

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 600 926**

51 Int. Cl.:

A61K 9/16 (2006.01)

A61K 9/19 (2006.01)

A61K 38/24 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.02.2012 PCT/IB2012/000272**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.11.2016 WO2012110886**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.02.2012 E 12706914 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.09.2016 EP 2696856**

54 Título: **Formulación de liberación controlada que comprende hCG**

30 Prioridad:

16.02.2011 IN MM22982010

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.02.2017

73 Titular/es:

**SANZYME PRIVATE LIMITED (100.0%)
8-2-120/13/5 Plot No. 13, Sagar Society, Road No.
2, Banjara Hills
Hyderabad 500034, IN**

72 Inventor/es:

**PRASAD, KOMPELLA VENKATA
SUBRAHMANYA;
SOMAN, JAY LAXMAN;
VAVIA, PRADEEP RATILAL y
VORA, LALITKUMAR KHIMJIBHAI**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 600 926 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

Formulación de liberación controlada que comprende hCG

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una formulación de liberación controlada de un fármaco; en particular, a una formulación de liberación controlada que comprende gonadotropina coriónica humana (hCG), o una variante de la hCG, conforme a lo que se define en las reivindicaciones.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La gonadotropina coriónica humana (hCG) es una hormona glucoproteica que aparece durante el embarazo y que es producida por el embrión en desarrollo, tras la concepción de éste, y posteriormente, por el sincitiotrofoblasto (parte de la placenta). Su función es evitar la desintegración del cuerpo lúteo del ovario, con lo que se mantiene la producción de progesterona, que resulta crucial para el embarazo en los seres humanos. Es posible que la hCG tenga funciones adicionales; por ejemplo, se cree que la hCG afecta a la tolerancia inmune durante el embarazo. Por lo general, las pruebas tempranas de embarazo se basan en la detección o medición de la hCG. Además, la gonadotropina coriónica humana desempeña un papel en la diferenciación/proliferación celular y puede que active la apoptosis.

20

La gonadotropina coriónica humana (hCG) es una glucoproteína; comprende 244 aminoácidos y tiene una masa molecular de 36,7 kDa. Es heterodimérica; tiene una subunidad α idéntica a la de las siguientes hormonas: hormona luteinizante (LH), hormona foliculoestimulante (FSH), hormona tiroestimulante (tirotropina, TSH); además, tiene una subunidad β (beta) que es exclusiva de la hCG. La subunidad α de la gonadotropina hCG tiene 92 aminoácidos de longitud, y la subunidad β contiene 145 aminoácidos y tiene dimensiones. Entre las dos subunidades crean un pequeño núcleo hidrófobo, rodeado por una zona de relación área de superficie/volumen alta: 2,8 veces la de una esfera. La inmensa mayoría de los aminoácidos exteriores de la hCG son hidrófilos.

25

La gonadotropina coriónica humana interacciona con el receptor de la hormona luteinizante/coriogonadotropina (LHCG) y promueve el mantenimiento del cuerpo lúteo durante el comienzo del embarazo; hace que dicho cuerpo lúteo secrete la hormona progesterona. La progesterona enriquece el útero mediante un revestimiento grueso con vasos sanguíneos y capilares, de manera que pueda sustentar al feto en desarrollo. A causa de su gran carga negativa, es posible que la hCG repela las células inmunitarias de la madre, protegiendo así al feto durante el primer trimestre del embarazo. También se ha planteado como hipótesis que es posible que la hCG constituya un vínculo a la placenta, de cara al desarrollo de una inmunotolerancia materna local.

35

De diversos estudios se desprende que es posible que la hCG constituya un vínculo para el desarrollo de una inmunotolerancia peritrofoblástica, y que es posible que facilite la invasión del trofoblasto, que se sabe que acelera el desarrollo del feto en el endometrio. Dada su similitud con la LH, también se puede usar clínicamente la hCG para inducir la ovulación en los ovarios y la producción de testosterona en los testículos. Puesto que la fuente biológica más abundante de hCG es la mujer embarazada, algunas organizaciones recogen orina de mujeres embarazadas a fin de extraer la hCG para uso en tratamientos de fertilidad. A medida que avanza el embarazo, se produce un aumento proporcional en los niveles de hCG.

40

La HCG se puede detectar en el suero sanguíneo de aproximadamente el 5% de las mujeres embarazadas 8 días después de la concepción (o antes), y en prácticamente todas las mujeres embarazadas 11 días después de la concepción (o antes). Los niveles de HCG aumentan progresivamente desde el momento de la concepción. En promedio, dichos niveles se duplican cada 30,9 horas, hasta que, aproximadamente en la octava semana posterior a la última menstruación (última menstruación = LMP, por sus siglas en inglés), se alcanzan valores de 6500 mUI/ml (6500 UI/l). Después, la velocidad del aumento se individualiza (en cada mujer), y el nivel máximo aparece entre los días 60 y 70 (de 9 a 10 semanas) después de la LMP. Los niveles de HCG se reducen ligeramente entre las semanas 12 y 16 después de la LMP; posteriormente, permanecen constantes hasta el nacimiento. En la Tabla 1 se indican los niveles de hCG, que son importantes para el mantenimiento y el avance del embarazo.

45

Las formulaciones de hCG actuales presentan ciertas desventajas, como el modo de administración de la formulación y el número de dosis que hay que administrar al sujeto. Pese a que se lleva usando el fármaco más de 4 décadas, la principal vía de administración sigue siendo la parenteral; es decir, por inyección intramuscular o subcutánea. Se han intentado otras vías, pero las tasas de éxito clínico de esas formulaciones son un enigma.

60

Los péptidos y las proteínas desempeñan una función crucial en todos los procesos biológicos, y en los últimos años han sido objeto de una atención creciente como posibles fármacos. Los rápidos avances que se han producido en la farmacología de los péptidos y las proteínas, así como la producción a gran escala de dichos compuestos mediante la tecnología de recombinación del ADN (entre otras técnicas), han dado lugar a un enorme interés en ellos. Desafortunadamente, el desarrollo de los péptidos y de las proteínas ha sido mucho más rápido y avanzado que la

65

capacidad de administrar dichos compuestos de manera sistémica mediante sistemas de administración cómodos y eficaces.

5 Para numerosas aplicaciones resulta deseable lograr una liberación sostenida y predecible de una sustancia; en especial, en los casos de los fármacos para los que resulta deseable mantener una velocidad de liberación estable y bien controlada, así como evitar la necesidad de administraciones frecuentes del fármaco.

10 Las principales metodologías para el logro de la liberación sostenida podrían ser las siguientes: usar bombas de infusión con agujas hipodérmicas o intubación (como en el caso de las bombas de insulina), pero son dispositivos mecánicos, es problemático para el sujeto llevarlas consigo, y son difíciles de mantener; difusión a través de membranas, como en el caso de los parches, que contengan el fármaco activo (en este caso, el nivel de uso por parte de los pacientes es muy alto, pero la gama de fármacos que se puede usar con este método es limitada); métodos iontoforéticos, que son bastante incómodos de usar y precisan de un equipo caro para administrar el fármaco; y la opción idónea, una formulación de liberación controlada, en forma inyectable y con una frecuencia de administración de 2-3 veces al mes.

20 La vía oral es la más cómoda y popular; sin embargo, la mayoría de los fármacos a base de péptidos tienen una actividad baja por vía oral, que se debe, sobre todo, a su degradación por enzimas del tracto gastrointestinal, así como a la escasa permeabilidad de la mucosa intestinal. Se han investigado vías alternativas, como la nasal, pulmonar, rectal, bucal, vaginal y transdérmica, pero con poco éxito.

25 Por ello, y más que nunca antes, existe un notable interés en el desarrollo de sistemas de administración novedosos que administren los fármacos a base de péptidos y de proteínas a una velocidad controlada, a lo largo de períodos de tiempo prolongados. La inestabilidad de las proteínas puede clasificarse en inestabilidad de dos tipos: física y química. En la inestabilidad física no hay modificación de los enlaces covalentes, sino que conlleva cambios en las estructuras de mayor magnitud, tales como la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria. Eso incluye la desnaturalización, es decir, el desplegamiento, de una molécula de proteína, así como la adsorción a superficies, la agregación y la precipitación de proteínas o péptidos. En la inestabilidad química hay formación o ruptura de enlaces covalentes, lo que conduce a la formación de entidades químicas diferentes. Son ejemplos de dicha inestabilidad química procesos como los siguientes, que se producen en las rutas correspondientes: escisión de cadenas (hidrólisis), desamidación, isomerización, racemización y oxidación.

