según el método del EJEMPLO 1.

**Ejemplo 5 de prueba Influencia de ácidos grasos que tienen diferentes números de átomos de carbono sobre la liberación de fármaco de las microesferas de rotigotina**

20

Las pruebas de liberación *in vitro* se llevaron a cabo para las microesferas preparadas en los EJEMPLOS 11-12 según el método del EJEMPLO 1 de prueba. Los datos de liberación *in vitro* se muestran en la Tabla 3, y las curvas de liberación *in vitro* se muestran en las Figs. 12-13.

Tabla 3. Los resultados de las microesferas de rotigotina que comprenden ácidos grasos que tienen diferentes números de átomos de carbono

Tiempo (día)	7525 4A 2,5 % de ácido octanoico (C8)		7525 4A 2,5 % de ácido lignocérico (C24)	
	Cantidad liberada acumulada (%)	Cantidad diariamente liberada (%)	Cantidad liberada acumulada (%)	Cantidad diariamente liberada (%)
0,125	1,01	1,01	1,14	1,14
1	2,84	2,84	4,02	4,02
2	4,35	1,51	6,25	2,23
4	11,91	3,78	13,23	3,49
6	32,64	10,36	27,50	7,14
8	59,65	13,51	52,89	12,70
10	71,05	5,70	74,47	10,79
12	86,32	7,64	90,87	8,20
14	92,34	3,01	94,66	1,90
16	94,65	1,16	96,48	0,91
18	96,58	0,96	99,82	1,67

25

Los datos en la Tabla 3 se compararon con los datos en la Tabla 1 (con una tasa de carga de fármaco del 30 %). En comparación con microesferas de rotigotina sin ácidos grasos, para las microesferas de rotigotina con ácido octanoico (8 átomos de carbono) y ácido lignocérico (24 átomos de carbono), la cantidad liberada de rotigotina en 0,125 días se redujo del 2,00 % al 1,01 %-1,14 %, y la cantidad liberada acumulada de rotigotina dentro de 1 día se redujo del 9,53 % al 2,84 %-4,02 %. Esto indica que la adición de tanto ácido octanoico como ácido lignocérico

30

puede reducir eficazmente el efecto de liberación rápida. Puede observarse de los resultados en la Tabla 2 (ácido esteárico que tiene 18 átomos de carbono) y la Tabla 3 que todos los ácidos grasos que tienen 8-24 átomos de carbono puede reducir eficazmente el efecto de liberación rápida.

5 **Ejemplo 13 Microesferas que comprenden una única PLGA y 0,5 % de ácido esteárico (Ejemplo de referencia)**

Las microesferas de rotigotina se prepararon a partir de 0,4528 g de rotigotina, 1,0432 g de PLGA 7525 4A y 0,0078 g de ácido esteárico (0,5 %) según el método del EJEMPLO 1.

**Ejemplo 14 Microesferas que comprenden una única PLGA y 1 % de ácido esteárico (Ejemplo de referencia)**

10 Las microesferas de rotigotina se prepararon a partir de 0,4528 g de rotigotina, 1,0362 g de PLGA 7525 4A y 0,0158 g de ácido esteárico (1 %) según el método del EJEMPLO 1.

**Ejemplo 15 Microesferas que comprenden una única PLGA y 5 % de ácido esteárico**

Las microesferas de rotigotina se prepararon a partir de 0,4528 g de rotigotina, 0,9751 g de PLGA 7525 4A y 0,0758 g de ácido esteárico (5 %) según el método del EJEMPLO 1.

**Ejemplo 16 Microesferas que comprenden una única PLGA y 10 % de ácido esteárico (Ejemplo de referencia)**

15 Las microesferas de rotigotina se prepararon a partir de 0,4492 g de rotigotina, 0,9028 g de PLGA 7525 4A y 0,1532 g de ácido esteárico (10 %) según el método del EJEMPLO 1.

**Ejemplo 17 Microesferas que comprenden una única PLGA y 15 % de ácido esteárico (Ejemplo de referencia)**

Las microesferas de rotigotina se prepararon a partir de 0,4528 g de rotigotina, 0,8261 g de PLGA 7525 4A y 0,2258 g de ácido esteárico (15 %) según el método del EJEMPLO 1.

20 **Ejemplo 6 de prueba**

Las pruebas de liberación *in vitro* se llevaron a cabo para las microesferas preparadas en los EJEMPLOS 13-17 según el método del EJEMPLO 1 de prueba.

Los resultados de liberación *in vitro* se muestran en la Tabla 4 y las Figs. 14-18.

Tabla 4. Los resultados de las microesferas de rotigotina que comprenden diferentes contenidos de ácido esteárico

Tiempo (día)	0,5 % de ácido esteárico		1 % de ácido esteárico		5 % de ácido esteárico		10 % de ácido esteárico		15 % de ácido esteárico	
	Cantidad liberada acumulada (%)	Cantidad diariamente liberada (%)	Cantidad liberada acumulada (%)	Cantidad diariamente liberada (%)	Cantidad liberada acumulada (%)	Cantidad diariamente liberada (%)	Cantidad liberada acumulada (%)	Cantidad diariamente liberada (%)	Cantidad liberada acumulada (%)	Cantidad diariamente liberada (%)
0,125	1,91	1,91	1,20	1,20	0,75	0,75	1,16	1,16	1,26	1,26
1	10,96	10,96	5,70	5,70	3,02	3,02	2,25	2,25	1,90	1,90
2	15,39	4,43	12,41	6,72	5,14	2,12	2,89	0,64	2,51	0,60
4	30,08	7,34	25,28	6,43	13,06	3,96	7,52	2,32	3,85	0,67
6	42,41	6,16	35,45	5,09	30,47	8,70	22,02	7,25	5,94	1,04
8	62,09	9,84	59,46	12,00	53,68	11,61	30,15	4,06	10,58	2,32
10	74,55	6,23	76,06	8,30	70,96	8,64	53,79	11,82	23,07	6,24
12	86,67	6,06	89,89	6,91	88,44	8,74	68,48	7,34	45,68	11,30
14	92,35	2,84	93,96	2,04	93,18	2,37	78,77	5,15	67,12	10,72
16	97,43	2,54	96,42	1,23	96,51	1,67	88,89	5,06	79,97	6,42
18			98,73	1,16			90,88	0,99	87,42	3,73
20							92,91	1,02	90,38	1,48

5 Puede observarse comparando los datos en la Tabla 4 con los datos en la Tabla 1 que, cuando el contenido de ácido esteárico era del 0,5 %, la cantidad liberada de rotigotina en 0,125 días y la cantidad liberada acumulada de rotigotina dentro de 1 día fueron del 1,91 % y 10,96 % respectivamente, y no cambiaron significativamente en comparación con las microesferas sin ácido esteárico preparadas en el EJEMPLO 3. Esto indica que la adición de ácido esteárico con un contenido inferior o igual al 0,5 % puede no reducir significativamente el efecto de liberación rápida. Cuando el contenido de ácido esteárico fue superior al 0,5 %, por ejemplo, 1-15 %, la cantidad liberada de rotigotina en 0,125 días y la cantidad liberada acumulada de rotigotina dentro de 1 día para las microesferas que comprenden 1 al 15 % de ácido esteárico se redujeron al 0,75 %-1,26 % y 1,90 %-5,70 %, respectivamente, así se redujo eficazmente la liberación rápida del fármaco. Como se indica en los datos en la Tabla 4 y las Figs. 14-18, al aumentar la cantidad de ácido esteárico, se ralentizó la liberación del fármaco.

**Ejemplo 7 de prueba Prueba *in vivo* de las microesferas que comprenden PLGA 5050 2,5A**

La prueba *in vivo* se llevó a cabo para las microesferas preparadas en el EJEMPLO 3 que comprenden PLGA 5050 2,5A en lugar de PLGA 7525 4A según el método del EJEMPLO 2 de prueba, siendo todas las otras cosas iguales o manteniéndose constantes. Los resultados se muestran en la Fig. 19.

15 Puede observarse de la Fig. 19 que, en el periodo de liberación anterior, la velocidad de liberación de las microesferas de PLGA 5050 2,5A fue mayor y el periodo de liberación completa fue más corto.

**Ejemplo 18 Microesferas de rotigotina que comprenden una combinación de dos PLGA con pesos moleculares diferentes (95:5)**

20 Las microesferas de rotigotina se prepararon a partir de 0,4504 g de rotigotina, y una combinación de 0,9973 g de PLGA 7525 4A y 0,0521 g de PLGA 5050 2,5A (con una relación de peso de 95:5) según el método del EJEMPLO 1.

**Ejemplo 19 Microesferas de rotigotina que comprenden una combinación de dos PLGA con pesos moleculares diferentes (50:50) (Ejemplo de referencia)**

25 Las microesferas de rotigotina se prepararon a partir de 0,4489 g de rotigotina, y una combinación de 0,5261 g de PLGA 7525 4A y 0,5256 g de PLGA 5050 2,5A (con una relación de peso de 50:50) según el método del EJEMPLO 1.

**Ejemplo 20 Microesferas de rotigotina que comprenden una combinación de dos PLGA con pesos moleculares diferentes (5:95) (Ejemplo de referencia)**

Las microesferas de rotigotina se prepararon a partir de 0,4508 g de rotigotina, y una combinación de 0,0519 g de PLGA 7525 4A y 0,9968 g de PLGA 5050 2,5A (con una relación de peso de 5:95) según el método del EJEMPLO 1.

30 **Ejemplo 8 de prueba Influencia de las combinaciones de polímero con relaciones de peso diferentes sobre la liberación de fármaco de las microesferas**

Las pruebas de liberación *in vitro* se llevaron a cabo para las microesferas preparadas en los EJEMPLOS 18-20 según el método del EJEMPLO 1 de prueba. Los resultados de liberación *in vitro* se muestran en la Tabla 5 y las Figs. 20-22.

