

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 600 554**

51 Int. Cl.:

A61K 9/10	(2006.01)
A61K 47/34	(2006.01)
A61K 9/16	(2006.01)
A61K 9/00	(2006.01)
A61K 38/09	(2006.01)
A61K 38/31	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.07.2004 PCT/US2004/023324**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.01.2005 WO05007122**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.07.2004 E 04778698 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.09.2016 EP 1660039**

54 Título: **Prevención de la reducción del peso molecular del polímero, de la formación de impurezas y de la gelificación en composiciones poliméricas**

30 Prioridad:

18.07.2003 US 488573 P

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

09.02.2017

73 Titular/es:

**OAKWOOD LABORATORIES L.L.C. (100.0%)
7670 FIRST PLACE
OAKWOOD, OH 44146, US**

72 Inventor/es:

**THANOO, B., C.;
MURTAGH, JAMES y
JOHNS, GONTO**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 600 554 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

Prevenición de la reducción del peso molecular del polímero, de la formación de impurezas y de la gelificación en composiciones poliméricas

5

Campo

La presente invención se define en las reivindicaciones. En el presente documento también se describen composiciones poliméricas capaces de proporcionar una liberación sostenida o extendida del fármaco, métodos para su preparación y uso en diversas aplicaciones biológicas. Específicamente, en el presente documento se describe la prevención o la eliminación de la reducción del peso molecular del polímero en una solución polimérica que contiene uno o más compuestos o uno o más agentes nucleofílicos. En el presente documento también se describe la reducción o eliminación de las impurezas poliméricas peptídicas en las soluciones poliméricas. Adicionalmente, en el presente documento se describen análogos de GnRH y soluciones que contienen polímeros capaces de formar soluciones no gelificantes, estables y esterilizables mediante filtros.

10

15

Antecedentes

Las composiciones que contienen principios activos biológicos combinados con polímeros biocompatibles y biodegradables se están utilizando cada vez más como sistemas de suministro de fármacos para proporcionar una liberación sostenida o retardada de fármacos. Las composiciones están disponibles en diversas formas de depósito incluyendo formas líquidas, implantes sólidos, microesferas, microcápsulas y micropartículas.

20

25

30

Por ejemplo, los sistemas de liberación controlada en donde las composiciones poliméricas son formas líquidas o sistemas de suministro de fluidos se describen en las patentes de EE.UU. 5.739.176, 4.938.763; 5.278.201, 5324519 y 5.278.202. Las composiciones descritas en estas patentes se administran al cuerpo de un sujeto en estado fluido. Una vez en el cuerpo, la composición precipita o coagula para formar una matriz o implante sólido y el disolvente orgánico de la composición se disipa o dispersa en el fluido acuoso o corporal. Una vez que el implante sólido se forma, normalmente en el sitio de administración, el agente biológicamente activo se libera de la matriz sólida mediante difusión o disolución en la matriz polimérica y/o mediante degradación lenta de la matriz polimérica.

35

40

También se dispone de varias microesferas o microcápsulas de liberación sostenida o se están desarrollando como sistemas de suministro para expandir rápidamente la clase de agentes terapéuticos o farmacológicos peptídicos o no peptídicos. Por ejemplo, se conocen microesferas o microcápsulas de liberación sostenida en la administración de hormonas, análogos de hormonas, fármacos antitumorales, tioridazina, antipsicóticos, y esteroides donde el PLGA o PLA es un material polimérico biodegradable constitutivo. Además, por ejemplo, en los últimos años, se ha descrito varias formulaciones de depósito inyectables en las que un análogo de somostatina (por ejemplo, acetato de octreótido) o un análogo de LHRH (por ejemplo, acetato de leuprolida) se encapsula en, y se libera lentamente desde, microesferas fabricadas con polímeros biodegradables (patentes de EE.UU. 5.478.564, 5.540.973, 5.609.886, 5.876.761, 5.688.530, 4.652.441, 4.677.191, 4.917.893, 4.954.298, 5.330.767, 5.476.663, 5.759.87, 5.631.020, 5.631.021 y 5.716.640; International Journal of Pharmaceutics, 203, 2000, páginas 193-202).

45

De hecho, las formulaciones de depósito inyectables de acción prolongada de análogos de GnRH (agonistas y antagonistas) se están utilizando y/o ensayando para el tratamiento de diversas dolencias patológicas y fisiológicas en mamíferos, particularmente en seres humanos (Kostanski et al., 2001, BMC Cancer, 1:18-24). Los tratamientos son para, entre otras cosas, la gestión de las enfermedades dependientes de hormonas sexuales, tales como el cáncer de próstata y la endometriosis, para la inducción de la ovulación, y para el control de la fertilidad en varones.

50

55

De esta manera, se están realizando esfuerzos significativos para obtener una liberación en estado estacionario de los fármacos medicinales en animales utilizando composiciones que contienen polímeros biocompatibles biodegradables. Uno de los objetivos obvios en todas estas composiciones poliméricas es que el agente biológicamente activo (por ejemplo, un péptido o proteína) de interés puede administrarse con menos frecuencia, algunas veces a dosis globales inferiores, que cuando se formulan como una solución sin el uso de polímeros en ellas. De forma más importante, esto puede justificar el desarrollo comercial de proteínas que, por varios motivos, no se comercializarían como meras formulaciones en solución.

60

A pesar de los avances tecnológicos que se han realizado en el campo de las formulaciones de depósito inyectables hasta la fecha, numerosos problemas de calidad evitan su fácil uso en aplicaciones biológicas. Estas incluyen la reducción en el peso molecular de los polímeros en la composición polimérica, la formación *de novo* de sustancias conjugadas (impurezas), la insolubilidad de los agentes biológicamente activos en disolventes utilizados normalmente en las composiciones poliméricas y su propensión a formar geles.

65

El peso molecular del material polimérico (por ejemplo, la matriz PLGA/PLA) es un importante factor en el diseño de formulaciones de liberación sostenida debido a que el perfil de liberación del fármaco y la velocidad de degradación del polímero dependen del peso molecular del polímero en el producto final. Se ha notificado que el peso molecular del PLGA disminuye en las microcápsulas (microesferas) que contienen compuestos básicos sencillos tales como

tioridazina y ketotifeno como bases libres durante su fabricación. Las microcápsulas fabricadas a partir de sus sales de pamoato no producen mucha reducción en el peso molecular (Maulding et al., 1986, Journal of Controlled Release, 3:103-117). La patente de EE.UU. 5.916.598 mostró que la presencia de alcohol bencílico, como el disolvente residual en las microesferas redujo la vida media del producto debido a la reducción del peso molecular y la patente proporciona un método para reducir el nivel de alcohol bencílico residual. Sin embargo, no es siempre posible eliminar los disolventes residuales de las microesferas.

La patente de EE.UU. 6.264.987 divulga que los compuestos nucleofílicos simples tales como risperidona, naltrexona, y oxibutinina pueden degradar PLGA de forma variable dependiendo del tiempo de reposo y de la temperatura de la solución de la fase dispersa. Los métodos proporcionados para minimizar la reducción en el peso molecular son, disminuir el tiempo de reposo de la solución de fármaco-polímero y la temperatura de reposo. Sin embargo, durante la fabricación de los productos de liberación sostenida, es muy difícil controlar el tiempo de reposo de las soluciones de fármaco-polímero. Asimismo, el tiempo de reposo y sus efectos pueden depender del tipo, la relación de comonomeros y la secuencia de comonomeros del polímero. Además, podría haber retrasos inesperados en la secuencia de procesamiento aséptica durante la fabricación de microesferas que podrían dar lugar a que la solución de fármaco-polímero completa no fuera utilizable. La disminución de la temperatura de reposo de la solución del fármaco-polímero podría dar como resultado la cristalización del fármaco o una solución de polímero fármaco viscosa. Las soluciones de mayor viscosidad son difíciles de esterilizar mediante y a menudo proporcionan un aumento de las partículas más grandes. Las partículas más grandes podrían poseer problemas de administración por jeringa.

Las directrices de la FDA e ICH sobre impurezas en nuevas sustancias de fármacos sugieren que ha de notificarse cualquier impureza (impureza individual) mayor de 0,1 %, y que ha de identificarse cualquier impureza mayor de 0,15 %. Si la impureza en un nuevo fármaco supera un nivel umbral dado, dichas impurezas deben ensayarse adecuadamente para determinar sus efectos adversos y seguridad biológica. Se entiende generalmente que no existen riesgos de seguridad si la impureza individual es menor de 0,5 % o la impureza total, que es la suma de las impurezas individuales, es menor del 2 % en, por ejemplo, la composición polimérica que contiene el péptido. Estos niveles definen los niveles umbral. De esta manera, el uso del péptido o la composición polimérica que contiene la proteína fármaco con una impureza individual mayor de 0,5 % una impureza total mayor del 2 % puede plantear problemas de conformidad con la normativa. A menudo, las sustancias o impurezas relacionadas con péptidos en formulaciones de microesferas, fabricadas mediante procesos actualmente conocidos, excede de lejos los niveles mayores que los niveles umbral. La extensión de la impureza depende del tipo de péptido. Disminuir el nivel de impureza a no más del umbral puede ser más sencillo y económico que proporcionar datos de seguridad.

La mayoría de los análogos de GnRH, particularmente los antagonistas, no están solubles libremente en agua o en otros disolventes y tienen propensión a formar geles incluso a bajas concentraciones (Ref: J. Med. Chem., 2001, 44, 453-467). Las formulaciones de liberación sostenida requieren normalmente concentraciones muy elevadas de los análogos disueltos en pequeños volúmenes de agua o algunos otros disolventes(s) adecuados. La solubilidad relativamente baja de los análogos de GnRH y su propensión dependiente de la concentración a formar geles en disolventes acuosos u otros disolventes limita mucho su uso en formulaciones de liberación sostenida. Además, a fin de preparar formulaciones de liberación sostenida estériles, es deseable esterilizar mediante filtración la solución del fármaco y la matriz polimérica (tanto por separado como mediante una solución combinada) más bien que recurrir a técnicas de esterilización tales como calor, vapor, radiación gamma y similares.

Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica anterior de desarrollar composiciones de fármacos poliméricos y métodos para las mismas que no susciten riesgos de calidad asociados con la reducción del peso molecular de los polímeros en la composición polimérica, impurezas, y solubilidad y gelificación de los agentes biológicamente activos utilizados en las composiciones.

50 Sumario

La presente invención se define en las reivindicaciones.

La materia sujeto que no está abarcada por el alcance de las reivindicaciones no forma parte de la invención actualmente reivindicada.

Se ha descubierto ahora que es posible obtener composiciones poliméricas que resuelvan los riesgos de calidad anteriormente descritos poseídos por las composiciones de la técnica anterior.

Específicamente, es ahora posible reducir o eliminar la reducción del peso molecular de un polímero, que está producida por una sustancia nucleofílica capaz de catalizar la escisión del enlace éster del polímero en la composición polimérica, incluyendo una pequeña cantidad de un aditivo ácido como parte de la composición polimérica. En particular, si una pequeña cantidad de ácidos de pKa bajo tales como ácido láctico, ácido glicólico o ácidos oligoméricos se incorporan en la solución de polímero-fármaco, puede reducirse o eliminarse considerablemente la reducción del peso molecular del polímero.

Se hace posible también ahora minimizar o eliminar los conjugados de polímeros peptídicos (impurezas) en las

composiciones poliméricas realizando determinadas manipulaciones durante el proceso de preparación de la composición polimérica, es decir, seleccionando un polímero adecuado que tiene un número de ácido entre 10 y 40 o una relación molar adecuada de diferentes monómeros en un copolímero y/o añadiendo uno o más ácidos de pKa bajo a la composición polimérica.

Se ha descubierto también en el presente documento que se pueden obtener soluciones estables que contienen análogos de GnRH al menos a niveles usualmente utilizados en las composiciones poliméricas sin los problemas de solubilidad y/o gelificación asociados utilizando un análogo de GnRH criodesecado y al menos un disolvente en el que se disuelve el análogo de GnRH como los componentes de la composición polimérica.

De acuerdo con ello, en un aspecto que se refiere a la reducción del peso molecular del polímero, se describen en el presente documento las composiciones poliméricas y los métodos para preparar dichas composiciones. La composición puede tener un polímero biocompatible y biodegradable (por ejemplo, poli(ácido d,l-láctico), poli(ácido 1-láctico), poli(ácido glicólico) o copolímeros de estos monómeros), al menos un ingrediente nucleofílico capaz de escindir enlaces éster del polímero y producir una reducción del peso molecular del polímero, y una baja cantidad de un aditivo ácido. La sustancia nucleofílica puede ser un disolvente (por ejemplo, metanol, propanol, isopropanol, terc-butanol o alcohol bencílico) o un compuesto tal como un péptido, ketotifeno tioridazina, olanzapina, risperidona, oxibutinina, naltrexona, octreotida, leuprólida, ornitida o Woc4D o una de sus sales farmacéuticamente aceptables. El aditivo ácido puede ser ácido láctico, ácido glicólico, ácido acético, ácido glicérico, ácido benzoico, ácido propanoico u oligómeros de ácido láctico terminados en carboxi, oligómeros de ácido glicólico terminados en carboxi, individualmente o una combinación de estos ácidos. Se puede usar en una cantidad de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 50 % con respecto a la cantidad del polímero en la composición. Debido a la presencia de dicho aditivo ácido en la composición polimérica, el polímero de la composición es menos susceptible a la reducción del peso molecular en comparación con la composición sin el aditivo ácido.

En otro aspecto, en el presente documento se describe una composición para una formulación en fase dispersa que tiene un análogo de GnRH, y un aditivo ácido de tal manera que el análogo de GnRH sigue estando en forma soluble y/o es resistente a la gelificación. También se describe un método para aumentar la solubilidad de un nivel elevado de un análogo de GnRH en un polímero que contiene una fase dispersa. Esto implica dispensar un elevado nivel del análogo de GnRH, añadiendo un primer disolvente orgánico al análogo de GnRH para formar una primera mezcla orgánica, disolviendo una cantidad de polímero en un segundo disolvente orgánico para formar una segunda mezcla orgánica, mezclar la primera y la segunda mezclas orgánicas para formar la fase dispersa, y añadir una cantidad de un aditivo ácido a la fase dispersa. La cantidad del aditivo ácido en la fase dispersa debe ser suficiente para aumentar la solubilidad del elevado nivel del análogo de GnRH en la fase dispersa sin afectar las características de liberación del soluto de cualquier soluto que transporta las microesferas preparadas procedentes de la fase dispersa.

En otro aspecto más, en el presente documento también se describen métodos para suprimir la secreción de gonadotropinas o esteroides en un mamífero, administrando una cantidad eficaz de una composición polimérica de un análogo de GnRH que se prepara más soluble y/o resistente a la gelificación de acuerdo a la presente divulgación, junto con un transportador y/o diluyente farmacéuticamente aceptable. Esto incluye la descripción de métodos para el tratamiento de patologías dependientes de esteroides o relacionadas con hormonas. Las composiciones poliméricas descritas en el presente documento pueden administrarse a mamíferos por vía subcutánea, intramuscular, mediante administración intravenosa, intranasal, intravaginal o intrarrectal para conseguir los efectos deseados, tales como el desencadenamiento de la supresión reversible de la actividad gonadal, en particular, la supresión reversible de las testosteronas. Las dosificaciones eficaces pueden variar con la forma de administración y con la especie concreta del mamífero que se esté tratando.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un histograma que muestra la reducción del peso molecular del PLGA en blanco y leuprólida que contienen DP almacenada a 25 °C durante 24 horas.

La Figura 2 es un histograma que muestra la reducción del peso molecular del PLGA en blanco y leuprólida que contiene DP almacenada a 40 °C durante 24 horas.

La Figura 3 es un histograma que muestra la reducción del PLGA en blanco y octreotida que contiene una DP almacenada a 25 °C durante 24 horas.

La Figura 4 es un histograma que muestra la reducción del PLGA en blanco y octreotida que contiene una DP almacenada a 40 °C durante 24 horas.

La Figura 5 muestra la relación entre la reducción en el peso molecular y la formación de sustancia relacionada en la DP de leuprólida.

La Figura 6 muestra la relación entre la reducción en el peso molecular y la formación de sustancia relacionada en la DP de octreotida.

La Figura 7 muestra el cromatograma de HPLC del extracto de octreotida con identidad de picos.

La Figura 8 es una gráfica que muestra el efecto del peso molecular del polímero sobre el nivel de las sustancias relacionadas.

La Figura 9 es una gráfica que muestra el efecto de la carga diana sobre la cantidad de sustancias liberadas

formadas.

La Figura 10 es una gráfica que muestra el efecto del porcentaje de glicólido en el polímero sobre la formación de las sustancias relacionadas.

5 La Figura 11 es una gráfica que muestra la relación entre el número de ácido y el porcentaje de impurezas para la microesferas preparadas a partir de PLGA 50:50 que tienen una carga diana del 10-12 % (Figura 11 A) y de otros polímeros que tienen una carga diana del 10-13 % (Figura 11B).

La Figura 12 es un histograma que muestra el efecto de aditivos ácidos en la fase dispersa sobre la formación de sustancias relacionadas. Las Figuras 13 A-C son gráficas que muestran la formación de sustancias relacionadas durante la liberación in vitro de fármacos peptídicos a través de microesferas.

10 La Figura 14 muestra el nivel de octreotida en suero inyectado con microesferas de octreotida (lotes de microesferas GC091903, GC091203, GC091503, GC091703 y GC091603) que no contienen impurezas detectables.

La Figura 15 muestra el porcentaje de aumento en el peso corporal en comparación con el tiempo cuando reciben las microesferas de octreotida (lotes de microesferas GC091203, GC091503, GC091603, GC091703 y GC091903) que no contienen impurezas detectables. El control indica el peso corporal de las ratas que recibieron solo el diluyente.

La Figura 16 es el cromatograma HPLC del extracto procedente de una microesfera RG503H, TV061297.

La Figura 17 muestra los niveles de leuprólida y testosterona en suero en pacientes de cáncer de próstata a los que se administró microesferas de leuprólida de acuerdo con un ejemplo descrito en el presente documento. El peso molecular (Mw 14420) del polímero en estas microesferas de leuprólida permaneció casi igual que el peso molecular (Mw 14321) del polímero bruto utilizado para la preparación de microesferas.

La Figura 18 es una gráfica que ilustra el efecto de una microesfera de ornitida, GJ082100 preparada de acuerdo con la presente divulgación, sobre la supresión de testosterona en un modelo de rata.

25 La figura 19 es una gráfica que ilustra el efecto de otra microesfera de ornitida, GJ082400 preparada de acuerdo con la presente divulgación, sobre la supresión de testosterona en un modelo de rata.

La Figura 20 muestra los niveles de ornitida en suero y testosterona en suero en ratas que recibieron microesferas de ornitida preparadas de 85:15 de PLGA (Mw 81 kDa; referidas en el presente documento GC102301) a 27 mg/Kg de peso corporal.

30 La Figura 21 muestra los niveles de ornitida en suero y testosterona en suero en ratas que recibieron microesferas de ornitida preparadas de PLA (Mw 30 kDa; referidas en el presente documento GC010402) a 27 mg/Kg de peso corporal.

Descripción detallada

35 La presente invención se define en las reivindicaciones. Se describen también en el presente documento composiciones que contienen polímeros y los métodos para preparar dichas composiciones para su uso en proporcionar una liberación en estado estacionario de fármacos durante periodos extendidos (liberación sostenida) en animales incluyendo seres humanos. Se describe también en el presente documento cómo eliminar o disminuir la reducción del peso molecular de un polímero (por ejemplo, PLGA o PLA) en la composición polimérica, cómo
40 eliminar o reducir la formación de conjugados poliméricos peptídicos en las composiciones poliméricas y cómo obtener soluciones estables que contengan análogos de GnRH al menos a los niveles normalmente usados en formulaciones de liberación sostenida sin la solubilidad asociada y/o los problemas de gelificación.

45 Las composiciones poliméricas pueden estar en la forma de soluciones poliméricas (denominadas en el presente documento como fase dispersa o formulaciones en fase dispersa). Las soluciones poliméricas o las formulaciones en fase dispersa descritas en el presente documento contienen necesariamente, entre otras cosas, un polímero y uno o más tipos de péptidos o compuestos nucleofílicos (por ejemplo, un agente o fármaco farmacéutico) y al menos un disolvente (por ejemplo, metanol, propanol, isopropanol, terc-butanol, alcohol bencílico, diclorometano y dimetilsulfóxido) en ellos.

50 Las composiciones poliméricas pueden estar en una o más de diferentes formas de liberación sostenida tales como implantes o microesferas o micropartículas o dichas otras resultantes del procesamiento de las soluciones poliméricas, descritas anteriormente, utilizando técnicas conocidas de los expertos en la materia. Estas técnicas incluyen, aunque no de forma limitativa, secado mediante pulverización, secado a vacío, formación de emulsión y evaporación del disolvente o extracción del disolvente y criodesecación. De esta manera, a pesar del uso de la frase "fase dispersa" a lo largo de la descripción en el presente documento, la idoneidad de las soluciones poliméricas no está de ninguna manera limitada solo a la dispersión en otra fase.

60 Un polímero añadido a la composición polimérica descrita en el presente documento puede ser cualquier polímero que se usa generalmente en la preparación de composiciones o formulaciones de liberación sostenida, y también retiene las características deseadas tales como la biodegradabilidad a nivel deseado, permite una mayor carga del fármaco, y en el caso de las microesferas preparadas a partir de emulsiones, potencia la eliminación del disolvente procedente de la fase dispersa o inhibe la migración del fármaco procedente de la fase dispersa en la fase continua. Las personas normalmente expertas en la materia conocen numerosos de los mencionados polímeros. Véase, por
65 ejemplo, las patentes de Estados Unidos números. 5.945.126, 5.407.609, 4.818.542, 4.767.628, 3.773.919 y 3.755.558. En la selección de un polímero particularmente adecuado para un sistema dado, se pueden considerar

numerosos factores a fin de producir un producto que tenga las características clínicas deseadas tales como la biodegradabilidad (por ejemplo, el perfil de liberación) y la biocompatibilidad.

5 El polímero puede ser biodegradable y biocompatible. Los ejemplos de materiales de la matriz polimérica incluyen poli(ácido glicólico), poli(ácido d,l-láctico), poli(ácido l-láctico), copolímeros de los anteriores, y similares. Otros polímeros u otros compuestos que se pueden utilizar como materiales de matriz son policaprolactona, copolímero de caprolactona con lactido y glicólido, copolímero de lactido y glicólido con polietilenglicol (denominado PLGA-PEG o PLA-PEG), y también polianhídrido. Diversos materiales de poli (lactido-co-glicólido) comercialmente disponibles (PLGA) o ácido poli (d,l-láctico) (PLA) se pueden usar en las microesferas descritas en el presente documento. Por
10 ejemplo, poli (ácido d,l-láctico-co-glicólico) está comercialmente disponible de Boehringer Ingelheim, Alemania, Alkermes, Inc, Cincinnati, OH Birmingham Polymers Inc., Birmingham, AL. Estos copolímeros están disponibles en un amplio intervalo de pesos moleculares y relaciones de ácido láctico a ácido glicólico. Cuando se usa el copolímero de poli (d,l-láctido-co-glicólido), es posible tener relaciones molares de lactido a glicólido de tal manera que un copolímero tenga solo un 25 % o menos de contenido de glicólido, aunque se pueden utilizar otras relaciones molares practicando la presente divulgación.
15

Los compuestos nucleofílicos, en el contexto descrito en el presente documento, son aquellos compuestos que son capaces de escindir enlaces éster (ataque nucleofílico) en el polímero o de producir la hidrólisis del polímero como resultado del ataque nucleofílico. La escisión del enlace éster obviamente da como resultado la fragmentación del
20 polímero y por tanto la reducción del peso molecular del material de partida del polímero en la formulación en fase dispersa. Cuando se lleva a la práctica la presente divulgación, ahora es posible disminuir la reducción en el peso molecular del polímero a pesar de la presencia de compuestos nucleofílicos en la formulación en fase dispersa.

Independientemente del polímero utilizado, la presencia de compuestos nucleofílicos en la fase dispersa ocasiona una reducción del peso molecular en ausencia de medidas tomadas para evitar dicha reducción. Se cree que el grupo nucleofílico (grupo que soporta pares solitarios de electrones) ataca el enlace éster del polímero. El ataque nucleofílico puede estar producido por grupos que contienen átomos de hidrógeno sustituibles (particularmente -SH, -NH₂, =NH, -OH) y aquellos que no contienen átomos de hidrógeno sustituibles (por ejemplo, aminas terciarias). Los
25 ejemplos de compuestos o agentes nucleofílicos que catalizan la hidrólisis del polímero en la fase dispersa incluyen, pero no de forma limitativa, metanol, etanol, propanol, trietilamina, ketotifeno tioridazina, risperidona, olanzapina, oxibutinina o naltrexona o un péptido nucleofílico o sus sales farmacéuticamente aceptables. El péptido puede ser, por ejemplo, octreotida, leuprólida, ornitida y/o Woc4D o una de sus sales.
30

La mayoría de los fármacos basados en polipéptidos contienen grupos nucleofílicos (-SH, -NH₂, =NH, =N-, u OH) y al menos determinados aminoácidos en los fármacos peptídicos son nucleófilos eficaces hacia un grupo éster del polímero. Lisina en un péptido, por ejemplo, es muy nucleofílico debido a la amina primaria. Los ejemplos de los otros nucleófilos son arginina, histidina, cistina (con la condición de que el grupo -SH esté libre y no esté formado por un enlace SS), serina o un aminoácido del péptido que tiene un grupo amino libre.
35

En general, la mayoría de fármacos polipeptídicos están disponibles como sus sales (principalmente como sales de acetato). Por ejemplo, leuprólida, ornitida y octreotida están disponibles como sales de acetato. Incluso aunque se cree que la molécula de acetato forma un par iónico con los grupos amino del polipéptido, se ha descubierto en el presente documento que los grupos nucleofílicos, incluso en forma de sal de acetato, catalizan la degradación del polímero (por ejemplo, PLGA). Además, Existen numerosos compuestos nucleofílicos diferentes que conoce un
40 experto en la técnica.
45

Principalmente, la presencia de compuestos peptídicos nucleofílicos en la fase dispersa conduce también a la formación de conjugados de polímeros peptídicos. De acuerdo con ello, existen dos problemas asociados con el ataque nucleofílico de los péptidos sobre el polímero en la solución polimérica; la reducción del peso molecular del polímero y la formación de aductos. El peso molecular de la matriz polimérica y la encapsulación del fármaco (carga del fármaco) son dos factores principales que afectan al comportamiento de liberación del producto. La pureza del fármaco es otro parámetro crítico para la calidad del producto. De este modo, es necesario controlar la reducción del peso molecular en la medida de lo posible para producir microesferas con muy poco nivel de impurezas.
50

Se ha descubierto ahora que la adición de una pequeña cantidad de un aditivo ácido a la formulación de la fase dispersa puede al menos proteger parcialmente el polímero en la formulación de la fase dispersa del ataque nucleofílico controlando de esta forma la reducción del peso molecular indeseable. Específicamente, un ácido con un pKa bajo en una pequeña cantidad puede disminuir la reducción del peso molecular del polímero (por ejemplo, poli-D,L-láctido-co-glicólido denominado también en el presente documento PLGA o poli-D,L-láctido denominado también en el presente documento PLA) inducido por dichos ataques nucleofílicos. Los ácidos de pKa bajo, como se usa en el contexto de la presente divulgación, son aquellos que tienen un valor del pKa de 5,0 o inferior. Los ácidos de pKa bajo, por ejemplo, son el ácido propanoico (pKa = 4,86), ácido acético glacial (pKa = 4,76), ácido benzoico (pKa = 4,19) o sus derivados, ácido glicólico (pKa = 3,83), ácido glicérico (pKa = 3,25), ácido láctico (pKa = 3,08), oligómeros de ácido láctico terminados en carboxi, ácido glicólico o la combinación de estos ácidos en cualquier
55 relación que tenga un peso molecular no mayor de 1000. En particular, los ácidos para prevenir la reducción del peso molecular del polímero pueden ser ácido glicólico, ácido láctico y ácidos oligoméricos.
60
65

Se ha descubierto también en el presente documento que el aditivo ácido en la fase dispersa redujo o eliminó la formación de conjugados entre el péptido y los fragmentos del polímero, cuyos conjugados (denominados también en el presente documento sustancias relacionadas con péptidos) se consideran como impurezas para los fines clínicos y por tanto son indeseables.