35 La nanotecnología podría proporcionar vectores óptimos capaces de proteger de la degradación al ingrediente o ingredientes activos y/o a las biomoléculas terapéuticas (proteínas, enzimas o polipéptidos concretos) (*International Journal of Nanomedicine* 2010, 5, 37-49). Los materiales sintéticos para aplicaciones biomédicas son cubiertos inmediatamente por proteínas cuando se los pone en contacto con un entorno biológico. Tras la unión a proteínas, las nanopartículas son retiradas rápidamente por el sistema fagocítico mononuclear (SFM), también conocido como el sistema reticuloendotelial (SRE). Se trata de macrófagos, que suelen ser células de Kupffer del hígado, y no son capaces de identificar directamente a las nanopartículas en sí, pero sí que reconocen las proteínas opsoninas específicas unidas a la superficie de dichas nanopartículas.

45 Los nanosistemas poliméricos no tóxicos biodegradables autorizados por la FDA (*Food and Drug Administration*, Organismo para el Control de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos de América) representan una alternativa atractiva a los liposomas, puesto que tienen las siguientes ventajas: circulación más prolongada en el torrente sanguíneo y, generalmente, mayor capacidad de transporte de fármacos. Se han investigado ampliamente polímeros como el poli(ácido láctico) (PLA, por sus siglas en inglés), el poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA, por sus siglas en inglés), para conocer su biocompatibilidad y su posible capacidad para liberar proteínas terapéuticas de manera controlada, a lo largo de un período de tiempo prolongado. Con independencia del nanomaterial que se elija para la encapsulación de las proteínas, hay que tener en cuenta una cuestión importante, cuál es la comprensión de las interacciones proteína-proteína (*International Journal of Nanomedicine* 2010, 5, 37-49).

55 El PLA y el PLGA han sido autorizados por la FDA como excipientes para lograr una liberación sostenida de un ingrediente activo. Sin embargo, su aplicación en sistemas de administración de proteínas se suele caracterizar por una eficiencia de atrapamiento baja, liberaciones súbitas (en ráfagas), inestabilidad de la proteína hidrófila encapsulada, y liberación parcial de proteína. A fin de aumentar el rendimiento de estas nanopartículas poliméricas, se podrían aplicar polisacáridos tales como el alginato (ALG) y el quitosán (CS). Se han estudiado ampliamente el CS y sus derivados como transportadores de proteínas y fármacos. Más concretamente, las nanopartículas de las que estamos hablando podrían estar compuestas, en su totalidad, de CS, o éste podría usarse en diversas combinaciones de copolímeros. Los copolímeros obtenidos mediante la combinación de CS y ALG son capaces de generar un entorno más propicio que protege a los péptidos y a las proteínas contra condiciones "estresantes" y que posibilita su estabilización durante la encapsulación, el almacenamiento y la liberación.

65 Aunque siguen apareciendo proteínas nuevas disponibles para usos médicos, su administración terapéutica sigue siendo difícil. Los nanosistemas parecen ser la solución óptima para aumentar la biodisponibilidad, biodistribución y seguridad de las proteínas. Además, la combinación de nanopartículas y proteínas podría ser un sistema válido para lograr el diseño de nanovectores eficientes para la administración de fármacos. De hecho, se

pueden ajustar adecuadamente las nanopartículas para aplicaciones concretas, y resultaría posible diseñarlas con precisión para que resuelvan necesidades biológicas. Se puede prever que, si se consigue fabricar dichas nanopartículas a gran escala, la aplicación, en nanobiotecnología, de los sistemas de administración descritos contribuirá a desbloquear la fabricación biofarmacéutica actual (*African Journal of Biotechnology*, Vol. 7 (25), páginas 4926-4934, 29 de diciembre de 2008).

Dentro de lo ya conocido en este campo de la técnica, se ha descrito varias veces el uso de polímeros biodegradables disueltos en solventes orgánicos adecuados para la administración de fármacos. Son ejemplos de polímeros biodegradables los siguientes: poliláctidos, poliglicólidos, policaprolactonas, polianhídridos, poliamidas, poli(aminoácidos), polivinilpirrolidona, polietilenglicol, polihidroxixelulosa, quitina y quitosán. La solubilidad de los polímeros en los diferentes solventes varía en función de su cristalinidad, hidrofiliidad, su unión mediante enlaces hidrógeno y su peso molecular (*Recent Patents on Drug Delivery & Formulation 2007*, 1, 65-71). Sin embargo, los polímeros biodegradables "inteligentes" y/o la absorción, la bioconjugación y la encapsulación de proteínas en nanopartículas son alternativas excelentes para asegurarse de que la velocidad de absorción de las proteínas procedentes de fuentes naturales, como, por ejemplo, la hCG, no se vea reducida durante la administración por vías parenterales.

En ZHU K J ET AL. 2001 se describe la *Preparation and characterization of hCG-loaded polylactide or poly(lactide-co-glycolide) microspheres using a modified water-in-oil-in-water (w/o/w) emulsion solvent evaporation technique* ("Preparación y caracterización de microesferas de poliláctido o poli(láctido-co-glicólido) cargadas de hCG, usando una técnica, modificada, de evaporación del solvente de una emulsión de agua-en aceite-en agua (w/o/w)"): microesferas con gonadotropina coriónica humana (hCG) atrapada, preparadas mediante una técnica, modificada, de evaporación del solvente de una emulsión de w/o/w (agua-en aceite-en agua).

La hCG humana, que es una gonadotropina, está disponible en forma acorde a la farmacopea, así como en forma muy purificada, como sustancia inyectable para uso subcutáneo o intramuscular. Sin embargo, para inducir la ovulación se inyecta una sola dosis de hCG cuando el folículo ha alcanzado un tamaño de 16 a 20 mm. Pero, para el mantenimiento del embarazo la pauta posológica es complicada y requiere inyecciones durante un período mínimo de 8 a 12 semanas, lo que resulta incómodo para las mujeres embarazadas. La necesidad de administrar inyecciones repetidamente podría evitarse mediante una formulación de liberación controlada; además, se podría administrar con precisión la cantidad de fármaco necesaria para su eficacia clínica, en el lugar de acción del mismo, con lo que se obtendría la biodisponibilidad adecuada.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona una formulación de liberación controlada que comprende microesferas cargadas de gonadotropina coriónica humana (hCG) o de una variante de la hCG, y las microesferas se pueden preparar mediante el proceso que comprende: (a) emulsionar una solución acuosa de hCG o de una variante de la hCG, que comprenda de un 0,1% a un 20% (p/v) de gelatina, con una fase oleosa orgánica que comprenda de un 1% a un 50% de PLGA de baja viscosidad, a fin de obtener una emulsión primaria; (b) emulsionar la emulsión primaria, con una fase acuosa que comprenda de un 0,01% a un 30% (p/v) de alcohol polivinílico y de un 0,1% a un 20% de cloruro sódico, a fin de obtener una microesfera cargada de hCG o de una variante de la hCG; (c) endurecer la microesfera cargada de hCG o de una variante de la hCG mediante agitación a 100-1000 rpm, a una temperatura de 25 °C a 50 °C, durante un período de 0,5 a 5 horas; (d) lavar con agua la microesfera cargada de hCG o de una variante de la hCG del paso (c); y (e) liofilizar la microesfera cargada de hCG o de una variante de la hCG del paso (d) usando de un 1% a un 30% (p/p) de manitol.

En una realización preferida, la formulación de liberación controlada de la invención comprende microesferas cargadas de gonadotropina coriónica humana (hCG) o de una variante de la hCG que tienen un tamaño comprendido en el intervalo de 0,02 µm a 500 µm.

