

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 343**

51 Int. Cl.:

A61F 2/02	(2006.01)
A61K 9/50	(2006.01)
A61K 9/51	(2006.01)
A61K 9/16	(2006.01)
A61K 31/70	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.07.2004 PCT/US2004/022816**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **03.02.2005 WO05009356**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.07.2004 E 04778360 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2017 EP 1651136**

54 Título: **Método para la preparación de formulaciones de liberación controlada**

30 Prioridad:

15.07.2003 US 487663 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.07.2017

73 Titular/es:

**EVONIK CORPORATION (100.0%)
299 Jefferson Road
Parsippany NJ 07054, US**

72 Inventor/es:

GARY, P., COOK

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 625 343 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

Método para la preparación de formulaciones de liberación controlada

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un método para obtener composiciones de liberación controlada, y específicamente a un método para poner en contacto una disolución orgánica que contiene un agente bioactivo y un polímero con una disolución acuosa que contiene un ion orgánico a través de un procedimiento de emulsión para crear composiciones de liberación controlada.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Actualmente hay numerosas formulaciones de liberación controlada en el mercado que contienen diversos agentes bioactivos, tales como análogos de GnRH, análogos de hormona del crecimiento humana, de risperidona y de somatostatina, de los cuales el acetato de octreotida es un ejemplo. Estas composiciones de liberación controlada se formulan típicamente con polímeros biodegradables, biocompatibles. Tales formulaciones se prefieren por los profesionales sanitarios y sus pacientes debido a que reducen la necesidad de múltiples inyecciones. Adicionalmente, puesto que una inyección trata a un paciente durante un período de tiempo prolongado, las organizaciones de la atención sanitaria las prefieren debido a que disminuye el número de visitas al consultorio por paciente, lo que sirve para disminuir los costes de la atención sanitaria.

15 Desafortunadamente, hay muchos problemas con los procedimientos de producción actuales y con las formulaciones para las composiciones de liberación controlada. Muchos procedimientos de fabricación actuales son incapaces de producir un producto concentrado que muestre una carga elevada de fármaco, necesitando así un gran volumen de inyección intramuscular (2 ml), que es bastante incómodo para el paciente cuando se administra. Adicionalmente, muchos métodos requieren procedimientos complejos y que consumen tiempo para solubilizar agentes bioactivos antes del encapsulamiento; y la manipulación de la solubilidad con fines de encapsulamiento puede dar como resultado perfiles de liberación perjudiciales, así como la degradación del propio agente bioactivo. Por ejemplo, el uso de agentes bioactivos muy solubles en agua da como resultado frecuentemente un "estallido" indeseable de agente bioactivo al entrar en contacto con una disolución acuosa, tal como mediante la administración a un paciente o la introducción a un medio fisiológico. Tal elevación rápida en los niveles de agente bioactivo puede ser perjudicial para un paciente, y puede dejar poco agente bioactivo para la liberación posterior durante el transcurso de tiempo del tratamiento deseado.

20 Se han intentado diversos métodos para resolver el problema de la solubilidad, pero ninguno ha sido particularmente eficiente o eficaz. Uno de tales intentos combinó un agente bioactivo con una molécula tensioactiva, que comprende una cabeza aniónica y una cola hidrófoba, para solubilizar el agente bioactivo en una fase orgánica antes del encapsulamiento. Otro método combinó ácidos orgánicos con el agente bioactivo para producir una sal de adición insoluble en agua antes del encapsulamiento. El uso de una sal adicional insoluble da como resultado una reducción del efecto de "estallido" con la administración; sin embargo, este método requirió procedimientos de fabricación adicionales que hizo cara e ineficaz la producción de estos compuestos. Otro método incluyó el encapsulamiento de la sal de acetato del agente bioactivo que dio como resultado que cantidades sustanciales de agente bioactivo químicamente modificado o degradado se liberasen tras la colocación en un amortiguador fisiológico acuoso. La degradación química estaba en forma de acilación indeseable del agente bioactivo.