La cantidad de aditivo ácido en la fase dispersa es tal que es suficiente para conferir su papel protector frente al ataque nucleofílico del polímero en la fase dispersa. La cantidad de ácido en la solución polimérica puede ser del 5 % o superior. Las cantidades de aditivo ácido pueden variar desde aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 5 % en la fase dispersa. Las cantidades de aditivo ácido pueden ser también de aproximadamente 1,0 % a aproximadamente 10 % en la fase dispersa.

Como alternativa, la cantidad de aditivo ácido que se va a añadir a la fase dispersa puede determinarse también basándose en la cantidad de un agente nucleofílico o en términos de la cantidad de polímero en la fase dispersa, es decir, en términos de partes en peso del aditivo ácido por peso total del polímero o % de aditivo ácido por % de polímero en la fase dispersa. Si se basa en la cantidad y en la composición del agente nucleofílico tal como un disolvente, por ejemplo, metanol, la cantidad de ácido puede ser igual a la del agente nucleofílico disolvente. De esta forma, la reducción de MW inducida por el metanol u otro agente nucleofílico puede reducirse o eliminarse significativamente. La cantidad de ácido puede ser en equivalentes estequiométricos de los grupos nucleofílicos en la DP. La cantidad de ácido puede ser tan baja como aproximadamente 0,01 % o 2 % y tan alta como aproximadamente 50 % en peso del polímero. También el % de ácido, con respecto a o basado en el polímero de la fase dispersa puede ser de aproximadamente 2,0 % a aproximadamente 20 %. Si se utiliza el aditivo ácido es con el objetivo de reducir la reducción del peso molecular del polímero, la cantidad de ácido puede no ser del 100 % con respecto a la cantidad del polímero en la fase dispersa. Si el aditivo ácido que se está utilizando tiene el objetivo de evitar la gelificación (descrita adicionalmente en el presente documento), se pueden utilizar cantidades superiores de ácido. Por ejemplo, la cantidad de ácido puede ser del 100 % con respecto a la cantidad del polímero en la fase dispersa. En algunos casos, puede incluso exceder la cantidad del polímero.

El aditivo ácido puede consistir en solo un ácido de pKa bajo o más de uno de dichos ácidos. El aditivo ácido que se va a añadir a la formulación de la fase dispersa puede ser cualquiera en forma de solución o en forma de no solución tal como, una dispersión fina.

Puede prepararse una fase dispersa para fabricar microesferas como sigue: un compuesto nucleofílico (por ejemplo, un fármaco basado en un polipéptido o proteína que contiene grupo(s) nucleofílicos y una cantidad de un aditivo ácido se mezclaron tal cual, o estos dos se disolvieron o dispersaron en un disolvente orgánico adecuado (por ejemplo, metanol o DMSO) para formar una solución o suspensión orgánica. Por separado, se disolvió una cantidad de un material polimérico (por ejemplo, PLGA) en un disolvente orgánico adecuado (diclorometano o DCM) para formar una solución polimérica. El compuesto nucleofílico y/o, el agente que contiene la solución o suspensión y la solución polimérica se mezclan para formar la fase dispersa. Se conocen en la técnica los disolventes adecuados para preparar la fase dispersa que contiene el polímero. Véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos 5.945.126. La formación de la solución o suspensión del fármaco y de la solución polimérica por separado podría reducir el tiempo de disolución implicado en la preparación de la fase dispersa. Sin embargo, el fármaco y la solución polimérica podrían formarse disolviéndolas juntas.

Debe señalarse que la fase dispersa puede contener más de un compuesto o agente nucleofílico. Por ejemplo, en el caso de una fase dispersa que contiene una octreotida disuelta en metanol, la octreotida y el metanol pueden escindir los enlaces éster del polímero en la fase dispersa. En dichos casos, la reducción del peso molecular del polímero en la fase dispersa puede ser más grave que la fase dispersa que contiene solo un compuesto nucleofílico. Por otra parte, en la fase dispersa que contiene la octreotida disuelta en DMSO, solo la octreotida puede producir la escisión del enlace éster del polímero en la fase dispersa y, por lo tanto, la reducción del peso molecular del polímero en la fase dispersa es menos importante que en la fase dispersa que contiene más de un compuesto nucleofílico.

Aunque la reducción del peso molecular inducida por metanol se puede controlar en una extensión significativa añadiendo un ácido con un pKa bajo a la formulación de la fase dispersa, una cantidad mayor de metanol en la fase dispersa puede requerir una cantidad mayor de ácido con un pKa bajo. Demasiado ácido (>50 % en la DP) podría hacer que la fase dispersa fuera menos susceptible a la formación de gotículas en una fase continua acuosa para formar microesferas. Sin embargo, no existirá ningún problema en formar microesferas mediante un proceso O/O. Incluso en formar microesferas mediante un proceso O/W, se podría utilizar una cantidad comprometida (relación) de metanol y un ácido con un bajo pKa en la DP que reduzca considerablemente la reducción del MW del PLGA, y que no afecte también la formación de gotículas en la fase dispersa en una fase continua acuosa. Si se desea una cantidad mayor de ácidos fuertes en la fase dispersa para minimizar la reducción del peso molecular y/o la formación de sustancias relacionadas, se pueden usar disolventes alternativos tales como DMSO y dimetilacetamida (DMAc). DMSO y DMAc son disolventes biocompatibles. Estos disolventes son miscibles con DCM. Estos disolventes se pueden extraer fácilmente en la fase continua a la vez que se preparan las microesferas. La mayoría de fármacos basados en péptidos son muy solubles en estos disolventes. Una fase dispersa que contiene DMSO y DMAc puede

aceptar una cantidad mayor de ácidos fuertes sin ningún problema de incompatibilidad de fases.

Pero una vez que se forman las microesferas utilizando la formulación en fase dispersa, no se observa usualmente la reducción del MW del polímero. Esta se puede determinar ensayando el perfil de liberación. Los presentes inventores prepararon microesferas que contenían leuprólida y encontraron el mismo perfil de liberación desde las microesferas después de 6 meses de almacenamiento a 40 °C, dos años de almacenamiento a 25 °C.

Los fármacos pueden ser fármacos de péptidos o de proteínas, fármacos esteroideos, fármacos no esteroideos, y otros compuestos farmacéuticamente activos. Estos incluyen análogos de somatostatina, octreotida, lanreotida (LANREOTIDE™), Vapreotida, Woc-2A, Woc-2B, Woc-3A, Woc-3B, Woc-4, Woc-4D y Woc-8 y sus sales, compuestos con actividad LHRH, análogos de LHRH, ornitida, leuprólida, una hormona estimuladora del tiroides (TSH), una hormona luteneizante (LH), una hormona estimuladora del folículo (FSH) y sus derivados, factores de crecimiento tales como el péptido de liberación de la hormona del crecimiento (GHRP-1), GH-RH, calcitonina, factor de necrosis tumoral (TNF), interferón, eritropoyetina y otros. Los fármacos son fármacos peptídicos que incluyen una lanreotida, octreotida, leuprólida, ornitida, Woc4D.

La microencapsulación de péptidos en polímeros biodegradables y no biodegradables implica normalmente la formación de una fase dispersa (solución de polímero). La fase dispersa incluye el péptido de interés, el(los) polímero(s), y los disolventes del fármaco y el polímero. Si el disolvente del polímero y el disolvente del fármaco no son miscibles, la fase dispersa será una emulsión. Para los fármacos peptídicos, a menudo la fase dispersa es una emulsión de agua en aceite (W/O). No es necesario que el fármaco necesite disolverse en un disolvente, y el fármaco podría sencillamente dispersarse uniformemente como una suspensión sólida en una solución polimérica (sistema S/O). Con un disolvente o mezcla de disolventes adecuados, es posible preparar la fase dispersa como una solución homogénea (O) para los fármacos peptídicos. La emulsión de la fase dispersa en una fase continua, y la eliminación del disolvente de la fase dispersa da como resultado la formación de microesferas/microcápsulas. La fase continua podría ser una solución acuosa, o podría ser otra fase oleosa inmiscible con la fase dispersa. De esta manera, las microesferas/microcápsulas (que son partículas poliméricas sustancialmente esféricas que contienen agentes biológicamente activos) se puede formar mediante un sistema W/O/W, S/O/W, O/W, W/O/O, S/O/O, u O/O / (se pueden encontrar detalles de la preparación de microesferas/microcápsulas en el "Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology, Donald L. Wise (ed.), Marcel Dekker, 2000, Capítulo 16, Microsphere Preparation by Solvent Evaporation Method, por A. Atila Hincal y Sema Calis, páginas 329-343").

El fármaco peptídico u otro agente activo puede ser parte de una fase dispersa y las microesferas se preparan a partir de la fase dispersa. Antes de incorporar el fármaco o el agente activo a la fase dispersa, suele ser necesario disolver el agente activo en un disolvente. Los disolventes para el agente activo variarán por supuesto dependiendo de la naturaleza del agente. Los disolventes típicos que pueden utilizarse en la fase dispersa para disolver el agente activo incluyen agua, metanol, etanol, dimetil sulfoxido (DMSO), dimetil formamida, dimetil acetamida, dioxano, tetrahidrofurano (THF), acetonitrilo, cloruro de metileno, cloruro de etileno, tetracloruro de carbono, cloroformo, éteres de alquilo inferior tales como dietil éter y metil etil éter, hexano, ciclohexano, benceno, acetona, acetato de etilo, y similares. La selección de disolventes adecuados para un sistema dado estará comprendida en los conocimientos de los expertos en la técnica a la vista de la presente divulgación.

La fase dispersa puede ser una solución homogénea de un fármaco, tal como un fármaco peptídico y un polímero en una mezcla de disolventes. En el contexto de las microesferas que contienen péptidos, las impurezas se refieren a impurezas hidrófobas. Específicamente, las impurezas o las sustancias relacionadas con péptidos a las que se hace referencia en el presente documento son aductos entre el péptido (por ejemplo, octreotida) y los bloques de construcción del polímero (por ejemplo, monómeros y oligómeros de PLGA). El problema de la impureza es más aplicable, pero no totalmente único, al proceso de la microesfera en el que se usa una solución homogénea de un fármaco peptídico y un polímero. Se cree que una solución del péptido y el polímero juntos forman una condición favorable para dicha formación de aductos debido al íntimo contacto entre el fármaco y el polímero.

Las sustancias hidrófobas relacionadas pueden detectarse mediante el análisis de HPLC. En el contexto de las microesferas de octreotida, las sustancias hidrófobas relacionadas que se encuentran mediante HPLC son péptidos relacionados con octreotida formados por la reacción del grupo amino de la octreotida y el glicólido, monómeros o dímeros de láctido. Entre los aminoácidos en la octreotida, la lisina y el grupo amino terminal de "D-Phe" son responsables de estos compuestos. La serina puede inducir también alguna cantidad de impurezas. Se puede encontrar una cantidad mayor de sustancias relacionadas con el monómero y el dímero de glicólido en comparación con el monómero y el dímero de láctido. La mayoría de las sustancias relacionadas se forman con fragmentos de glicólidos. Se cree que el glicólido puede ser más reactivo a los grupos amino. Se puede observar la misma tendencia con otros análogos de somatostatina tales como WOC4D. Es posible que las microesferas con péptidos tengan un grupo amino reactivo (tal como lisina, o arginina, histidina y cistina). Además, un péptido con un grupo amino libre como grupo terminal puede inducir también la formación de sustancias relacionadas. Las impurezas en dichas microesferas pueden minimizarse a niveles aceptables o eliminarse completamente de manera sencilla con la aplicación de la presente divulgación. Específicamente, las impurezas en las microesferas de péptidos pueden minimizarse o eliminarse completamente seleccionando un polímero adecuado y una carga diana añadiendo ácidos a las formulaciones de microesferas. La carga diana es el contenido de fármaco teórico expresado como porcentaje

de la composición del fármaco en las microesferas, si todo el fármaco se encapsulara en la microesfera. Esta es la relación de porcentaje del fármaco a la cantidad total de fármaco y el polímero.

5 Deben tenerse presentes las siguientes consideraciones generales en todos los intentos de eliminar o reducir las impurezas en las microesferas: (i) Cuanto mayor sea el contenido de láctido en la microesfera de PLGA, menor será la cantidad de sustancias relacionadas y las microesferas preparadas a partir de un 100 % de PLA que tendrán menos cantidad de sustancias relacionadas; (ii) cuanto mayor sea el peso molecular del PLGA, mayor será la cantidad de sustancias relacionadas; mayor la carga diana en el PLGA, mayor será el nivel de las sustancias relacionadas; y (iii) cuanto menor sea el nivel de oligómeros extraíbles en el PLGA, mayor será el nivel de sustancias relacionadas; el PLGA hidrófobo (PLGA bloqueado en el extremo terminal) puede producir más sustancias relacionadas en comparación con el PLGA hidrófilo (grupo terminal del ácido libre).

15 Se debe señalar que, a pesar del contenido de láctido, el número de ácido de PLA o PLGA es otro factor en la etapa de selección del polímero que jugaría un papel en la minimización o eliminación de impurezas en las microesferas. El número de ácido del polímero es la cantidad en "mg" de hidróxido de potasio requerido para neutralizar el ácido presente en un gramo del polímero. Debido a que los polímeros de extremos bloqueados no tienen un grupo ácido libre, el número de ácido de dichos polímeros de extremos bloqueados será cero o poco importante. Los polímeros con grupo terminal ácido libre tendrán algún número de ácido. Los polímeros de peso molecular más bajo tendrán más grupos terminales ácidos, y tendrán mayores números de ácido. Los ácidos oligoméricos extraíbles en microesferas pueden contribuir también al número de ácido, mientras que no se afecte el peso molecular promedio en peso (Mw). Hablando de manera general, el número de ácido muestra una relación con el peso molecular, más hacia el peso molecular promedio en número. Se relacionan a continuación en la Tabla 1A algunos de los polímeros que tienen un grupo ácido libre utilizado comúnmente en el estudio de los inventores y sus números de ácido.

25

Tabla 1A. Número de ácido de algunos polímeros

Polímero y fuente	% de láctido	Lote n.º	Mw	Mn	N.º de ácido
R203H (BI)	100	86034	27325	20877	9,0
R202H (BI)	100	34038	12855	9592	14,1
100DL1AP (Alkermes)	100	00-141-25	5626	3131	29,5
100DL1AP (Alkermes)	100	00-141-21	7665	4136	21,5
DL-PLA iv 0,11 (BPI)	100	D99115	6477	5296	19,9
DL-PLA iv 0,22 (BPI)	100	D99120	16761	14212	9,6
8515 PLGA (BPI)	85	X97010	16692	10217	9,4
8515DL2A (Alkermes)	85	96-11-178	13924	9279	19,2
8515DL1AP (Alkermes)	85	99-120-190	9699	6664	13,6
PLGA7525H (BI)	75	76045	14279	9789	14,0
7525DL2A (Alkermes)	75	96-11-133	15289	10411	17,2
7525DL2A (Alkermes)	75	1151-514	12067	6049	14,8
RG504H (Alkermes)	50	34020	41077	30157	5,9
RG503H (Alkermes)	50	281334	35151	25739	6,5
RG503H (Alkermes)	50	241802	32987	24553	7,4
RG502H (Alkermes)	50	34035	7831	4544	29,3

30 El número de ácido de las composiciones de polímeros PLA o PLGA (por ejemplo, microesferas) puede variar de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 50, preferentemente de 5 a 40, más preferentemente de 10 a 35. Los polímeros con número de ácido 40-45 se pueden usar en formulaciones de liberación a corto plazo (por ejemplo, para la liberación en pocos días). La carga diana puede ser de hasta un 15 %. El número de ácido del polímero seleccionado para la microesfera puede estar por debajo de 14 si uno o más ácidos específicos también se incorporan (denominados en el presente documento aditivo(s) ácido(s)) en la microesfera durante el proceso de preparación de la microesfera. Una lista no exclusiva de ejemplos de aditivos ácidos son el ácido acético glacial, ácido láctico, ácido glicólico y ácido esteárico. Véase el texto anterior para los ejemplos de diferentes ácidos que se pueden usar en el presente contexto. De acuerdo con ello, dependiendo de la formulación de microesfera, un experto en la materia que tenga la presente divulgación en la mano sabría cómo seleccionar un polímero con un número de ácido adecuado y la carga de la diana de tal manera que la impureza total en las microesferas que contienen el péptido está en o por debajo del nivel aceptable. Si se añade ácido a la DP, entonces incluso se puede usar un PLGA50:50 de MW alto y al mismo tiempo se pueden reducir los niveles de impureza a niveles aceptables o eliminarse completamente.

Los números de ácido y la carga diana para conseguir una impureza total de menos de 2 % en las microesferas de PLGA pueden ser como sigue:

45 En las microesferas de PLGA50:50, se pueden conseguir niveles de impureza por debajo del 2 % utilizando un polímero que tenga un número de ácido mayor de 25 y teniendo también la carga diana de menos del 15 %. En las microesferas de PLGA75:25, se pueden conseguir niveles de impureza por debajo del 2 % utilizando un polímero que tenga un número de ácido mayor de 15 y una carga diana menor del 13 %. En las microesferas de PLGA85:15,

se pueden conseguir niveles de impureza por debajo del 2 % utilizando un polímero que tenga un número de ácido mayor de 12, más preferentemente mayor de 14 y la carga diana menor del 15 %.

5 Las microesferas preparadas de esta manera adoptando una o más de las etapas anteriores podrían producir además impurezas durante la liberación. Por ejemplo, el(los) presente(s) inventor(es) ha(n) realizado la siguiente información: Durante la liberación in vitro en tampón fosfato, a pH 7,2, la cantidad de estas impurezas aumentó y excedió a menudo del 50 %. El estudio in vivo confirmó también dicha observación. De esta manera, la incidencia de las impurezas depende también del pH del medio de liberación. La liberación del fármaco en un entorno ácido produce menos sustancias relacionadas en comparación con la liberación a pH neutro o alcalino. La formación de impurezas durante la liberación procedente del PLGA/PLA podría minimizarse incluyendo menos ácidos solubles en agua en la microesfera. Cuando estos ácidos permanecen largo tiempo en la microesfera, proporcionan un entorno de pH bajo que da como resultado menor cantidad de impurezas. Incluso con un entorno a pH bajo en el interior de las microesferas, el PLGA con un contenido mayor de glicólido puede producir impurezas. En esos casos, es posible un PLA o PLGA con un contenido de glicólido menor del 25 %. Si está presente un entorno ácido en el interior de las microesferas durante la liberación in vivo, por ejemplo, en un tejido de un animal o ser humano, las microesferas preparadas de acuerdo con la presente divulgación no pueden producir una cantidad significativa de sustancias relacionadas. El producto de microesferas puede ser uno formado utilizando PLGA 85:15 o PLGA 75:25.

20 Como ya se ha citado anteriormente, se describen también en el presente documento formulaciones poliméricas que contienen un análogo de GnRH que muestran una solubilidad aumentada del análogo y resistencia a la gelificación a pesar de la presencia de altos niveles del análogo en la formulación. En la técnica se conocen numerosos análogos de GnRH. Estos incluyen agonistas y antagonistas de GnRH. Entre ellas se incluyen, por ejemplo, ornitida, antida, cetorelix, ganirelix, abarelix, leuprólida, nafarelina, triptorelina, goserelina, buserelina, azalina y otros conocidos en la materia. Véanse también, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos con números 5.480.969 y 5.656.727 y Jiang et al., 2001, J. Med. Chem., 44:453-467.

30 Un alto nivel de análogo de GnRH significa una cantidad de análogo de GnRH que ya no es soluble en un disolvente, incluso si es soluble, la solución resultante es inestable y gelifica debido al alto nivel. El disolvente citado en esta definición es uno que se utilice normalmente para disolver un análogo de GnRH en la preparación de las formulaciones en fase dispersa. Los disolventes que se usan normalmente son agua, metanol, etanol, dimetil sulfóxido (DMSO), dimetil formamida, dimetil acetamida, dioxano, tetrahidrofurano (THF), cloruro de metileno, cloruro de etileno, tetracloruro de carbono, cloroformo, dietil éter, metil etil éter, hexano, ciclohexano, benceno, acetona y acetato de etilo. Sin embargo, La mayoría de los análogos de GnRH son solubles solo a determinadas concentraciones (a concentraciones muy bajas de antagonistas y concentraciones moderadas de agonistas) más allá de las cuales estos análogos poseen solubilidad y problemas de gelificación cuando se disuelven en estos disolventes. Por ejemplo, ornitida, que es antagonista de GnRH, es soluble en un medio acuoso solo a concentraciones menores de 5 mg/ml incluso a un pH menor de 5. Además, tiende a gelificar a una concentración baja y mientras que la concentración deseada de ornitida en una formulación para microesferas es al menos de 100 mg/ml. Una vez que la ornitida gelifica en la DP, puede ser muy difícil que vuelva a estar en solución. Leuprólida, que es un agonista de GnRH, es soluble a una concentración de 140 mg de leuprólida/ml de metanol sin problemas de gelificación. La concentración de 240 mg de leuprólida/ml de metanol, sin embargo, no forma una solución estable; la solución se vuelve turbia en unos pocos minutos a horas seguido por la gelificación de la solución turbia.

45 Cuando se lleva a la práctica la presente divulgación, sin embargo, una persona experta en la técnica puede superar los problemas asociados con el uso de altos niveles de análogos de GnRH en una formulación. Dichas formulaciones pueden utilizarse para producir microesferas, implantes y otros tipos de sistemas de suministro de fármacos de liberación sostenida. Además, dichas formulaciones pueden filtrarse utilizando microfiltros. De particular importancia, las personas expertas serían capaces de obtener formulaciones que contengan un análogo de GnRH esterilizable para uso en la fabricación de microesferas. Esto es, las formulaciones preparadas de acuerdo con la presente divulgación pueden filtrarse para obtener soluciones estériles. Por ejemplo, las soluciones preparadas de acuerdo con la presente divulgación pueden filtrarse utilizando un filtro de 0,2 µm.

55 De los análogos de GnRH, los antagonistas de GnRH son más difíciles de disolver en disolventes que los agonistas de GnRH. Como resultado, los antagonistas de GnRH pueden, pero no necesariamente, requerir más de una única etapa de procedimiento para conseguir una elevada concentración de antagonistas de GnRH en una solución transparente que sea completamente resistente a la gelificación, y pueden requerir también una cantidad mayor de ácido. Los antagonistas de GnRH pueden ser ornitida, cetorelix, ganirelix, y abarelix y los agonistas de GnRH pueden ser leuprólida, triptorelina, y goserelina. Ahora, en referencia a ornitida, un antagonista de GnRH, como ejemplo, se explican a continuación diversos enfoques para aumentar la solubilidad de la ornitida presente en disolventes a altos niveles (es decir, a los niveles normalmente utilizados para disolver un análogo de GnRH y para preparar formulaciones en fase dispersa).

65 A fin de preparar una forma de liberación sostenida para utilizar una matriz de poliéster tal como formulaciones en fase dispersa que contienen PLGA, se disolvió la ornitida en un disolvente o en una de sus mezclas con las que el polímero que contiene la solución es compatible o miscible. Pero, la formulación típica que tiene, por ejemplo,

cloruro de metileno, metanol, PLGA y ornitida no produce una solución trasparente estable. Esta forma una suspensión turbia que a menudo gelifica antes de completar la preparación de la formulación. Las microesferas preparadas procedentes de una solución turbia y gelificante no muestran características de liberación consistentes. La solución de gelificación supone un problema para esterilización por filtración en la fabricación aséptica de la formulación de microesferas. Por ejemplo, en un intento de obtener microesferas de ornitida, los presentes inventores prepararon una fase dispersa (DP) mediante la mezcla de una suspensión de ornitida-metanol y una solución de PLA o PLGA-DCM. La concentración de ornitida era aproximadamente de 1,7 %. La DP obtenida de esta manera era de parcialmente transparente a turbia y mostró un considerablemente aumento en la viscosidad incluso durante un corto periodo de almacenamiento (5-10 min) antes de dispersarse en una fase continua (CP, solución de PVA al 0,35 %) para preparar las microesferas. La DP no se pudo filtrar a través de un filtro de 0,22 micrómetros debido a características tales como la falta de transparencia y la tendencia a gelificar. Pero cuando se lleva a la práctica la presente divulgación, pueden superarse los problemas anteriores de insolubilidad y gelificación.

Puede mejorarse la estabilidad de la ornitida que contiene la DP frente a la gelificación añadiendo una cantidad suficiente de un ácido o una combinación de ácidos (un ácido o una combinación de ácidos se denomina también en el presente documento un aditivo ácido). Un experto en la materia sabría qué es una cantidad suficiente de un aditivo ácido. Por ejemplo, añadir ácido acético glacial a la DP puede aumentar la estabilidad. Se puede usar ácido láctico en vez de ácido acético glacial. El ácido láctico es higroscópico y está disponible como una solución al 85-90 % en agua. Debe señalarse que el contenido de agua en los ácidos en una cantidad muy grande puede producir la separación de fases. De acuerdo con ello, son posibles los ácidos anhidros o ácidos que contienen agua en menos del 5 %.

Otra etapa más para conseguir una fase dispersa transparente con la mínima cantidad requerida de ácido es siguiendo un determinado orden para añadir los componentes del disolvente a la ornitida. El orden de la adición puede ser como sigue: En primer lugar, se añadió ácido acético glacial a la ornitida para formar una solución. A esta solución, se añadió metanol o algún otro metanol adecuado; un disolvente que se usa normalmente para disolver un antagonista de GnRH o una parte de disolvente en la que el antagonista y el polímero son solubles (por ejemplo, DCM) se añade para formar una solución antes de añadir cualquier otro componente a esta solución. Después, se añade una parte de DCM u otro disolvente que se usa para disolver el polímero en la composición. Preparar la ornitida de esta manera no requiere calentar o entibiar a 40 °C para conseguir una solución trasparente y también esto evita una gelificación inicial. A continuación, se añade esta solución a una solución polimérica (por ejemplo, PLGA o PLA) y se mezcla bien. Como alternativa, se puede añadir una solución polimérica a la solución de ornitida en ácido. De esta forma, se puede obtener una DP transparente, estable, no gelificante y filtrable. Si se añade cualquier otro disolvente a la ornitida antes de añadir y disolver la ornitida en un ácido, la tendencia para formar el gen es mayor.

La ornitida tiene una mejor solubilidad en un tampón a pH bajo. Para conseguir una buena eficacia de incorporación del fármaco, la CP puede tamponarse a, por ejemplo, pH 7 a 9. La capacidad tamponante de la CP debe ser suficientemente alta para neutralizar el ácido añadido a la formulación de la DP sin que el pH disminuya preferentemente por debajo de 6,8, ciertamente no por debajo de 6. Esto puede seguirse como un método general para aumentar la eficacia de encapsulación en microesferas de diversos fármacos que son más solubles en ácido en soluciones básicas.

Otra observación era que la materia prima de ornitida preparada sin el proceso especial de criodesecación puede requerir una cantidad considerablemente alta de aditivo ácido, mayor del 20 %. La composición de la fase dispersa obtenida de esta manera puede no producir microesferas con un polímero de bajo MW con las características de liberación deseadas mediante un proceso O/W, y bajo esta situación, el método de preparar microesferas puede ser mediante un proceso O/O. Del mismo modo, la materia prima de ornitida que está sujeta a una criodesecación especial seguida por la adición de un aditivo ácido puede requerir también calentar a 40 °C, pero la cantidad de ácido necesaria es considerablemente baja y la composición de la fase dispersa obtenida de esta manera produce microesferas con las características de liberación deseadas. De esta manera, en el caso de antagonistas de GnRH, la cantidad de ácido requerida depende en alguna extensión de si el antagonista se criodesecó o no. Al añadir los componentes en un orden adecuado, sin embargo, no se requiere calentamiento. Tal como se ha mencionado anteriormente, como parte del orden, la ornitida debe primero disolverse en un ácido antes de añadir otros componentes tales como metanol para preparar una formulación en fase dispersa. De esta forma, la solución de ornitida u de otro antagonista puede conseguirse rápidamente sin ninguna gelificación inicial. Dará como resultado una solución muy estable que es fácilmente filtrable a través de un filtro de 0,2 m o más pequeño (0,1 m 0,5 m y así sucesivamente).