Un aspecto adicional de la presente invención proporciona un proceso para la preparación de una formulación inyectable, de liberación controlada, de gonadotropina coriónica humana (hCG), y dicho proceso comprende: (a) emulsionar una solución acuosa de hCG o de una variante de la hCG, que comprenda de un 0,1% a un 20% (p/v) de gelatina, con una fase oleosa orgánica que comprenda de un 1% a un 50% de PLGA de baja viscosidad, a fin de obtener una emulsión primaria; (b) emulsionar la emulsión primaria, con una fase acuosa que comprenda de un 0,01% a un 30% (p/v) de alcohol polivinílico y de un 0,1% a un 20% de cloruro sódico, a fin de obtener una microesfera cargada de hCG o de una variante de la hCG; (c) endurecer la microesfera cargada de hCG o de una variante de la hCG mediante agitación a 100-1000 rpm, a una temperatura de 25 °C a 50 °C, durante un período de 0,5 a 5 horas; (d) lavar con agua la microesfera cargada de hCG o de una variante de la hCG del paso (c); y (e) liofilizar la microesfera cargada de hCG o de una variante de la hCG del paso (d) usando de un 1% a un 30% (p/p) de manitol.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS ACOMPAÑANTES

La Figura 1 muestra un perfil de distribución por tamaño de partícula

A) Ejemplo 3, B) Ejemplo 4

La Figura 2 muestra un perfil comparativo de liberación de hCG de la microesfera (Ejemplos 1-4).

La Figura 3 muestra un cromatograma estándar de la hCG (1 mg/ml) en agua.

5 La Figura 4 muestra un cromatograma estándar de la hCG (1 mg/ml) en solución salina tamponada con fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés), pH 7,4 (medio de liberación).

La Figura 5 muestra un cromatograma de la hCG extraída de la microesfera.

La Figura 6 muestra un cromatograma de la hCG liberada de la microesfera, a lo largo de 24 horas, en tampón PBS, pH 7,4.

10 La Figura 7A) muestra una electroforesis SDS-PAGE estándar de la hCG en su forma reducida, a diversas concentraciones.

La Figura 7B) muestra un análisis de la estabilidad de la hCG mediante electroforesis SDS-Page, en donde las vías:

1. Marcador molecular
2. hCG estándar (forma reducida)
3. hCG estándar (forma no reducida)
- 15 4. hCG tratada con diclorometano (forma reducida)
5. hCG tratada con diclorometano (forma no reducida)
6. hCG tratada con diclorometano en presencia de gelatina (forma reducida)
7. hCG tratada con diclorometano en presencia de gelatina (forma no reducida)
- 20 8. Microesfera cargada de hCG (forma reducida)
9. Microesfera cargada de hCG (forma no reducida).

La Figura 8 muestra una imagen, tomada mediante microscopía electrónica de barrido, de la microesfera porosa cargada de hCG preparada sin cloruro sódico en una fase acuosa externa (Ejemplo 2).

La Figura 9 muestra una imagen, tomada mediante microscopía electrónica de barrido, de la microesfera no porosa cargada de hCG preparada con cloruro sódico (0,2M) en una fase acuosa externa (Ejemplo 4).

25

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

30 La presente invención proporciona una formulación de liberación controlada que comprende gonadotropina coriónica humana (hCG) o variantes de la misma, así como un proceso para su preparación conforme a las presentes reivindicaciones.

35 La formulación de liberación controlada que comprende hCG conforme a lo que describe en la presente invención es estable y eficaz, y presenta ventajas frente a las formulaciones de hCG conocidas hasta ahora en este campo del conocimiento. La formulación de liberación controlada de hCG de la presente invención tiene numerosos usos terapéuticos no existentes hasta ahora. La formulación que se describe en la presente invención es particularmente útil en los tratamientos terapéuticos, a fin de aumentar los niveles de hCG de cara al mantenimiento del embarazo. La novedosa formulación viene a cubrir la necesidad que existía, de soluciones, formulaciones y productos que comprendan hCG o variantes de la hCG, que sean estables y que se puedan conservar y usar en el ámbito de la ginecología.

40

La formulación de liberación controlada de hCG que se describe en la presente invención comprende hCG encapsulada en una matriz polimérica que, cuando se administra, libera hCG. La concentración de hCG en la formulación está comprendida en el intervalo de 500 UI a 100000 UI.

45 La encapsulación de la proteína hCG humana en polímeros biodegradables adecuados y la formulación de liberación controlada (LC) de este compuesto farmacológicamente activo garantizan la administración del fármaco en el lugar de acción específico, a la velocidad y la posología óptimas desde el punto de vista terapéutico.

50 Las nano/micropartículas poliméricas ofrecen ventajas específicas frente a otros compuestos, como los liposomas u otros transportadores, dado que aumentan la estabilidad del fármaco y de sus variantes y poseen útiles propiedades de liberación controlada. El tamaño de partícula oscila entre 10 y 1000 nm. La microesfera cargada de hCG que se describe en la presente invención se prepara disolviendo, atrapando, encapsulando o fijando hCG a la matriz polimérica; en función del método de preparación, se pueden obtener micropartículas, microesferas, nanopartículas, nanoesferas, nanocápsulas o una combinación de todo lo anterior.

55

Asimismo, la presente invención proporciona un proceso de preparación de la formulación de liberación controlada de hCG.

60 En función del método de preparación, se pueden obtener nanopartículas/micropartículas, nanoesferas/microesferas, nanocápsulas/microcápsulas o una combinación de todo lo anterior.

Durante la polimerización, se podrían usar para el proceso diversos estabilizadores, como por ejemplo: dextrano 10, 40 o 70, o poloxámero 188, 184 o 237. Además, en la formulación de liberación controlada de hCG pueden usarse surfactantes.

65

La formulación de liberación controlada de hCG que se describe en la presente invención reduce el número de dosis que se necesita tomar; el sujeto únicamente debe tomar la formulación una vez cada dos semanas (o cada más tiempo), en función de sus necesidades; así, se evita la necesidad de inyecciones repetidas.

5 En otra realización de la presente invención se proporciona una formulación de liberación controlada de hCG que comprende la molécula de hCG encapsulada, y dicha formulación puede llevar un excipiente o no.

10 La formulación de liberación controlada de hCG comprende hCG liofilizada y muy purificada, integrada o encapsulada en nano/micropartículas, nano/microcápsulas o nano/microesferas. Los excipientes se preparan a partir de polímeros biodegradables permitidos.

15 En otra realización de la presente invención se proporciona una formulación de liberación controlada de hCG, en la que las concentraciones de hCG o de sus variantes oscilan entre 100 UI y 100000 UI, como formulaciones de liberación controlada (LC) o de liberación sostenida (LS) (LC/LS).

En otra realización de la presente invención se proporciona una formulación de liberación controlada de hCG, en la que la hCG está en forma natural, sintética o recombinante.

20 En otra realización de la presente invención se proporciona una formulación de liberación controlada de hCG, en la que la hCG es una variante de la hCG.

En una realización, la proporción entre la hCG y el PLGA que se usan en el proceso de la presente invención está comprendida en el intervalo de 1:0,5 a 1:50.

25 En otra realización de la presente invención, la solución acuosa de hCG o de la variante de hCG que se usa en la preparación de una formulación de la presente invención puede comprender, además, un estabilizador. El estabilizador puede seleccionarse de un grupo que comprende, entre otros compuestos posibles, los siguientes: gelatina, dextrano, poloxámero, polioles, sacáridos, aminoácidos, sales orgánicas y/o inorgánicas, y combinaciones de los mismos.

30 En otra realización, el emulgente que se usa en el proceso de la presente invención se selecciona de un grupo que comprende, entre otros compuestos posibles, los siguientes: alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, polisorbato, lecitina, carboximetilcelulosa y combinaciones de los mismos.

35 En otra realización, la fase acuosa que se usa en el paso (b) del proceso de la presente invención puede comprender un emulgente y una sal orgánica/inorgánica o un monosacárido/oligosacárido/polisacárido y derivados/combinaciones de lo anterior, a fin de obtener una microesfera cargada de hCG o de una variante de la hCG.

40 Preferiblemente, el sacárido se selecciona de un grupo que comprende sacarosa, dextrosa, manitol y glucosa.

En otra realización, el paso (b) del proceso de la presente invención puede comprender emulsionar la emulsión primaria con una fase acuosa que comprenda un emulgente y cloruro sódico, a fin de obtener una microesfera cargada de hCG o de una variante de la hCG.

45 En otra realización adicional, el tamaño de partícula de la microesfera cargada de hCG o de una variante de la hCG está comprendido en el intervalo de 0,02 μm a 500 μm .

50 En otro aspecto de la presente invención, la formulación libera hCG o variante de la hCG durante como mínimo 15 días (o más).