35 Tabla 5. Los datos de liberación *in vitro* de las microesferas preparadas a partir de una combinación de dos PLGA con pesos moleculares diferentes

Tiempo (día)	PLGA 7525 4A: PLGA 5050 2,5A=95:5		PLGA 7525 4A: PLGA 5050 2,5A=50:50		PLGA 7525 4A: PLGA 5050 2,5A=5:95	
	Cantidad liberada acumulada (%)	Cantidad diariamente liberada (%)	Cantidad liberada acumulada (%)	Cantidad diariamente liberada (%)	Cantidad liberada acumulada (%)	Cantidad diariamente liberada (%)
0,125	2,22	2,22	2,58	2,58	2,90	2,90
1	9,10	9,10	12,32	12,32	16,12	16,12
2	15,72	6,62	23,86	11,54	29,13	13,02
4	29,36	6,82	45,44	10,79	53,34	12,11
6	52,30	11,47	63,26	8,91	73,25	9,95
8	64,32	6,01	74,28	5,51	89,49	8,12

(continuación)

Tiempo (día)	PLGA 7525 4A: PLGA 5050 2,5A=95:5		PLGA 7525 4A: PLGA 5050 2,5A=50:50		PLGA 7525 4A: PLGA 5050 2,5A=5:95	
	Cantidad liberada acumulada (%)	Cantidad diariamente liberada (%)	Cantidad liberada acumulada (%)	Cantidad diariamente liberada (%)	Cantidad liberada acumulada (%)	Cantidad diariamente liberada (%)
10	75,29	5,49	82,98	4,35	95,26	2,89
12	86,16	5,44	91,44	4,23	97,31	1,02
14	92,51	3,17	97,26	2,91	99,30	0,99
16	95,96	1,73	99,23	0,99		
18	98,29	1,16				

5 Puede observarse de la Tabla 5 y las Figs. 20-22 que, cuando el contenido de PLGA 5050 2,5A en las microesferas aumentó del 5 % al 95 %, las cantidades liberadas de rotigotina en 1-4 días aumentaron, en la que la cantidad liberada acumulada de rotigotina dentro de 1 día aumentó del 9,10 % al 16,12 % y la cantidad liberada acumulada de rotigotina en 4 días aumentó del 29,36 % al 53,34 %. Cuando la relación de peso de PLGA 7525 4A con respecto a PLGA 5050 2,5A en las microesferas fue 50:50, en comparación con los datos del EJEMPLO 3 en la Tabla 1, las cantidades liberadas de rotigotina en 1-4 días aumentaron con un periodo de liberación estable, en la que la cantidad liberada acumulada de rotigotina dentro de 1 día aumentó del 9,53 % al 12,32 % y la cantidad liberada acumulada de rotigotina en 4 días aumentó del 22,90 % al 45,44 %.

**Ejemplo 21 Microesferas de rotigotina que comprenden ácido esteárico (1 %) y una combinación de dos PLGA con pesos moleculares diferentes (50:50) (Ejemplo de referencia)**

15 Las microesferas de rotigotina se prepararon a partir de 0,4507 g de rotigotina, una combinación de 0,5170 g de PLGA 7525 4A y 0,5177 g de PLGA 5050 2,5A (con una relación de peso de 50:50), y 0,0155 g de ácido esteárico (1 %) según el método del EJEMPLO 1.

**Ejemplo 22 Microesferas que comprenden ácido esteárico (2,5 %) y una combinación de dos PLGA con pesos moleculares diferentes (50:50)**

20 Las microesferas de rotigotina se prepararon a partir de 0,4491 g de rotigotina, una combinación de 0,5060 g de PLGA 7525 4A y 0,5055 g de PLGA 5050 2,5A (con una relación de peso de 50:50), y 0,0371 g de ácido esteárico (2,5 %) según el método del EJEMPLO 1.

**Ejemplo 23 Microesferas que comprenden ácido esteárico (7,5 %) y una combinación de dos PLGA con pesos moleculares diferentes (50:50)**

25 Las microesferas de rotigotina se prepararon a partir de 0,4510 g de rotigotina, una combinación de 0,4680 g de PLGA 7525 4A y 0,4701 g de PLGA 5050 2,5A (con una relación de peso de 50:50), y 0,1119 g de ácido esteárico (7,5 %) según el método del EJEMPLO 1.

**Ejemplo 24 Microesferas que comprenden ácido esteárico (10 %) y una combinación de dos PLGA con pesos moleculares diferentes (50:50) (Ejemplo de referencia)**

30 Las microesferas de rotigotina se prepararon a partir de 0,4503 g de rotigotina, una combinación de 0,4479 g de PLGA 7525 4A y 0,4501 g de PLGA 5050 2,5A (con una relación de peso de 50:50), y 0,1520 g de ácido esteárico (10 %) según el método del EJEMPLO 1.

**Ejemplo 25 Microesferas que comprenden ácido octanoico (2,5 %) y una combinación de dos PLGA con pesos moleculares diferentes (50:50)**

35 Las microesferas de rotigotina se prepararon a partir de 0,4490 g de rotigotina, una combinación de 0,5101 g de PLGA 7525 4A y 0,5091 g de PLGA 5050 2,5A (con una relación de peso de 50:50), y 0,0380 g de ácido octanoico (2,5 %) según el método del EJEMPLO 1.

**Ejemplo 26 Microesferas que comprenden ácido lignocérico (2,5 %) y una combinación de dos PLGA con pesos moleculares diferentes (50:50)**

5 Las microesferas de rotigotina se prepararon a partir de 0,4520 g de rotigotina, una combinación de 0,5055 g de PLGA 7525 4A y 0,5062 g de PLGA 5050 2,5A (con una relación de peso de 50:50), y 0,0379 g de ácido lignocérico (2,5 %) según el método del EJEMPLO 1.

**Ejemplo 27 Microesferas que comprenden ácido esteárico (2,5 %) y una combinación de dos PLGA con pesos moleculares diferentes (95:5)**

10 Las microesferas de rotigotina se prepararon a partir de 0,4507 g de rotigotina, una combinación de 0,9621 g de PLGA 7525 4A y 0,0505 g de PLGA 5050 2,5A (con una relación de peso de 95:5), y 0,0369 g de ácido esteárico (2,5 %) según el método del EJEMPLO 1.

**Ejemplo 28 Microesferas que comprenden ácido esteárico (2,5 %) y una combinación de dos PLGA con pesos moleculares diferentes (5:95)**

15 Las microesferas de rotigotina se prepararon a partir de 0,4514 g de rotigotina, una combinación de 0,0501 g de PLGA 7525 4A y 0,9610 g de PLGA 5050 2,5A (con una relación de peso de 5:95), y 0,0370 g de ácido esteárico (2,5 %) según el método del EJEMPLO 1.

**Ejemplo 9 de prueba Prueba *in vitro* de las microesferas de rotigotina que comprenden ácido esteárico con diferentes contenidos y una combinación de PLGA con pesos moleculares diferentes**

20 Las pruebas de liberación *in vitro* se llevaron a cabo para las microesferas preparadas en los EJEMPLOS 21-24 según el método del EJEMPLO 1 de prueba. Los resultados de liberación *in vitro* se muestran en la Tabla 6 y las Figs. 23-26.

Tabla 6. Los datos de liberación *in vitro* de las microesferas que comprenden ácido esteárico con diferentes contenidos y una combinación de dos PLGA con pesos moleculares diferentes

Tiempo (día)	7525 4A: 5050 2,5A=50 : 50 (1 % de ácido esteárico)		7525 4A: 5050 2,5A=50: 50 (2,5 % de ácido esteárico)		7525 4A: 5050 2,5A=50: 50 (7,5 % de ácido esteárico)		7525 4A: 5050 2,5A=50: 50 (10 % de ácido esteárico)	
	Cantidad liberada acumulada (%)	Cantidad diariamente liberada (%)	Cantidad liberada acumulada (%)	Cantidad diariamente liberada (%)	Cantidad liberada acumulada (%)	Cantidad diariamente liberada (%)	Cantidad liberada acumulada (%)	Cantidad diariamente liberada (%)
0,125	1,96	1,96	1,02	1,02	0,91	0,91	1,13	1,13
1	9,19	9,19	6,32	6,32	5,18	5,18	2,87	2,87
2	22,80	13,61	17,78	11,46	11,46	6,28	5,78	2,91
4	41,53	9,36	39,17	10,69	31,83	10,18	11,24	2,73
6	65,49	11,98	60,00	10,42	53,15	10,66	24,45	6,61
8	77,74	6,12	75,37	7,68	70,41	8,63	50,47	13,01
10	89,90	6,08	85,71	5,17	81,12	5,36	67,76	8,65
12	93,04	1,57	92,61	3,45	88,77	3,83	77,49	4,86
14	97,38	2,17	96,14	1,77	92,85	2,04	84,64	3,58
16	99,56	1,09	99,22	1,54	96,26	1,70	89,79	2,57
18							93,67	1,94
20							95,82	1,08

Puede observarse comparando los resultados en la Tabla 6 y las Figs. 23-26 con aquellos del EJEMPLO 19 en la Tabla 5 que, cuando la relación de peso de PLGA 7525 4A con respecto a PLGA 5050 2,5A era 50:50 y el contenido de ácido esteárico en las microesferas era del 2,5-7,5 %, el efecto de liberación rápida fue significativamente reducido, y las curvas de liberación de fármaco acumuladas fueron mucho más lineales.

**5 Ejemplo 10 de prueba Prueba *in vitro* de las microesferas de rotigotina que comprenden ácidos grasos con pesos moleculares diferentes y una combinación de PLGA con pesos moleculares diferentes**

Las pruebas de liberación *in vitro* se llevaron a cabo para las microesferas preparadas en los EJEMPLOS 22, 25 y 26 según el método del EJEMPLO 1 de prueba. Los resultados de liberación *in vitro* se muestran en la Tabla 7 y las Figs. 24, 27 y 28.