Los presentes inventores han preparado algunas formulaciones de microesferas comenzando con la ornitida criodesecada con TBA como el antagonista de GnRH. Los problemas de solubilidad y gelificación se evitaron tanto mediante adición de ácido a la DP como con el orden adecuado de añadir componentes para preparar la DP. Se prepararon microesferas de PLA o PLGA para conseguir formulaciones de liberación de 3 meses, 6 meses o 1 año.

Ahora, en referencia a leuprólida, un agonista de GnRH, como ejemplo, se explican el(los) enfoque(s) requerido(s) para aumentar la solubilidad de la leuprólida a altos niveles en disolventes (es decir, a los niveles normalmente utilizados para preparar formulaciones y microesferas). Leuprólida es más soluble que omitida en disolventes tales como agua o metanol. Sin embargo, para disolver un alto nivel de leuprólida puede seguirse uno o más de los

5 enfoques que aumentan la solubilidad descritos anteriormente con respecto a la omitida. En general, añadir una pequeña cantidad de un ácido (un ácido con un pKa bajo) a leuprólida o una leuprólida que contiene DP debe, en su mayor parte superar la solubilidad y los problemas de gelificación. De esta manera, cuando se utilizan agonistas criodesecados de GnRH como materia prima puede seguirse, aunque no es imprescindible, un determinado orden de adición de componentes para preparar la fase dispersa.

10 En el contexto de análogos de GnRH tales como leuprólida, una cantidad traza de anión polivalente en el material de partida de la leuprólida puede inducir también problemas de precipitación/gelificación/solubilidad de la leuprólida, independientemente del nivel de leuprólida, en fase dispersa o incluso en una solución de disolvente-leuprólida sencilla (metanol o DMSO). Dicha insolubilidad inducida por impurezas puede superarse eliminando aquellos iones que utilizan agentes tales como EDTA u otros agentes quelantes adecuados. El mismo procedimiento puede aplicarse a análogos de GnRH que son antagonistas.

15 Las formulaciones de liberación sostenida descritas en el presente documento pueden utilizarse para aplicaciones humanas, así como para animales no humanos, tales como perros, cerdos, monos, ratas, ratones, conejos y otros animales.

Ejemplo(s)

25 Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la presente invención. Los ejemplos siguientes se llevan a cabo utilizando técnicas normalizadas, que son bien conocidas y rutinarias para los expertos en la materia, excepto cuando se describen en detalle de otra forma. Los ejemplos son ilustrativos.

A. Reducción del peso molecular de la matriz de poliéster y su control en la fase dispersa preparada con metanol

30 Se llevó a cabo la reducción del peso molecular en el blanco y un péptido que contenía la fase dispersa preparada usando metanol como disolvente y el control de la reducción del peso molecular como se detalla a continuación:

1. Leuprólida como péptido en la fase dispersa

35 Se estudió el control de la reducción del peso molecular del PLGA en la fase dispersa (DP) con leuprólida o sin leuprólida (es decir, blanco). La DP es una solución de PLGA o PLA en disolventes. Se utilizaron los siguientes materiales y procedimientos para demostrar el control de la reducción del peso molecular del PLGA en la fase dispersa.

40 Acetato de leuprólida, Lote n.º FLEUP 9905 (Bachem, CA); RG503H, Lote n.º 290103 (Boehringer Ingelheim); RG503, Lote n.º 1002249 (Boehringer Ingelheim); Ácido láctico, Lote racémico n.º (Sigma) con un contenido de agua del 10 % o menor, conseguido mediante una solución de secado al 85-90 % en una cámara desecadora al vacío durante un día; ácido glicólico, 98 %, Calidad ultra, Lote n.º 118H3449 (Sigma); Oligómero, obtenido degradando RG502H Lote n.º 34035 (BI) mediante una temperatura y humedad superiores (este era un líquido de color amarillo oscuro viscoso y el peso molecular mediante GPC mostró un Mw= 533 y Mn= 393); dimetil sulfóxido (DMSO), Lote n.º CC939 (Burdick & Johnson); Dimetilacetamida (DMAc), Lote n.º CS08952AS (Sigma-Aldrich); Diclorometano (DCM), calidad HPLC, Lote n.º BZ200 (Burdick & Johnson); metanol (MeOH), calidad HPLC, Lote n.º CE075 (Burdick & Johnson); Tetrahidrofurano (THF), calidad HPLC, Lote n.º BW062, (Burdick & Johnson).

50 Procedimiento GPC: Las muestras de la DP se diluyeron con THF y se evaluaron para el peso molecular mediante el procedimiento GPC. Específicamente, la fase dispersa se diluyó adecuadamente con THF para conseguir la concentración de PLGA a aproximadamente 10 mg/ml. Leuprólida no es soluble en THF y precipitará. Incluso si la solución aparecía transparente, las muestras de GPC se filtraron siempre a través de un filtro con jeringa PTFE de 0,45 micrómetros antes del análisis. Se descartaron las primeras muestras de pocos ml.

55 Las columnas utilizadas en el procedimiento eran Waters, Styragel HR-2, 30 x 100 mm, Para MW 500-20.000, Lote n.º T11991, Pieza n.º WAT045865 y Waters, Styragel HR-4, 30 x 100 mm, Para MW 5000-500.000, Lote n.º T13211, Pieza n.º WAT045865 conectado en serie. La temperatura de las columnas era de 35 °C. Se usó THF (100 %) como fase móvil. El caudal era de 0,4 ml/min. El detector utilizado era un detector de índice de refracción eran patrones de poliestireno con una distribución de pesos moleculares estrecha procedentes de Polymer Laboratories Inc, Amherst, MA. Los patrones de poliestireno usados tenían un MW 283.300, MW 68.900, MW 21.000, MW 4920, y MW 1260.

65 Extracción del péptido procedente de la DP: Se extrajo el acetato de leuprólida de la fase dispersa tras diluir la DP con DCM. Hasta aproximadamente 50 mg de DP, se añadieron 2 ml de DCM y se añadieron 9 ml de tampón acetato 0,1 M, pH 4. Se mezcló el contenido durante aproximadamente 1 hora utilizando una rueda giratoria. A continuación se centrifugaron los contenidos para obtener una fase acuosa exenta de gotículas de DCM para el ensayo de HPLC.

Método de HPLC: La columna utilizada en el método de HPLC era Nucleosil C-18, 30 x 100 mm, 100 Å, 5 µm de Phenomenex. La fase móvil era (A) fosfato de potasio 0,025 M, pH 5,0 (B): Acetonitrilo. El gradiente era de 80 % 50 % A en 55 minutos. La temperatura de la columna era la temperatura ambiente y el caudal era de 1,5 ml/min. La detección del pico era a 220 nm.

5 La temperatura durante la formación de la DP era de 25-30 °C, es decir, 25-30 °C era la temperatura de disolución. Tras la formación, la DP se filtró, y se sometió a las preparaciones de microsferas o al almacenamiento a la temperatura adecuada.

10 Reducción del peso molecular en la DP blanco: Se prepararon las DP utilizando RG503H sin incluir acetato de leuprolida. Se añadieron a la DP diversos ácidos como se muestra en la Tabla 1B.

Tabla-1B: Formulación en fase dispersa del blanco con aditivos ácidos

	RG503H	DCM	MeOH	Ácido	% de ácido en DP*
RG503H + DCM + MeOH	0,68 g	3,10 g	0,87 g	0	N.A.
RG503H + DCM + MeOH + G.AA	0,68 g	3,10 g	0,87 g	G. ácido acético = 0,017 g	0,4
RG503H+DCM+MeOH +LA	0,68 g	3,10 g	0,87 g	Ácido láctico = 0,02 g	0,4
RG503H+DCM+MeOH +GA	0,68 g	3,10 g	0,87 g	Ácido glicólico = 0,017 g	0,4
RG503H + DCM + MeOH + Oligómero	0,68 g	3,10 g	0,87 g	Oligómero = 0,017 g	0,4

* Basándose en la relación en peso

15 La formulación de la DP se dividió en tres partes y una parte se diluyó en THF inmediatamente mezclando 0,25 g de la DP y 3,0 ml de THF. Se llevó a cabo la GPC en estas muestras. Las otras dos partes de la DP se colocaron en hornos de estabilidad a 25 °C y 40 °C en viales precintados. Tras 24 horas de incubación, se diluyeron las muestras de DP con THF y se evaluaron para determinar el peso molecular mediante GPC. Véase, la Tabla 2 para los valores del peso molecular de PLGA en la DP incubada a 25 °C o 40 °C durante 24 horas.

20

Tabla 2: Valores del Mw de PLGA en la DP

Componente de la DP	Mw inicial	25 °C-24 Horas		40 °C-24 Horas	
		Mw	% de cambio en el Mw	Mw	% de cambio en el Mw
RG503H+DCM+ MeOH	46585	38940	16,4	28476	38,9
RG503H+DCM+MeOH+G.AA	45638	38329	16,0	27209	40,4
PLGA+DCM+MeOH+LA	46128	41853	9,3	34361	25,5
PLGA+DCM+MeOH + GA	46053	42748	7,2	34902	24,2
PLGA+DCM+MeOH+Oligómero	46022	42283	8,1	32664	29,0

25 Se produjo una reducción en el Mw tras incubar la DP que consiste en RG503H, DCM y MeOH. La presencia de ácido láctico, ácido glicólico, y ácidos oligoméricos redujo la reducción en el Mw. En las condiciones experimentales, los ácidos con pKa muy bajo tales como ácido láctico (pKa 3,08) y ácido glicólico (pKa 3.83) fueron más eficaces en la prevención de la reducción de MW producida por metanol. Incluso con una fracción del ácido (menor que o igual a 1 % en moles del compuesto nucleofílico, metanol) en la fase dispersa, hubo influencia sobre la reducción del peso molecular.

30 Reducción del peso molecular en la DP de leuprolida: Se prepararon las DP con acetato de leuprolida y con diversos aditivos ácidos como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3: Formulación en fase dispersa que contiene leuprolida con aditivos ácidos

Componentes de la DP	RG503 H	DCM	MeOH	Acetato de leuprolida	Ácido	% de ácido en DP*	Relación molar de ácido/Ac. de leuprolida
RG503H+Acetato de leuprolida +DCM+ MeOH	0,68 g	3,10 g	0,87 g	0,17 g	0	N.A.	N.A.
RG503H+Acetato de leuprolida +DCM+ MeOH + G.AA	0,68 g	3,10 g	0,87 g	0,17 g	G. ácido acético = 0,017 g	0,4	2,1
RG503H+Acetato de leuprolida +DCM+ MeOH + LA	0,68 g	3,10 g	0,87 g	0,17 g	Ácido láctico = 0,020 g	0,4	1,41

RG503H+Acetato de leuprolida +DCM+ MeOH + GA	0,68 g	3,10 g	0,87 g	0,17 g	Ácido glicólico = 0,017 g	0,4	1,64
RG503H + Leuprolida Ac +DCM + MeOH + Oligómero	0,68 g	3,10 g	0,87 g	0,17 g	Oligómero = 0,017 g	0,4	0,32

* Basándose en la relación en peso

Las formulaciones de la DP se dividieron en tres partes. Se usó una parte para la determinación del peso molecular (GPC) y la pureza de la leuprolida (HPLC). Otras dos partes se colocaron en viales precintados a 25 °C y 40 °C en viales precintados. Después de 24 horas, se evaluaron el peso molecular del polímero y la pureza de la leuprolida.

5 En la Tabla 4 se muestran el peso molecular del polímero en diversas muestras de DP y el cambio tras el almacenamiento.

Tabla 4: Mw del polímero en la DP y el cambio

Componentes de la DP	Mw inicial	25 °C-24 Horas		40 °C-24 Horas	
		Mw	% de reducción en el Mw	Mw	% de reducción en el Mw
RG503H+Acetato de leuprolida + DCM+ MeOH	42538	14533	65,8	5301	87,5
RG503H+Acetato de leuprolida+DCM+MeOH+G.AA	44507	15700	64,7	5891	86,8
RG503H+Acetato de leuprolida+ DCM+MeOH +LA	44969	23022	48,8	9675	78,5
RG503H+Acetato de leuprolida+ DCM+MeOH + GA	44398	26361	40,6	10825	75,6
RG503H+Acetato de leuprolida+ DCM+MeOH+Oligómero	43918	20593	53,1	8430	80,8

10 Como se muestra en la Tabla 4, hubo una considerable reducción en el peso molecular del polímero en la DP que contenía la leuprolida. La presencia de ácido láctico, ácido glicólico, y ácidos oligoméricos redujo la extensión de la reducción del peso molecular, mucho más eficazmente en comparación con el ácido acético.

15 Se muestra en la Figura 1 una comparación del Mw del PLGA en blanco y la DP de leuprolida almacenada a 25 °C en la Figura 2 es una comparación de la reducción del Mw que se produjo en la DP almacenada a 40 °C. A 25 °C, los aditivos ácidos (ácido láctico, ácido glicólico, y los ácidos oligoméricos) fueron eficaces en la reducción del peso molecular de PLGA inducida por leuprolida. A 40 °C, la reducción del Mw de la leuprolida que contiene la DP era muy alta incluso en presencia del aditivo ácido. Utilizar una cantidad mayor de un ácido con un bajo pKa sería más eficaz en la prevención de la reducción del Mw.

20 **2. Octreótida como péptido en la fase dispersa**

Se estudió también el control de la reducción del peso molecular del PLGA en la DP con octreotida o sin esta (es decir, el blanco). Acetato de octreotida es un péptido que tiene dos grupos amino libres, D-Phe (1^{er} lugar) y lisina (5^o lugar). La DP es una solución de PLGA o PLA en disolventes. Los siguientes materiales y procedimientos se utilizaron para demostrar el control de la reducción de peso molecular de PLGA en una fase dispersa con octreotida.

30 El acetato de octreotida procedente de Polypeptide Laboratories, Lote n.º PPL-OCT9901R; RG503H, Lote n.º 290103 (Boehringer Ingelheim); RG503, Lote n.º 1002249 (Boehringer Ingelheim); Ácido láctico, Lote racémico n.º (Sigma) con un contenido de agua del 10 % o menor, conseguido mediante una solución de secado al 85-90 % en una cámara desecadora al vacío durante un día; ácido glicólico, 98 %, Calidad ultra, Lote n.º 118H3449 (Sigma); Oligómero, obtenido degradando RG502H Lote n.º 34035 (BI) mediante una temperatura y humedad superiores (este era un líquido de color amarillo oscuro viscoso y el peso molecular mediante GPC mostró un Mw= 533 y Mn= 393); dimetil sulfóxido (DMSO), Lote n.º CC939 (Burdick & Johnson); Dimetilacetamida (DMAc), Lote n.º CS08952AS (Sigma-Aldrich); Diclorometano (DCM), calidad HPLC, Lote n.º BZ200 (Burdick & Johnson); metanol (MeOH), calidad HPLC, Lote n.º CE075 (Burdick & Johnson); Tetrahidrofurano (THF), calidad HPLC, Lote n.º BW062, (Burdick & Johnson).

40 Procedimiento GPC, las condiciones y la extracción peptídica de la DP son iguales para el ejemplo de octreotida que los utilizados para el anterior ejemplo de la leuprolida.

Método de HPLC: La columna utilizada era una C-18 Nucleosil, 30 x 100 mm, 100 Å, 5 µm de Phenomenex y la temperatura de la columna era la ambiente. La fase móvil era (A) agua-0,1 % de TFA, (B) Acetonitrilo-0,1 % de TFA.

El gradiente era de 20 % de B a 60 % de A en 25 minutos. El caudal era de 1,5 ml/min. La detección de la longitud de onda del pico era de 220 nm.

- 5 Reducción del peso molecular en la fase dispersa del blanco: Se prepararon las fases dispersas utilizando RG503H sin incluir acetato de octreotida. Se añadieron a la DP diversos ácidos como se muestra en la Tabla 5.

Tabla -5: Formulación en fase dispersa del blanco con aditivos ácidos

Componentes de la DP	RG503H	DCM	MeOH	Ácido	% de ácido en la DP
PLGA+DCM+ MeOH	0,77 g	3,71 g	0,87 g	0	N.A.
PLGA+DCM+Me OH +G.AA	0,77 g	3,71 g	0,87 g	G. ácido acético = 0,037 g	0,7
PLGA+DCM+Me OH +G.AA+Pam.A	0,77 g	3,71 g	0,87 g	G. ácido acético = 0,073 g Ácido pamoico = 0.037 g	1,5, 0,7,
PLGA+DCM+Me OH + LA	0,77 g	3,71 g	0,87 g	Ácido láctico = 0,044 g	0,7
PLGA+DCM+Me OH+GA	0,77 g	3,71 g	0,87 g	Ácido glicólico = 0,037 g	0,7
PLGA+DCM+Me OH+Oligómero	0,77 g	3,71 g	0,87 g	Oligómero = 0,037 g	0,7

- 10 La formulación de la DP se dividió en tres partes y una parte se diluyó en THF inmediatamente mezclando 0,25 g de la DP y 3 ml de THF. Se llevó a cabo la GPC en estas muestras. Las otras dos partes de la DP se colocaron en hornos de estabilidad a 25 °C y 40 °C en viales precintados. Tras 24 horas de incubación, se diluyeron las muestras de DP con THF y se evaluaron para determinar el peso molecular mediante GPC. Véase, la Tabla 6 para los valores del peso molecular de PLGA en la DP incubados a 25 °C o 40 °C durante 24 horas.

15 Tabla 6: Valores del Mw de PLGA en la DP

Componentes de la DP	Mw inicial	25 °C-24 Horas		40 °C-24 Horas	
		Mw	% de cambio en el Mw	Mw	% de cambio en el Mw
RG503H+DCM+ MeOH	51807	41448	20,0	28225	45,5
RG503H+DCM+MeOH+G.AA	49881	41787	16,2	27020	45,8
RG503H+DCM+MeOH+G.AA+PA	50739	40244	20,7	28914	43,0
PLGA+DCM+MeOH +LA	51692	47071	8,9	38111	26,3
PLGA+DCM+MeOH + GA	51269	46525	9,3	38393	25,1
PLGA+DCM+MeOH+Oligómero	53052	46389	12,6	35847	32,4

Como se muestra en la Tabla -6, el ácido láctico y el ácido glicólico proporcionaron una buena protección al PLGA contra la reducción en el peso molecular seguido por el ácido oligomérico.

- 20 Reducción del peso molecular en la DP que contiene octreotida: Se prepararon las fases dispersas con acetato de octreotida y con diversos aditivos ácidos como se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7: Formulación de fase dispersa que contiene acetato de octreotida con aditivos ácidos

Componentes de la DP	RG503 H	DCM	Acetato de octreotida	MeOH	Ácido	% de ácido en la DP
RG503H + acetato de octreotida +DCM + MeOH	0,77 g	3,71 g	0,096 g	0,87 g	0	N.A.
RG503H+ Acetato de octreotida +DCM+ MeOH + G.AA	0,77 g	3,71 g	0,096 g	0,87 g	G. ácido acético = 0,038, g	0,7
RG503H+ Acetato de octreotida+DCM+ MeOH + G.AA + Pam. A	0,77 g	3,71 g	0,096 g	0,87 g	G. ácido acético = 0,074 g ácido pamoico = 0,038 g	1,5, 0,7,
RG503H + acetato de octreotida +DCM+ MeOH + LA	0,77 g	3,71 g	0,096 g	0,87 g	ácido láctico = 0,045 g	=0,7
RG503H + Acetato de octreotida+DCM + MeOH + GA	0,77 g	3,71 g	0,096 g	0,87 g	Ácido glicólico = 0,038 g	=0,7
PLGA + Acetato de octreotida +DCM + MeOH + Oligómero	0,77 g	3,71 g	0,096 g	0,87 g	Oligómero = 0,038 g	=0,7

Nota: la relación molar de ácido al MeOH es igual a la que se muestra en la Tabla 5

- 25 Las formulaciones de la DP se dividieron en tres partes. Se usó una parte para la determinación del peso molecular mediante GPC y la pureza de la octreotida mediante HPLC. Las otras dos partes se colocaron a 25 °C y 40 °C en

viales precintados. Después de 24 horas, se evaluaron el peso molecular del polímero y la pureza de la octreotida. En la Tabla 8 se muestran el peso molecular del polímero en diversas muestras de DP y el cambio tras el almacenamiento.

5

Tabla 8: Valores del Mw de PLGA en la DP

Componentes de la DP	Mw inicial	25 °C-24 Horas		40 °C-24 Horas	
		Mw	% de cambio en el Mw	Mw	% de cambio en el Mw
RG503H + DCM + Octreotida+ MeOH	42512	14539	65,8	7085	83,3
RG503H + DCM + MeOH + Octreotida + G.AA	45061	16931	62,4	7222	84,0
RG503H + DCM + MeOH + Octreotida + G.AA + PA	47509	23952	49,6	10353	78,2
RG53H + DCM + MeOH + Octreotida + LA	51207	31317	38,8	14869	71,0
RG503H + DCM + MeOH + Octreotida + GA	49888	33026	34,8	16018	67,9
RG503H + DCM + MeOH Octreotida +Oligómero	50427	31594	37,4	16363	67,6

Como se muestra en la Tabla 8, se produjo una considerable reducción en el peso molecular del polímero en la DP que contenía la octreotida sin el(los) ácidos.

- 10 Se muestra en la Figura 4 una comparación del cambio del Mw del PLGA en blanco y la DP de la octreotida almacenada a 25 °C y la Figura 5 es una comparación del cambio del Mw del PLGA en blanco y la DP de la octreotida produjo la reducción del peso molecular en el PLGA, y la presencia de ácidos fuertes incluso en pequeñas cantidades controló la reducción del peso molecular. A 25 °C, los aditivos ácidos (ácido láctico, ácido glicólico, y los ácidos oligoméricos) ayudaron en la reducción del peso molecular de PLGA inducida por leuprólida. A 40 °C, la reducción del Mw del PLGA en la leuprólida que contiene la DP era muy alta incluso en presencia de los aditivos ácidos.

B. Reducción del peso molecular de la matriz de poliéster y su relación con la formación del aducto del polímero peptídico en la DP

20

La reducción del peso molecular de PLGA en la DP que contenía un péptido con grupo(s) nucleofílico(s) condujo al aumento proporcional en la formación de aductos entre el péptido y el material polimérico (denominado también en el presente documento sustancia relacionada o los conjugados). 1. DP de leuprólida

- 25 Se analizó la leuprólida extraída de la DP incubada mediante HPLC para determinar el contenido de aductos. Se observaron aductos múltiples procedentes de diferentes fragmentos de PLGA. Estos aductos se eluyeron después del pico de leuprólida. En la Tabla 9 se muestra el contenido de sustancia relacionada con la leuprólida en las muestras de DP incubadas.

30 Tabla 9: Contenido de sustancia relacionada con la leuprólida en las muestras de DP incubadas

Componentes de la DP	Inicial	25 °C durante 24 horas	40 °C durante 24 horas
RG503H + Leuprólida + DCM + MeOH	0	1,19	5,23
RG503H + Leuprólida + DCM + MeOH + G.AA	0,05	0,35	2,18
RG503H + Leup + DCM + MeOH + LA	0,05	0,15	0,63
RG503H + Leup + DCM + MeOH + GA	0,05	0,15	0,46
RG503H + Leup + DCM + MeOH + Oligomer	0,05	0,15	0,93

- 35 Aunque la DP que contiene el ácido acético glacial como aditivo ácido ralentizó la formación de la sustancia relacionada, la DP que contiene el ácido láctico o el ácido glicólico mostró una reducción considerable en la formación de la sustancia relacionada. Asimismo, se observó una relación evidente entre la reducción del peso molecular y la formación de sustancias relacionadas como se ilustra en la Figura 3. Específicamente, se observó un aumento exponencial en la formación de la sustancia relacionada al de la reducción del peso molecular.

2. Octreotida DP

- 40 La formación de impurezas debido al ataque nucleófilo de los péptidos de PLGA es otro problema, que afecta a la calidad de las microesferas que contienen el péptido. Se analizó el octreótido extraído de la DP incubada mediante HPLC para determinar el contenido de aductos. Se había demostrado anteriormente que estos aductos se eluyen después del pico de octeotrida, y que existirán múltiples aductos formados a partir de diferentes fragmentos de PLGA que interactúan con los dos grupos amino reactivos, el grupo terminal D-Phe y la lisina. Más adelante en el presente documento, estas impurezas hidrófobas se denominarán sustancias relacionadas con octreotida.

45

Las muestras de DP mostradas en la Tabla 7, incubadas a 25 °C y 40 °C, se analizaron para determinar el contenido de sustancias relacionadas, que se comparó con las muestras iniciales sin incubación. Los datos comparativos se

muestran en la Tabla 10 siguiente.

Tabla 10: Contenido de sustancias relacionadas con la octreotrida en las muestras de DP incubadas

Componentes de la DP	Inicial	25 °C durante 24 horas	40 °C durante 24 horas
RG503H + DCM + Octreotida+ MeOH	0	13,95	47,59
RG503H + DCM + MeOH + Octreotida + G.AA	0	3,04	23,30
RG503H + DCM + MeOH + Octreotida + G.AA + PA	0	0,95	8,10
RG53H + DCM + MeOH + Octreotida + LA	0	1,24	4,31
RG503H + DCM + MeOH + Octreotida + GA	0	0,99	2,68
RG503H + DCM + MeOH Octreotida +Oligómero	0	0,22	6,04

5 La Figura 6 muestra la relación entre la reducción del Mw en PLGA y la formación de la sustancia relacionada. Existe una relación entre la formación de las sustancias relacionadas y la reducción del peso molecular. La inclusión de ácidos de pKa bajo ayuda a reducir las sustancias relacionadas.

10 C. Microesferas preparadas a partir de la DP incubada con y sin un aditivo ácido

Como se muestra anteriormente, el peso molecular del PLGA y la pureza de la leuprólida se vieron afectadas por el almacenamiento de la DP a 25 °C.

15 Se muestra aquí el efecto del almacenamiento de la DP sobre la carga de fármaco y la eficacia de encapsulamiento del fármaco. Se prepararon dos fases dispersas. Véase, Tabla 6: Poco después de la preparación de la fase dispersa, se retiraron aproximadamente 0,125 g para hacer un seguimiento de la pureza de la leuprólida. La DP restante se colocó a 30 °C durante 16 horas (durante la noche) en un recipiente precintado. Después del almacenamiento, se retiró una parte pequeña de la DP para determinar el Mw del PLGA y la pureza de la leuprólida como se llevó a cabo inicialmente. La DP restante se sometió a las formulaciones de las microesferas.

Tabla 11: Formulaciones en fase dispersa para las microesferas de leuprólida

Componente	Leup DP	Leup DP + LA
RG503H	4,12 g	4,11 g
acetato de leuprólida,	0,99 g	0,99 g
DCM	18,93 g	18,74 g
MeOH	5,27 g	5,27 g
Ácido láctico	0	0,114 g
% de ácido láctico basado en el peso de RG503H	N.A.	2,7 %

25

Tabla 12: Propiedades de la DP antes y después del almacenamiento

Propiedad	Leup DP	Leup DP + LA
Mw inicial	46585	46128
Sustancias relacionadas con la leuprólida inicial	0	0
Mw después del almacenamiento	14326	28359
% de reducción en el Mw	69,2 %	38,5 %
Sustancias relacionadas con la leuprólida tras el almacenamiento	0,53	0

30 Como se muestra en la Tabla 12, ambas formulaciones de la DP mostraron un peso molecular más bajo para la PLGA pero la presencia de ácido láctico en la DP disminuyó la reducción del peso molecular, y evitó la formación de las sustancias relacionadas.

Se compararon las propiedades de las microesferas preparadas a partir de la DP almacenada respecto de la propiedad típica conseguida para una microesfera preparada a partir de DP no almacenada. Véase, Tabla 13.