Otra realización de la presente invención se refiere a la formulación de liberación controlada de hCG que se describe la presente invención, y en dicha realización, la formulación muestra una velocidad de liberación, *in vitro*, de la hCG o variante de la hCG, que está comprendida en el intervalo de 1000 UI a 8000 UI dentro las primeras 24 horas tras la administración, y de 10 UI a 1000 UI cada 24 horas durante el período restante.

55 Otra realización de la presente invención se refiere a la formulación de liberación controlada de hCG que se describe la presente invención, y en dicha realización, la formulación muestra una velocidad de liberación, *in vivo*, de la hCG o variante de la hCG, que está comprendida en el intervalo de 0,1 UI/ml a 2,0 UI/ml de plasma dentro las primeras 24 horas tras la administración, y de 0,0002 UI/ml a 0,2 UI/ml de plasma cada 24 horas durante el período restante.

60 Otra realización de la presente invención proporciona una formulación de liberación controlada que comprende microesferas cargadas de gonadotropina coriónica humana (hCG) o de una variante de la hCG, conforme a lo que se define en las reivindicaciones, con un tamaño comprendido en el intervalo de 0,02 μm a 500 μm , y dicha formulación libera hCG o variante de la hCG durante como mínimo 15 días (o más).

65

La novedosa formulación de liberación controlada de hCG que se describe en la presente invención evita la necesidad de inyecciones repetidas de la hCG muy purificada. El NDDS (siglas en inglés de “Nuevo sistema de administración de fármacos”) hace posible proteger a las moléculas de proteína muy purificada contra la degradación durante su circulación. La tecnología NDDS que hace uso de microesferas facilita la liberación controlada y sostenida, reduce la exposición sistémica a las moléculas liberadas y reduce los efectos de la degradación en entornos biológicos. Los materiales tamaño nano son capaces de pasar directamente al interior de los tejidos, e incluso directamente al interior de las células, y de ejercer la actividad farmacológica deseada. La novedosa formulación que se describe en la presente invención podría administrarse como inyección depot que contenga el fármaco activo incluido en partículas tamaño nano (nanoesferas, nanocápsulas y nanopartículas).

Las formas de administración existentes en la actualidad son ampollas o viales, que vienen en un envase que comprende una ampolla o vial con el fármaco activo liofilizado (hCG) y otra ampolla o vial que contiene el solvente para disolver el fármaco activo, junto con excipientes que se usan para inyección intramuscular o subcutánea; en cambio, la presente invención proporciona una formulación de liberación controlada de hCG que se puede administrar por vía oral, y que puede proveerse en forma de cápsulas, comprimidos y diversas otras formas que se pueden administrar por vía oral a un sujeto que las necesite.

Convencionalmente, las nanopartículas se preparan mediante diversos métodos, como la dispersión de polímeros formados previamente o la polimerización de monómeros. Se pueden utilizar varios métodos para preparar nanopartículas biodegradables haciendo uso de PLA, PLG, PLGA (poli(D,L-sustancia surfactante/emulgente tal como gelatina, poli(vinil-láctido), poli(ácido láctico), poli(D,L-glicólido)-alcohol), polisorbato-80, poloxámero-188, etc.

El proceso de preparación de las nanopartículas (micropartículas) novedosas es relativamente fácil de poner en práctica. Pueden liberarse, a lo largo de un período de tiempo prolongado, cantidades exactas de una molécula concreta; por ejemplo, de una proteína. Preferiblemente, la preparación se lleva a cabo en condiciones acuosas y suaves. Las capas de polielectrolito actúan como dispositivo de almacenamiento, y pueden contribuir a inhibir la degradación de las moléculas “incluidas”; por ejemplo, inhibiendo la proteólisis de los fármacos a base de péptidos. Además, se puede evitar tener en una solución concentraciones altas de las moléculas de proteína incluidas, lo que resulta beneficioso si las concentraciones altas pueden conducir a la desactivación de la carga útil o si no resulta deseable, por algún otro motivo, tener concentraciones altas.

Algunos de los métodos usados con frecuencia para la preparación de las nano/micropartículas son: evaporación del solvente, difusión del solvente o emulsificación espontánea, precipitación por salado/emulsificación-difusión. Lo más reciente es la tecnología de los fluidos supercríticos. Conforme a los informes disponibles, y conforme a los artículos con revisiones científicas independientes publicados, en el transcurso de la polimerización se usan diversos estabilizadores, como, por ejemplo, el dextrano (70/40/10). Además, junto con los estabilizadores se usan algunos surfactantes, como, por ejemplo, los polisorbatos. En esta novedosa preparación de hCG muy purificada y de sus variantes, no se descarta la posibilidad de usar polímeros hidrófilos novedosos.

Dosificación:

En mujeres se necesitan de unas 5000 UI a 20000 UI de hCG para inducir la ovulación, en una inyección el día 12 del ciclo menstrual, o cuando el folículo de Graaf alcanza un tamaño > 18 mm.

Abortos habituales/recurrentes: una vez confirmado el embarazo, se necesitan 5000 UI al día, que se deben inyectar en tres días alternos. A partir del día 9 tras la primera inyección, 2000 UI dos veces a la semana hasta la semana 14 del embarazo.

En hombres, se necesitan unas 5000 UI de hCG, dos veces a la semana durante 12 semanas, y es posible que haya que proseguir con las administraciones durante un período de hasta 1 año, a fin de mejorar la calidad del semen.

Ventajas de la formulación de liberación controlada que comprende hCG o una variante de la Hcg

- Usando la microesfera cargada de hCG, las inyecciones diarias conocidas hasta ahora en este campo se pueden reducir a una inyección cada 15 días (o con una periodicidad aún menor);
- La microesfera cargada de hCG que se describe en la presente invención es estable y eficaz;
- Desorción del fármaco unido a superficie o adsorbido;
- Difusión del fármaco a través de la matriz de nano/micropartículas;
- Difusión a través de la pared polimérica (nano/microcápsulas);
- Erosión de la matriz de nano/micropartículas; y
- Proceso combinado de erosión/difusión;
- Usando la microesfera cargada de hCG que se describe en la presente invención, puede formularse una formulación de hCG para uso por vía oral

Preparación de la microesfera cargada de hCG

Se puso en práctica una técnica de evaporación del solvente de una emulsión de w/o/w (agua-en aceite-en agua) para la preparación de microesferas de poli(láctido-co-glicólido) (PLGA) cargadas de gonadotropina coriónica humana (hCG). Primero, se disolvió gonadotropina coriónica humana (HCG) en agua o tampón que contenía una concentración de un 0,5% a 50% (p/v) de estabilizador. Se pueden usar diversos estabilizadores; por ejemplo, gelatina, polioles, sacáridos, aminoácidos y/o sal. En la presente invención se usó como estabilizador gelatina (de un 0,1% a un 20% p/v). Se disolvió en diclorometano (DCM) polímero PLGA (poli-dl-láctido-co-glicólido, 50:50) de baja viscosidad. La concentración de PLGA en el solvente orgánico puede oscilar entre un 1% y un 150% p/v. La concentración preferida es de un 5% a un 50% p/v. A fin de preparar una emulsión primaria, se emulsificó una solución acuosa de hCG con una fase oleosa orgánica que comprendía PLGA, en un homogeneizador de alta velocidad a una velocidad de entre 2000 rpm y 24000 rpm (preferiblemente, a 20000 rpm) durante un período de entre 10 segundos y 5 minutos (preferiblemente, durante 30 segundos). Después, se emulsificó aún más la emulsión primaria, a una velocidad de entre 1000 rpm y 10000 rpm durante un período de entre 10 segundos y 5 minutos, con un volumen de 10 a 500 veces mayor (preferiblemente, de 50 a 200 veces mayor) de la fase de la emulsión primaria con una fase acuosa externa, obteniéndose una doble emulsión que comprendía la microesfera cargada de hCG. El emulgente puede usarse en una fase acuosa externa; puede ser, por ejemplo: alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, polisorbato, lecitina, carboximetilcelulosa y, específicamente, alcohol polivinílico; su concentración puede oscilar entre un 0,01% y un 30% y, preferiblemente, entre un 0,02% y un 5% p/v. Además, se puede usar, en una fase acuosa externa junto con el emulgente, a fin de obtener partículas menos porosas: de un 0,1% a un 20% de una sal (por ejemplo, cloruro sódico), o azúcares como la sacarosa, la dextrosa, el manitol y la glucosa. Se endurecieron las microesferas extrayendo el solvente mediante un agitador de hélice, un agitador magnético o un evaporador de vacío, a una temperatura comprendida en un intervalo de 25 °C a 45 °C (preferiblemente, de 30 °C a 40 °C), durante un período de entre 1 y 5 horas. Las microesferas endurecidas se recogieron mediante filtración o centrifugación y se lavaron de tres a cuatro veces con agua, a fin de eliminar el emulgente y la sal residuales. Las microesferas cargadas de hCG así obtenidas se mezclaron con un crioprotector, como, por ejemplo, carbohidratos, polisacáridos –preferiblemente, manitol– (de un 1% a un 30% p/p), y se liofilizaron, obteniéndose el producto final. El tamaño de partícula de la microesfera oscila entre 0,02 µm y 500 µm. En la Tabla 2 se proporciona información detallada acerca de los parámetros de preparación de las microesferas.