10 Tabla 7. Los datos de liberación *in vitro* de las microesferas que comprenden ácidos grasos con pesos moleculares diferentes y una combinación de PLGA con pesos moleculares diferentes

Tiempo (día)	7525 4A : 5050 2,5A=50 : 50 (2,5 % de ácido octanoico)		7525 4A : 5050 2,5A=50 : 50 (2,5 % de ácido esteárico)		7525 4A : 5050 2,5A=50 : 50 (2,5 % de ácido lignocérico)	
	Cantidad liberada acumulada (%)	Cantidad diariamente liberada (%)	Cantidad liberada acumulada (%)	Cantidad diariamente liberada (%)	Cantidad liberada acumulada (%)	Cantidad diariamente liberada (%)
0,125	0,92	0,92	1,02	1,02	1,13	1,13
1	8,27	8,27	6,32	6,32	7,48	7,48
2	21,86	13,59	17,78	11,46	15,66	8,18
4	37,41	7,77	39,17	10,69	29,35	6,85
6	53,26	7,93	60,00	10,42	48,02	9,33
8	67,35	7,04	75,37	7,68	70,91	11,45
10	82,98	7,81	85,71	5,17	84,08	6,59
12	91,44	4,23	92,61	3,45	91,22	3,57
14	94,26	1,41	96,14	1,77	95,54	2,16
16	97,16	1,45	99,22	1,54	97,49	0,98

15 Puede observarse comparando los resultados en la Tabla 7 y las Figs. 24, 27, 28 con aquellos del EJEMPLO 19 en la Tabla 5 que, cuando se añadieron ácido octanoico, ácido esteárico y ácido lignocérico con un contenido del 2,5 %, respectivamente, a la formulación, se redujo la liberación rápida, y las curvas de liberación de fármaco tendieron a ser más lineales, que indica que todos los ácidos grasos que tienen 8-24 átomos de carbono pueden cumplir el requisito de liberación de fármaco estable.

**Ejemplo 11 de prueba Prueba *in vitro* de las microesferas de rotigotina que comprenden ácido esteárico (2,5 %) y una combinación de PLGA con pesos moleculares diferentes en relaciones de peso diferentes**

20 Las pruebas de liberación *in vitro* se llevaron a cabo para las microesferas preparadas en los EJEMPLOS 22, 27 y 28 según el método del EJEMPLO 1 de prueba. Los resultados de liberación *in vitro* se muestran en la Tabla 8 y las Figs. 24, 29 y 30.

Tabla 8. Los datos de liberación *in vitro* de las microesferas que comprenden ácido esteárico y una combinación de PLGA con pesos moleculares diferentes en relaciones de peso diferentes

Tiempo (día)	7525 4A : 5050 2,5A=50 : 50 (2,5 % de ácido esteárico)		7525 4A : 5050 2,5A=95 : 5 (2,5 % de ácido esteárico)		7525 4A : 5050 2,5A=5 : 95 (2,5 % de ácido esteárico)	
	Cantidad liberada acumulada (%)	Cantidad diariamente liberada (%)	Cantidad liberada acumulada (%)	Cantidad diariamente liberada (%)	Cantidad liberada acumulada (%)	Cantidad diariamente liberada (%)
0,125	1,02	1,02	0,96	0,96	1,24	1,24
1	6,32	6,32	5,19	5,19	11,18	11,18
2	17,78	11,46	10,46	5,27	24,13	12,95
4	39,17	10,69	25,47	7,50	50,45	13,16
6	60,00	10,42	44,25	9,39	70,25	9,90
8	75,37	7,68	66,29	11,02	84,49	7,12
10	85,71	5,17	79,25	6,48	93,26	4,39
12	92,61	3,45	88,19	4,47	96,10	1,42
14	96,14	1,77	94,51	3,16	99,28	1,59
16	99,22	1,54	98,80	2,14		

5 Puede observarse de la Tabla 8 y las Figs. 29 y 30 que, cuando el contenido de ácido esteárico fue del 2,5 % y la relación de peso de PLGA 7525 4A con respecto a PLGA 5050 2,5A fue 95:5, la cantidad de liberación de fármaco en 1-4 días fue ligeramente baja; cuando la relación de peso de PLGA 7525 4A con respecto a PLGA 5050 2,5A fue 5:95, la cantidad de liberación de fármaco en 1-4 días fue ligeramente alta, y en el día 10, la cantidad liberada acumulada alcanzó el 93,26 % con un periodo de liberación corto; y cuando la relación de peso de PLGA 7525 4A con respecto a PLGA 5050 2,5A fue 50:50, la liberación de fármaco fue más estable, y el fármaco puede liberarse de forma sostenida durante 14 días.

**Ejemplo 12 de prueba Prueba *in vivo* de las microesferas con una tasa de carga de fármaco que comprende ácido esteárico (2,5 %) y una combinación de PLGA 7525 4A y PLGA 5050 2,5A con relaciones de peso diferentes**

15 Las microesferas se prepararon según el EJEMPLO 8, pero con relaciones de peso diferentes de PLGA 7525 4A con respecto a PLGA 5050 2,5A de 90:10, 80:20, 70:30 y 50:50. Las pruebas de liberación *in vivo* se llevaron a cabo para las microesferas según el método del EJEMPLO 2 de prueba. Los resultados se muestran en la Fig. 31.

20 Puede observarse de la liberación *in vivo* (Fig. 31) que, después de mezclarse dos PLGA con relaciones de peso diferentes con relaciones de peso diferentes, con contenido creciente de PLGA 5050 2,5A, las cantidades de liberación de fármaco de las microesferas en 1-4 días aumentaron, y la curva de liberación *in vivo* tendió a ser más estable; y cuando la relación de peso de PLGA 7525 4A con respecto a PLGA 5050 2,5A fue 50:50, la curva de liberación *in vivo* fue más estable sin efecto de liberación rápida significativo.

25 Como se indica a partir de los resultados anteriores, dos PLGA con relaciones de peso diferentes se mezclaron en relaciones de peso diferentes, venciendo así eficazmente los defectos de una única PLGA. Es decir, la PLGA con un peso molecular de 15000-30000 (PLGA 2,5A) puede aumentar la cantidad de liberación de fármaco de las microesferas en 1-4 días, y la PLGA con un peso molecular de 42000-75000 (PLGA 4A) puede prolongar el periodo de liberación de fármaco, obteniéndose así microesferas con liberación de fármaco *in vivo* más estable.

**Ejemplo 13 Prueba *in vitro* de las microesferas con una tasa de carga de fármaco que comprende ácido esteárico (2,5 %) y una combinación de PLGA 7525 5A y PLGA 5050 2,5A con relaciones de peso diferentes**

30 Las microesferas se prepararon según el EJEMPLO 8, pero con relaciones de peso diferentes de PLGA 7525 5A con respecto a PLGA 5050 2,5A de 90:10, 80:20 y 70:30. Las pruebas de liberación *in vitro* se llevaron a cabo para las microesferas según el método del EJEMPLO 1 de prueba. Los datos de liberación *in vitro* se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Los datos de liberación *in vitro* de las microesferas que comprenden ácido esteárico y una combinación de PLGA 7525 5A y PLGA 5050 2,5A con pesos moleculares diferentes

Tiempo (día)	7525 5A : 5050 2,5A =90 : 10 (2,5 % de ácido esteárico)		7525 5A : 5050 2,5A =80 : 20 (2,5 % de ácido esteárico)		7525 5A : 5050 2,5A =70 : 30 (2,5 % de ácido esteárico)	
	Cantidad liberada acumulada (%)	Cantidad diariamente liberada (%)	Cantidad liberada acumulada (%)	Cantidad diariamente liberada (%)	Cantidad liberada acumulada (%)	Cantidad diariamente liberada (%)
0,125	1,44	1,44	1,53	1,53	1,61	1,61
1	4,28	4,28	6,23	6,23	7,64	7,64
2	8,73	4,45	11,70	5,47	15,74	7,09
4	24,29	7,78	28,96	8,63	30,21	7,74
6	42,41	9,06	43,30	7,17	47,89	8,84
8	63,49	10,54	65,68	11,19	63,17	7,64
10	75,38	5,95	74,35	4,33	72,48	4,66
12	84,65	4,64	80,81	3,23	81,97	4,75
14	90,45	2,90	90,57	4,88	89,30	3,66
16	94,83	2,19	95,78	2,61	92,56	1,63
18	97,87	1,52	98,21	1,22	94,65	1,05
20					95,81	0,58

5 Puede observarse de la Tabla 9 que, después de mezclarse PLGA 7525 5A y PLGA 5050 2,5A con relaciones de peso diferentes, las características de liberación de fármaco de las microesferas preparadas fueron similares a aquellas de las microesferas preparadas a partir de PLGA 7525 4A y PLGA 5050 2,5A. Con contenido creciente de PLGA 5050 2,5A en las microesferas, la cantidad de liberación de fármaco de las microesferas en 1-4 días aumentó consecutivamente. Cuando la relación de peso de PLGA 7525 5A con respecto a PLGA 5050 2,5A varió de 90:10 a 70:30, la cantidad liberada acumulada dentro de 1 día aumentó del 4,28 % al 7,64 %, y la cantidad liberada acumulada en 4 días aumentó del 24,29 % al 30,21 %. Debido a que las microesferas contienen 2,5 % de ácido esteárico, las cantidades de liberación de las microesferas en 0,125 días y 1 día fueron más pequeñas, que indica que la liberación rápida *in vivo* de las microesferas fue más pequeña.

#### Ejemplo 14 de prueba Prueba de correlación *in vitro-in vivo* de las microesferas de rotigotina

15 El diagrama de correlación se representó con los datos de liberación acumulados *in vitro* y los datos de liberación *in vivo* de las microesferas preparadas en el EJEMPLO 22, como se muestra en la Fig. 32 (la ecuación lineal:  $y = 1,2137x - 3,7464$ ,  $r = 0,9943$ ). Puede observarse de la Fig. 32 que el tiempo de liberación de fármaco *in vitro* y el porcentaje de absorción *in vivo* de las microesferas de rotigotina tienen una correlación, que indica que la condición de liberación *in vitro* seleccionada para evaluar la liberación *in vitro* de las microesferas puede usarse para predecir el perfil de liberación *in vivo* de las microesferas.

#### 20 Ejemplo 15 de prueba La determinación del peso molecular de PLGA

Instrumento y reactivo

25 Cromatógrafo de líquidos de alto rendimiento Agilent 1100 (que comprende una bomba cuaternaria, una estufa de columna, un inyector automático, un detector de RID y HP-ChemStation con software GPC); columna cromatográfica: Styragel<sup>®</sup> HT3 (7,8×300 mm, 10 µm, intervalo de peso molecular: 500-30000), Styragel<sup>®</sup> 6E (7,8×300 mm, 10 µm, intervalo de peso molecular: 5000-600000); tetrahidrofurano (puro cromatográfico, SK CHEMICAL, G6EE3H); patrón de peso molecular de poliestireno (Fluka, 1226627); Muestra: PLGA 7525 5A, PLGA 7525 4A, PLGA 5050 2,5A (Lakeshore Biomaterials, Inc.).