Tabla 13: Propiedades de las microesferas

Propiedad	GJ040302 (MS preparada a partir de la "DP de leuprólida" almacenada)	GJ040902 (MS preparada a partir de la "DP de leuprólida con lote de MS típico LA")	Propiedad de un lote de MS típico
Carga de fármaco, %	5,6 ± 0,35 %	4.33 ± %	14-16
Eficacia de encapsulación del fármaco, %	31 %	24 %	78-89
Sustancias relacionadas con leuprólida, %:	6,04 ± 0,30 %	0	2-4 %
% del fármaco en la CP poco tiempo después de la formación de MS	14,7 %	17,7 %	~7 %
% de fármaco encontrado en la CP	50,9 %	58,2 %	~10 %
* Extracción del fármaco en tampón acetato			

5 La incorporación de ácido láctico eliminó la sustancia relacionada en las microesferas. La DP de leuprólida que no contiene ácido láctico mostró un 0,53 % de sustancia relacionada inicialmente, y aumentó hasta el 6,04 %. La formación de sustancias relacionadas fue gradual para las microesferas de leuprólida preparadas a partir de una DP reciente que no contiene ácido láctico (no se muestran los datos). Ácido láctico en la DP protegida con leuprólida
10 procedente de la formación de la sustancia relacionada durante el proceso completo de las microesferas.

D. Efecto del disolvente utilizado para preparar la dp sobre la reducción del peso molecular del polímero

15 Las formulaciones de DP, mostradas en la Tabla -14, se incubaron durante 24 horas a 25 °C y a 40 °C para observar el efecto de DMSO y DMAc sobre la reducción del peso molecular en comparación con el metanol. Una DP que contenía simplemente DCM y PGLA se incluyó también en el experimento a efectos comparativos.

Tabla -14: Composición de VP con diferentes disolventes

Código OP	RG503H	DCM	Otro disolvente
RG503H+DCM	0,85 g	3,87 g	0
RG503H+DCM+MeOH	0,85 g	3,87 g	MeOH: 1,12 g
RG503H+DCM+DMSO	0,85 g	3,87 g	DMSO: 1,12 g
RG503H+DCM+DMAc	0,85 g	3,87 g	DMAc: 1,12 g

20 Las muestras de DP se incubaron durante 24 horas a 40 °C en tubos precintados. El peso molecular del PLGA tras la incubación fue como se muestra en la Tabla 15.

Tabla 15: Mw y la reducción del Mw de PLGA tras la incubación - Efecto del disolvente

	Mw
RG503H+DCM	52257
RG503H+DCM+MeOH	25907
RG503H+DCM+DMSO	52150
RG503H+DCM+DMAc	52876

25 Como se muestra en la Tabla 15, el Mw de RG503H en el sistema DP exento de metanol permanece inalterado. La DP que contiene la leuprólida con DMSO en vez de metanol es el sistema adecuado para comparar el efecto de diversos ácidos sobre la prevención del ataque nucleofílico inducido por leuprólida de los enlaces éster del PLGA.

30 Se prepararon las muestras de DP relacionadas en la Tabla 16 y se incubaron a 25 y 40 °C durante 24 horas. Se realizó un seguimiento del peso molecular y de la impureza de leuprólida.

Tabla 16: Formulaciones de DP preparadas con disolvente DMSO

Componentes de la DP	RG503H	DCM	Acetato de Leup.	DMSO	Aditivo ácido	% de ácido basado en la DP total
RG503H+Leup. Ac. +DMSO	0,85 g	3,87 g	0	1,52 g	0	N.A.
RG503H+Ac.Leup.+ DMSO+G.AA-1	0,85 g	3,87 g	0,21 g	1,52 g	GAA: 0,022 g	0,35
RG503H+Ac.Leup.+ DMSO+G.AA-2	0,85 g	3,87 g	0,21 g	1,52 g	GAA: 0,044 g	0,70
RG503H+Ac.Leup.+ DMSO+LA-1	0,85 g	3,87 g	0,21 g	1,52 g	LA: 0,026 g	0,35
RG503H+Ac.Leup.+ DMSO+LA2	0,85 g	3,87 g	0,21 g	1,52 g	LA: 0,052 g	0,70
RG503H+Ac.Leup.+ DMSO+GA-1	0,85 g	3,87 g	0,21 g	1,52 g	GA: 0,022 g	0,35
RG503H+Ac.Leup.+ DMSO+GA-2	0,85 g	3,87 g	0,21 g	1,52 g	GA: 0,044 g	0,70
RG503H+Ac.Leup.+ DMSO+Oligómero-1	0,85 g	3,87 g	0,21 g	1,52 g	Oligómero: 0,0229	0,35
RG503H+Ac.Leup.+ DMSO+Oligómero-2	0,85 g	3,87 g	0,21 g	1,52 g	Oligómero: 0,0449	0,70

La Tabla 17 muestra los valores de Mw antes y después de la incubación de la DP y compara la pérdida de porcentaje en el Mw.

5

Tabla 17: Cambio del Mw tras el almacenamiento de DP de leuprólida que contiene DMSO

Componentes de la DP	Mw inicial	25 °C-24 Horas		40 °C-24 Horas	
		Mw	% de reducción en el Mw	Mw	% de reducción en el Mw
RG503H+Leup. Ac. + DMSO	44564	39155	12,1	23470	47,3
RG503H+Ac.Leup.+ DMSO+G.AA-1	45925	40724	11,3	28063	38,9
RG503H+Ac.Leup.+ DMSO+G.AA-2	47019	42045	10,6	27897	40,7
RG503H+Ac.Leup.+ DMSO+LA-1	46581	41816	10,2	32804	29,6
RG503H+Ac.Leup.+ DMSO+LA-2	46101	41515	9,9	32503	29,5
RG503H+Ac.Leup.+ DMSO+GA-1	46470	40435	13,0	24864	46,5
RG503H+Ac.Leup.+ DMSO+GA-1	47399	37954	19,9	23612	50,2
RG503H+Ac.Leup.+ DMSO+Oligómero-1	47080	41951	10,9	34281	27,2
RG503H+Ac.Leup.+ DMSO+Oligómero-2	47463	43196	9,0	35648	24,9

De esta manera, el almacenamiento de la DP a 25 °C produjo aproximadamente una reducción del 11 % en el Mw. Los aditivos ácidos mostraron muy poca o ninguna protección frente a la reducción del Mw. Es sorprendente encontrar que el ácido glicólico no proporciona ninguna protección frente a la reducción del peso molecular.

10

La Tabla 18 compara la reducción del peso molecular producida en la DP de leuprólida que contiene metanol a la que contiene DMSO

15

Tabla 18: Mw del polímero en la DP y el cambio

Componentes de la DP	Mw inicial	25 °C-24 Horas		40 °C-24 Horas	
		Mw	% de reducción en el Mw	Mw	% de reducción en el Mw
RG503H+Acetato de leuprólida + DCM+MeOH	42538	14533	65,8	5301	87,5
RG503H+Acetato de leuprólida + DCM+DMSO	44564	39155	12,1	23470	47,3
RG503H+Ac.Leup.+DCM+MeOH+G.AA	44507	15700	64,7	5891	86,8
RG503H+Ac.Leup.+DCM+DMSO+G.AA	45925	4	11,3	28063	38,9
RG503H+Ac.Leup.+ DCM+MeOH +LA	44969	23022	48,8	9675	78,5
RG503H+Ac.Leup.+ DCM+DMSO +LA	46581	41816	10,2	32804	29,6
RG503H+Ac.Leup.+ DCM+MeOH + GA	44398	26361	40,6	10825	75,6
RG503H+Ac.Leup.+ DCM+DMSO + GA	46470	4	13,0	24864	46,5
RG503H+Ac.Leup.+ DCM+MeOH+Oligómero	43918	20593	53,1	8430	80,8
RG503H+Ac.Leup.+ DCM+DMSO+Oligomer	47080	41951	10,9	34281	27,2

De esta manera, la reducción del Mw inducida por metanol fue mucho mayor en comparación con la reducción del Mw inducida por acetato de leuprólida.

5 Se siguieron también las muestras de DP para la formación de la sustancia relacionada. Tabla 19 compara la sustancia relacionada formada en la DP que contiene DMSO incubada durante 24 horas.

Tabla 19: Formación de la sustancia relacionada en la DP de leuprólida que contiene DMSO

	Inicial	25 °C durante 24 horas	40 °C durante 24 horas
RG503H + Ac.Leup. + DCM + DMSO	0	3,00	18,55
RG503H + Leuprólida + DCM + DMSO + G.AA-1	0	1,39	8,46
RG503H + Leuprólida + DCM + DMSO + G.AA-2	0	0,98	6,49
RG503H + Leup + DCM + DMSO + LA-1	0	0,34	1,80
RG503H + Leup + DCM + DMSO + LA-2	0	0	1,48
RG503H + Leup + DCM + DMSO + GA-1	0	0	0,56
RG503H + Leup + DCM + DMSO + GA-2	0	0	0,24
RG503H + Leup + DCM + DMSO + Oligómero-1	0	0,18	1,61
RG503H + Leup + DCM + DMSO + Oligómero-2	0	0,28	1,15

10 Como se muestra en la Tabla 19, La DP sin aditivo ácido produjo una cantidad mayor de la sustancia relacionada en presencia de DMSO. La reducción del Mw fue menor en la DP que contenía DMSO, debido a que la escisión del enlace éster fue solo mediante acetato de leuprólida. La escisión del enlace éster inducida por acetato de leuprólida podría estar asociada con la formación de la sustancia relacionada. El metanol puede estar compitiendo con el acetato de leuprólida por la escisión del enlace éster produciendo por tanto menos sustancia relacionada. Asimismo, existe una posibilidad de que el metanol puede estar convirtiendo posteriormente la sustancia relacionada con leuprólida en leuprólida. La presencia de una pequeña cantidad de ácido redujo notablemente la formación de sustancias relacionadas. No se observó relación entre la reducción en el Mw y la formación de péptido relacionado en presencia de f DMSO en la DP.

20 E. Microesferas con dp que tienen metanol o dmsol

Se prepararon microesferas de PLGA cargadas con acetato de leuprólida mediante un procedimiento de extracción del disolvente. En resumen, se disolvieron acetato de leuprólida (0,3 g) y ácido acético (0,15 g) tanto en MeOH (1,8 g) como en DMSO (1,8 g). A continuación se combinaron las soluciones con una solución que contenía polímero (2,7 g de RG503H) en DCM (9 g). Las muestras de DP preparadas de esta manera se almacenaron en recipientes precintados a 25 °C durante 24 horas.

30 Se prepararon las microesferas dispersando las formulaciones de la DP en una solución acuosa que contenía 0,35 % (p/vol) de poli(alcohol polivinílico) (fase continua (CP) utilizando un homogeneizador tal como un homogeneizador (Silverson Machines, Waterside Reino Unido). La suspensión de microesferas formada de esta manera se transfirió a un recipiente de eliminación de disolvente de 3 litros para completar la eliminación del disolvente. A continuación, el precipitado se filtró, se lavó y se secó durante la noche a temperatura ambiente.

35 Se prepararon dos lotes de microesferas que contenían leuprólida utilizando RG503H, con metanol) en la fase dispersa, y con DMSO en la fase dispersa. La DP que contenía el metanol se preparó mezclando una solución de 2,7 g de RG503H en 9 g de DCM, y una solución de 0,3 g de acetato de leuprólida (puro) en 0,15 g de ácido acético glacial y 1,8 g de metanol.

40 La DP que contenía el DMSO se preparó mezclando una solución de 2,7 g de RG503H en 9 g de DCM, y una solución de 0,3 g de acetato de leuprólida (puro) en 0,15 g de ácido acético glacial y 1,8 g de DMSO.

45 Las muestras de DP preparadas de esta manera se almacenaron en un recipiente precintado a 25 °C durante 24 horas. Se preparó el lote de microesferas BT040303 utilizando la DP que contiene metanol que se almacenó durante 24 horas, y se preparó el lote de microesferas utilizando la DP que contiene metanol que también se había almacenado durante 24 horas.

50 Se prepararon microesferas dispersando la DP en una CP de 1,5 litros que es una solución de PVA al 0,35 %. Se consiguió la dispersión utilizando un homogeneizador Silverson, agitando a 5000 RPM. Mientras se agitaba la CP, se administró la DP, exactamente por debajo de la cabeza del homogeneizador. La suspensión de microesferas formada de esta manera se transfirió a un biorreactor encamisado de 3 litros (Applikon) agitando a 800 RPM. Se calentó la suspensión a 40 °C con un barrido de aire para la eliminación completa de DCM. La suspensión se enfrió posteriormente a temperatura ambiente, se filtró, se lavó con abundante agua, y se secó durante la noche al vacío a temperatura ambiente. Las propiedades de los dos lotes de microesferas fueron como se muestra en la Tabla 20 siguiente.

55

Tabla 20 - Propiedades de las microesferas.

Propiedad	BT040303	GJ040303
Componentes en la DP	DCM, MeOH, Acetato de leuprólida, RG503H, Ácido acético glacial	DCM, DMSO, Acetato de leuprólida, RG503H, Ácido acético glacial
Carga diana del acetato de leuprólida en la microesfera	10 %	10 %
Contenido real de leuprólida en el ensayo	8,506 ± 0,002	9,093 ± 0,002
Eficacia de encapsulación del fármaco, %	85 %	91 %
% de sustancia relacionada en la microesfera	1,83±0,28	1,39±0,04
Peso molecular del polímero en la microesfera	Pm: 18983 Mn: 7771	Pm: 35789 Mn: 15690
% de Rendimiento	77 %	71 %
Densidad a granel g/ml	0,82	0,41
Nota: el peso molecular (Mw) del polímero bruto RG503H utilizado para los lotes era: 40812 y el Mn: 19491.		

Las microesferas preparadas con DMSO y metanol en la DP tuvieron buena eficacia de encapsulación del fármaco. La densidad a granel de la microesfera preparada con DMSO es mayor, debido probablemente a que el DMSO es un buen disolvente para el polímero, que no da lugar a que el polímero precipite en las gotículas de la DP.

Se prepararon ambos lotes de microesferas de una DP que contenía ácido acético glacial. Por tanto, la cantidad de sustancias relacionadas en la microesfera es comparativamente baja, incluso aunque estas microesferas se preparen con la DP almacenada (comparar con la Tabla 13).

F. Microesferas 1 de octreotida.

1. Preparación de las microesferas

Se prepararon microesferas de PLGA y PLA cargadas con acetato de octreotida mediante un procedimiento de extracción del disolvente. En resumen, se disolvió acetato de octreotida en metanol, y se combinó con una solución de polímero/cloruro de metileno. A continuación se dispersó la mezcla posterior de octreotida/polímero (fase dispersa) en una solución acuosa que contenía alcohol polivinílico al 0,35 % (p/vol.) (Fase continua (CP) utilizando un homogeneizador tal como un homogeneizador Silverson (Silverson Machines, Waterside Reino Unido). La suspensión de microesferas formada de esta manera se transfirió a un recipiente de eliminación de disolvente de 3 litros para completar la eliminación del disolvente. A continuación, el precipitado se filtró, se lavó y se secó durante la noche a temperatura ambiente.

Se prepararon diversas microesferas de octreotida a partir de una fase dispersa transparente que contenía el polímero, octreotida, cloruro de metileno (DCM) y metanol. Se obtuvo acetato de octreotida de Polypeptide Laboratories o Peninsula Lab. Se varió la concentración del polímero en los lotes para obtener un tamaño de partícula adecuado y también para obtener una carga del fármaco eficaz. Se aumentó la relación del metanol (MeOH) a DCM preparando a la vez lotes de carga de fármaco mayores para conseguir una fase dispersa transparente. La fase continua era una solución de PVA al 0,35 % en todas las preparaciones. En una preparación típica, se introdujo la CP en un vaso de precipitados y se agitó utilizando un homogeneizador Silverson (filtro emulsionante normalizado). A la CP en agitación, se añadió la fase dispersa exactamente por debajo de la cabeza Silverson utilizando una jeringuilla de laboratorio con una aguja doblada. Después de 30 s a 1 minuto de homogeneización, se transfirió toda la suspensión a un biorreactor Applikon de 3 litros para la eliminación del disolvente. La eliminación del disolvente de la microesfera se consiguió mediante la sustitución de la CP inicial con agua seguido por el calentamiento de la suspensión a 40 °C junto con un barrido de aire. Después de la eliminación del disolvente se recogieron las microesferas en un filtro de membrana, se lavaron y se secaron al vacío.

Se prepararon un tamaño de lote de 3g y superior mediante un proceso de flujo continuo. La fase dispersa y la CP se administraron en una mezcla en línea, mientras que se recogió la suspensión de microesferas con agitación en un biorreactor Applikon y se llevó a cabo la eliminación del disolvente como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos 5.945.126. Los parámetros de preparación de las microesferas de octreotida fueron como se resume en la Tabla 21.

Tabla -21: Parámetros de preparación de las microesferas de octreotida

Lote	Polímero	Relación L:G %	Mw	Componentes de la fase dispersa (g)			CP	Carga diana %	Velocidad agitación, RPM	Tamaño de lote, g	
				Polímero	Octreotida	DCM					MeOH
BT120798	RG503H	50:50	30.000	2,0	0,25	9,66	1,10	1500	11,1	5500	2,25
BT121198	RG502H	50:50	8.500	2,4	0,36	5,1	0,51	1500	13,0	5500	2,75
BT011599	RG503H	50:50	30.000	2,0	0,38	9,66	1,10	1500	16,0	6000	2,4
BT020999	RG503	50:50	32.000	2,22	0,28	9,66	1,10	1500	11,1	5500	2,5
BT021799	RG504H	50:50	41.000	1,78	0,22	9,0	0,9	1800	11	5500	2,0
MG090899	PLGA75:25H	75:25	14.000	1,74	0,26	8,3	2,1	1300	13,0	7000	2,0
MG091099	RG503H	50:50	30.000	1,74	0,26	8,3	0,83	1300	13,0	7000	2,0
MG092299*	RG503H	50:50	30.000	1,7	0,3	8,3	0,83	1300	15,0	7000	2,0
GJ032400	50-50DL2.5A	50:50	24.000	2,25	0,25	7,5	0,75	1500	10	7000	2,5
GJ032700	75-25DL2.5A	50:50	24.000	2,20	0,30	7,5	0,75	1500	12	6500	2,5
GJ032800	75-25DL3A	75:25	39.000	1,16	0,29	5,22	0,522	1000	20	6500	2,5
GJ033100	50-50DL2.5A	100:0	24.000	2,10	0,40	6,0	0,90	1200	16	6500	2,5
GJ040300	85:15DL2A	85:15	14.000	2,175	0,325	6,5	0,85	1300	13	6500	2,5
GJ040500	75:25DL2.5A	75:25	24.000	1,837	0,363	6,0	0,9	1200	16,5	6500	2,5
GJ042700	85:15DL2A	85:15	14.000	1,8	0,2	5,0	0,6	1000	10,0	6500	2,0
GJ050100	PLGA85:15	85:15	17.000	1,78	0,22	5,5	0,66	1100	11	6500	2,0
GJ050300	90:10 PLGA	90:10	6500	1,78	0,22	4,0	0,48	1000	11	6000	2,0
GJ050800	PLA iv 0.11	100:0	7000	1,78	0,22	3,8	0,45	950	11	6000	2,0
GJ050900	100DL2A	100:0	14.000	1,55	0,25	4,2	0,75	1000	14	6000	1,8
GJ051100	85:15 DL2A	85:15	14.000	1,53	0,27	4,5	0,72	1000	15	6000	1,8
GJ051600	RG502H	50:50	8.500	1,80	0,20	4,5	0,5	1000	10	6000	2,0
GC122001	7525DL2A	75:25	12.000	2,625	0,375	9,0	0,9	1500	12,5	6000	3,0

*CP es PVA al 0,35 % con tampón a pH 7,2

2. Aductos de péptido-polímero (o sustancias hidrófobas relacionadas) en las microesferas que contienen el fármaco de octreotida.

5 Se determinó el contenido del fármaco disolviendo las microesferas secas en DCM y extrayendo el fármaco en tampón acetato, pH 4,0. El extracto procedente de la mayoría de lotes de microesferas mostró impurezas hidrófobas (hidrófobas en comparación con la octreotida) en cantidad variable. Se encontró que la incubación de estas microesferas a una temperatura de 37 °C en tampón fosfato a pH 7,4 potenció estas impurezas, especialmente las procedentes de un polímero PLGA50:50 La estructura de las sustancias hidrófobas relacionadas se determinó mediante HPLC-EM/EM. Se analizó el extracto de octreotida procedente de las microesferas RG503H que se había
10 incubado a 37 °C durante dos semanas en tampón fosfato a pH 7,4. La Figura 7 muestra el cromatograma de HPLC del extracto de octreotida con identidad de picos. El cromatograma de HPLC del fármaco extraído mostró picos adicionales que aparecían después del pico de octreotida.

15 La Tabla 22 relaciona la estructura de las sustancias relacionadas. La mayoría de los picos son sustancias relacionadas formadas con un segmento de glicólido. Resulta evidente a partir de estos análisis que el PLGA con más contenido de glicólido produjo más impurezas. El nivel de impurezas totales que se encuentra en cada uno de los lotes (es decir, la suma de las sustancias relacionadas eluidas después del pico de octreotida) se relaciona en la Tabla 23.

20 Tabla 22: La estructura de las sustancias relacionadas identificadas en la Figura 7

N.º Pico, según HPLC (Véase, Fig. 1)	Estructura
1	H-D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-ol (Octreotida)
2	H-D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-[Lys+G]-Thr-Cys-Thr-ol
3a	H-D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-[Lys+G-G]-Thr-Cys-Thr-ol
3b	H-D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-[Lys+L]-Thr-Cys-Thr-ol
4	H-D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-[Lys+G-G-G]-Thr-Cys-Thr-ol
6	H-D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-[Lys+L-G]-Thr-Cys-Thr-ol
7	H-D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-[Lys+L-L]-Thr-Cys-Thr-ol
8	H-D-[Phe+G]-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-ol
9	H-D-[Phe+G]-Cys-Phe-D-Trp-[Lys+G]-Thr-Cys-Thr-ol
11	H-D-[Phe+G]-Cys-Phe-D-Trp-[Lys+G-G]-Thr-Cys-Thr-ol

Tabla 23. Porcentaje de sustancias relacionadas eluidas después del pico de octreotida en HPLC

Lote	Polímero	% de láctido	Mw (Aprox)	Carga diana %	% Impurezas totales	N.º ácido
BT021799	RG504H	50	41.000	11	7,91	5,9
BT020999	RG503	50	32.000	11,1	14,03	0,5
BT120798	RG503H	50	30.000	11,1	6,71	7,4
BT011599	RG503H	50	30.000	16,0	10,99	7,4
MG091099	RG503H	50	30.000	13,0	9,24	7,4
MG092299	RG503H	50	30.000	15,0	11,73	7,4
GJ042800	RG503H	50	30.000	11,1	7,21	7,4
GJ032400	50:50DL2.5A	50	24.000	10	5,88	15,2
GJ033100	50:50 DL2.5A	50	24.000	16	10,11	15,2
BT121198	RG502H	50	8.500	13,0	1,38	29,3
GJ051600	RG502H	50	8.500	10	0,92	29,3
GJ032800	75:25DL3A	75	39.000	20	11,38	6,7
GJ032700	75:25DL2.5A	75	24.000	12	7,98	11,0
GJ040500	75:25DL2.5A	75	24.000	16,5	8,35	11,0
GC122001	7525DL2A	75	12.000	12,5	1,76	14,8
MG090899	PLGA75:25H	75	14.000	13,0	2,87	14,0
GJ050100	PLGA85:15	85	17.000	11	3,73	9,4
GJ040300	85:15DL2A	85	14.000	13	0,65	19,2
GJ042700	85:15DL2A	85	14.000	10,0	0,1	19,2
GJ051100	85:15 DL2A	85	14.000	15	1,96	19,2
GJ050300	90:10 PLGA	90	6500	11	0,15	31,0
GJ050900	100DL2A	100	14.000	14	0,54	22,2
GJ050800	PLA iv 0.11	100	7000	11	0,23	19,9

3. Efecto del peso molecular de PLGA sobre las sustancias relacionadas en microesferas de octreotida

25 Se ha demostrado el efecto del peso molecular sobre la formación de sustancias relacionadas utilizando microesferas de octreotida con PLGA 50:50 y PLGA 75:25. Las cargas dianas de estos lotes fueron similares. Se observó una relación entre el peso molecular del polímero y el nivel de las sustancias relacionadas. Véase la Figura

8. Se encontraron más sustancias relacionadas en las microesferas preparadas a partir de polímeros de alto peso molecular.

4. Efecto de la carga diana sobre sustancias relacionadas en microesferas de octreotida

5 La carga diana con el peso molecular mostró una relación directa con la formación de sustancias relacionadas. Se prepararon lotes con tres PLGA con una carga diana variable. Se observó una relación evidente entre la cantidad de sustancias relacionadas formadas frente a la carga diana. En la Figura 9 se muestran los datos.

10 5. Efectos de la relación de comonomeros sobre las sustancias relacionadas

15 La relación de comonomeros tuvo una influencia muy significativa sobre la formación de sustancias relacionadas. Entre los polímeros ensayados, PLGA 50:50 mostró el máximo de sustancias relacionadas como se muestra en la Tabla-23 anterior. Comparando las sustancias relacionadas de los lotes preparados con polímeros de pesos moleculares similares, resulta evidente que el contenido de ácido glicólico aumentado en el polímero aumentó el nivel de sustancias relacionadas. Véase, la Figura 10.

6. Extracción con ácido y sustancias relacionadas

20 El efecto de la extracción con ácido sobre las sustancias relacionadas mostró una relación inversa (véanse los datos siguientes en la Tabla 24)

Tabla 24. Relación entre la extracción con ácido (% en moles) y las sustancias relacionadas (%)

Lote	Polímero, Mw y fabricante	Carga diana %	Sustancias extraíbles con ácido % en moles	Sustancias relacionadas, %
GJ050100	85:15 PLGA de BPI	11	0,0025	3,73
GJ042700	85:15 PLGA de Alkermes	10	0,01	0,1

25 Se determinaron las sustancias extraíbles con ácido en el polímero disolviendo la cantidad conocida del polímero en DCM, extrayendo las fracciones solubles en agua en agua, y valorando volumétricamente frente a un patrón de álcali.

7. Efecto del grupo terminal del polímero

30 Se preparó un lote de microesferas con un polímero bloqueado en su extremo. Incluso aunque no exista un grupo terminal de ácido libre en el polímero, puede haber inicialmente unos pocos grupos terminales ácidos o podría haber algunos grupos terminales ácidos adicionales formados tras el almacenamiento antes de la formulación de las microesferas y durante la formación de microesferas mediante la escisión del enlace éster. La comparación de polímeros con Mw similares con grupos terminales ácidos y grupos bloqueados terminales mostró que el polímero bloqueado terminalmente produjo más sustancias relacionadas que el polímero con grupos terminales ácidos que se muestra en la Tabla 25 siguiente.

Tabla -25: Efecto del grupo terminal sobre la formación de sustancias relacionadas

Polímero	Mw	Número de ácido	Carga diana %	Sustancias relacionadas, %	Lote
RG503	32.000	<1	11	14,06	BT020999
RG503H	30.000	7,4	11	6,71	BT120798

40 8. Efecto del número de ácido del polímero sobre la formación de sustancias relacionadas

45 El número de ácido del polímero está relacionado inversamente con la cantidad de impurezas en las microesferas. La Figura 11 muestra la relación entre el número de ácido y el porcentaje de impurezas para la microesferas preparadas a partir de PLGA 50:50 que tienen una carga diana del 10-12 % (Figura 11 A) y de otros polímeros que tienen una carga diana del 10-13 % (Figura 11B).

9. Formación de sustancias relacionadas durante las diversas etapas del proceso de preparación de microesferas

50 Se preparó el lote GJ042800 a partir de RG503H y se eliminaron partes de la suspensión de microesferas durante diversas etapas. Las microesferas se filtraron sobre un filtro de membrana de 1,2 micrómetros y se secaron al aire sobre el propio filtro. Las microesferas (parcialmente secas) se disolvieron en DCM y el fármaco se extrajo en tampón acetato. En la Tabla-26 siguiente se muestra el nivel de sustancias relacionadas que se encuentran en diversas etapas.