La gonadotropina coriónica humana (hCG) que se usa en el proceso es hCG muy purificada, y su pureza está comprendida en el intervalo de 5000 UI/mg a 20000 UI/mg. La proporción hCG/PLGA puede estar comprendida en el intervalo de 1:50 a 1:0,5.

La presente invención se elabora con la ayuda de los siguientes ejemplos. No obstante, no debe considerarse que los ejemplos limiten el ámbito de la invención. La invención se define en las reivindicaciones. Cualesquiera ejemplos que estén excluidos del ámbito de las reivindicaciones no forman parte de la invención, sino que se incluyen con una finalidad comparativa

Ejemplos

Quede claro que los siguientes ejemplos tienen únicamente una finalidad ilustrativa, y que los entendidos en la materia podrían sugerir diversas modificaciones o cambios a la luz de lo aquí descrito; dichas modificaciones o dichos cambios deben quedar incluidos dentro del ámbito de las reivindicaciones de la presente invención.

45 Ejemplo 1

Se disolvió, en 1 ml de cloruro de metileno, un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico (PLGA, por sus siglas en inglés, viscosidad inherente: 0,16-0,24 dl/mg) (100 mg) que contenía ácido láctico y ácido glicólico en una proporción, en peso, de 50:50. Se disolvió pHCG (2 mg) en agua (0,1 ml), con 2 mg de gelatina como estabilizador, y se emulsificó con la fase oleosa del PLGA mencionado, usando un homogeneizador Ultra-Turrax (IKA, Alemania) a 20000 rpm durante 30 segundos, obteniéndose una emulsión de agua en aceite (w/o, por sus siglas en inglés). Dicha emulsión w/o se añadió a una solución de alcohol polivinílico (PVA, por sus siglas en inglés) 1% p/p. Se prosiguió con la emulsificación mediante un homogeneizador (Ultra-Turrax) a 4000 rpm. Esta dispersión se agitó con suavidad en un vaso de precipitados de 500 ml en una placa de agitación magnética que contenía una barra agitadora, durante un período de 3 a 4 horas a temperatura ambiente. La microesfera resultante se recogió mediante centrifugación a 8000 rpm durante 5 minutos. La microesfera obtenida se lavó con agua tres veces, se liofilizó con manitol, y se almacenó a 4 °C en un desecador. Se caracterizó aún más esta microesfera mediante un estudio sobre su eficiencia de encapsulación y sobre su liberación *in vitro* (Tabla 3).

60 Ejemplo 2

Se preparó una microesfera cargada de HCG conforme al mismo método que el descrito en el Ejemplo 1, salvo que se emplearon 3 mg de HCG, y 10 mg de gelatina como estabilizador. Se caracterizó aún más esta microesfera mediante un estudio sobre su tamaño de partícula y eficiencia de encapsulación, así como sobre su liberación *in vitro*.

Ejemplo 3

Se preparó una microesfera cargada de HCG conforme al mismo método que el descrito en el Ejemplo 1, salvo que se empleó un solvente orgánico que contiene 0,8 ml de cloruro de metileno y 0,2 ml de acetona. Se caracterizó aún más esta microesfera mediante un estudio sobre su tamaño de partícula y eficiencia de encapsulación, así como sobre su liberación *in vitro*.

Ejemplo 4

Se preparó una microesfera cargada de HCG conforme al mismo método que el descrito en el Ejemplo 1, salvo que se usó cloruro sódico 0,2 M (1,16%), junto con alcohol polivinílico 1% p/v, como emulgente para la preparación de la emulsión secundaria. Se caracterizó aún más esta microesfera mediante un estudio sobre su tamaño de partícula y eficiencia de encapsulación, así como sobre su liberación *in vitro*.

Con la adición de cloruro sódico (NaCl) (1,16% p/v) a la fase acuosa externa de PVA al 1% durante la preparación de la emulsión secundaria, la intensidad de las liberaciones súbitas (en ráfagas) se redujo del 90% al 43% (Ejemplo 4). La reducción de la liberación inicial de hCG en presencia de NaCl se produjo gracias a la estructura más densa de la microesfera resultante. La presencia de NaCl en la fase acuosa externa (presión osmótica alta) durante la preparación de la microesfera redujo la solubilidad del diclorometano, y por ello, retrasó la precipitación del polímero y condujo a la formación de una microesfera menos porosa. La reducción de la porosidad redujo la accesibilidad del fármaco al medio de liberación, lo que se corresponde con una menor liberación inicial (Figura 2, Tabla 3).

Ejemplo 5**25 Caracterización de la microesfera de PLGA cargada de hCG**Análisis del tamaño de partícula de la microesfera de PLGA cargada de hCG

Se analizaron el tamaño de partícula y la distribución por tamaños de las micropartículas de PLGA cargadas de hCG, usando un analizador de tamaños de partícula (Malvern Instruments, Reino Unido) (Figura 1). Se observó que el tamaño de partícula, en todos los ejemplos, estaba comprendido en el intervalo de 1 a 60 μm ; asimismo, se observó una buena polidispersabilidad (amplitud ~ 1). La preparación de la microesfera en presencia de cloruro sódico en el medio acuoso externo proporciona un tamaño de partícula pequeño ($\sim 20 \mu\text{m}$). En la Tabla 2 se indican los diversos tamaños de la microesfera obtenida.

Eficiencia de encapsulación (EE) de la microesfera de PLGA cargada de hCG

Se disolvieron, en 200 μl de acetonitrilo, 5 mg (pesados con exactitud) de microesfera cargada de hCG. Se precipitó el PLGA mediante la adición de 800 μl de solución salina tamponada con fosfatos (PBS) 10 mM, y se separó mediante centrifugación a 16000 rpm durante 4 minutos. El sobrenadante con proteína hCG se analizó mediante HPLC (muestreador automático Waters 717plus Autosampler, Estados Unidos). En la Figura 5 se muestra un cromatograma de esta hCG extraída de la microesfera; dicho cromatograma se puede comparar con los cromatogramas estándar que se muestran en las Figuras 3 y 4. La eficiencia de encapsulación de la microesfera cargada de hCG se indica en la Tabla 3.

Microscopía electrónica de barrido de la microesfera de PLGA cargada de hCG

Cuando se prepara la microesfera sin cloruro sódico en la fase acuosa externa se observa que la estructura de la microesfera es porosa (Figura 8). A causa de esta naturaleza porosa de la microesfera, la mayoría de la liberación de pHCG tiene lugar durante el período inicial. La adición de cloruro sódico (0,2 M) a la fase acuosa externa redujo drásticamente la porosidad de la microesfera (Figura 9). Mediante la adición de cloruro sódico, las liberaciones súbitas (en ráfagas) se redujeron desde el 88% hasta el 44% (Ejemplo 4). La presencia de cloruro sódico en la fase acuosa externa durante la preparación de la microesfera redujo la solubilidad en agua del cloruro de metileno; por ello, retrasó la precipitación del polímero (PLGA) y condujo a microesferas menos porosas y, con ello, a menos liberaciones súbitas (en ráfagas) iniciales.

Ejemplo 6**Perfil de liberación**

Se incubaron 10 o 15 mg (pesados con exactitud) de microesferas cargadas de hCG con 0,8 o 1 ml de solución salina tamponada con fosfatos (PBS) 10 mM (pH 7,4) que contenía un 0,02% de ázida sódica, a 37 °C en un agitador con baño de agua de temperatura controlada. Se recogieron alícuotas en momentos previamente elegidos, mediante centrifugación durante 3 minutos a 5000 rpm. El contenido en HCG del sobrenadante se analizó mediante un sistema HPLC (muestreador automático Waters 717plus Autosampler, Estados Unidos). El cromatograma de esa

HCG liberada se muestra en la Figura 6. Se añadió una alícuota de PBS (0,8 ml) recién preparada a las microesferas, a fin de reemplazar el sobrenadante extraído.