Los pesos moleculares de las muestras se determinaron usando cromatografía de exclusión por tamaño. Debido a que el polímero de PLGA era liposoluble y que no tenía absorción ultravioleta, las muestras se probaron en un detector de índice de refracción diferencial, usando tetrahidrofurano como disolvente y la fase móvil. Debido a que el peso molecular ( $P_m$ ) del polímero de PLGA era de aproximadamente 50.000, el intervalo de peso molecular de la columna cromatográfica seleccionada incluyó este intervalo, y el intervalo de distribución de peso molecular de las muestras que iban a medirse estuvo en el centro del intervalo de peso molecular de la columna cromatográfica seleccionada. Styragel<sup>®</sup>HT3 (7,8×300 mm, 10  $\mu$ m, intervalo de peso molecular: 500-30.000) y Styragel<sup>®</sup>6E (7,8×300 mm, 10  $\mu$ m, intervalo de peso molecular: 5.000-600.000) se conectaron en serie para su uso. Debido a que la propiedad de PLGA es similar a la del poliestireno, se seleccionó un patrón mixto de poliestireno (intervalo de peso molecular: 500-2.500.000) que comprendía un intervalo de peso molecular de las muestras disponibles de Fluka Chemical Corp.

Método de determinación

Se añadió cantidad apropiada de la muestra a una fase móvil para preparar una solución con una concentración de aproximadamente 1 mg/ml, y se vibró para preparar una solución de prueba. Se añadió un conjunto de patrón de peso molecular de poliestireno (3 botellas, comprendiendo cada botella un patrón mixto de 4 pesos moleculares estándar) a la fase móvil para preparar una solución con una concentración de 1,0 mg/ml como solución de referencia. La prueba se llevó a cabo en un detector de índice de refracción diferencial según la cromatografía de exclusión por tamaño (Farmacopea China 2005, vol. II, Apéndice VH) usando columnas cromatográficas de gel y usando tetrahidrofurano como fase móvil con una temperatura de la columna de 30 °C, un caudal de 1,0 ml/min y una temperatura del detector de 35 °C. Se diluyó una cantidad requerida de acetonitrilo a un factor de 500 con la fase móvil. Se inyectaron 20  $\mu$ l de la solución diluida en el cromatógrafo de líquidos, y el cromatograma se registró, con un número de platos teórico no inferior a 10.000 calculado según el pico de acetonitrilo.

Se inyectaron 20  $\mu$ l de cada una de las soluciones de referencia en el cromatógrafo de líquidos, se registró el cromatograma, y la ecuación de regresión se calculó por el software GPC. Se midieron 20  $\mu$ l de la solución de prueba según el mismo método, se calcularon el peso molecular promedio en peso, el peso molecular promedio en número y la distribución de peso molecular de la muestra por el software GPC. Los resultados se muestran en las Tablas 10, 11 y 12.

Tabla 10. Los resultados del peso molecular de PLGA

N.º	PLGA 5050 2,5A (kDa)	PLGA 7525 4A (kDa)	PLGA 7525 5A (kDa)
1	24	49	67
2	23	53	66
3	23	51	67

Los resultados del informe de la prueba de PLGA de Lakeshore Biomaterials Inc. se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Informe de la prueba del peso molecular de PLGA

N.º	PLGA 5050 2,5A (kDa)	PLGA 7525 4A (kDa)	PLGA 7525 5A (kDa)
1	26	51	67
2	26	54	68
3	28	42	72

Tabla 12. Distribución de peso molecular de PLGA

PLGA	distribución de peso molecular
PLGA 5050 2,5A	15.000-35.000
PLGA 7525 4A	42.000-58.000
PLGA 7525 5A	55.000-75.000

Los pesos moleculares de ciertos PLGA se muestran en la Tabla 12.

**Ejemplo 16 de prueba Conformidad lote a lote**

Se prepararon cinco lotes de las microesferas de rotigotina según el método del EJEMPLO 3, EJEMPLO 8, EJEMPLO 11, EJEMPLO 12, EJEMPLO 14 y EJEMPLO 16. Las pruebas de liberación *in vitro* se llevaron a cabo

para las microesferas según el método del EJEMPLO 1 de prueba.

Las curvas de liberación *in vitro* de los 5 lotes de microesferas preparadas en el Ejemplo 3 se muestran en la Fig. 33.

Las curvas de liberación *in vitro* de los 5 lotes de microesferas preparadas en el Ejemplo 8 se muestran en la Fig. 34.

5 Las curvas de liberación *in vitro* de los 5 lotes de microesferas preparadas en el Ejemplo 14 se muestran en la Fig. 35.

Las curvas de liberación *in vitro* de los 5 lotes de microesferas preparadas en el Ejemplo 16 se muestran en la Fig. 36.

Las curvas de liberación *in vitro* de los 5 lotes de microesferas preparadas en el Ejemplo 11 se muestran en la Fig. 37.

10 Las curvas de liberación *in vitro* de los 5 lotes de microesferas preparadas en el Ejemplo 12 se muestran en la Fig. 38.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición de microesferas que comprende rotigotina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; al menos una poli(lactida-co-glicolida) (PLGA); y al menos un ácido graso, en la que la rotigotina o su sal farmacéutica de la misma es el 20-40 %, la al menos una PLGA es el 57,5-72,5 % y el al menos un ácido graso es el 2,5-7,5 % en peso con respecto al peso total de la composición.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que la sal farmacéuticamente aceptable se forma con un ácido inorgánico, opcionalmente elegido de ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico y ácido nítrico; o un ácido orgánico, opcionalmente elegido de ácido cítrico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido acético, ácido benzoico, ácido láctico, ácido metanosulfónico, ácido naftalenosulfónico, ácido tolueno-p-sulfónico, ácido glutámico y ácido aspártico.
- 10 3. La composición de la reivindicación 1, en la que:
- la rotigotina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma es el 20-40 %, la al menos una PLGA es el 57,5-72,5 % y el ácido graso es el 2,5 % con respecto al peso total de la composición.
4. La composición de la reivindicación 1, en la que:
- la rotigotina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma es el 30 %, la al menos una PLGA es el 62,5-67,5 % y el ácido graso es el 2,5-7,5 % con respecto al peso total de la composición.
- 15 5. La composición de cualquier reivindicación precedente, en la que la al menos una PLGA es 5.000-100.000 Da de peso molecular.
6. La composición de cualquier reivindicación precedente, en la que la al menos una PLGA tiene una relación de polimerización de lactida con respecto a glicolida que oscila de 95:5 a 5:95, opcionalmente de 75:25 a 25:75.
- 20 7. La composición de cualquier reivindicación precedente, en la que el al menos un ácido graso se elige de ácidos grasos que tienen 8-24 átomos de carbono, opcionalmente el al menos un ácido graso se elige de ácido esteárico, ácido palmítico, ácido oleico, ácido decanoico, ácido octanoico y ácido lignocérico.
8. La composición de cualquier reivindicación precedente, en la que la al menos una PLGA comprende una primera PLGA y una segunda PLGA, en la que la primera PLGA tiene un peso molecular de 42.000-75.000 Da, la segunda PLGA tiene un peso molecular de 15.000-35.000 Da, y la relación de peso de la primera PLGA y la segunda PLGA es de 95:5 a 5:95; y en la que opcionalmente la primera PLGA se elige de PLGA 7525 4A y PLGA 7525 5A, y la segunda PLGA es PLGA 5050 2.5A.
- 25 9. La composición de la reivindicación 8, en la que:
- la rotigotina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma es el 20-40 %, la cantidad de la primera PLGA y la segunda PLGA es el 57,5-72,5 %, y el ácido graso es el 2,5-7,5 % con respecto al peso total de la composición, o
  - la rotigotina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma es el 20-40 %, la cantidad de la primera PLGA y la segunda PLGA es el 57,5-72,5 %, y el ácido graso es el 2,5 % con respecto al peso total de la composición.
- 30 10. La composición de la reivindicación 8, en la que:
- la rotigotina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma es el 30 %, la cantidad de la primera PLGA y la segunda PLGA es el 62,5-67,5 %, y el ácido graso es el 2,5-7,5 % con respecto al peso total de la composición; o
  - la rotigotina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma es el 30 %, la cantidad de la primera PLGA y la segunda PLGA es el 67,5 %, y el ácido graso es el 2,5 % con respecto al peso total de la composición.
- 35 40 11. La composición de cualquier reivindicación precedente para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