Tabla 26: Porcentaje de sustancias relacionadas que se encuentran durante diversas etapas de la formación de microesferas

Etapa de preparación	Tiempo para la formación de DP, min	% Sustancias relacionadas
Fase dispersa (antes de formar MS)	0	0,30
Poco después de la formación de MS	5	1,78
Después del intercambio con agua a TA	25	2,61
Tras rampa de calentamiento	74	4,55
30 minutos de eliminación de disolventes	104	6,02
60 minutos de eliminación de disolventes	134	6,58
Microesfera final	181	7,21
<i>Fase dispersa (almacenada a 40 °C durante 4 horas)</i>	240	2,64 o 5,07

5 Las sustancias relacionadas formadas procedían del proceso de preparación de microesferas. En la fase dispersa solo se encontró una pequeña cantidad de sustancias relacionadas (0,3 %). Poco tiempo después de que se formaran las microesferas, las sustancias relacionadas aumentaron al 1,78 %. Hubo un aumento en las sustancias relacionadas calentando la suspensión a 40 °C y durante la eliminación del disolvente se formaron más sustancias relacionadas. Almacenar la fase dispersa a 40 °C aumenta las sustancias relacionadas desde el 0,3 % al 2,86 % o más. Se estudiaron también los tiempos de retención y los niveles individuales de las sustancias relacionadas (no se muestran los datos).

10. Efecto de la adición de ácidos a la fase dispersa sobre la formación de sustancias relacionadas

15 A 1,5 mg de octreotida se añadieron 20 mg de PLGA/PLA y se disolvieron en 0,5 ml de DCM y 0,1 ml de metanol. A esto, se añadieron 10 mg de ácido acético glacial, trietilamina, 85 % de ácido láctico, ácido glicólico o ácido esteárico. Se colocaron las muestras a 40 °C durante un periodo de 24 horas y 48 horas, seguido de la adición a la muestra de 2 ml de DCM y se extrajo el fármaco en tampón acetato 0,1 M y se evaluó mediante HPLC. En la Tabla 27 se relacionan las muestras incluidas en el estudio.

20 En la Figura 12 se muestran las sustancias hidrófobas relacionadas que se encuentran en estas muestras después de un periodo de 24 y 40 horas. La elución de la muestra del control mostró sustancias que son impurezas (2,5 %) pero no las sustancias relacionadas, y unas pocas de aquellas impurezas se encontraron también en el patrón de octreotida. La presencia de RG503H aumentó las sustancias relacionadas a 4-7 %. Una repetición del estudio de RG503H mostró hasta un 18 % de sustancias relacionadas en 48 horas de incubación. La presencia de ácido láctico en el sistema RG503H redujo las sustancias relacionadas y las hizo comparables a las del control El ácido glicólico evitó también la formación de sustancias relacionadas en el sistema de la octreotida RG503H. El ácido acético y el ácido esteárico fueron menos eficaces que los ácidos láctico y glicólico en la reducción de la formación de las sustancias relacionadas en la mezcla de octreotida RG503H.

30 En el experimento en el que se incubaron RG503H y octeotrida en DCM/ metanol durante 24 y 48 horas, se añadió ácido láctico y la incubación continuó durante otras 24 horas. Se extrajo el fármaco mediante el procedimiento usual. Mediante este proceso, el ácido láctico no tiene ningún efecto en la reducción de las sustancias relacionadas ya que estas se produjeron ya en el sistema antes de la incorporación del ácido láctico. Esto muestra que la presencia de ácido láctico inicialmente en la fase dispersa evitó la cantidad de sustancias relacionadas. Sin embargo, la posterior adición no convertirá las sustancias relacionadas en el fármaco nativo. RG503 mostró un nivel de sustancias relacionadas muy alto después de 48 horas de incubación. Los poli(ácido láctico), PLA iv 0.11 y R203H y también PLGA 85:15 mostraron muy pocas sustancias relacionadas incluso menores que el control. La presencia de trietilamina produjo algunas impurezas, sin embargo, no muestra similitud con la sustancia relacionada debido al tiempo de retención. TEA con RG503H produjo una enorme cantidad de sustancias relacionadas con RG503H, y en una extensión menor con PLA iv 0.11. De esta manera, se ha demostrado que la adición de ácidos inicialmente en la fase dispersa reduce la cantidad de sustancias relacionadas.

Tabla 27. Estudio de cribado para evaluar las condiciones de sustancias relacionadas con octeotrida

n.º	Código	Composición	Nota
1	Control	Octreotida (1,5 mg) + DCM (0,5 ml) + MeOH (0,1 ml)	
2	Control + LA	Octreotida (1,5 mg) + DCM (0,5 ml) + MeOH (0,1 ml)+ 85 % de ácido láctico (10 ml)	
3	RG503H	RG503H (20 mg) + Octreotida (1,5 mg) + DCM (0,5 ml) + MeOH (0,1 ml)	

4	RG503H+LA	RG503H (20 mg) + Octreotida (1,5 mg) + DCM (0,5 ml) + MeOH (0,1 ml) + 85 % de ácido láctico (10 ml)	
5	RG503H+AA	RG503H (20 mg) + Octreotida (1,5 mg) + DCM (0,5 ml) + MeOH (0,1 ml) + Ácido acético glacial (10 ml)	
6	RG503H+GA	RG503H (20 mg) + Octreotida (1,5 mg) + DCM (0,5 ml) + MeOH (0,1 ml) + Ácido glicólico (10 mg)	II
7	RG503H+SA	RG503H (20 mg) + Octreotida (1,5 mg) + DCM (0,5 ml) + MeOH (0,1 ml) + Ácido esteárico (10 mg)	
8	SA	Octreotida (1,5 mg) + DCM (0,5 ml) + MeOH (0,1 ml) + Ácido esteárico (10 mg)	
9	RG503H-40+LA+40	RG503H (20 mg) + Octreotida (1,5 mg) + DCM (0,5 ml) + MeOH (0,1 ml) + 85 % de ácido láctico (10 ml)	III
10	RG503	RG503 (20 mg) + Octreotida (1,5 mg) + DCM (0,5 ml) + MeOH (0,1 ml)	
11	PIA 0.11	PIA IV 0,11 (20 mg) + Octreotida (1,5 mg) + DCM (0,5 ml) + MeOH (0,1 ml)	
12	PIA 0,11+TEA	PIA IV 0,11 (20 mg) + Octreotida (1,5 mg) + DCM (0,5 ml) + MeOH (0,1 ml) + Trietilamina (40 ml)	IV
13	85:15 PIGA	PIGA 85:15 (20 mg) + Octreotida (1,5 mg) + DCM (0,5 ml) + MeOH (0,1 ml)	
14	R203H	R203H (20 mg) + Octreotida (1,5 mg) + DCM (0,5 ml) + MeOH (0,1 ml)	
15	RG503H+TEA	RG503H (20 mg) + Octreotida (1,5 mg) + DCM (0,5 ml) + MeOH (0,1 ml) + Trietilamina (10 ml)	
16	TEA	Octreotida (1,5 mg) + DCM (0,5 ml) + MeOH (0,1 ml) + Trietilamina (10 ml)	
17	Policarbonato	Policarboxilato (20 mg) + Octreotida (1,5 mg) + DCM (0,5 ml) + MeOH (0,1 ml)	
18	Polisulfona	Polisulfona (20 mg) + Octreotida (1,5 mg) + DCM (0,5 ml) + MeOH (0,1 ml)	
<p>Nota: II: GA fue solamente parcialmente soluble en la fase dispersa incluso a 40 °C, III Al extracto preparado como el n.º 3, se añadieron 10 ml de ácido láctico al 85 % y se incubó adicionalmente a 40 °C durante 24 horas. IV: Cuatro veces la cantidad en n.º 16 y n.º 17, ya que el grupo terminal ácido del polímero es grande y neutralizará parte del TEA.</p>			

11. Formación del péptido relacionado con octreotida durante la incubación in vivo

5 Las microesferas analizadas se prepararon con RG503H (GJ091001), 8515DL1AP (GJ031401) y 100DL1AP (GJ012401). Se usaron como blanco microesferas sin octeotrida en el estudio. Las propiedades de las microesferas se muestran en la Tabla 28.

Tabla 28: Propiedades de las microesferas utilizadas para la incubación in vivo

	GC091001	GJ031401	GJ012401
Polímero	RG503H	8515DL1AP	100DL1AP
Número de ácido del polímero	7,4	13,6	21,5
Carga diana	11 %	11 %	10 %
Método para fabricar MS	Proceso O/W	Proceso O/W	Proceso O/W
Carga de fármaco	8,5 %	10,2 %	8,5 %

10 Estas microesferas se inyectaron en ratas por vía subcutánea y se recuperaron en un momento adecuado. En este ejemplo de trabajo, se suspendieron 100 a 250 microesferas en 0,3 a 0,5 ml de diluyente consistente en manitol al 6 %, carboximetilcelulosa al 0,5 % y Tween 80 al 0,1 % en agua. Se inyectó la suspensión en la región subcutánea de las ratas, en el sitio marcado con un marcador permanente, En un punto temporal adecuado, se sacrificaron las ratas, y las microesferas procedentes de los sitios de inyección se escindieron y se criodesecaron. Posteriormente,
 15 se disolvieron las partículas en una mezcla de 2 ml de dimetilsulfóxido y 2 ml de DCM, y se extrajo añadiendo 6 ml de tampón acetato 0,1 M a pH 4,0. Se evaluaron los extractos mediante HPLC para el fármaco puro y la sustancia relacionada, y se confirmaron mediante un espectrofotómetro de masas. El control (microesferas blancas) no muestra ningún pico mediante HPLC.

Los niveles de impurezas (aductos de fragmentos del polímero de octreotida) encontrados en las microesferas, recuperados del tejido de rata, fueron como se muestra en la Tabla 29 siguiente.

Tabla 29: Impurezas (sustancia relacionada) (% de impureza) procedente de las microesferas tras la incubación in vivo

Días	GC091001	GJ031401	GJ012401
14	30,1	12,5	8,6
22	46,2	17,1	7,4
30	52,9	21,7	10,0
41	52,9	24,1	12,6

Por separado, también se estudiaron microesferas preparadas a partir de polímeros muy similares, pero según el proceso O/O. Este conjunto incluye también la sandostatina LAR comercialmente disponible, y las microesferas del control preparadas a partir de PLA sin fármaco. Las propiedades de las microesferas son como se muestra en la Tabla 30 siguiente.

Tabla 30: Propiedades de las microesferas utilizadas para la incubación in vivo

	FR072402	FR062602	FR071002	Sandostatina LAR
Polímero	RG503H	8515DL1AP	100DLCO4 (otro nombre de 100DL1AP)	PLGA50:50-Glu
Número de ácido del polímero	7,4	13,6	25,3	Frecuencia no conocida
Carga diana	11 %	8 %	11 %	Frecuencia no conocida
Método para fabricar MS	O/O	O/O	O/O	Frecuencia no conocida
Carga de fármaco	10 %	7,4 %	9,2 %	Aprox. 5 %

Estas microesferas se inyectaron en tejido de rata y se recuperaron el día 14, 22, 32 y 40. En la Tabla 31 siguiente se muestra el perfil de impurezas. Las impurezas y los aductos de octeotrida con los fragmentos poliméricos evidenciados mediante HPLC y espectrometría de masas

Tabla 31: Impurezas (sustancia relacionada) procedentes de las microesferas tras la incubación in vivo (% impurezas)

Día	FR072402	FR062602	FR071002	Sandostatina LAR
14	15,5	8,8	4,6	36,3
22	26,0	16,1	7,8	40,4
32	39,8	22,5	13,0	55,1
40	49,7	24,8	11,8	55,3

12. Formación del péptido relacionado con octreotida durante la incubación in vitro

Para este ejemplo de trabajo, aproximadamente 100 mg de microesferas de octreotida se pesaron en un vial con tapón de rosca de 12-20 ml y se añadieron a los medios de liberación. Los medios de liberación eran tampón fosfato isotónico, pH 7,4, 7,0 u 6. El contenido se introdujo en un baño de agua con agitación a 37 °C. En cada punto temporal, el sobrenadante exento de microesferas se retiró cuidadosamente para el análisis de HPLC, y el medio completo se sustituyó con medio reciente. La liberación acumulativa de octreotida y la sustancia relacionada se representaron gráficamente frente al tiempo. A medida que procedió la incubación, aumentó también la sustancia relacionada liberada a partir de la microesfera. Sin embargo, las microesferas con 85 % de PLA y 100 % de PLA produjeron menos cantidad de sustancia relacionada. La diferencia era más pronunciada a pH bajo.

Se muestra en la Figura 13A el porcentaje de sustancia relacionada durante la liberación in vitro de octreotida a partir de PLGA 75:25 (MG090899), 50:50 (GJ033100 y GJ051600) 85:15 (GJ021501), y las microesferas de PLA a 37 °C en un tampón de fosfato isotónico. PLGA50:50 produjo impurezas hidrófobas a una velocidad más rápida. PLA produjo las impurezas a una velocidad más lenta. PLGA con 85 % y 75 % de láctido produjo impurezas a una velocidad mayor que PLA y menor que PLGA 50:50. Estos estudios de liberación se llevaron a cabo en tampón a pH 7,4 y el medio de liberación se sustituyó con frecuencia. Se llevó a cabo un estudio de liberación independiente en microesferas basadas en PLGA 50:50, PLGA 85:15 y PLA a pH 7. Se comparó la formación de sustancia relacionada en estas microesferas. A pH 7, hubo un aumento estacionario en la sustancia relacionada similar al modelo observado a pH 7,4, sin embargo, de menor magnitud. En la Figura 13B se muestra una comparación de la formación de sustancia relacionada durante la liberación in vitro de octreotida a partir de estas microesferas a 37 °C en un tampón fosfato isotónico a pH 7. En la Figura 13C se muestra una comparación de la formación de la sustancia relacionada durante la liberación in vitro de octreotida a partir de microesferas de PLGA 50:50, PLGA 85:15 y PLA a 37 °C en un tampón fosfato isotónico a pH 6. A pH 6, hubo una diferencia considerable entre el 50:50

PLGA y el PLGA con un mayor contenido de láctido. La formación de la sustancia relacionada redujo considerablemente las microesferas de 85:15PLGA y PLA mientras que las microesferas basadas en PLGA 50:50 siguieron mostrando sustancia relacionada.

5 13. Formación de sustancias hidrófobas relacionadas mediante el procedimiento de extracción de fármacos

El procedimiento de extracción de fármacos no produce las sustancias hidrófobas relacionadas. Para mostrar esto, se mezcló aproximadamente 1 mg de acetato de octreotida con 10 mg de polímero (R203H, R202H, PLA 0.11, PLGA 90:10 (iv 0.11), PLGA 85:15DL2A, PLGA 75:25H (BI), RG504H y RG503H). A la mezcla, se añadieron 2 ml de acetonitrilo/agua (9:1) y se disolvió el contenido completo. Se obtuvo una solución transparente en todos los casos. A esta se añadieron 8 ml de tampón acetato (0,1 M, pH 4,0) y se mezcló bien durante 10 minutos. La solución turbia se filtró a través de un filtro de jeringa de PTFE de 0,45 micrómetros y se evaluó mediante HPLC. Se incluyeron también controles sin fármaco y sin polímero en el estudio. No se encontraron sustancias hidrófobas relacionadas en el extracto. La recuperación del fármaco fue ligeramente superior al 100 % (los valores reales fueron 101-103 %) lo que muestra que no hubo pérdidas de fármaco y prueban también que el método de recuperación del fármaco da como resultado un valor preciso (no se muestran los datos)

14. Estabilidad en almacenamiento

20 Para demostrar la estabilidad durante el almacenamiento de las microesferas de PLGA que contienen octreotida, se prepararon lotes de microesferas con 85:15PLGA y 50:50 PLGA y se almacenaron en condiciones de temperatura diferentes.

25 En la Tabla 32 se proporcionan las propiedades del polímero, la composición de la fase dispersa y las propiedades de las microesferas.

Tabla 32: Propiedades del polímero, solución de polímero y microesferas

		GC 100903	GC111703
Propiedades de los polímeros	Composición de comonomero	85 % de láctido 15 % de glicólido	50 % de láctido 50 % de glicólido
	Mw del polímero	10 kDa	30 kDa
	Número de ácido	17,2	7,4
Composición de la fase dispersa	Polímero en la DP, %	33,88	16,47
	Acetato de octreotida en la DP, %	3,76	1,24
	Cloruro de metileno en la DP, %	53,01	70,14
	Metanol en la DP, %	5,33	7,02
	Ácido acético glacial en la DP, %	4,02	5,08
	Fármaco diana en la microesfera, %	10	7
Propiedades de la microesfera	Carga de fármaco en la microesfera, %	7,82	5,65
	Eficacia de encapsulación, %		
	% Impurezas (totales)	Ninguna detectada	3,4
	Densidad a granel, g/ml	0,61	0,72
	Tamaño de partículas, Vol. dest		
	10 % bajo	4,17	2,82
	25 % bajo	10,3	11,94
	50 % bajo	23,9	26,32
	75 % bajo	37,8	38,99
90 % bajo	46,8	49,04	

30 La microesfera GC100903 preparada a partir de 85:15 PLGA que tiene un número de ácido 17,2 no muestra ninguna impureza, mientras que GC111703 preparada a partir de 50:50 PLGA que tiene un número de ácido de 7,4 mostró un 3,4 % de impureza inicial, a pesar de la carga diana más baja. Estas microesferas se sometieron a análisis de estabilidad durante el almacenamiento y se compararon con la microesfera de octreotida comercial, Sandostatina LAR. Las microesferas se almacenaron a -20 °C, 2-8 °C (refrigerado), 25 °C y a 40 °C. Después de tres meses de almacenamiento, el lote GC100903 mostró mejor estabilidad durante el almacenamiento en comparación con GC111703 y Sandostatina LAR. En la Tabla 33 se muestran los datos de estabilidad.

Tabla 33. Porcentaje de impurezas (sustancias relacionadas) en microesferas que contienen octreotrida tras el almacenamiento

Duración del almacenamiento	Condición de almacenamiento	GC 100903	GC111703	Sandostatina LAR
Inicial	N.A.	Ninguna detectada	3,4 %	6,6 %
3 meses	-20 °C	Ninguna detectada	3,3 %	6,2 %
	2-8 °C	Ninguna detectada	3,3 %	6,1 %
	25 °C	Ninguna detectada	6,9 %	8,4 %
	40 °C	1,8 %	17,2 %	23,3 %

5 Como se muestra en el presente documento, las microesferas de octreotida preparadas a partir de una solución polimérica que contiene 85 % de láctido se pueden almacenar a temperatura ambiente con sustancias relacionadas con péptidos indetectables, mientras que la microesfera de octreotida comercialmente disponible, Sandostatina LAR, requiere al menos refrigeración durante el almacenamiento.

10 15. Eficacia de microesferas de octreotida que no tienen impurezas detectables

Se prepararon soluciones poliméricas que contenían acetato de octreotida utilizando algunos polímeros PLGA85:15 (GC091903, GC091203, GC091503, GC091703 y GC091603). El número de ácido de los polímeros varió de 14 a 18. Se prepararon microesferas dispersando la fase dispersa en la fase continua (solución de alcohol polivinílico al 0,35 %) mediante el proceso de flujo continuo descrito en las patentes de Estados Unidos 5945126 y 6270802. Las propiedades del polímero, la composición de diversos componentes en la fase dispersa, y las propiedades de las microesferas fueron como se muestra en la Tabla 34 siguiente.

20 Las microesferas preparadas de esta manera se recuperaron y formularon en un diluyente, que es una solución de carboximetilcelulosa, manitol y tween-80. Cada vial tenía 5 mg de acetato de octreotida. Las microesferas tuvieron una eficacia de encapsulación del fármaco que variaba de 76 a 81 % y no hubo impurezas detectables (sustancias relacionadas) en las microesferas. A continuación se criodesecaron las suspensiones de microesferas en el diluyente para conseguir la formulación que es adecuada para la evaluación in vivo.

25 Tabla -34: Propiedades de los polímeros 85:15 PLGA, Formulaciones de la fase dispersa y propiedades de las microesferas

	Lote de polímero	GC091903	GC091203	GC091503	GC091703	GC091603
Propiedades de los polímeros	N.º de lote de polímero	02-012-105	03-001-085	03-001-097	03-001-105	03-001-114
	Composición de comonomero	85 % de láctido y 15 % de glicólido	85 % de láctido y 15 % de glicólido	85 % de láctido y 15 % de glicólido	85 % de láctido y 15 % de glicólido	85 % de láctido y 15 % de glicólido
	Número de ácido del polímero	14,8	17,5	17,8	17,1	17,2
	Mw del polímero	13395	11546	10307	10507	10961
Composición de la fase dispersión	Polímero en la DP, %	29,7	29,7	29,7	29,7	29,7
	Acetato de octreotida en la DP, %	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3
	Cloruro de metileno en la DP, %	57,3	57,3	57,3	57,3	57,3
	Metanol en la DP, %	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7
	Ácido acético glacial en la DP, %	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
	Fármaco diana en la microesfera, %	10 %	10 %	10 %	10 %	10 %
Propiedades de la microesfera	Carga de fármaco en la microesfera, %	8,1	7,7	7,8	7,6	7,7
	Eficacia de encapsulación, %	81	77	78	76	77
	% Impurezas (totales)	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1

Densidad a granel, g/ml	0,70	0,70	0,61	0,65	0,74
Tamaño de partículas, Vol. dest					
10 % bajo	2,19	2,76	3,16	2,59	2,80
25 % bajo	9,61	10,0	13,3	8,72	10,6
50 % bajo	20,8	23,1	25,4	21,6	24,9
75 % bajo	30,2	33,3	35,0	30,8	34,4
90 % bajo	37,8	41,5	43,6	38,3	42,1

A continuación se reconstituyeron las formas farmacéuticas criodesecadas con agua y las suspensiones de microesferas resultante se inyectaron por vía s.c. a ratas; cinco ratas para cada formulación de microesferas. Se extrajeron muestras de sangre a intervalos adecuados y se siguió también la velocidad de crecimiento de las ratas. La Figura 14 muestra los datos del nivel de octreotida en suero inyectado en ratas con microesferas de octreotida (lotes de microesferas GC091903, GC091203, GC091503, GC091703 y GC091603) que no contienen impurezas detectables. Las ratas del control recibieron solo diluyente (sin microesferas) y la concentración de octreotida que se encuentra en el suero es cero o despreciable. La Figura 15 muestra los datos del porcentaje de aumento en el peso corporal en comparación con el tiempo cuando reciben en primer lugar las microesferas de octreotida (lotes de microesferas GC091203, GC091503, GC091603, GC091703 y GC091903) que no contienen impurezas detectables. El control indica el peso corporal de las ratas que recibieron solo diluyente. Los valores indicados son el promedio de cinco ratas.

Las microesferas eran formulaciones de liberación en un mes. Es sabido en la técnica que la octreotida en suero controla la hormona del crecimiento (GH) y el factor-1 de crecimiento de tipo insulina (IGF-1) en pacientes con acromegalia (McKeage et al., 2003, Octreotide Long-Acting Release (LAR) - A Review of its Use in the Management of Acromegaly, Drugs 63 (22): 2473-2499. Se muestra por medio de este ejemplo en el presente documento que las microesferas de octreotida exentas de impurezas descritas en el presente documento son eficaces en el control o en la reducción de la velocidad de crecimiento de las ratas.

G. Microesferas 1 de leuprolida.

1. Microesferas PLGA de leuprolida

Se prepararon tres lotes de microesferas con PLGA 50:50 a partir de una fase dispersa transparente mediante el mismo procedimiento descrito anteriormente para las microesferas de octreotida. Véase la Tabla 35 siguiente.

Tabla 35. Microesferas de leuprolida con PLGA50:50

Lote	PLGA usado	Número de ácido	Carga diana	Carga de fármaco	% Impurezas
TV061297	RG503H	7,4	18 %	14,0 %	3,46
BT073096	RG503H	7,4	12,5 %	9,5 %	2,32
BT103196	RG502H	29,3	12,5 %	9,4 %	0,21

2. Efecto del peso molecular (o efecto del número de ácido):

Otro lote, BT103196, se preparó con el polímero de bajo peso molecular RG502H. La carga diana era el 12,5 % y la carga real era el 9,4 %. El porcentaje de impurezas, como aducto de polímero-fármaco es solo del 0,21 %.

3. Efecto de la carga diana:

Se prepararon microesferas de acetato de leuprolida con RG503H en dos cargas diana. Se preparó el lote TV061297 con la carga diana del 18 % y dio como resultado microesferas con un 14 % de carga diana. Las microesferas resultantes tenían un 3,46 % de impurezas como un aducto de fármaco-polímero. Se preparó el lote BT073096 con el mismo polímero RG503H en un 12,55 de la carga diana. Las microesferas resultantes tenían un 9,5 % de carga diana y un 2,32 % de impurezas.

En la Figura 16 se muestra el cromatograma de HPLC del extracto procedente de una microesfera RG503H TV061297. Se identificaron las estructuras de las impurezas marcadas en la Figura 16 mediante HPLC-MS, y se muestran a continuación:

ID del Pico	Estructura
1	[5-OxoL-Proil]-[L-histidil]-[L-triptofil]-[L-Seril]-[L-Tirosil]-[D-Leucil]-[L-Leucil]-L-[L-arginil]-[N-etilprolinamida] (Acetato de leuprolida)
2	[5-OxoL-Proil]-[L-histidil]-[L-triptofil]-[L-Seril]-[L-Tirosil]-[D-Leucil]-[L-Leucil]-L-[L-arginil-GLY]-[N-etilprolinamida]
3	[5-OxoL-Proil]-[L-histidil]-[L-triptofil]-[L-Seril]-[L-Tirosil]-[D-Leucil]-[L-Leucil]-L-[L-arginil-GLY-- GLY]-[N-etilprolinamida]
4	[5-OxoL-Proil]-[L-histidil]-[L-triptofil]-[L-Seril]-[L-Tirosil]-[D-Leucil]-[L-Leucil]-L-[L-arginil-GLY-- LAC]-[N-etilprolinamida]
5	[5-OxoL-Proil]-[L-histidil]-[L-triptofil]-[L-Seril]-[L-Tirosil]-[D-Leucil]-[L-Leucil]-L-[L-arginil-LAC-- LAC]-[N-etilprolinamida]

4. Microesferas de leuprolida con PLA

5 Se prepararon tres lotes de microesferas de leuprolida con poliláctido. Véase la Tabla 36 siguiente.

Tabla 36. Microesferas de leuprolida con PLA

Lote	Polímero	N.º de ácido	Carga diana %	Carga real, %	% Impurezas totales
GJ110899	PLA0.22	9,6	15,5	10,2 %	0,67
GJ110299	PLA, IV 0.11	19,9	15,5 %	11,0 %	0,29
GJ111999	PLA, IV0.11	19,9	15,0 %	10,6 %	0,27

10 Como se muestra en la tabla 36, las microesferas de leuprolida con poliláctido produjeron menos impurezas con respecto a las microesferas de PLGA. Asimismo, se ha mostrado que al disminuir el peso molecular (número de ácido mayor), disminuye la impureza.

5. Castración química en pacientes de cáncer de próstata tratados con microesferas de leuprolida con PLA

15 Se prepararon microesferas que contenían leuprolida a una escala de 480 g utilizando una fase dispersa que contenía ácido acético glacial En la Tabla 37 se muestra la composición de la fase dispersa.

Tabla 37. Composición de la fase dispersa

	Cantidad, g	% Composición
Poliláctido	401	25,0
Diclorometano	852	53,0
acetato de leuprolida,	79,1	4,92
Ácido acético glacial	6,7	0,42
Metanol	268	16,7

20 Se prepararon microesferas de la fase dispersa mediante el proceso de flujo continuo en condiciones asépticas utilizando el procedimiento descrito en las patentes de Estados Unidos 5.945.126 y 6.270.802. Las microesferas preparadas de esta manera se formularon en un diluyente, que era una solución estéril de carboximetilcelulosa, manitol, y tween 80. A continuación se introdujo la suspensión de microesferas en diluyente en viales para tener 22,5 mg de acetato de leuprolida por vial (más el exceso para acomodar la pérdida de transferencia) y se criodesecó. En la Tabla 38 siguiente se muestran las propiedades de la forma farmacéutica acabada.

Tabla 38. Propiedades de la microesfera

Contenido de acetato de leuprolida por vial*	23,2 mg
Carga de acetato de leuprolida en la microesfera	13,4 %
Tamaño de partículas, distribución en vol.	
	10 % bajo 3 micrómetros
	25 % bajo 12 micrómetros
	50 % bajo 25 micrómetros
	75 % bajo 36 micrómetros
	90 % bajo 45 micrómetros
pH tras reconstitución	6,9
Contenido de humedad, %	0,1 %
Liberación de fármaco acelerada	
	5 horas 20 % de liberación de fármaco

24 horas	50 % de liberación de fármaco
48 horas	73 % de liberación de fármaco
72 horas	86 % de liberación de fármaco
* Rellenado con un exceso de ~10 % e intento de administrar 22,5 mg de acetato de leuprólida	

Una comparación del peso molecular del polímero utilizado para la preparación de microesferas y del peso molecular del polímero en la microesfera (datos presentados en la Tabla-39 siguiente) mostró que el Mw del polímero no cambia tras la formación de microesferas.