5 Se observó que la HCG fue liberada de las microesferas dentro de un período de 24 horas (liberación súbita [en ráfaga]) (Ejemplos 1-3). Este problema de la alta liberación súbita puede deberse a la estructura más porosa de la microesfera (Figura 8).

Ejemplo 7

10 **Datos analíticos: estudio mediante electroforesis SDS para el análisis de la estabilidad de la hCG**

15 Se prepararon muestras de HCG (R) y de HCG, en forma reducida y no reducida, de 1 mg/ml de solución de HCG, respectivamente. Se preparó gel de poliacrilamida (15%) conforme al protocolo estándar. Se cargaron e hicieron migrar en gel muestras de 20 µl, a 180 Voltios, en tampón de electroforesis (tampón de migración) SDS. Tras la migración electroforética, se introdujo el gel en un recipiente de plástico, con solución fijadora, a temperatura ambiente. Retirar la solución fijadora. Añadir solución de tinción de azul de Coomassie (0,1 % p/v), cubriendo el gel, y agitar a temperatura ambiente durante 2 horas. Retirar la solución de tinción. Se lavó el gel con ácido acético (10%), a fin de desteñir las muestras. En el estudio mediante SDS-Page no se detectó degradación importante alguna de la hCG tras el tratamiento con diclorometano con y sin gelatina; tampoco de la microesfera (Figura 7, A-B).

20 Tabla 1: Niveles séricos de hCG (LMP [última menstruación])

Semanas tras la LMP	Niveles séricos de hCG (mUI/ml)
3 semanas	5 - 50
4 semanas	5 - 426
5 semanas	18 - 7340
6 semanas	1080 - 56500
7-8 semanas	7650 - 229000
9-12 semanas	25700 - 288000
13-16 semanas	13300 - 254000

25 Tabla 2: Tamaño de partícula de las microesferas cargadas de hCG

Ejemplo	Tamaño de partícula			Tamaño medio de partícula	Amplitud
	D(0,1) (10%)	D(0,5) (50%)	D(0,9) (90%)	Media ponderada del volumen D[4,3]	
2	13,13 µm	25,02 µm	37,72 µm	25,34 µm	0,98
3	20,0 µm	38,48 µm	59,22 µm	39,17 µm	1,02
4	2,65 µm	12,41 µm	19,96 µm	12,1 µm	1,39

Tabla 3: Eficiencia de encapsulación y liberaciones súbitas de los diferentes ejemplos

Ejemplo	Concentración (mg)			% de producción	Eficiencia de encapsulación (%)	Liberación dentro de 24 horas
	hCG	Gelatina	PLGA			
1	2 mg	2 mg	100 mg	76,1 %	78,86 %	75,2 %
2	3 mg	10 mg	100 mg	76,5 %	73,31 %	88,25 %
3	4,5 mg	8 mg	150 mg	72,5 %	78,92 %	79,1 %
4	5 mg	3 mg	100 mg	80,5 %	82,08 %	43,89 %

30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Formulaci3n de liberaci3n controlada que comprende microesferas cargadas de gonadotropina cori3nica humana (hCG) o de una variante de la hCG, en la que las microesferas se pueden preparar mediante el proceso que comprende: (a) emulsionar una soluci3n acuosa de hCG o de una variante de la hCG, que comprende de un 0,1% a un 20% (p/v) de gelatina con una fase oleosa org3nica que comprende de un 1% a un 50% de PLGA de baja viscosidad, a fin de obtener una emulsi3n primaria; (b) emulsionar la emulsi3n primaria, con una fase acuosa que comprende de un 0,01% a un 30% (p/v) de alcohol polivinilico y de un 0,1% a un 20% de cloruro s3dico, a fin de obtener una microesfera cargada de hCG o de una variante de la hCG; (c) endurecer la microesfera cargada de hCG o de una variante de la hCG mediante agitaci3n a 100-1000 rpm a una temperatura de 25°C a 50°C durante un per3odo de 0,5 a 5 horas; (d) lavar con agua la microesfera cargada de hCG o de una variante de la hCG del paso (c); y (e) liofilizar la microesfera cargada de hCG o de una variante de la hCG del paso (d) usando de un 1% a un 30% (p/p) de manitol.
- 15 2. Formulaci3n de liberaci3n controlada, seg3n la reivindicaci3n 1, en la que la proporci3n entre hCG y PLGA se encuentra en el intervalo de 1:0,5 a 1:50.
- 20 3. Formulaci3n de liberaci3n controlada, seg3n la reivindicaci3n 1, en la que el tama1o de part3cula de la microesfera cargada de hCG o de una variante de la hCG se encuentra en el intervalo de 0,02 μm a 500 μm .
- 25 4. Formulaci3n de liberaci3n controlada, seg3n cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la formulaci3n muestra una velocidad de liberaci3n *in vitro* de la hCG o variante de la hCG en el intervalo de 1000 UI a 8000 UI dentro las primeras 24 horas tras la administraci3n, y de 10 UI a 1000 UI durante como m3nimo los 15 d3as posteriores.
- 30 5. Formulaci3n de liberaci3n controlada, seg3n cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la formulaci3n muestra una velocidad de liberaci3n *in vivo* de la hCG o variante de la hCG en el intervalo de 0,1 UI/ml a 2,0 UI/ml de plasma, dentro las primeras 24 horas tras la administraci3n, y de 0,0002 UI/ml a 0,2 UI/ml de plasma durante como m3nimo los 15 d3as posteriores.
- 35 6. Proceso para la preparaci3n de una formulaci3n inyectable, de liberaci3n controlada, de gonadotropina cori3nica humana (hCG), comprendiendo dicho proceso: (a) emulsionar una soluci3n acuosa de hCG o de una variante de la hCG, que comprende de un 0,1% a un 20% (p/v) de gelatina con una fase oleosa org3nica que comprende de un 1% a un 50% de PLGA de baja viscosidad, a fin de obtener una emulsi3n primaria; (b) emulsionar la emulsi3n primaria con una fase acuosa que comprende de un 0,01% a un 30% (p/v) de alcohol polivinilico y de un 0,1% a un 20% de cloruro s3dico, a fin de obtener una microesfera cargada de hCG o de una variante de la hCG; (c) endurecer la microesfera cargada de hCG o de una variante de la hCG mediante agitaci3n a 100-1000 rpm a una temperatura de 25°C a 50°C durante un per3odo de 0,5 a 5 horas; (d) lavar con agua la microesfera cargada de hCG o de una variante de la hCG del paso (c); y (e) liofilizar la microesfera cargada de hCG o de una variante de la hCG del paso (d) usando de un 1 % a un 30% (p/p) de manitol.
- 40 7. Proceso, seg3n la reivindicaci3n 6, en el que la proporci3n entre hCG y PLGA se encuentra en el intervalo de 1:0,5 a 1:50.