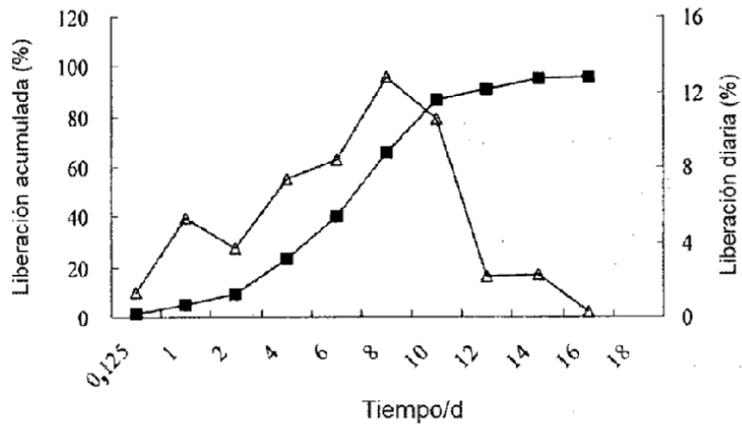


Fig.1

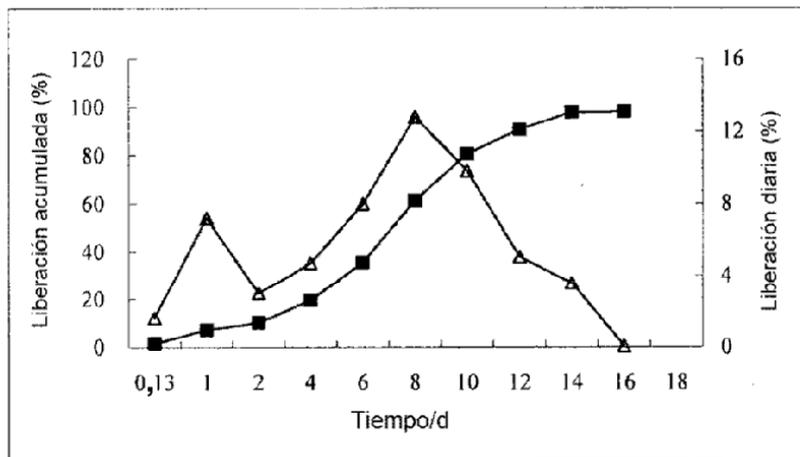


Fig.2

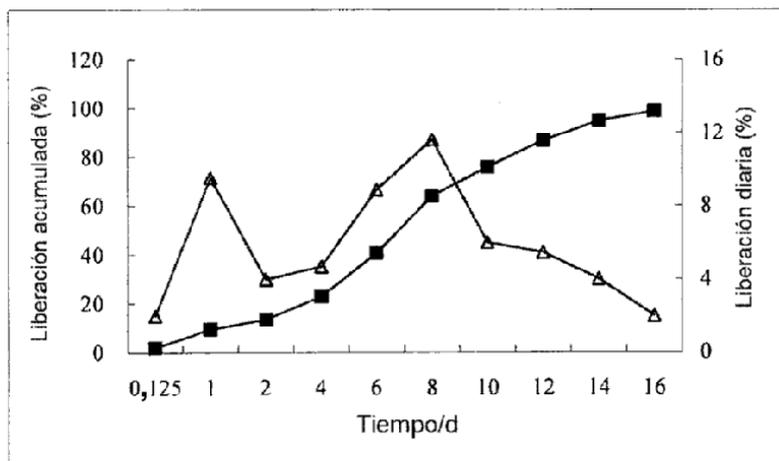


Fig.3

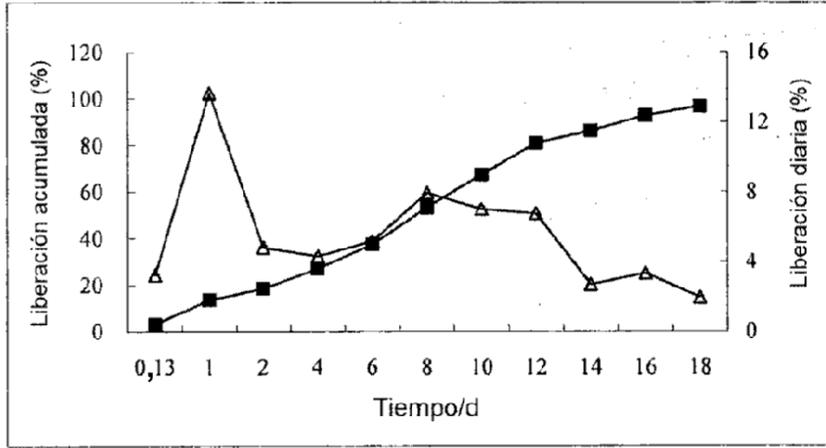


Fig.4

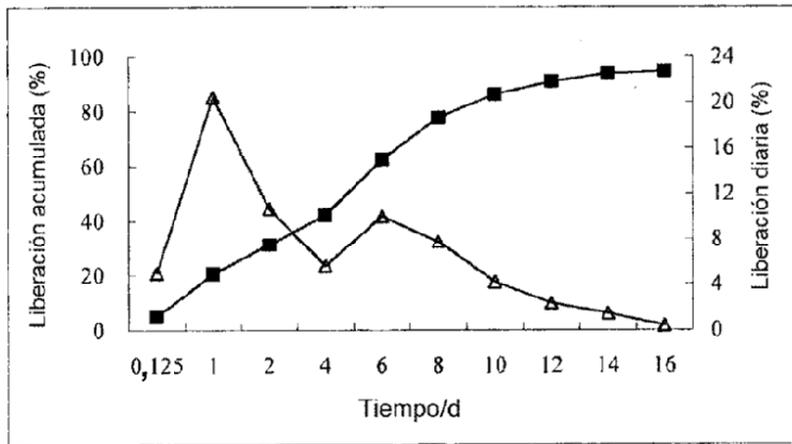


Fig.5

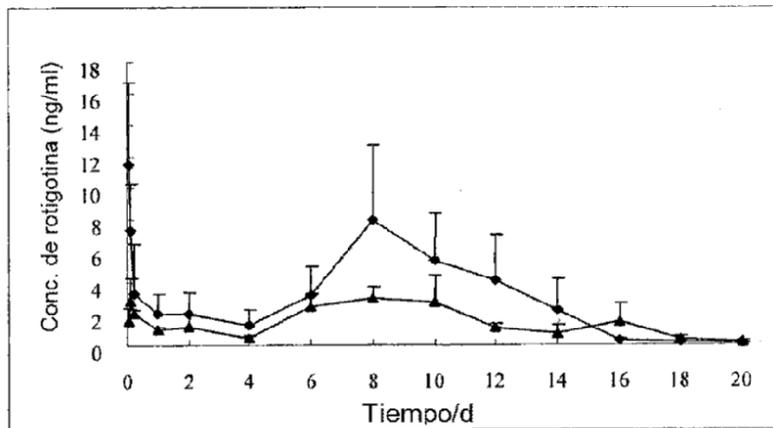


Fig.6

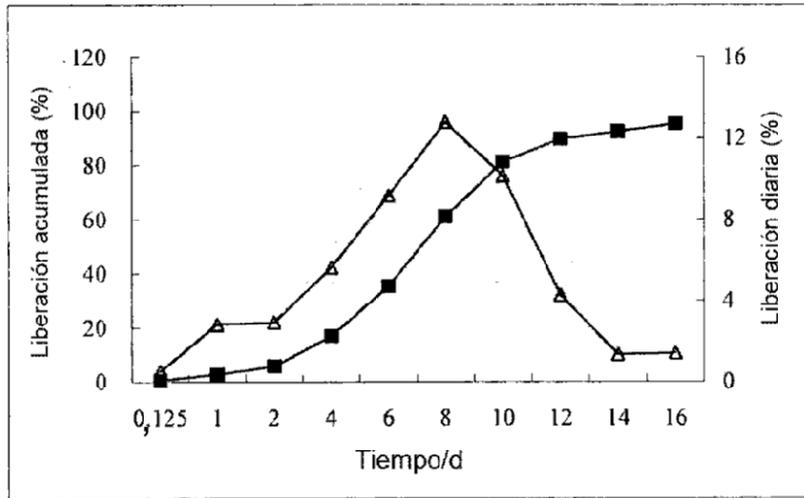


Fig.7

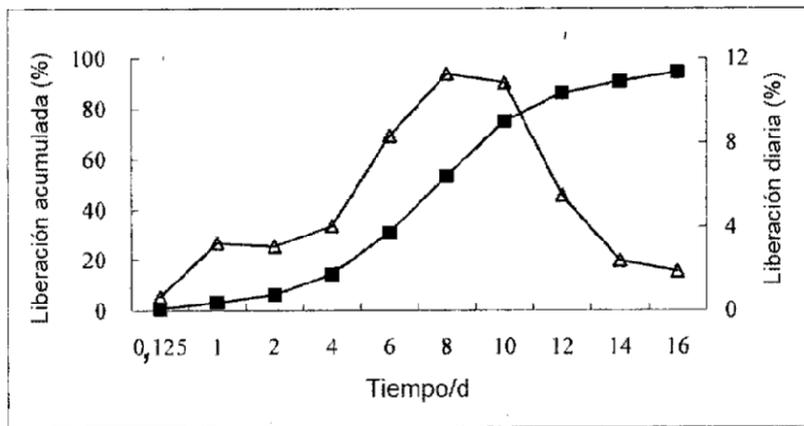