5

Tabla 39. Peso molecular (Mw) del polímero bruto y la microesfera

	Mw	% de cambio en el Mw
Polímero bruto	14321	N.A.
MS n.º Lote 0H	14420	+0,7

Se inyectaron las microesferas una vez cada tres meses para castrar químicamente y mantener a los pacientes de cáncer de próstata. En pacientes con cáncer de próstata conseguir niveles de testosterona sérica menores de o iguales a 0,5 ng/ml (nivel de castración química) es un indicador farmacológico deseado de la acción terapéutica. De esta manera, fisiológicamente, los pacientes que recibieron la microesfera de leuprólida deben tener su nivel de testosterona sérica reducido o inferior a 0,5 ng/ml en cuatro semanas o más pronto y deben mantener el nivel de castrado durante la duración completa del tratamiento. En total, cuarenta pacientes de cáncer de próstata recibieron las inyecciones de microesferas (inyecciones intramusculares). Se realizó un seguimiento de doce pacientes para determinar la leuprólida en suero para seguir la farmacocinética y se vigiló a todos los pacientes para la testosterona en suero. La Figura 17 muestra el nivel de leuprólida en suero y su nivel de testosterona. Se consiguió la castración química en los 28 días en 39 pacientes de 40. Tras conseguir la castración, todos los pacientes mantuvieron la castración durante el periodo de tratamiento completo. La segunda inyección de la formulación no produce aumento de testosterona y mantuvo el nivel de testosterona bajo.

10

15

20

H. Microesferas de ornitida

Se prepararon microesferas que contenían ornitida (Ac-D-2NaI-D-4Cpa-D-3Pal-Ser-Lys(Pic)-D-Orn(6-Aminonicotinil)-Leu-Ilys-Pro-D-Ala-NH₂) con algunos polímeros. Se descubrió una impureza en gran cantidad preparando a la vez las microesferas de ornitida con PLGA5050. Este compuesto se eluyó exactamente antes de la ornitida y se identificó como un aducto de ornitida-glicólido a través de serina. Este pico eluyó antes de la ornitida en HPLC debido a que, la ornitida es comparativamente hidrófoba. Se observaron otras pocas impurezas tras la ornitida que no se identificaron, y se supusieron que son aductos con fragmentos más grandes procedentes de PLGA. Como se ha observado con las microesferas de octreotida y leuprólida anteriores, el PLGA con un contenido mayor de láctido produce menos impurezas. Las microesferas de ornitida preparadas con PLA no muestran una impureza individual suficientemente grande que notificar. A continuación, la Tabla 40 muestra ejemplos de microesferas de ornitida con PLGA

25

30

Tabla 40. Microesferas de ornitida con PLGA

35

Lote	Polímero	% de láctido	N.º de ácido	Carga diana	Carga real	Aducto Orn-Gly	Suma de otras impurezas y n.º de impurezas
GJ022300	RG504H	50	5,9	21 %	14,2 %	1,87 %	1,43 % (Cinco)
GJ022900	RG503H	50	7,4	22 %	15,2 %	1,64 %	1,38 (Cuatro)
GJ022400	7525DL3A	75	6,7	21 %	14,0 %	0,52 %	0,57 (dos o tres)

I. Microesferas de WOC4D,

WOC4D, cuya estructura se muestra a continuación, es otro análogo de somatostatina similar a octreotida.

40

H-D-Tyr-D-Tyr-D-Tyr-D-Tyr-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂ es la estructura)



Se prepararon microesferas de WOC4D con varios polímeros. La microesfera de WOC4D mostró también un comportamiento similar como se ha observado con las microesferas de octreotida. El nivel de formación de aducto, sin embargo, es muy inferior. La siguiente Tabla 41 muestra ejemplos de microesferas de WOC4D con PLGA

45

Tabla 41. Microesferas de WOC4D con PLGA

Lote	Polímero	% de láctido	N.º de ácido	Carga diana	Carga real	Suma de impurezas
GJ062199	RG503H	50	7,4	13 %	7,9	1,46
GJ070199	RG504H	50	5,9	13 %	8,4	1,74
GJ050499	RG503	50	0,5	11,1 %	8,2	1,97
MG052500	8515DL2A	85	19,2	15 %	13,4	0,22
MG050200	PLA iv 0.11	100	19,9	9 %	8,2	0

J. Formulación que contiene ornitida y prevención de su gelificación

5 1. Solubilidad de la ornitida con y sin un aditivo ácido en la fase dispersa

Se evaluó la solubilidad de la ornitida en diclorometano (DCM) y metanol.

10 La ornitida recibida de diversas fuentes mostró características de insolubilidad y gelificación en la mezcla de DCM-metanol. En general, se encontró que la solución no era muy transparente y tenía una tendencia a gelificar rápidamente. El ácido acético glacial ayudó a formar una solución transparente. Sin embargo, la cantidad de ácido acético glacial requirió conseguir que variara la solución con el fabricante y con el número de lote. Se comparó también la solubilidad de tres materias primas de ornitina procedentes de varias fuentes mediante el ensayo de solubilidad en presencia de ácido acético glacial. A 84 mg de acetato de ornitida, se añadieron inicialmente 100 mg de ácido acético glacial y se añadieron 130 mg de metanol. Tras mezclar bien estos componentes formando una solución transparente, se añadieron 1,28 g de cloruro de metileno y se calentó la mezcla a 40 °C durante aproximadamente 5 minutos para formar una solución transparente. La Tabla-42 proporciona el recuento comparativo de la gelificación. En los tres casos, se añadió en primer lugar ácido a la muestra de ornitida y la solución formada tras añadir todos los aditivos era transparente. Sin embargo, PPL-ORN-9902 se volvió gel en 30 minutos.

Tabla 42. Comparación de solubilidad con acetato de ornitida

PPL-ORN-9901 Polipéptido Lab	PPL-ORN-9902 Polipéptido Lab	MG n.º 401 California Péptido Lab
Solución transparente estable durante más de una hora.	Gelificada en 30 min y convertida en una masa pastosa de color blanco.	Solución transparente. Turbia y con tendencia a gelificar después de una hora

25 La adición de ácido acético glacial y el calentamiento de la solución mejoró la solubilidad. Sin embargo, la solución mostró algo de gelificación, dependiendo de la fuente y del n.º de lote. Se prepararon las fases dispersas con diversos polímeros para preparar microesferas que contenían PPL-ORN-9902 como se muestra en la Tabla-43. La DP comenzó a gelificar, y el calentamiento invirtió la gelificación, pero volvió posteriormente a gelificar después que la DP se enfriara por debajo de la temperatura ambiente y a continuación se almacenó durante aproximadamente 10 minutos.

Tabla 43: Parámetro de preparación de DP

	GJ011900	GJ013100	GJ020400	BT020300	BT020800
Polímero	PLA iv 0.11 BPI, n.º de lote 99115	7525DL3A Alkermes n.º de lote 97-12-113	RG503H BI n.º de lote 281334	RG504H BI n.º de lote 34020	8515DL2A Alkennes n.º de lote 96-11-178
Cantidad de polímero, g	3,5	2,46	1,56	2,34	2,37
Cantidad de ornitida, g	0,5	0,54	0,44	0,66	0,63
Cantidad de DCM, g	7,5	12,0	7,0	12,0	5,0
Cantidad de MeOH, g	0	0,6	0,7	1,2	0,5
Cantidad de ácido acético, g	2,50	2,2	1,4	2,2	1,2
% de ácido acético en DP	17,9	12,4	21	12	12
Propiedades de la DP tras el calentamiento a 60 °C	Turbia, gelificación	Turbia. Transparencia mejorada con MeOH	Transparente después de calentar a 60 °C	Transparente después de calentar a 60 °C	Transparente después de calentar a 60 °C

Se requirió hasta un 22 % de ácido acético glacial para la DP para formar una solución de DP transparente y filtrable. La DP con dicha cantidad elevada de ácido acético puede no formar microesferas deseables mediante un proceso O/W, si el peso molecular del polímero es menos de 10.000 (no se muestran los datos).

- 5 Otros ácidos que tienen valores de pKa bajos tales como HCl, ácido glicólico, y ácido láctico (solución al 85 % en agua) ayudaron también a conseguir la solubilidad y la estabilidad de la DP. Sin embargo, los ácidos anhidros son, por ejemplo, para evitar la separación de fases producida por el agua. HCl y ácido láctico están disponibles con agua. De este modo, estos ácidos en la DP podrían producir la separación de fases. El ácido láctico con un menor contenido de agua no da lugar a la separación de fases y evitó la gelificación. El ácido láctico con un 85 % de agua (comercialmente disponible) evitó la gelificación, sin embargo, se observó separación de fases en la DP. La composición de la DP ensayada contenía, 0,22 g de ornitida, (n.º de lote PPL-ORN-9902), 0,6 g de metanol, 0,78 g de RG503H, 4,0 g de DMF, y una cantidad adecuada de ácido como se muestra en la Tabla 44. La estabilidad se siguió durante 1 día.

15 Tabla 44: Comportamiento de solubilidad de la ornitida DP que contiene ácidos de pKa bajo

Tipo de ácido y % de composición en la DP	% de ácido en la DP	Observación
Ácido clorhídrico conc.	5 %	Dos fases transparentes, tras el mezclado se vuelven turbias por mezclado de las dos fases. No gelifica durante el almacenamiento.
Ácido clorhídrico conc.	2,5 %	Dos fases transparentes, tras el mezclado se vuelven turbias por mezclado de las dos fases. No gelifica durante el almacenamiento.
Ácido clorhídrico conc. + 85 % de ácido láctico	2,5 % + 2,5 %	Dos fases transparentes, tras el mezclado se vuelven turbias por mezclado de las dos fases. No gelifica durante el almacenamiento
85 % de ácido láctico	5 %	Turbio incluso después del calentamiento. Gelificado durante la noche
85 % de ácido láctico	11 %	Dos fases. Sin gelificación.
Ácido láctico: 11 % (tratado con tamices mol.)*	11 %	Solución estable y transparente.

* Los tamices moleculares redujeron el contenido de agua en 85 % de ácido láctico desde el 15 % hasta aproximadamente un 7 %.

2. Mejora de la solubilidad de la ornitida bruta en la DP a partir de disolventes no acuosos

- 20 En un intento de minimizar la cantidad de ácido que se va a usar para disolver la ornitida en disolventes orgánicos, se realizó un intento de volver a criodesecar la ornitida con un sistema disolvente adecuado. Los dos disolventes orgánicos que podrían criodesecarse en un ciclo de criodesecación normal son, terc-butanol (TBA) y ciclohexano. En este estudio se prepararon 40 mg/ml de solución de ornitida en una mezcla de TBA-agua, A un conjunto de muestra también se añadió ácido acético glacial. La solución se criodesecó usando el ciclo siguiente:

- 25 Congelación -50 °C durante 2 horas
Secado: Rampa desde -50 °C a 10 °C durante un periodo de 20 horas.
Rampa desde 10 °C a 25 °C durante un periodo de 20 horas.
Secado final a 25 °C durante aproximadamente 10 horas.

- 30 En la Tabla-45 se muestra la relación de soluciones sometidas a criodesecación.

Tabla 45: Soluciones de ornitida en TBA agua para criodesecación para mejorar la solubilidad

ornitida (100 mg)	%TBA/ %Agua	Otros aditivos	Conc.	Código
Cal.Péptido, MG0401	23/74	3 % de ácido acético	40 mg/ml	H
PPI-ORN-9902	23/74	3 % de ácido acético	40 mg/ml	I
PPI-ORN-9902-EDTA Limpio*	23/74	3 % de ácido acético	40 mg/ml	J
PPI-ORN-9902	76/24	No	40 mg/ml	K
PPI-ORN-9902	44/56	No	100 mg/ml	L
PPI-ORN-9902	34/66	No	50 mg/ml	M
PPI-ORN-9902	34/66	No	100 mg/ml	N

* Ornitida tratada con solución EDTA para eliminar iones

- 35 La ornitida criodesecada pasó a través de una formación en fase dispersa y un estudio de gelificación, con la siguiente composición de la DP.

ES 2 600 554 T3

Ornitida: 84 mg
 Metanol: 150 mg
 Ácido acético glacial: 200 mg
 DCM: 1280 mg
 R202H: 450 mg.

5

De esta manera, la DP contenía 9,2 % de ácido en la formulación. La ornitida criodesecada procedente de "M" produjo una DP transparente que era estable durante una semana. Otras formulaciones mostraron una solubilidad mejorada en comparación con el material original, pero no tan buena como la muestra "M". De acuerdo con la petición de los Oakwood labs, El Polypeptide lab volvió a criodesecar el péptido en una mezcla de TBA-agua y envió el material. Se produjeron algunos lotes de microesferas con la ornitida que se volvió a criodesecar con TBA. La tabla 45 muestra los parámetros de preparación, que mostraron que un 11 % de ácido acético en la formulación de la DP es suficiente para formar una DP estable. La Tabla -46 muestra las propiedades de las microesferas.

15

Tabla 45: Parámetros de preparación de lotes de microesferas de ornitida

Parámetros de preparación	GJ00	GJ00	GJ00	GJ00*
Polímero	RG503H	RG503H	RG503H	RG503H
Fuente/n.º de lote	BI 281334	BI 281334	BI 281334	BI 281334
Tamaño del lote	1,0 g	1,0 g	1,0	5,0
Carga diana	21	18	21	21
Conc. de polímero en DCM	16,5	16,5	16,5	15,3
MeOH/DCM	0,15	0,15	0,15	0,15
Ácido acético en DP	11 %	11 %	16 %**	11 %
Silverson RPM	5000	4000	4000	4000
CP/DCM	200	193	200	182
CP: Conc. de PB y pH	0,1 M, 7,4	0,1 M, 7,4	0,1 M, 7,4	0,1 M, 7,4
* Utilizado en un mezclador en línea ** para comprobar la influencia del ácido acético superior en la DP sobre la supresión de la testosterona en rata				

GJ081000 tuvo un 21 % de carga diana y GJ081500 tuvo un 18 % de carga diana. La eficacia de incorporación del fármaco no influyó sobre el direccionamiento del 21 % de la carga del fármaco. GJ082400 tuvo también un 21 % de carga diana, sin embargo, se preparó utilizando un mezclador en línea. La eficacia de incorporación del fármaco no se vio afectada: sin embargo, se encontró una cantidad mayor de partículas no esféricas en el producto. GJ082100 tuvo también un 21 % de carga diana, sin embargo, la DP contenía un 16 % de ácido acético.

20

Tabla 46: Propiedades de las microesferas de ornitida

Propiedades	GJ081000	GJ081500	GJ082100	GJ082400
Carga de fármaco, %	17,5	13,58	16,24	17,74
Eficiencia incorp. de fármaco	83 %	75 %	77 %	84 %
Fármaco en CP				
inicial	26,27	26,12	19,21	32,02
EV-0 min	20,52	24,64	12,84	17,85
EV-60 min	12,34	18,95	12,34	17,50
Final	13,81	16,04	25,21	17,14
Balance de materia	97	91	102	101
Tamaño de partículas				
10 % bajo	1,29	1,32	1,79	2,27
25 % bajo	3,09	3,20	5,51	6,24
50 % bajo	8,25	9,13	12,81	14,56
90 % bajo	29,61	27,5	35,75	31,33

25

Se formularon dos lotes de microesferas, GJ082100 y GJ082400, a 3 mg/vial de ornitida y se criodesecó. Las microesferas formuladas se administraron a ratas a 3 mg/Kg mediante inyección sc. Las Figuras 18 y 19 muestran la supresión de testosterona para las ratas que recibieron uno de los dos lotes, es decir, GJ082100 o GJ082400.

3. Orden de adición del aditivo ácido, ornitida y otros componentes forman la DP

El ácido acético requerido en la DP se añadió en primer lugar a la ornitida y la ornitida era soluble porque se añadió una cantidad limitada a la solución de ornitida en ácido acético. La DCM restante se utilizó para disolver el PLGA o PLA. La solución de polímero viscosa y la solución de ornitida se mezclaron juntas para formar la DP. Esta DP mostró una mejor filtrabilidad y estabilidad frente a la gelificación que cuando se añadió el ácido a la DP. En vez de añadir la parte de DCM en la DP a la solución de ornitida en ácido, podría añadirse metanol o una combinación de metanol y DCM. La formulación ensayada tenía la composición, 0,984 g de RG503H, 0,22 g de ornitida, 0,85 g de ácido acético glacial, 5,0 g DCM y 0,74 g de metanol. Se comprobó el efecto del orden de la adición de los componentes. Para formar una solución transparente, el ácido acético debe añadirse formando en primer lugar una solución transparente. A continuación, la adición de la mitad del DCM (2,5 g) o el metanol, formó una solución menos viscosa y transparente. Después, la solución podría mezclarse con la solución polimérica. La solución de ornitida en ácido acético podría también premezclarse con la solución de polímero directamente.

4. Supresión de los niveles de testosterona en un mamífero por las microesferas que contienen ornitida preparadas de una matriz polimérica de PLGA o PLA

Se prepararon microesferas de ornitida utilizando el PLGA o PLA adecuados para conseguir la liberación durante nueve meses a un año. En la Tabla-47 se muestran los parámetros y propiedades de preparación de las microesferas de ornitida. Se preparó la fase dispersa como se describe anteriormente utilizando el acetato de ornitida criodesecado. Se utilizó una solución de alcohol polivinílico tamponada a pH >7,5 como fase continua. Se prepararon las microesferas utilizando el procedimiento descrito en la Patente de Estados Unidos 5.945.126 usando el mezclador en línea a 4000 RPM y se llevó a cabo la eliminación posterior del disolvente como se describe en la patente de Estados Unidos 6.270.802.

Tabla 47. Parámetro de preparación y propiedades de las microesferas de ornitida

		GC102301	GC010402
Composición de la DP	Polímero	85:15 PLGA (Mw 81 kDa)	PLA (Mw 30 kDa)
	Conc. polímero, %	9,6	13,5
	Diclorometano, %	70,5	64,8
	Conc. de ornitida, %	2,2	2,4
	Ácido acético glacial, %	10,0	10,9
	Metanol, %	7,7	8,4
Propiedades de la microesfera	Carga de fármaco, %	11,0	12,2
	Eficacia de encapsulación, %	61	81
	Tamaño de partícula (distribución en volumen)		
	10 % bajo	1,9 µm	1,9 µm
	25 % bajo	4,9 µm	5,1 µm
	50 % bajo	15,1 µm	13,7 µm
	90 % bajo	36,5 µm	21,8 µm

Las microesferas obtenidas de esta manera se suspendieron en un diluyente que contenía carboximetilcelulosa, tween-80 y manitol, y se desecó en viales.

Se dosificó a las ratas (por vía subcutánea) a 27 mg de acetato de ornitida por kilogramo de peso corporal, suponiendo que la formulación liberará el fármaco durante aproximadamente una duración de 12 meses. Se estableció previamente que 2,25 mg por mes es una dosis eficaz para la castración química (testosterona por debajo de 0,5 ng/ml) de las ratas si se proporciona como formulación de liberación sostenida. Seis ratas recibieron cada formulación de microesferas.

La Figura 20 muestra el nivel de ornitida en suero y el nivel de testosterona en suero en ratas que recibieron GC102301 y la Figura 21 muestra el nivel de testosterona en ratas que recibieron GC010402. Las microesferas de ornitida fueron eficaces en suprimir rápidamente la testosterona a niveles de castración y del mantenimiento a aquellos niveles durante periodos prolongados. El GC102301 fue eficaz durante 9 meses y GC010402 fue eficaz durante poco más de 12 meses.

K. Formulación que contiene leuprólida y prevención de su gelificación

A la vez que se preparan microesferas de leuprólida que tienen una etapa de disolución de la leuprólida en metanol a 0,24 g/g, se produce una gelificación/precipitación de la leuprólida. La leuprólida precipitada/gelificada no se pudo poner posteriormente en solución ni siquiera añadiendo una amplia cantidad de metanol. La experiencia previa muestra que 0,14 g/g de solución de leuprólida en metanol es estable y transparente durante al menos un día.

Inicialmente, se disolvió la leuprólida fácilmente en metanol, formando una solución transparente a una concentración de 0,24 g/g. Sin embargo, aunque esto se acercaba a la solubilidad completa, la leuprólida precipitó de la solución rápidamente, convirtiéndose en un espeso gel de color blanco. Se llevó a cabo un breve estudio de investigación sobre la solución de leuprólida en metanol y en la fase dispersa.

5 Se llevó a cabo este estudio para comparar la estabilidad de la solución de leuprólida/metanol y la estabilidad de la DP. La Tabla-48 compara la estabilidad de la DP.

10 Tabla 48: Estabilidad de la solución de leuprólida en metanol y DP

Solución de leuprólida en metanol			Leuprólida en DP (Leup, MeOH, Polímero y DCM)		
Proveedor/n.º de lote	Conc. (g/g)	Estabilidad	Polímero	Tipo de DP*	Estabilidad
Bachem, FLEUP9901	0,14	Estable transparente durante 4 días.	yRG503H	30 días	Estable durante 5 días
Bachem, FLEUP9805	0,14	Estable transparente durante 2 días	yRG503H	30 días	Estable durante 2 días
Bachem FLEUP9805	0,24	Turbio después de 30 min	R202H	90 días	Turbio después de 30 min, gelificado el mismo día
Peninsula, 769A, purificado (n.º de lote 036973)	0,14	Estable transparente durante 3 días	yRG503H	30 días	Transparente durante 2 días (viscosidad superior a Bachem Leup)
Peninsula, 769A, purificado (n.º de lote 036973)	0,24	Estable transparente durante 40 min	yR202H	90 días	Estable durante 30 minutos, se volvió turbio y viscoso después de 30 min.
Bachem FLEUP9901	0,24	Turbio después de 2 horas			
Traza de ácido acético glacial y de Bachem Leup9901	0,24	Solución transparente. Estable durante >7 días			

*Nota: se obtuvo la DP de 30 días mezclando 0,612 g de una solución de 0,14 g/g de leuprólida/metanol y 2,2 g de una solución de 0,18 g/g de RG503H/DCM. Se obtuvo la DP de 90 días mezclando 1,05 g de una solución de 0,24 g/g de leuprólida/metanol y 3,95 g de una solución de 0,32 g/g de R202H/DCM.

La adición de ácido acético a la solución demostró proporcionar una excelente estabilidad para la leuprólida de Bachem frente a la gelificación/precipitación de la leuprólida de su solución de metanol, así como en la DP. Es necesario encontrar la cantidad eficaz de ácido acético requerida para mantener la DP estable durante un periodo prolongado de tiempo. La formulación de la DP es muy similar a la formulación de la leuprólida de 90 días. Se prepararon soluciones de la leuprólida Bachem y Peninsula con ácido acético para evaluar la estabilidad. La Tabla 49 muestra los resultados.

15

Tabla 49: Ácido acético y estabilidad de la DP

Solución de leuprólida en metanol*	Rendimiento	Comportamiento de la fase dispersa**
Bachem FLEUP9805 (0,4 g) + 75 mg de ácido acético glacial + Metanol (1,27 g)	Estable durante 5 días	Estable durante una semana
Bachem FLEUP9805 (0,4 g) + 7,5 mg de ácido acético glacial + Metanol (1,27 g)	Estable durante 5-6 horas	Estable durante 5-6 horas
Purificado por Peninsula, 769-A (0,4 g) + 75 mg de ácido acético glacial + Metanol (1,27 g)	Estable durante 3 días	Estable durante 4 días

* Se trata de una solución de 0,24 g/g** 90 Días de composición DP con polímero, R202H

20 La Tabla 50 muestra la mínima composición de ácido acético necesaria en la DP para obtener una solución estable.

Tabla 50: Composición sugerida para la formulación DP de 90 días

Componente	Cantidad (g)	% Amt en solución en metanol (wt)	% Amt. En DP
Acetato de leuprólida	4 g	24,3 %	5,4
Ácido acético	0,075 g	0,4 %	0,1
Metanol	12,4 g	75,3 %	16,8

ES 2 600 554 T3

R202H	18,4	N.A.	24,9
DCM	39,0		52,8

Se prepararon algunos lotes de microesferas a aproximadamente 400 g y aproximadamente 800 g, que se analizaron en ratas, perros y seres humanos. La composición de la fase dispersa se muestra en la Tabla 10.

5

Tabla 51: Composición de dos lotes producidos en condiciones estériles para estudio clínico

Lote	Lote de escala de aprox. 400 g	Lote de escala de aprox. 800 g
Polímero	R202H de BI	R202H de BI
Fuente de leuprólida	Bachem	Bachem
Cantidad de R202H	401 g	598 g
Cantidad de acetato de leuprólida	82 g	123 g
Cantidad de ácido acético glacial	7 g	10 g
Cantidad de metanol	268 g	390 g
Cantidad de DCM	852 g	1250 g

Las microesferas producidas a 400 g también se evaluaron en seres humanos, y se descubrió que castraban >95 % de los hombres en el plazo de un mes y mantuvieron la castración durante el periodo analizado, tres meses.

REIVINDICACIONES

1. Una solución de polímero que comprende:

5 un polímero biocompatible y biodegradable,
 en la que el polímero biocompatible y biodegradable se selecciona entre el grupo que consiste en poli(ácido d,l-láctico), poli(ácido l-láctico) o poli(ácido glicólico), o un copolímero de poli(ácido d,l-láctico) o poli(ácido l-láctico) y poli(ácido glicólico), o policaprolactona, o un copolímero de caprolactona con láctido y glicólido, o un
 10 copolímero de láctido y glicólido con polietilenglicol, poli(ácido d,l-láctico) con polietilenglicol, y polianhídrido; al menos un ingrediente nucleofílico, en donde el ingrediente nucleofílico es acetato de leuprólida o acetato de octreótido,
 y
 una cantidad de un aditivo ácido tal que el polímero de la formulación sea menos susceptible a la reducción del peso molecular en comparación con la formulación sin el aditivo ácido, y

15 en la que el aditivo ácido comprende uno o más ácidos que tienen un pKa de 5,0 o inferior, seleccionándose dichos ácidos entre el grupo que consiste en ácido acético, ácido propanoico, ácido glicólico, ácido glicérico, ácido láctico, oligómeros de ácido láctico terminados en carboxi, oligómeros de ácido glicólico terminados en carboxi o la combinación de estos ácidos en cualquier relación que tenga un peso molecular no mayor de 1000, y en donde la
 20 cantidad de aditivo ácido es del 2 % al 50 % en peso del polímero.

2. La solución polimérica de la reivindicación 1, en la que el aditivo ácido incluye oligómeros de ácido glicólico terminados en carboxi que tienen un peso molecular no mayor de 1000, oligómeros de ácido láctico terminados en carboxi que tienen un peso molecular no mayor de 1000, ácido láctico, ácido glicólico, ácido acético o ácido glicérico.

25 3. La solución polimérica de las reivindicaciones 1 o 2, en la que el polímero es un copolímero de poliláctido d,l y poliláctido d,l-co-glicólido que tiene una relación molar de láctido a glicólido en el intervalo de 100:0 a 50:50.

30 4. Una formulación de liberación sostenida que se fabrica a partir de la solución polimérica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

5. Una forma de liberación sostenida que se fabrica a partir de la solución polimérica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

35 6. La forma de liberación sostenida de la reivindicación 5, en donde la forma de liberación sostenida es un implante, una microesfera o una micropartícula.

7. Un método para preparar una formulación de liberación sostenida que comprende:

40 la formación de una mezcla que comprende una solución de polímero de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un disolvente para el polímero; y
 la eliminación del disolvente, formando de esta manera una formulación de liberación sostenida en la que la cantidad de aditivo ácido es tal que el polímero de la formulación de liberación sostenida es menos susceptible a la reducción del peso molecular en comparación con la formulación de liberación sostenida sin el aditivo ácido.

45 8. El método de la reivindicación 7, en el que la solución es una emulsión, una suspensión o una solución homogénea.