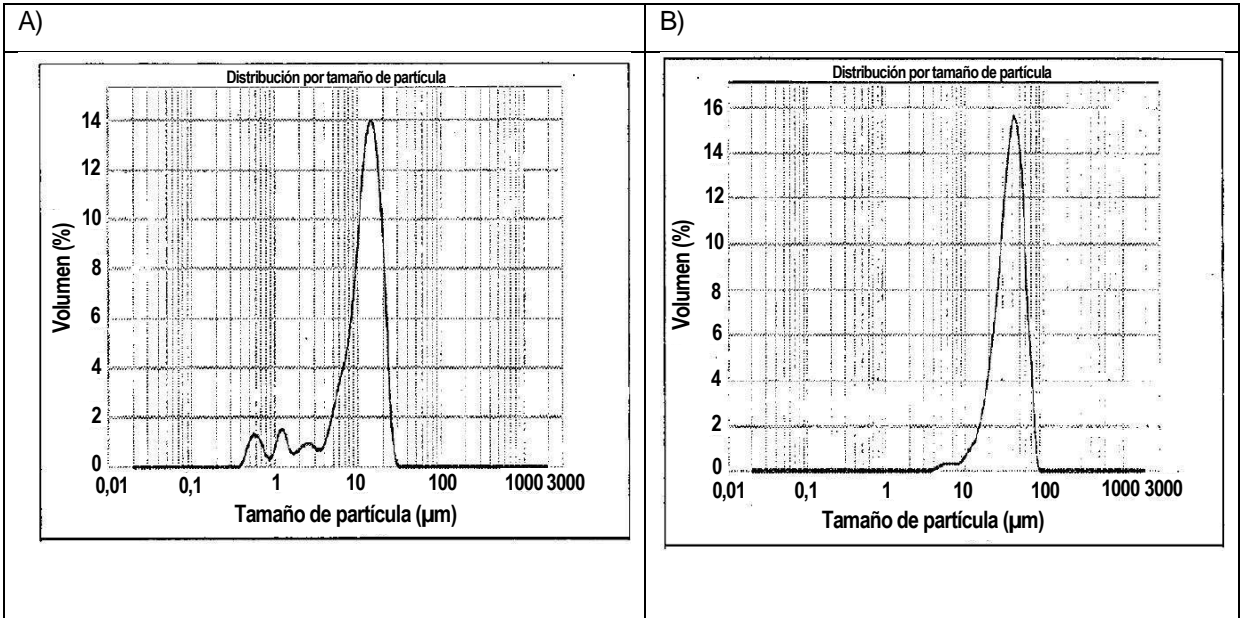


Figura 1

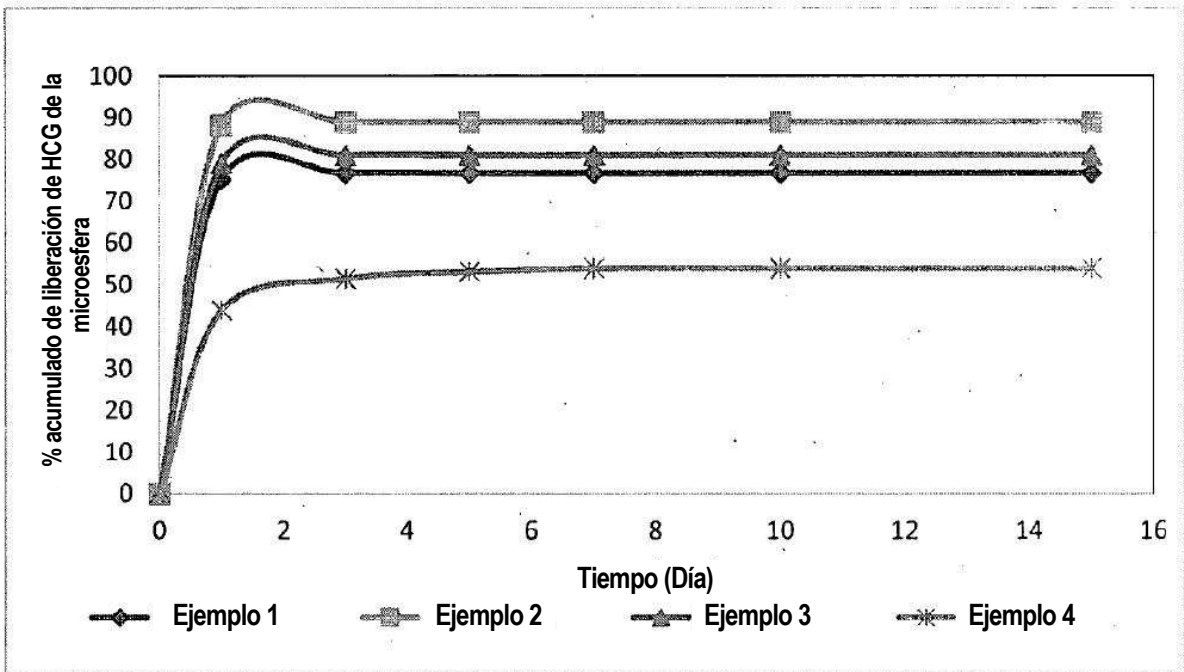


Figura 2

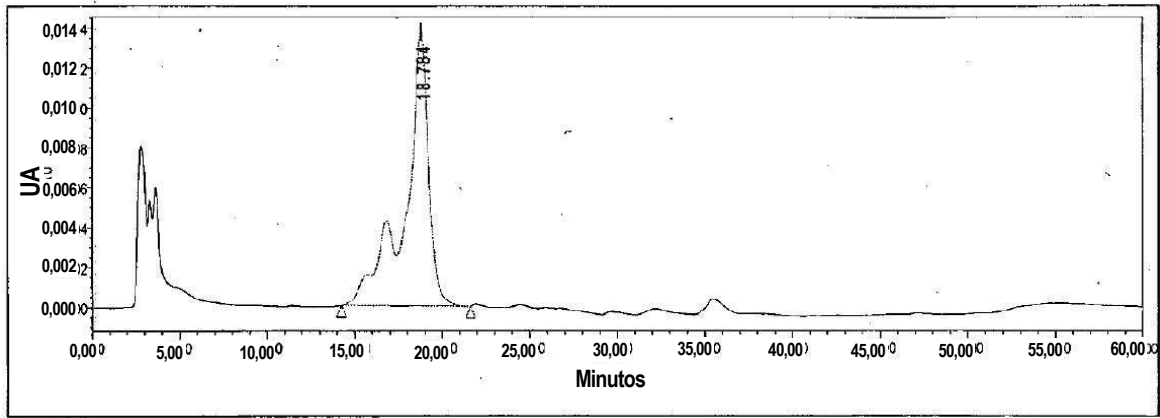


Figura 3

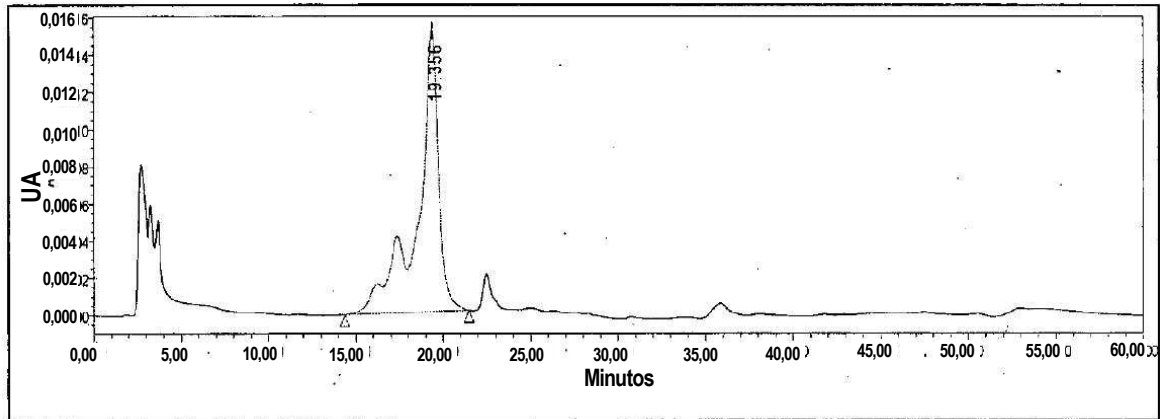


Figura 4

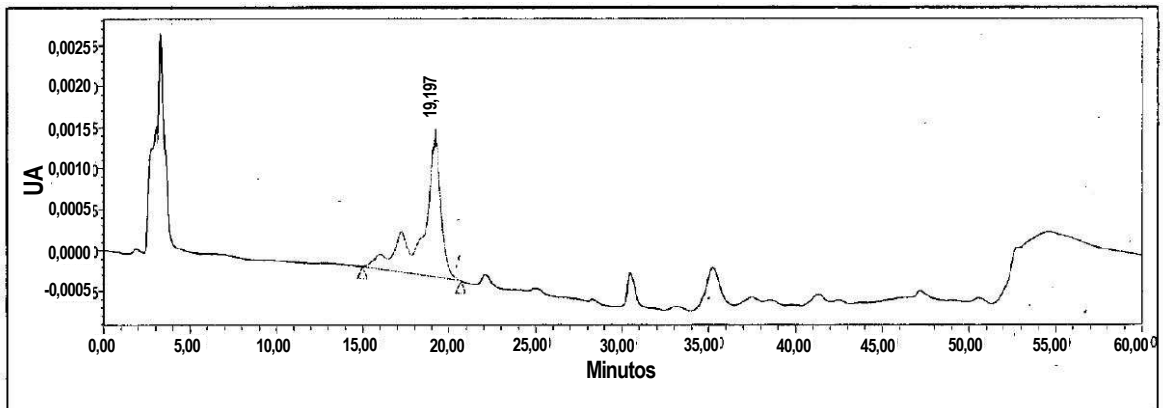