Fig.8

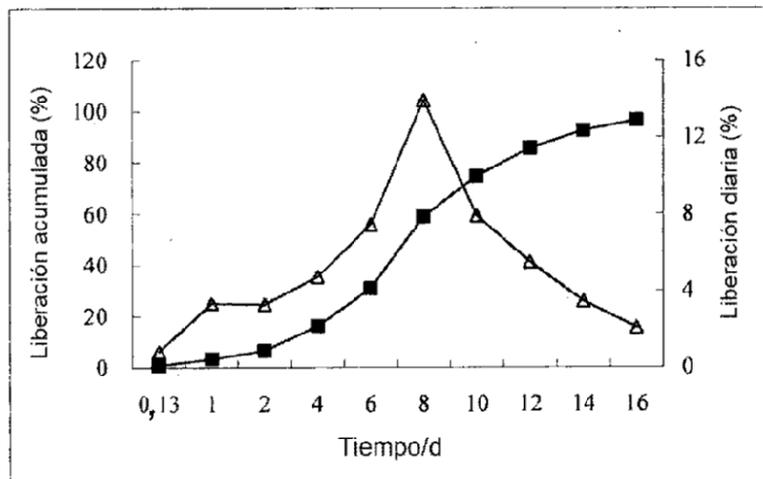


Fig.9

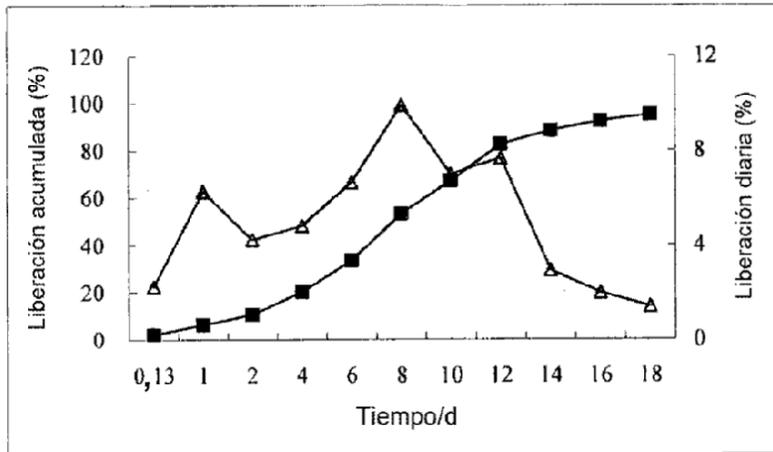


Fig.10

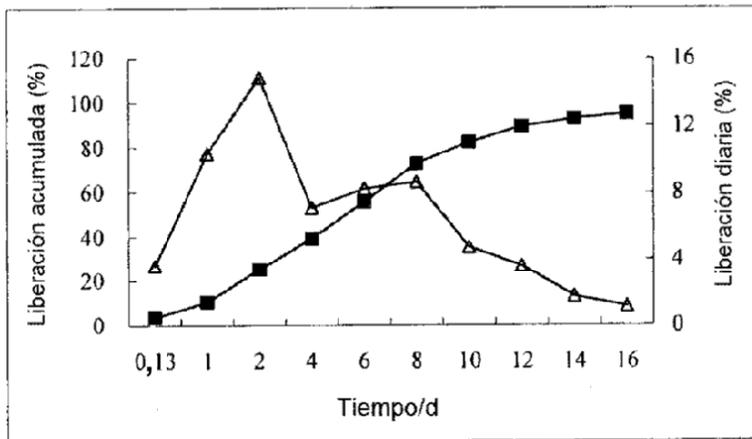


Fig.11

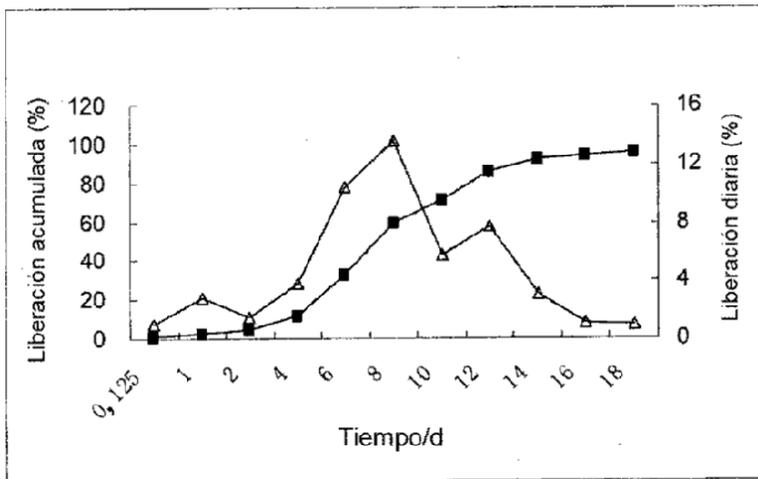


Fig.12

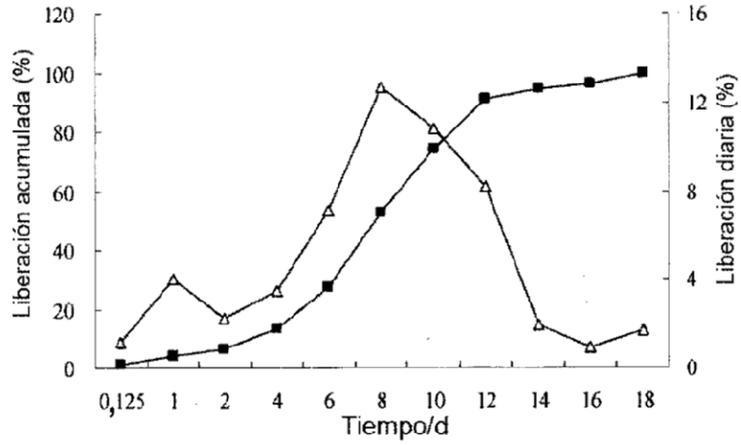


Fig.13

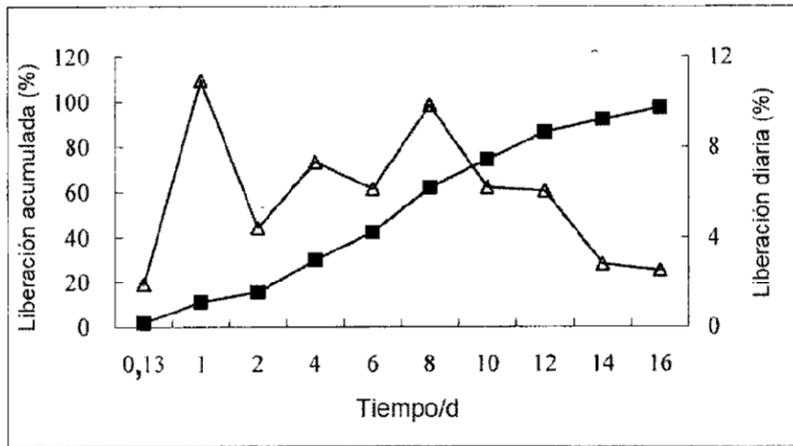


Fig.14

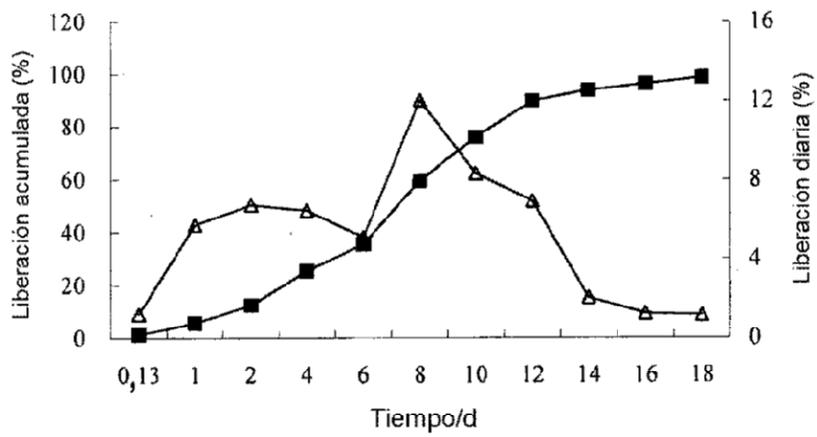


Fig.15