50 9. El procedimiento de las reivindicaciones 7 u 8, en el que el polímero es poli(ácido d,l-láctico), poli(ácido l-láctico), poli(ácido glicólico) o copolímeros de los mismos.

10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que el polímero es un copolímero de ácido láctico y monómeros de ácido glicólico.

55 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que la mezcla se procesa a al menos 25 °C.

12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, en el que la mezcla se procesa a al menos 40 °C.

60 13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, en el que el disolvente del polímero se selecciona entre el grupo que consiste en: metanol, etanol, propanol, isopropanol, terc-butanol, diclorometano y alcohol bencílico.

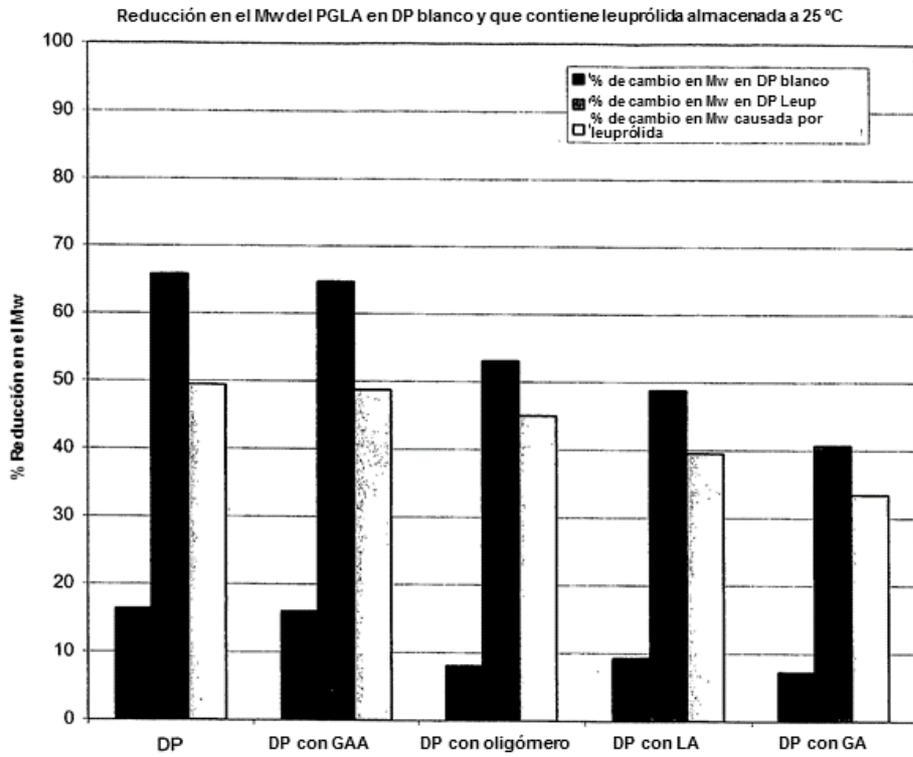


Figura 1

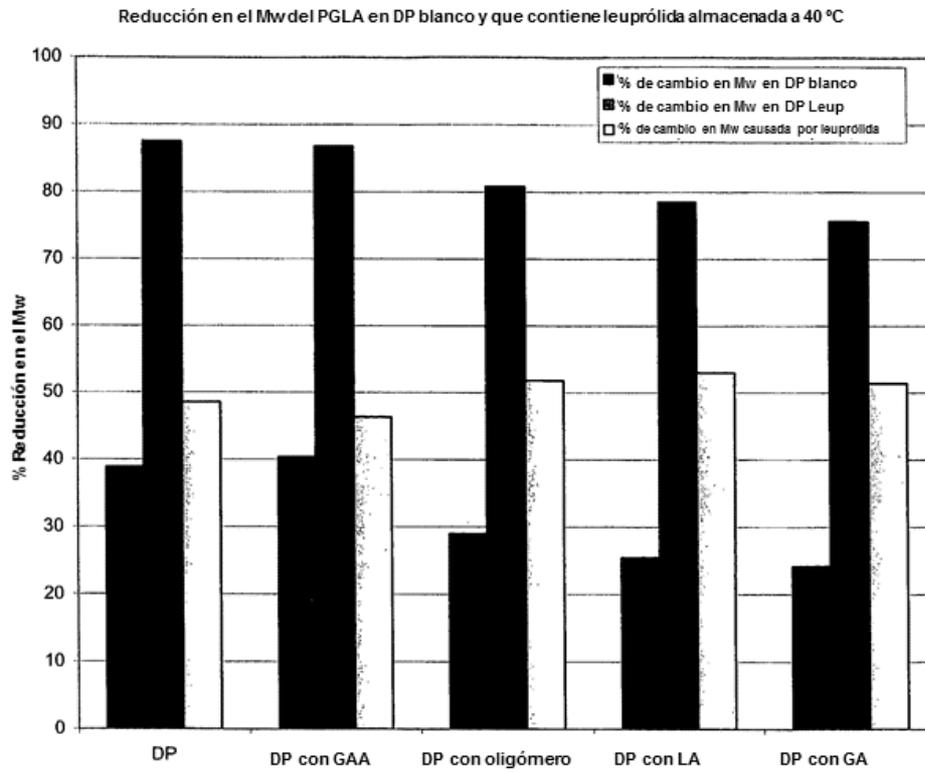


Figura 2

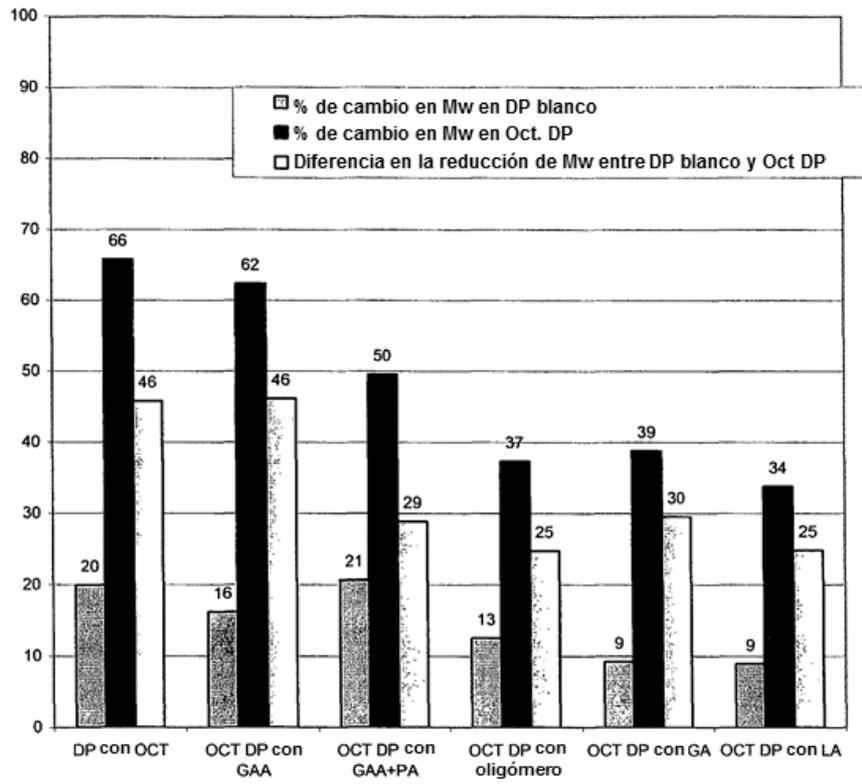


Figura 3

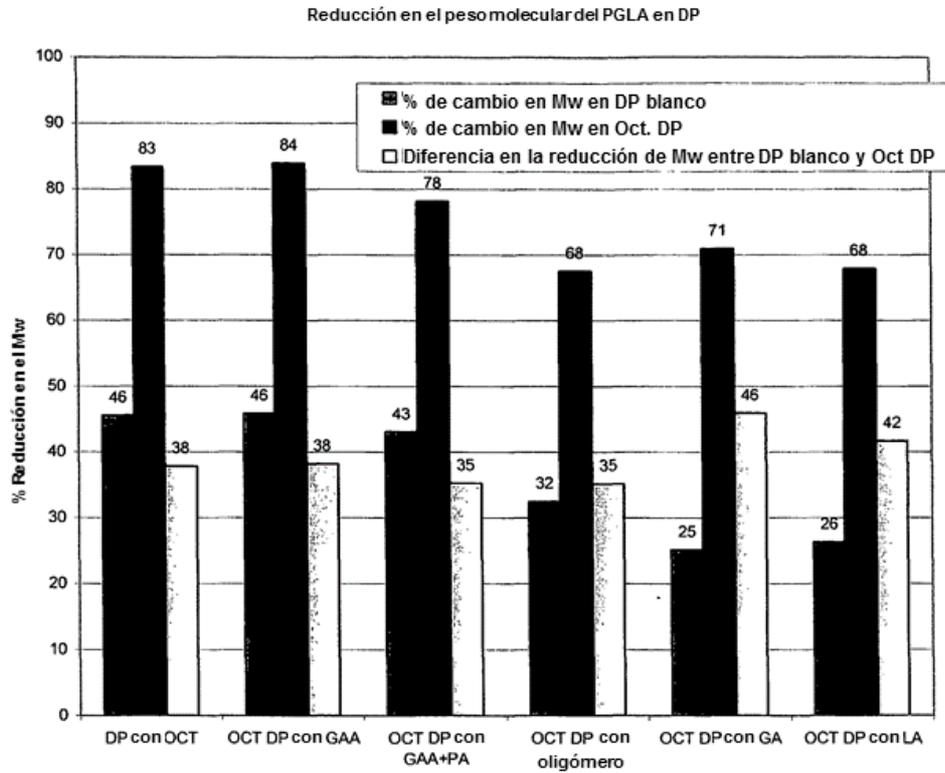
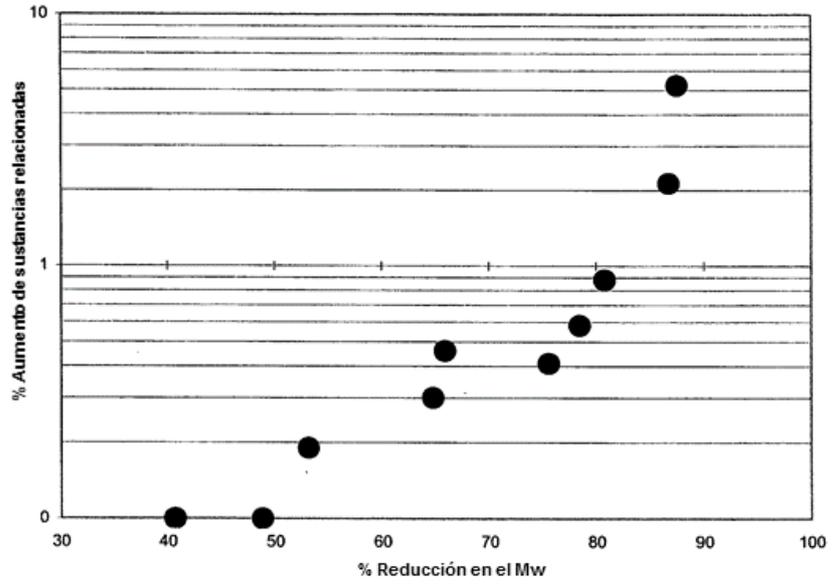


Figura 4

Figura 5



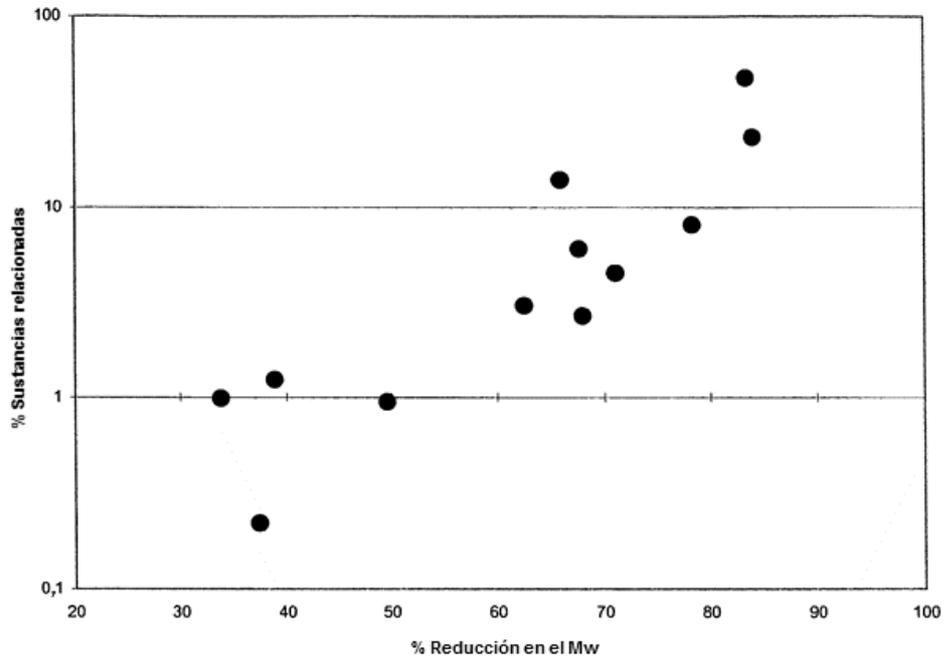


Figura 6

MultiView 1.4 Jueves 22 de febrero de 2001 4:08 PM Página 1 de 1
Octeótrida Q1
Periodo 1, Expt 1; Intervalo de masa: 300,0 a 1800,0 por 1,0 uma; Permanencia: 1,0 ms; Pausa: 2,0 ms
Acq de tiempo: lunes 29 de enero de 2001 a las 4:43:25 PM; Nombre de muestra: Octeótrida Q1

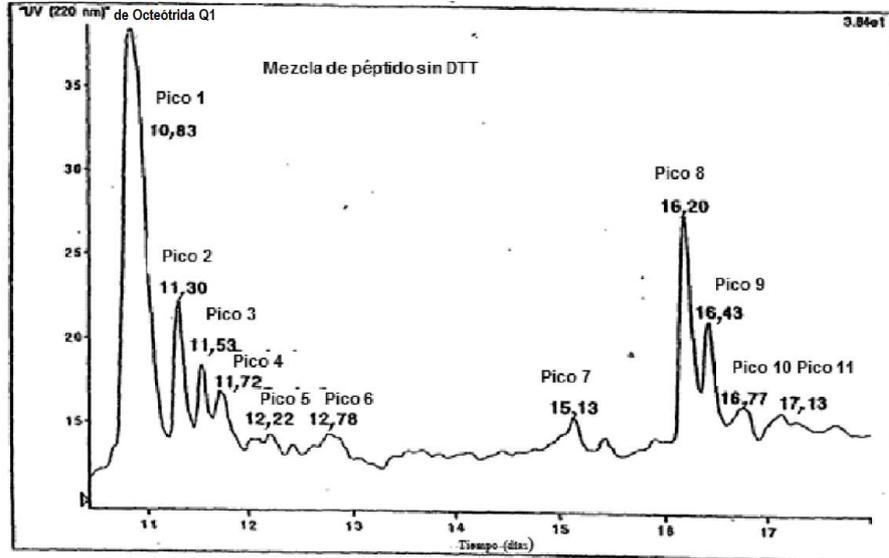


Figura 7

FIGURA 8

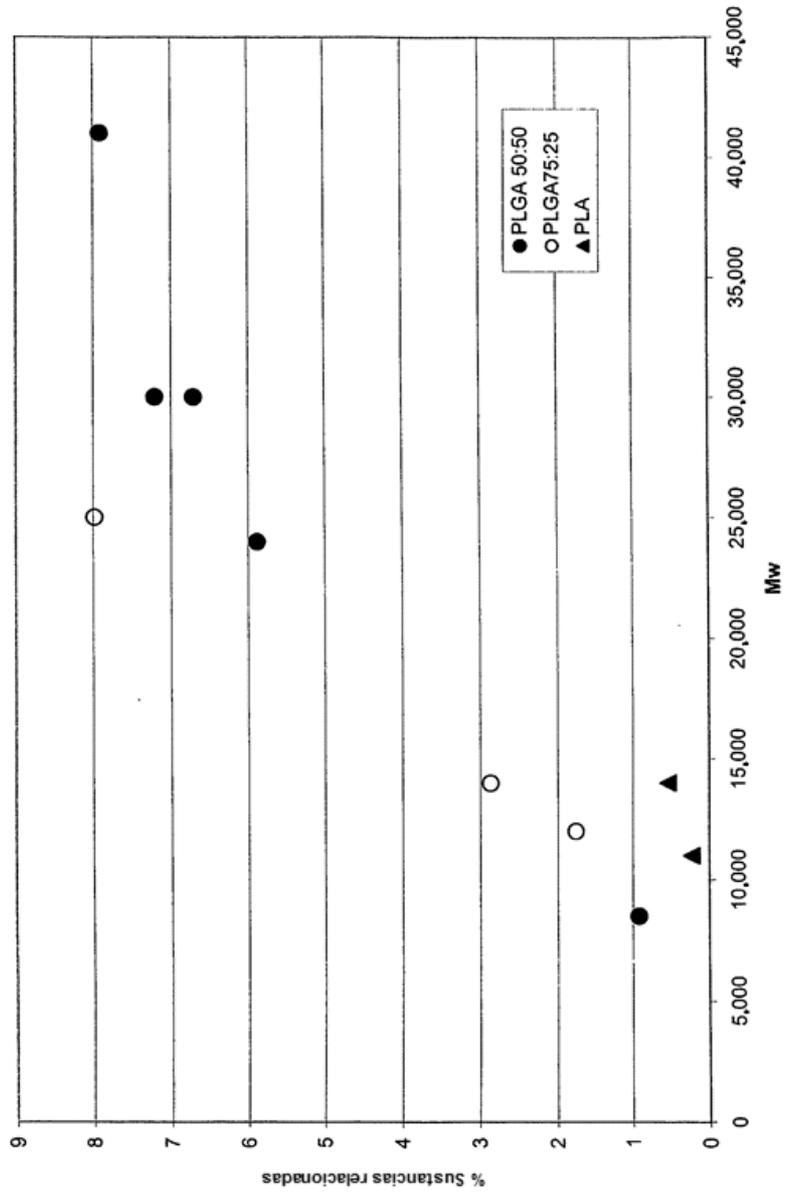


FIGURA 9

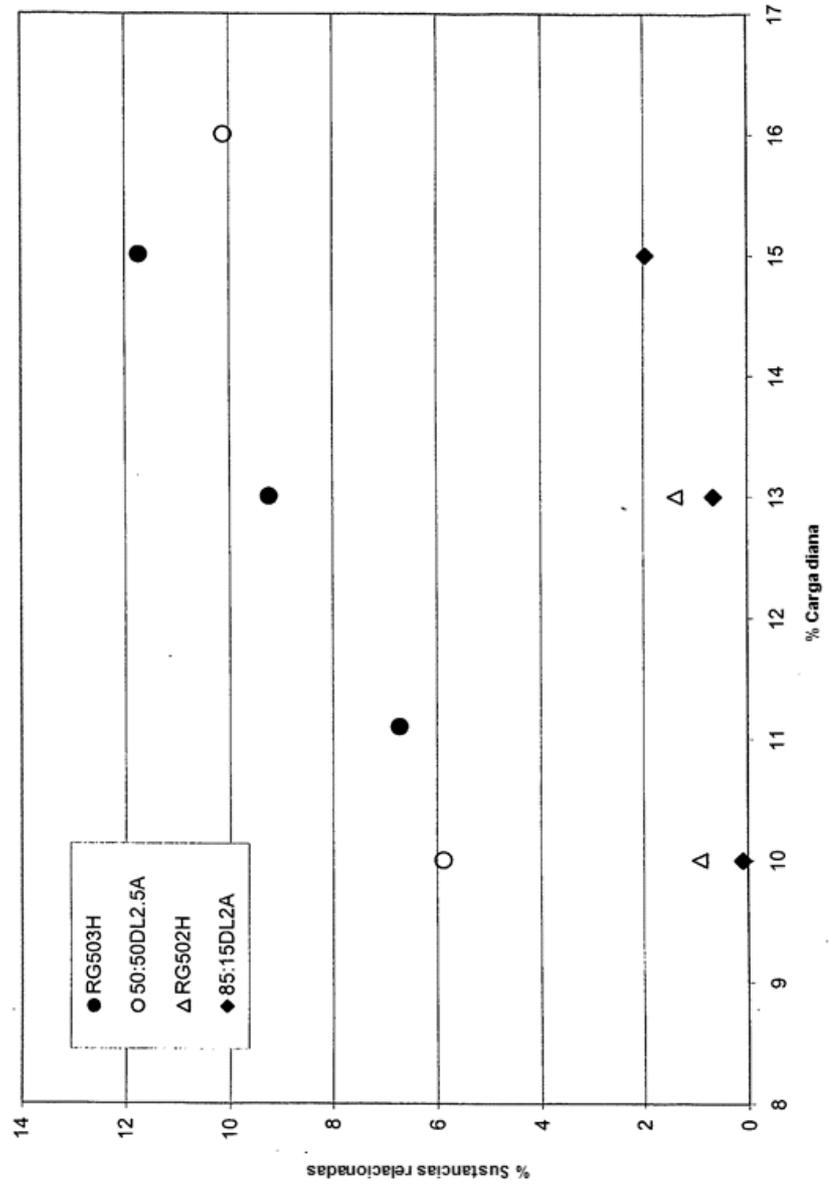
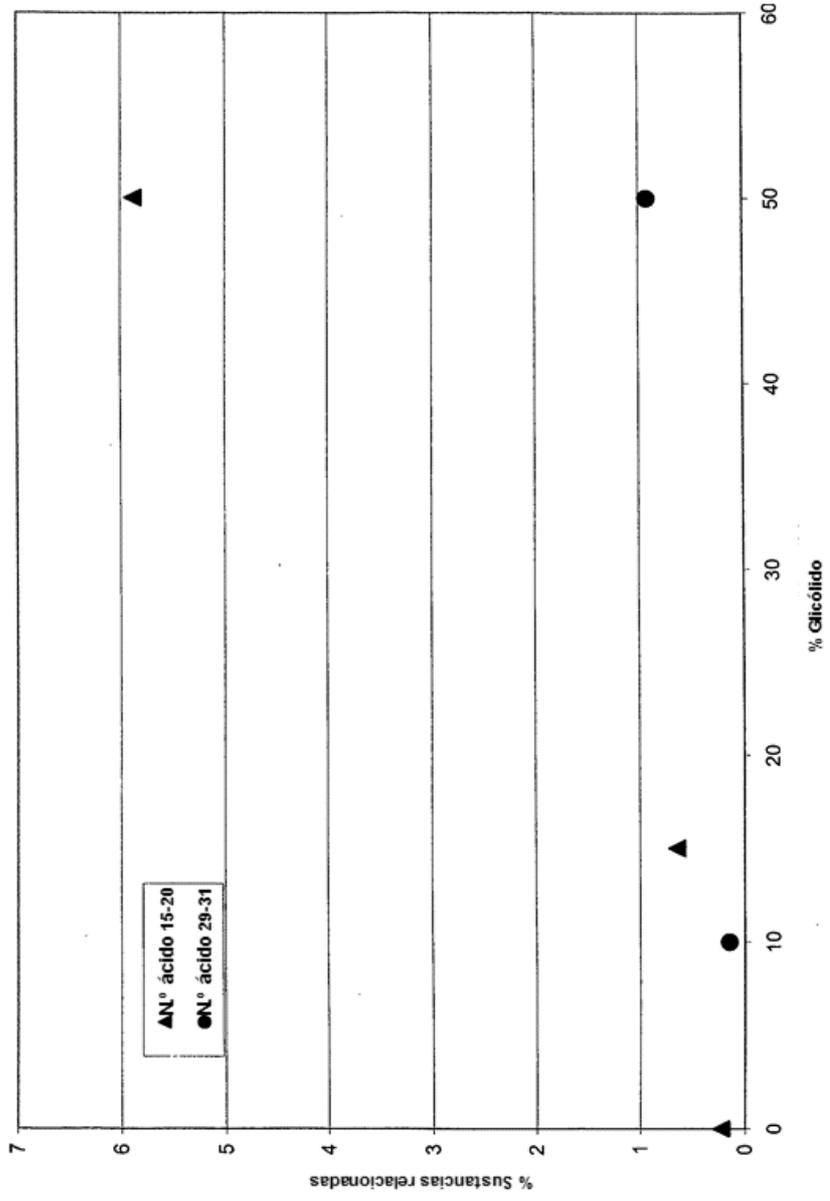