Figura 5

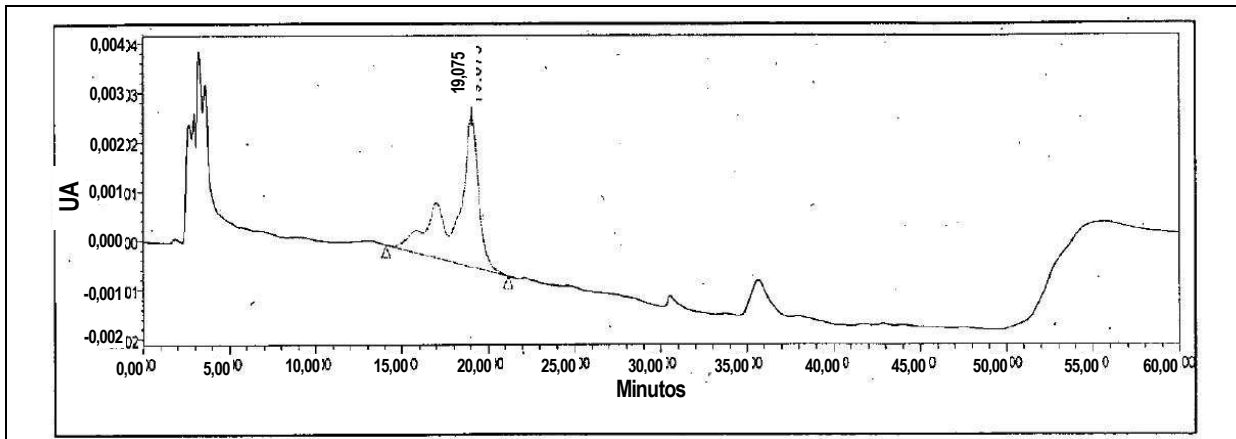


Figura 6

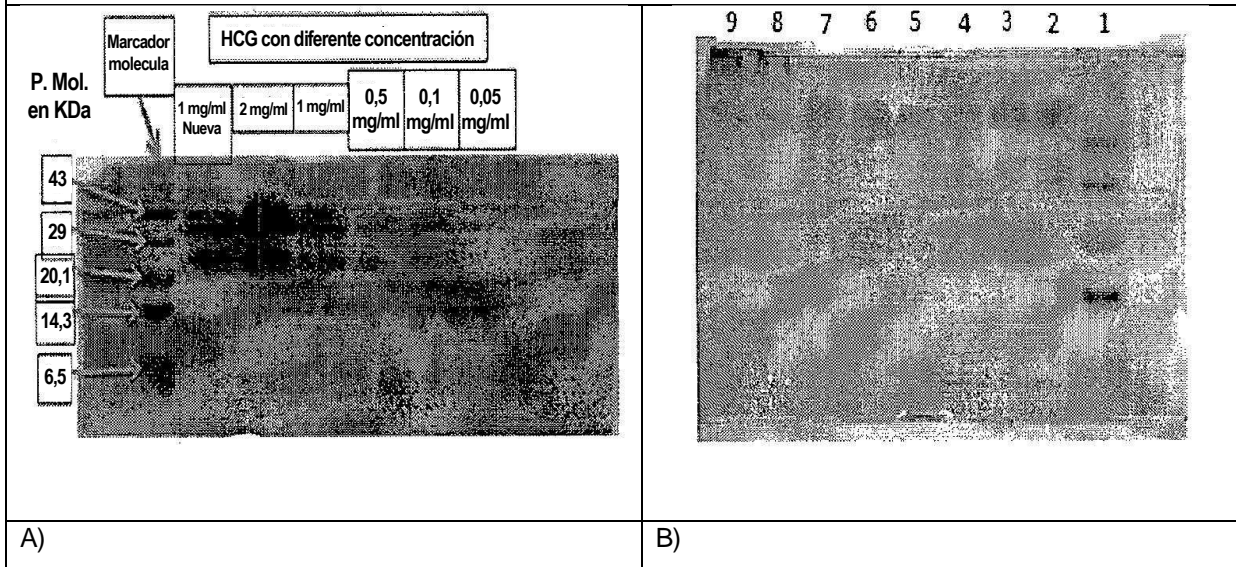


Figura 7

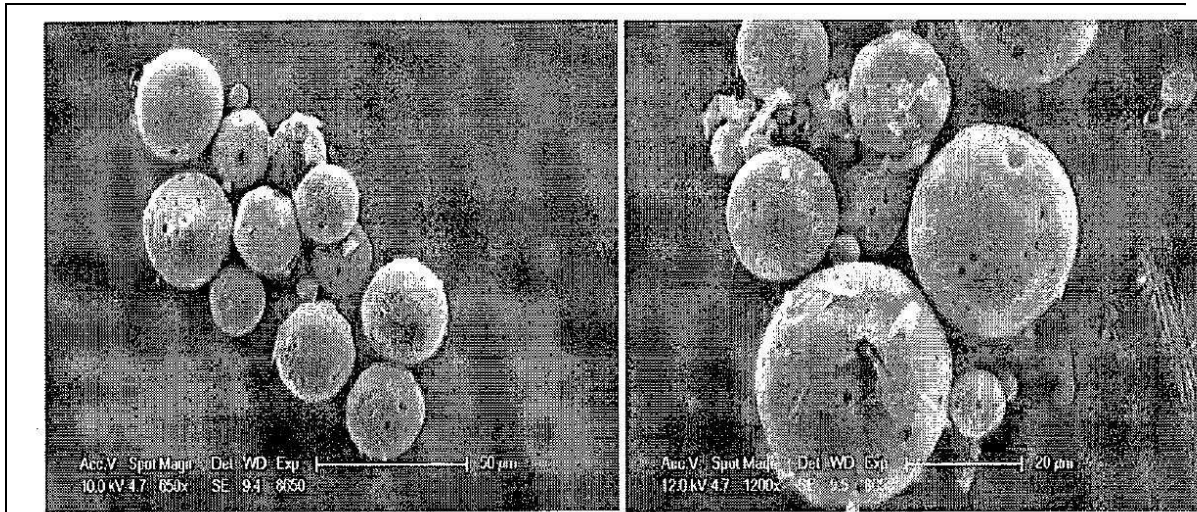


Figura 8

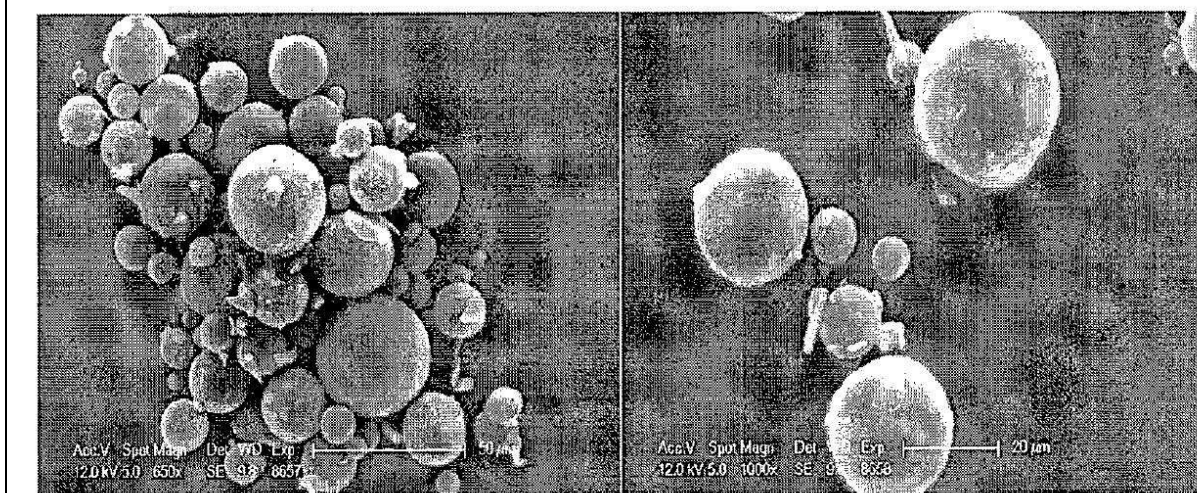


Figura 9