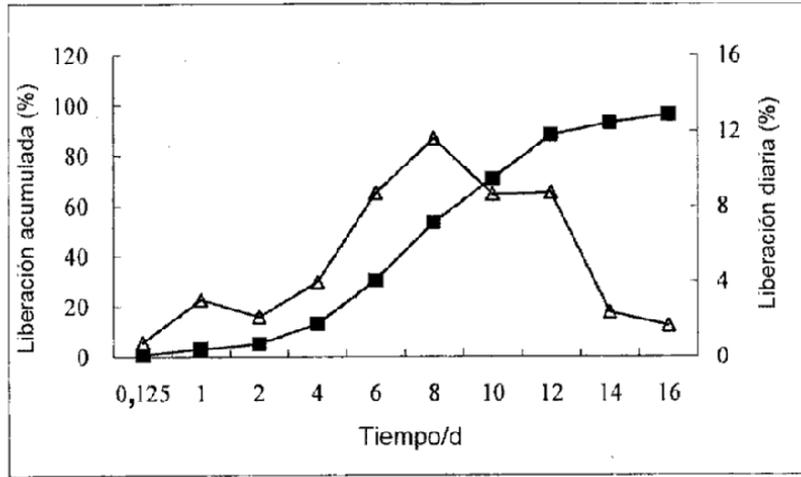


Fig.16

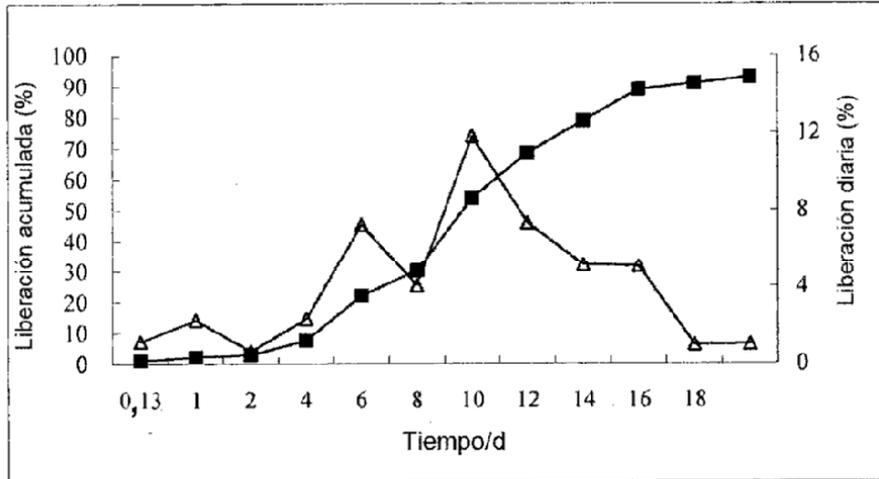


Fig.17

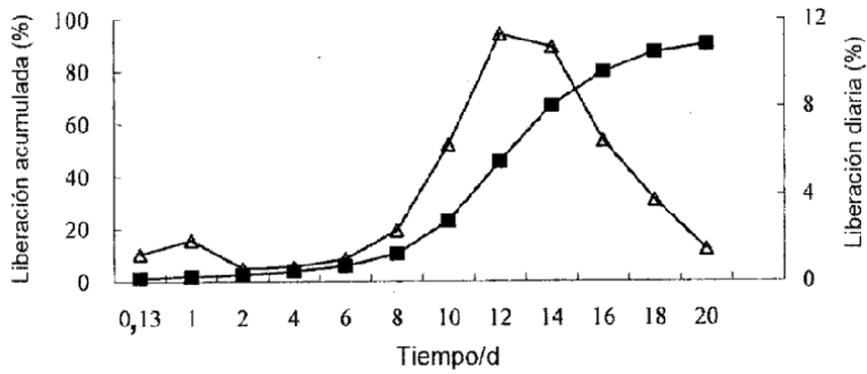


Fig.18

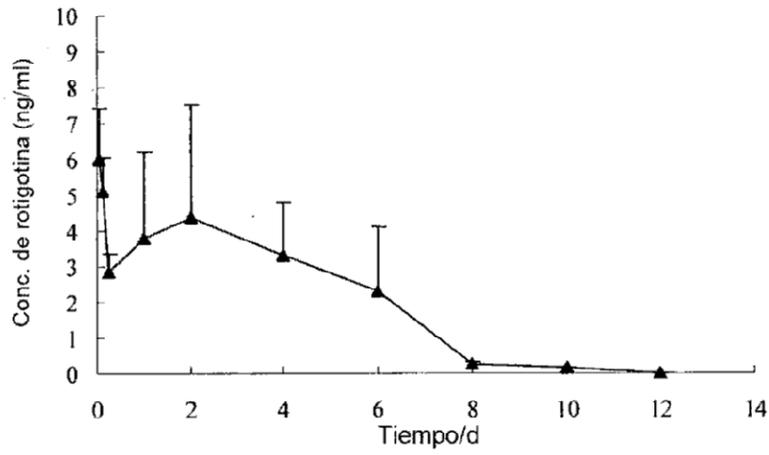


Fig.19

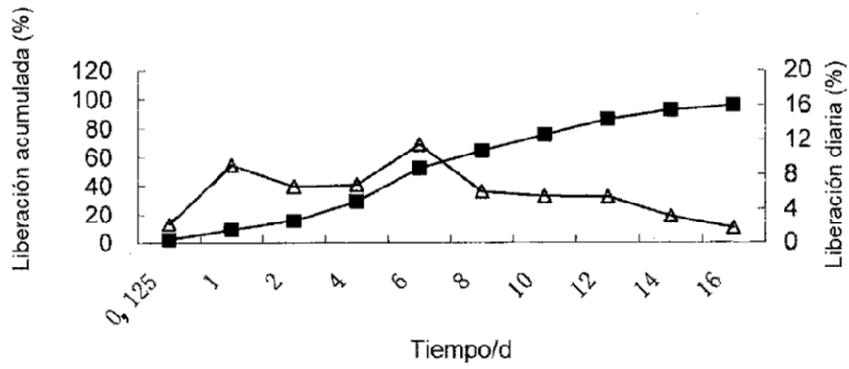


Fig.20

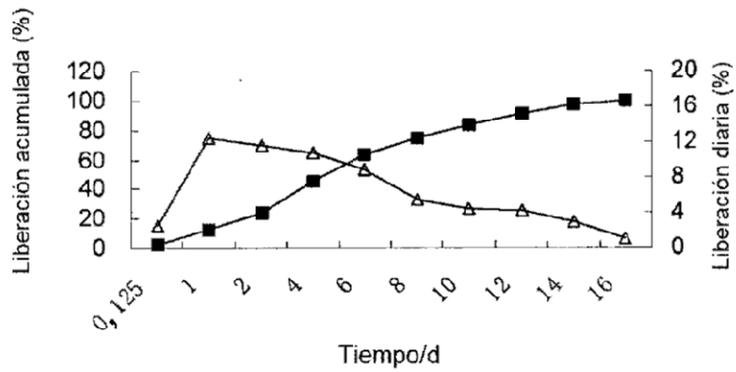
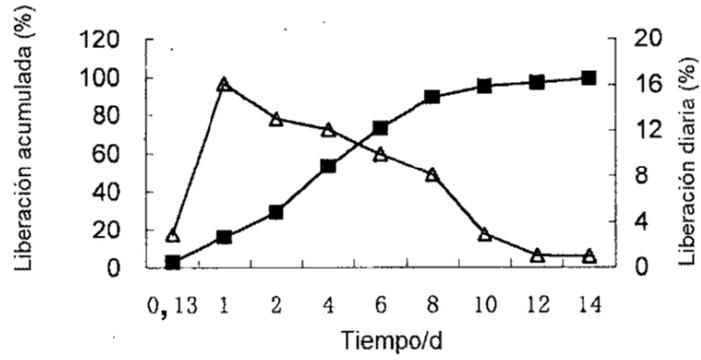
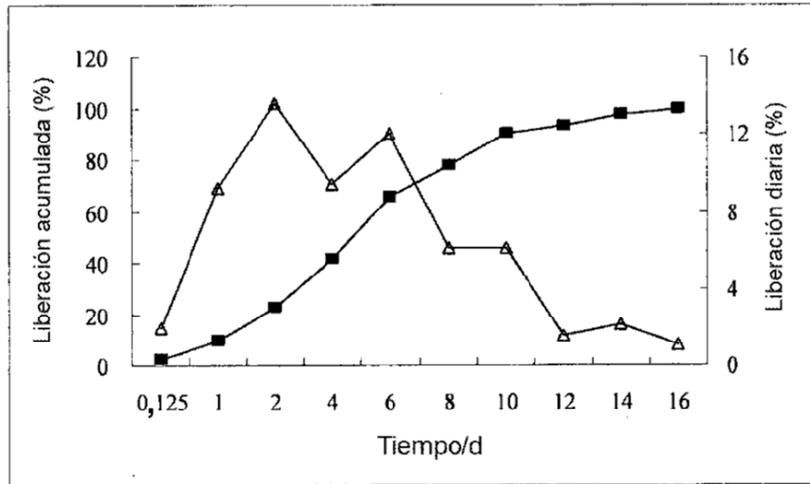