FIGURA 10



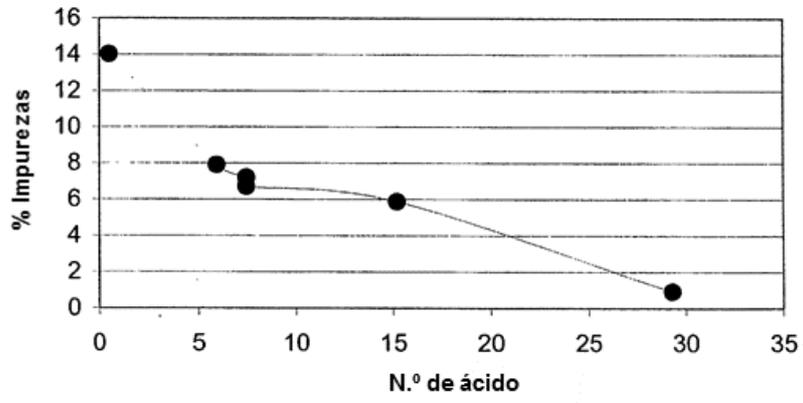


FIGURA 11A

FIGURA 11B

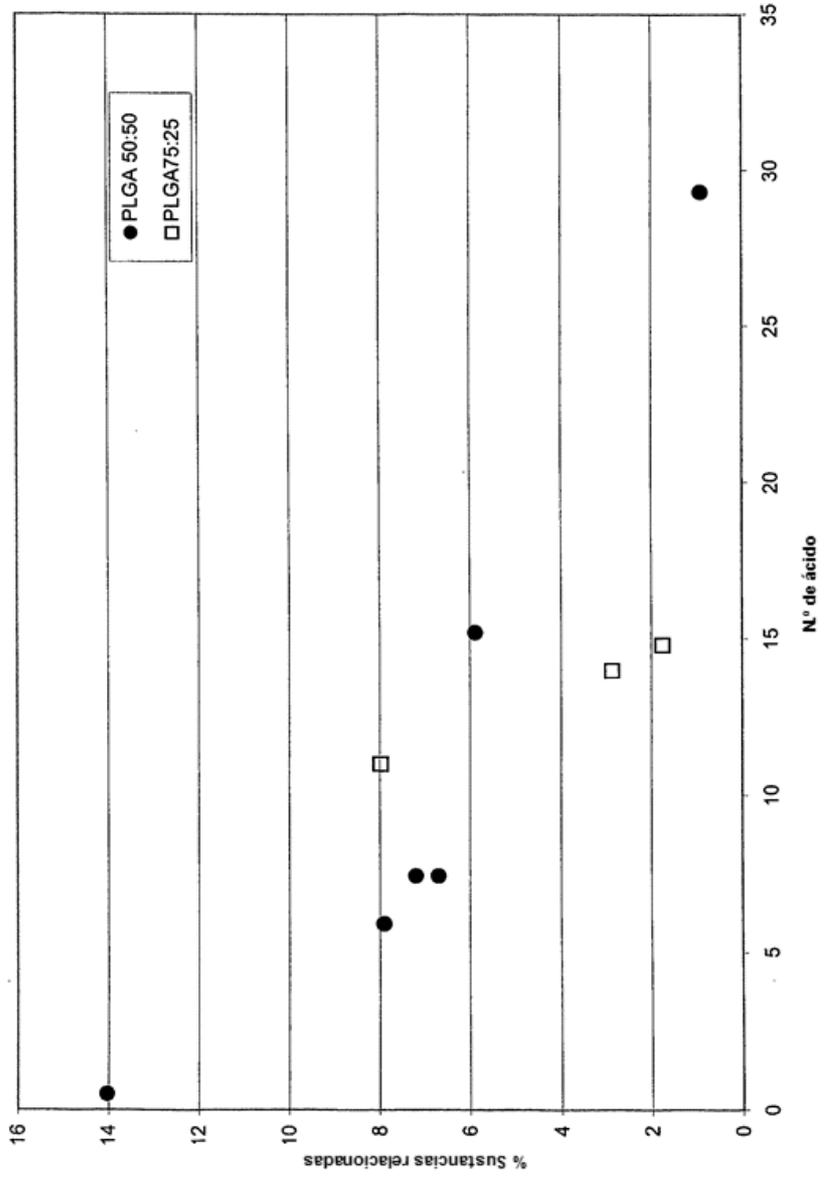


FIGURA 12

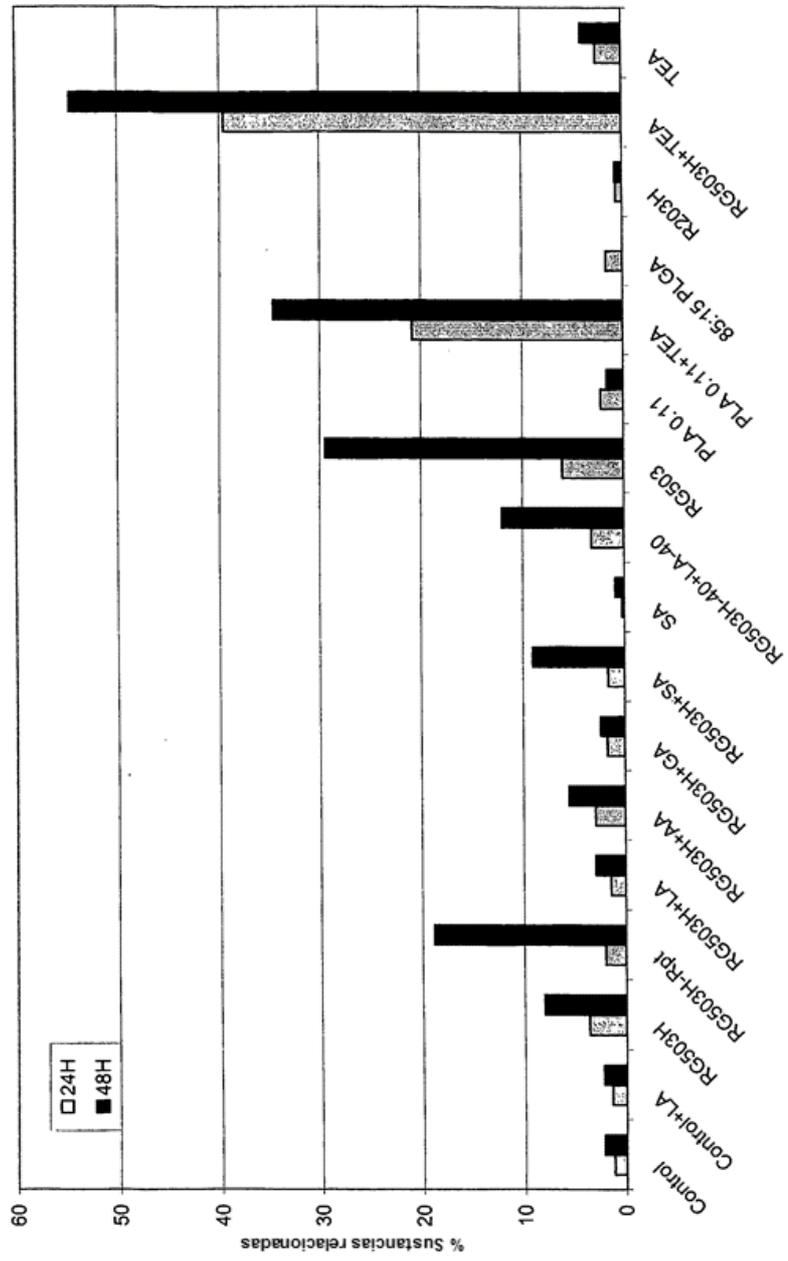


FIGURA 13A

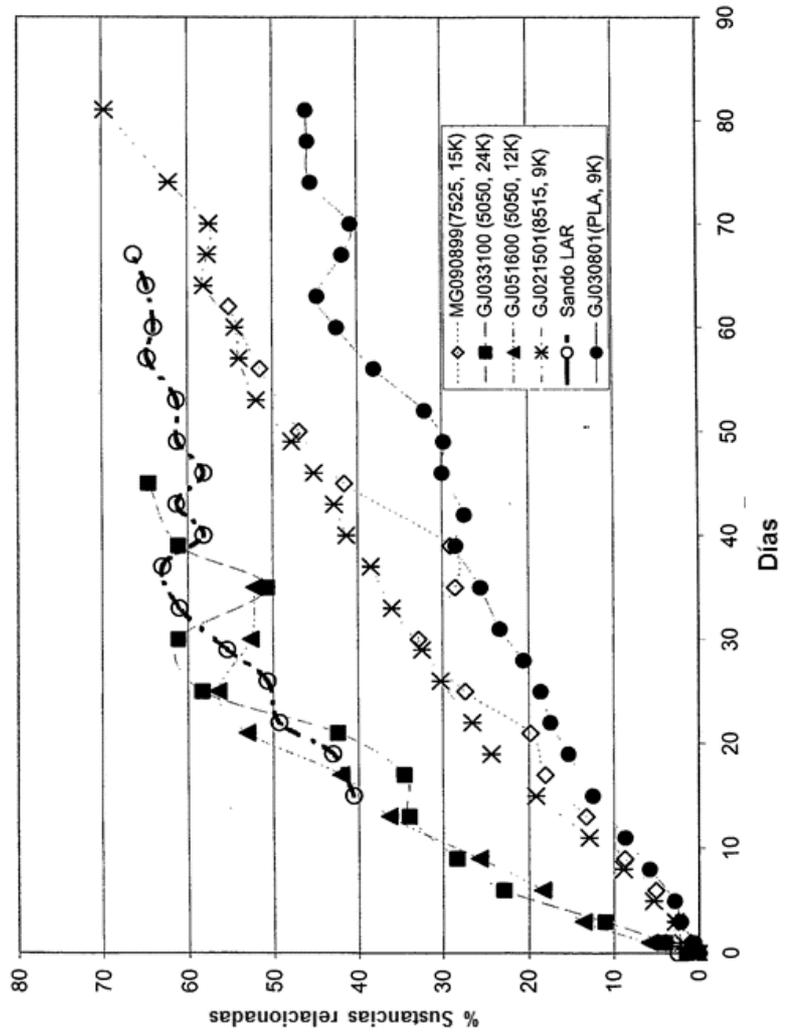


FIGURA 13B

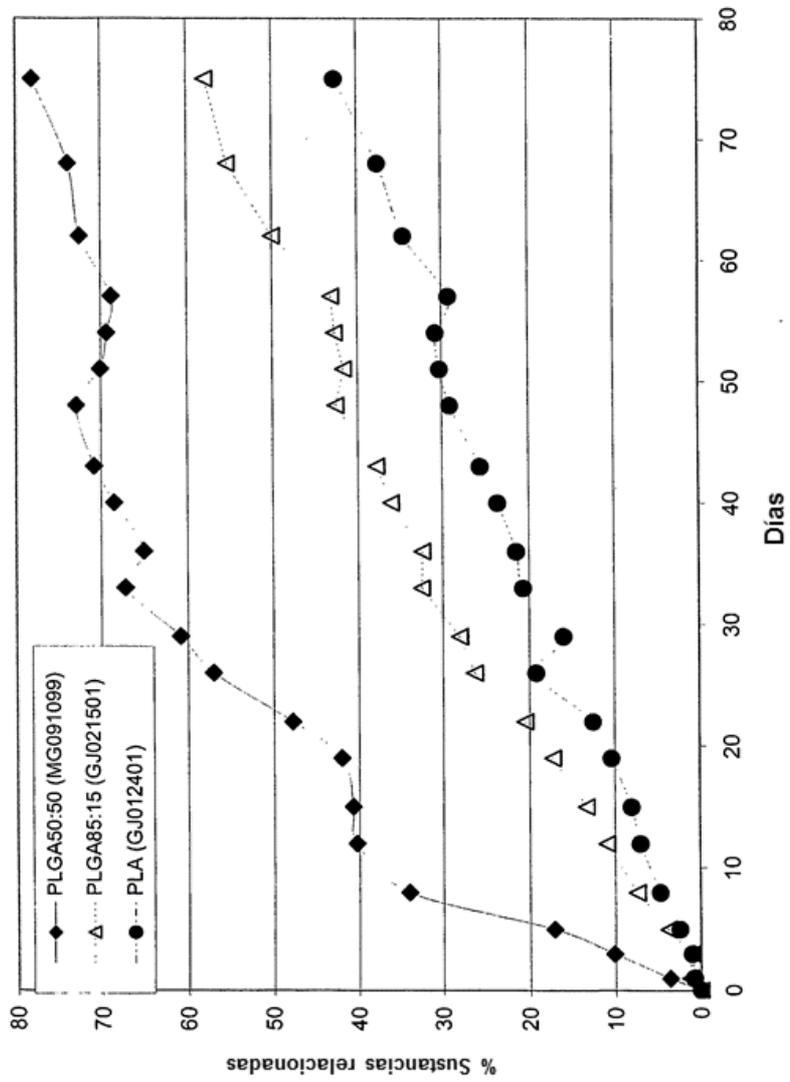


FIGURA 13C

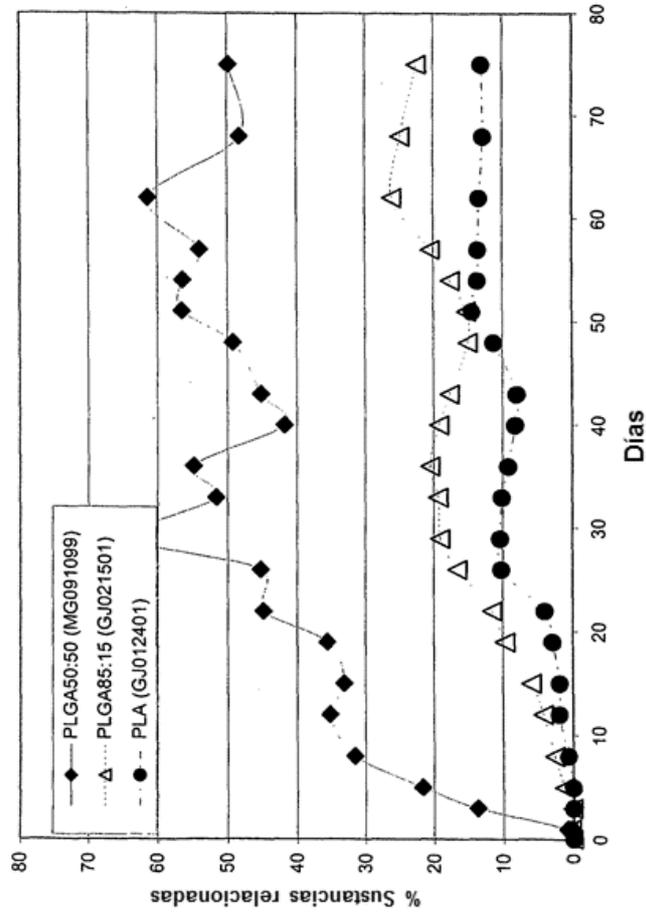


FIGURA 14

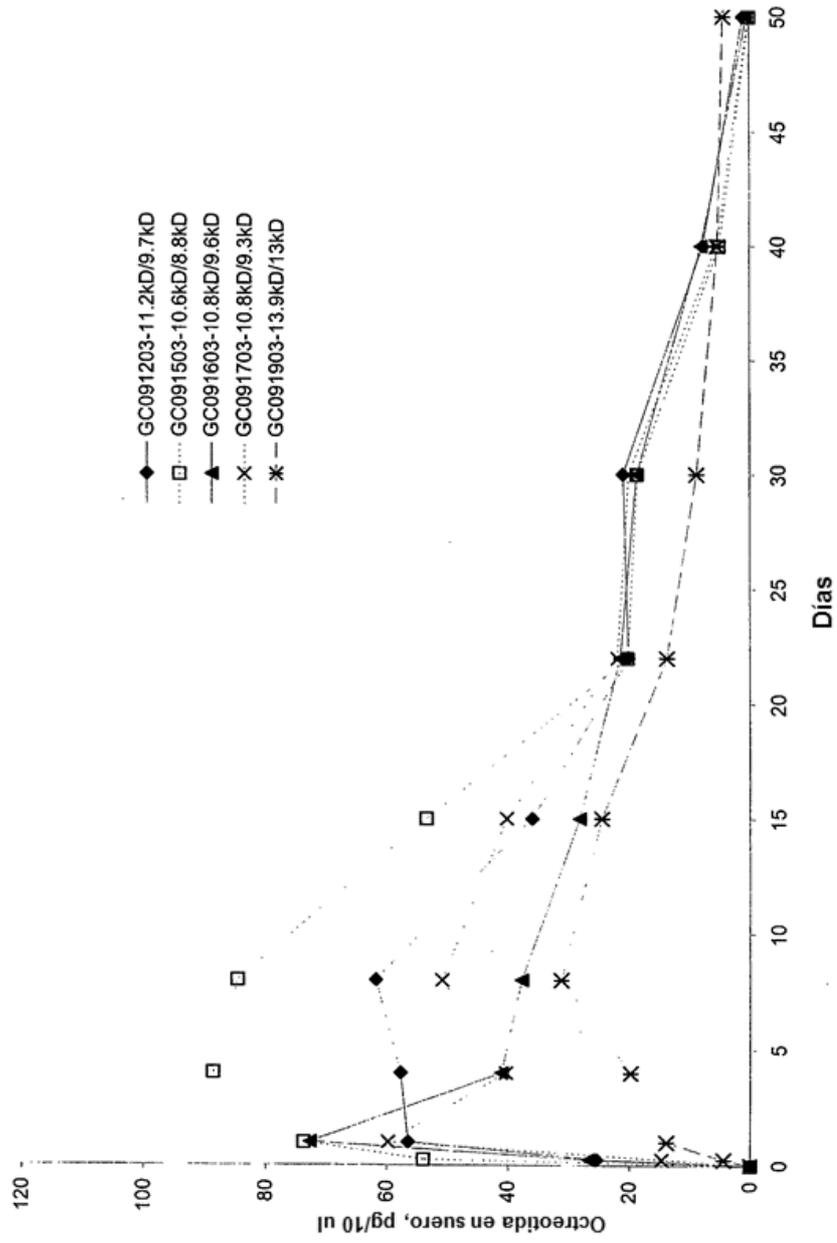
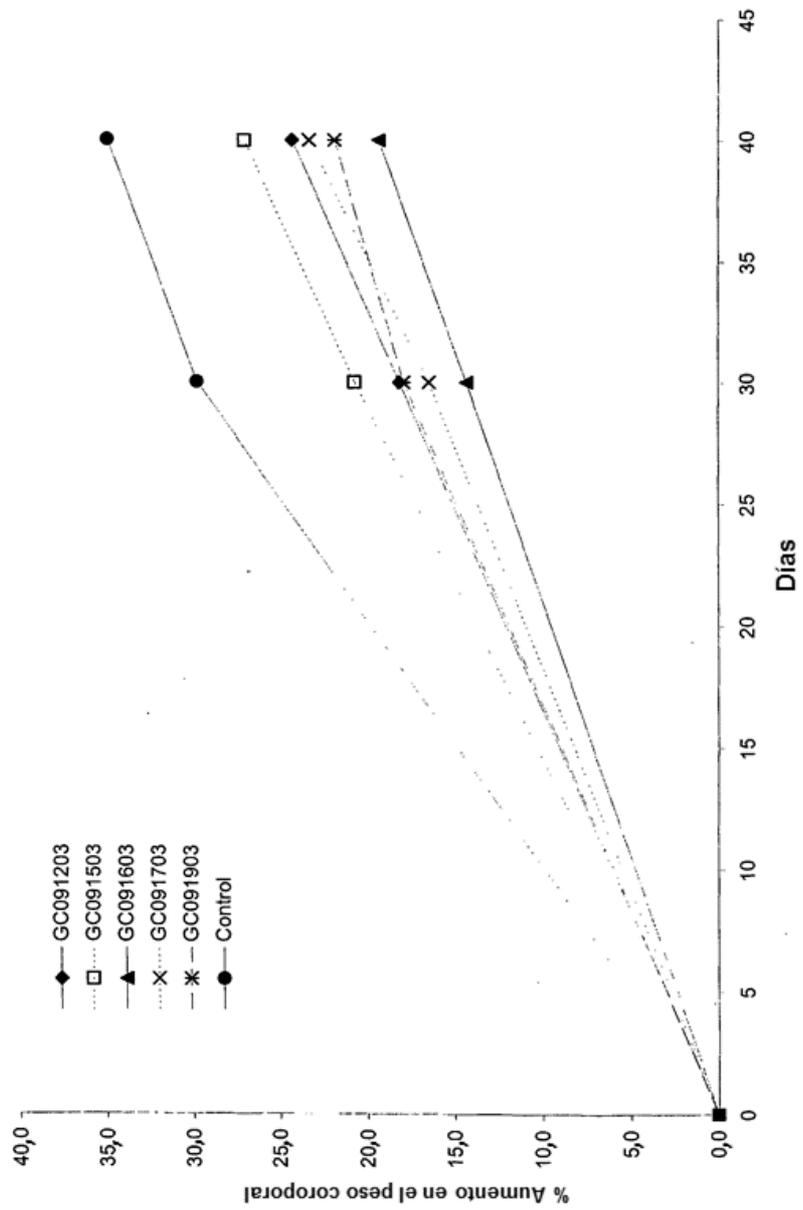


FIGURA 15



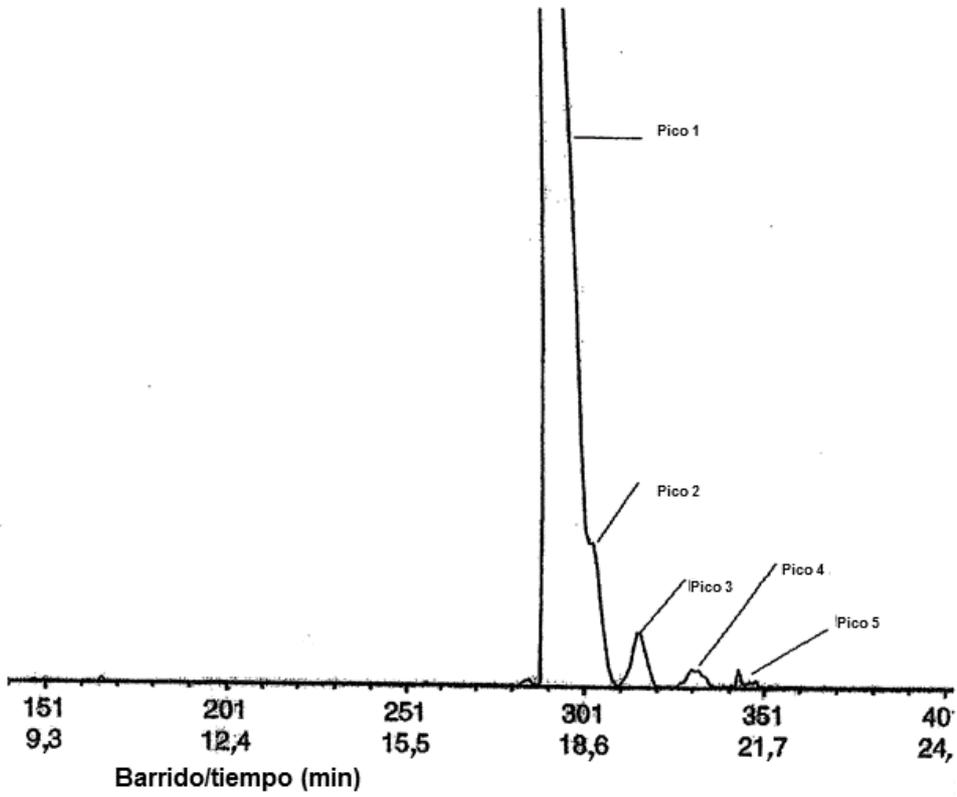


Figura 16

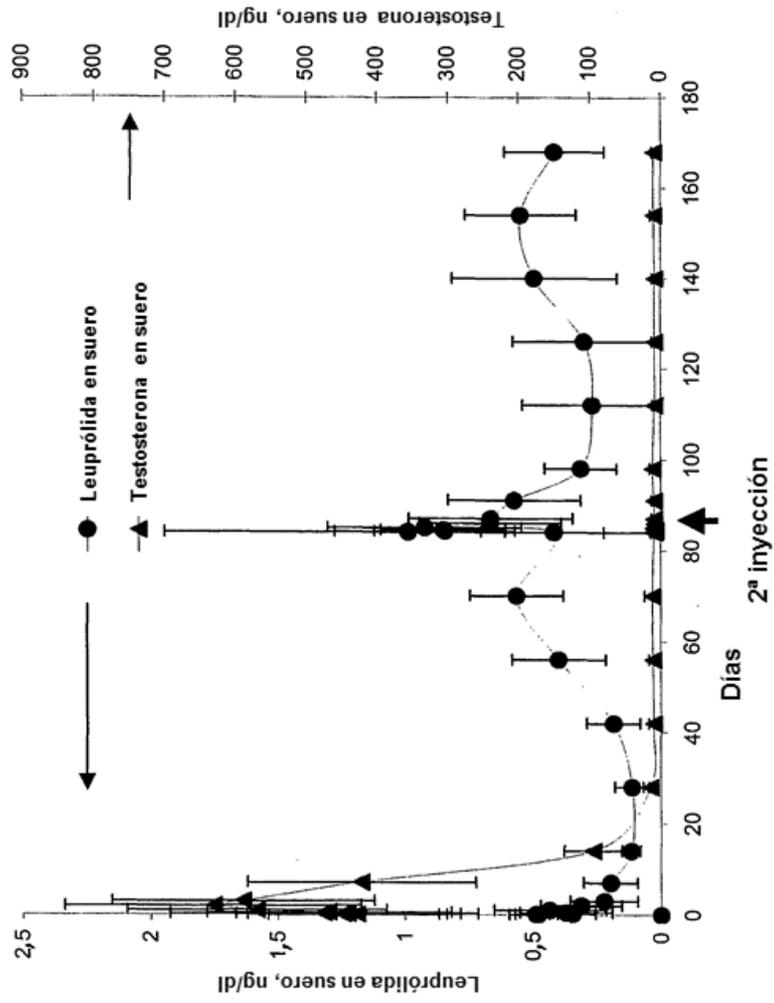


FIGURA 17

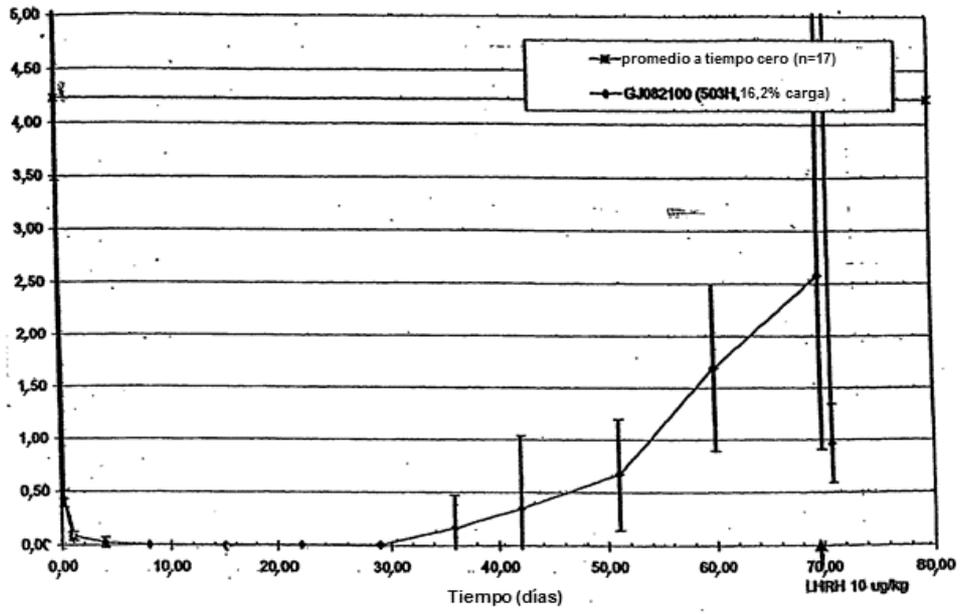


Figura 18

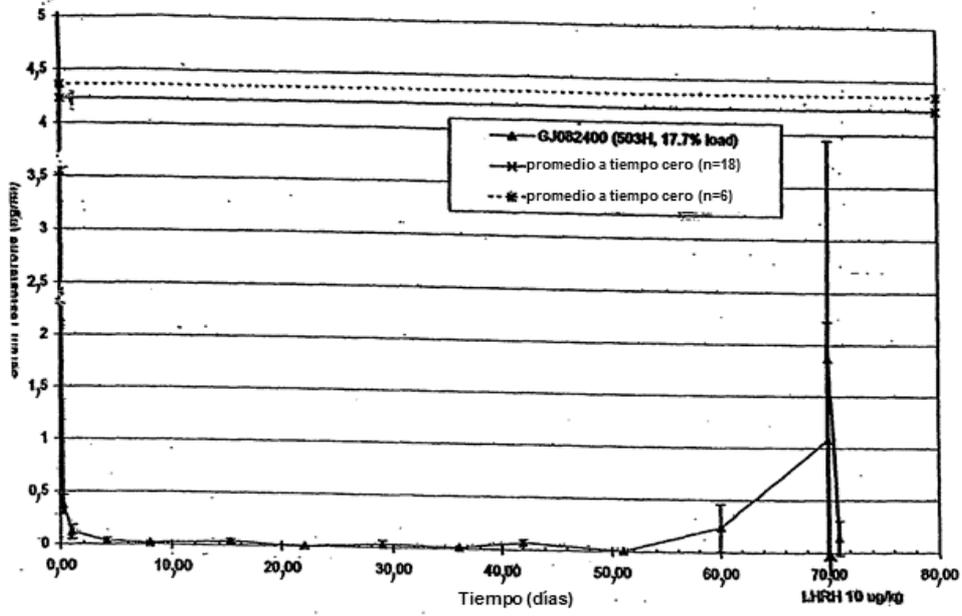


Figura 19

Figura 20

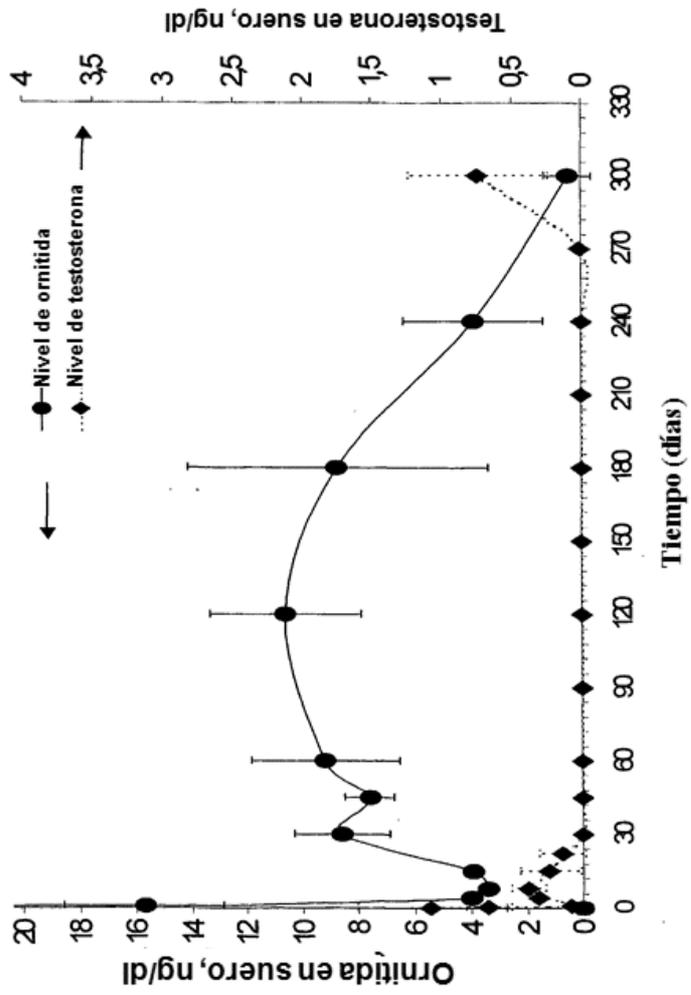


Figura 21