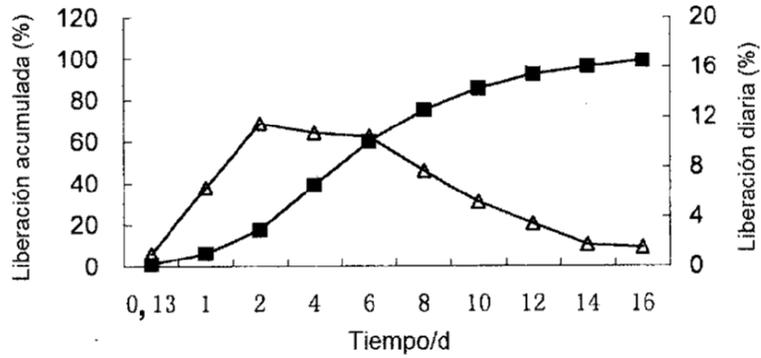
Fig.21



**Fig.22**



**Fig.23**



**Fig.24**

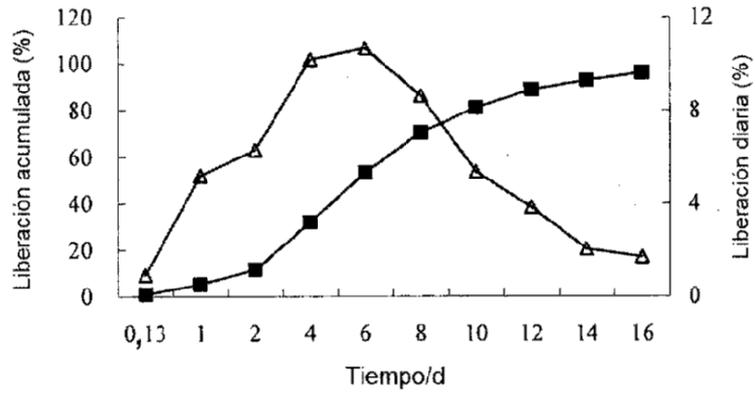


Fig.25

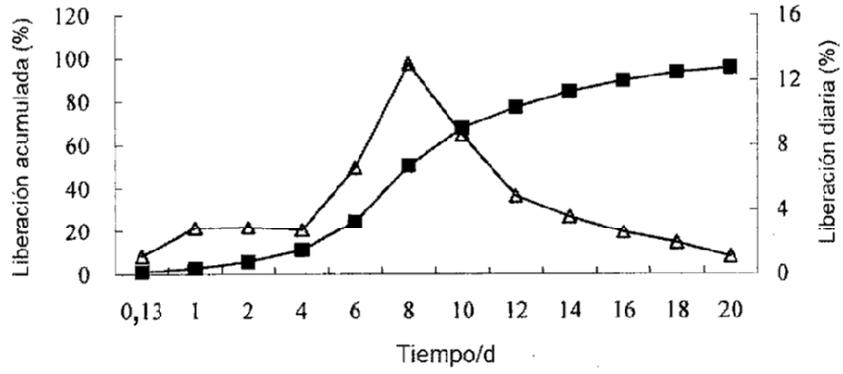


Fig.26

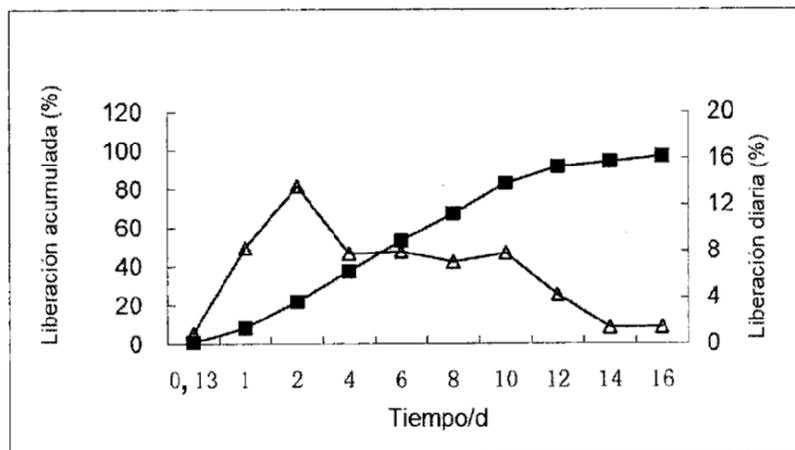


Fig.27

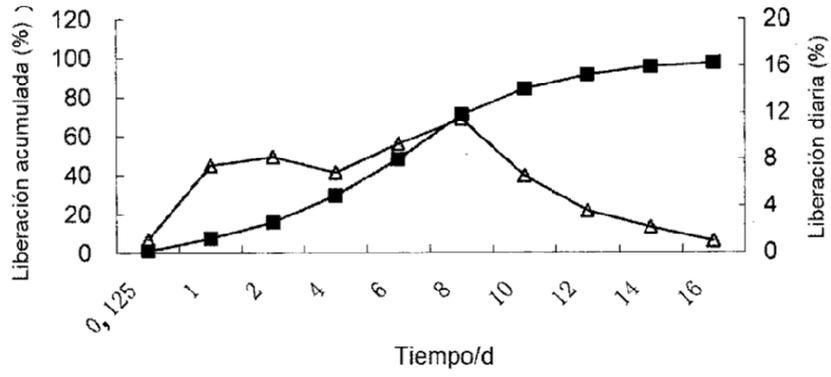


Fig.28

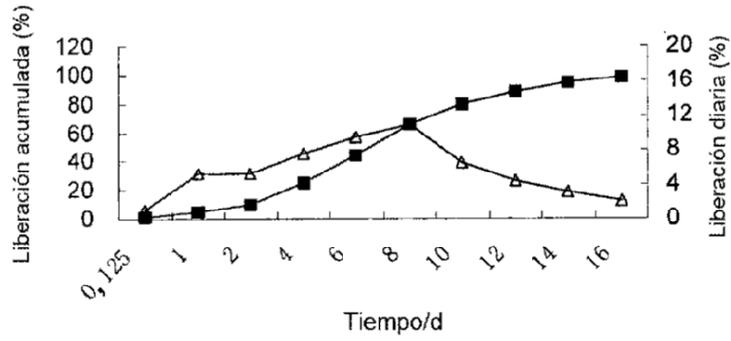


Fig.29

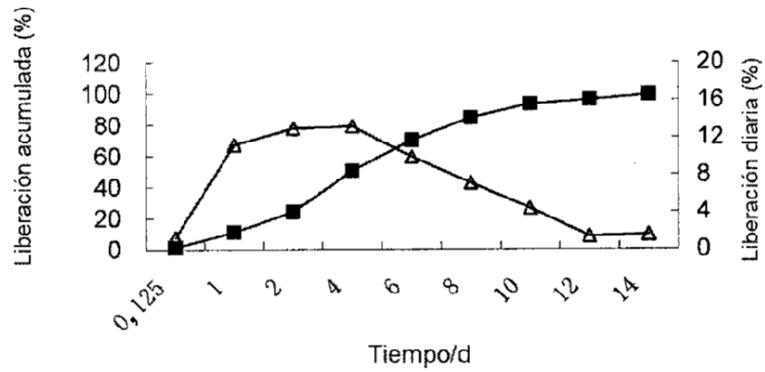


Fig.30

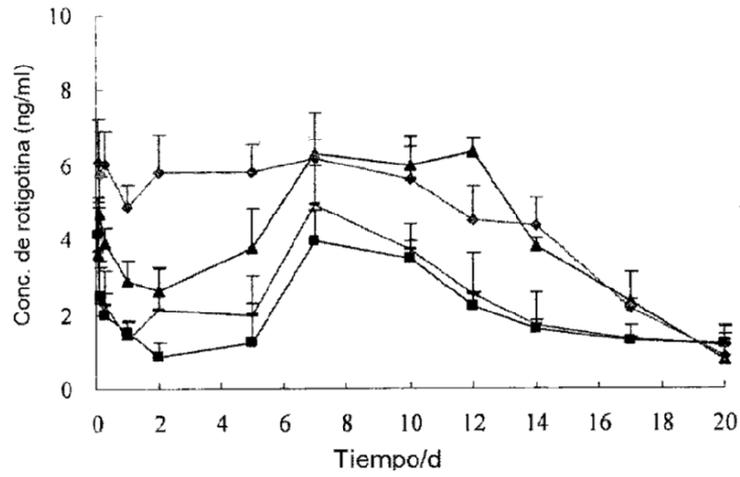


Fig.31

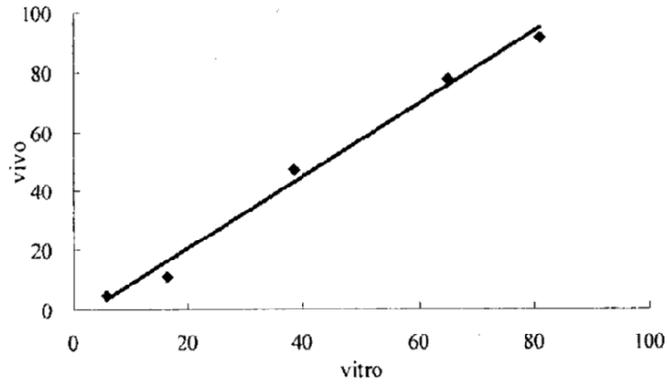


Fig.32

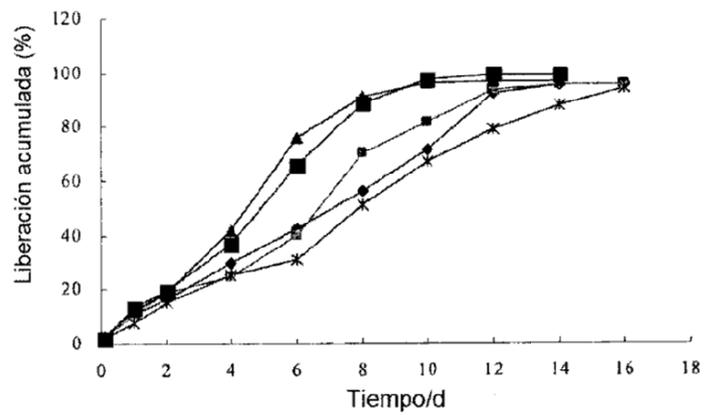


Fig 33

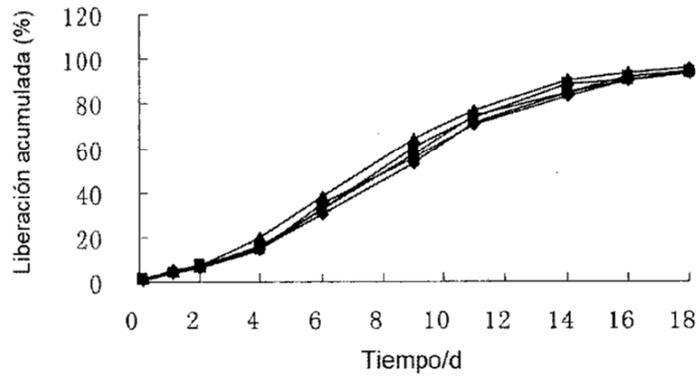


Fig 34

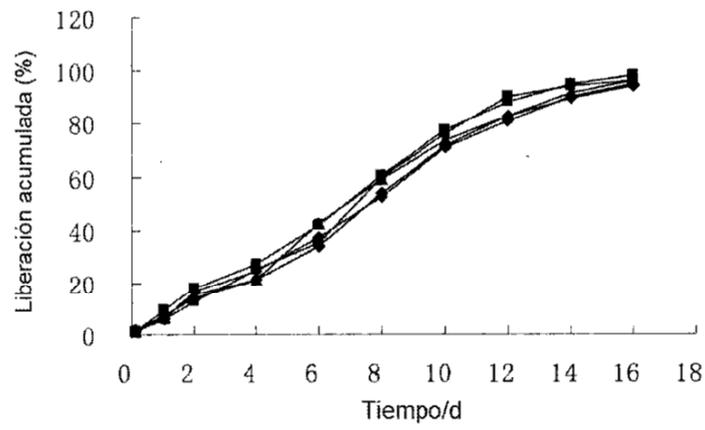


Fig 35

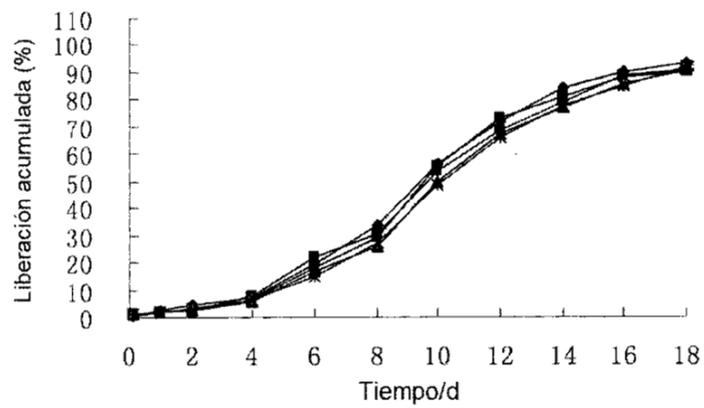
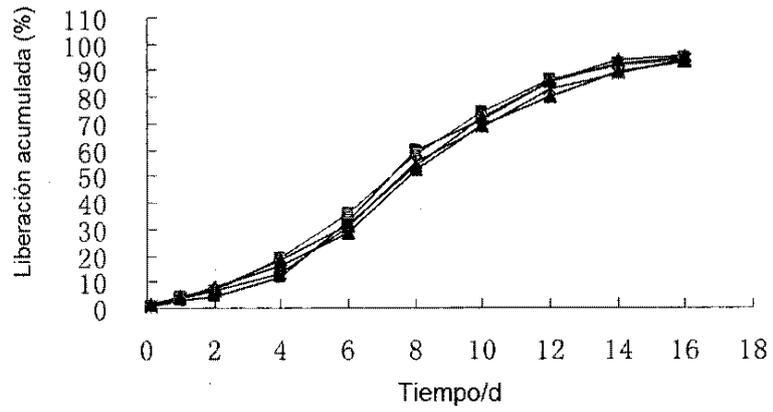
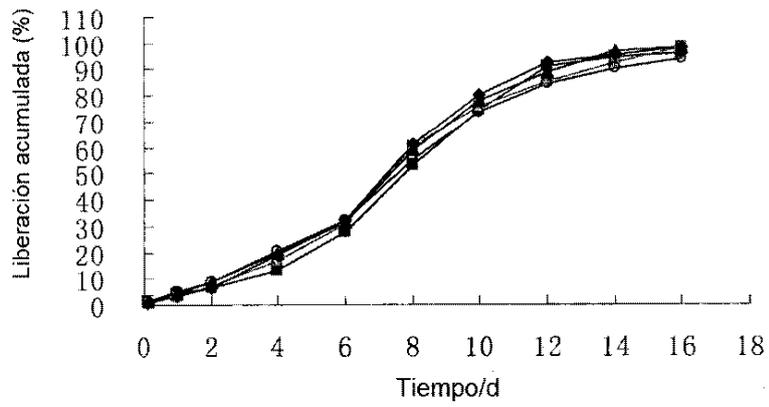


Fig 36



**Fig 37**



**Fig 38**