30 El documento WO 98/32423 describe un método para obtener una formulación de liberación controlada, que comprende las etapas de: proporcionar un péptido en una fase acuosa; proporcionar un polímero en una fase orgánica; combinar dichas dos fases para formar una emulsión W/O; combinar pamoato en una fase acuosa; añadir dicha fase acuosa a la emulsión, emulsionando posteriormente la mezcla resultante; y eliminar el disolvente para producir una composición de liberación controlada.

35 Los métodos para producir composiciones de liberación controlada que sean capaces de producir un producto con una carga elevada de fármaco, un efecto mínimo de estallido al administrarlas, y una degradación mínima del agente bioactivo, son muy necesarios para obtener los beneficios verdaderos de estos tipos de composiciones como sustancias terapéuticas humanas o veterinarias.

SUMARIO DE LA INVENCION

50 Según el fin o fines de esta invención, como se personifican y se describen ampliamente aquí, esta invención se refiere a métodos para obtener composiciones de liberación controlada.

En una realización, el método incluye las etapas de:

combinar un agente bioactivo soluble en agua y un polímero en una fase orgánica;

combinar un ion orgánico en una fase acuosa; y

combinar las fases orgánica y acuosa resultantes usando un procedimiento de emulsión para producir una

composición de liberación controlada;

5 en el que dicho ion orgánico se selecciona del grupo que consiste en pamoato, trifluorometil-p-toluato, 2-naftalenosulfonato, 2,3-naftalenodicarboxilato, 1-hidroxi-2-naftoato, 3-hidroxi-2-naftoato, 2-naftoato, y salicilsalicilato; y en el que dicho agente bioactivo se selecciona del grupo que consiste en ácidos nucleicos, hidratos de carbono, agonistas de LHRH, octreotida, insulina, leuprolida, somatostatina, inmunógenos, precursores metabólicos capaces de promover el crecimiento y supervivencia de células y tejidos, agentes antineoplásicos, antihistaminas, agentes cardiovasculares, agentes antiulcerosos, broncodilatadores, vasodilatadores, agentes del sistema nervioso central, y antagonistas narcóticos.

10 En una realización, la fase orgánica comprende un disolvente seleccionado del grupo que consiste en, pero no se limita a, cloruro de metileno, acetato de etilo, alcohol bencílico, acetona, ácido acético y carbonato de propileno.

En una realización particular, la fase orgánica incluye además un codisolvente. El codisolvente se puede seleccionar del grupo que consiste en, pero no se limita a, dimetilsulfóxido, dimetilformamida, n-metilpirrolidinona, PEG₂₀₀, PEG₄₀₀, alcohol metílico, alcohol etílico, alcohol isopropílico y alcohol bencílico.

15 En otra realización, la fase acuosa incluye además un agente emulsionante. El agente emulsionante se puede seleccionar del grupo que consiste en, pero no se limita a, poli(alcohol vinílico), albúmina, lecitina, vitamina E-D-alfa-tocoferil polietilenglicol (TPGS) y polisorbatos. En una realización particular, el agente emulsionante puede estar presente en una concentración final que oscila de alrededor de 0,1 a 10% (p/p).

En cierta realización, el ion orgánico está en una concentración final que oscila de 0,1 a 1000 mM.

20 En cierta realización, la composición de liberación controlada se selecciona del grupo que consiste en, pero no se limita a, micropartículas y nanopartículas. En una realización particular, las micropartículas y nanopartículas son biodegradables.

25 En otra realización, el polímero se puede seleccionar del grupo que consiste en, pero no se limita a, poli(lactida)s, poli(glicolida)s, poli(lactida-co-glicolida)s, poli(ácido láctico)s, poli(ácido glicólico)s, poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)s, policaprolactona, policarbonatos, poliésteramidas, polianhídridos, poli(aminoácidos), poliortoésteres, poliacetilos, policianoacrilatos, polieterésteres, poli(dioxanona)s, poli(alquilato de alquilenos), copolímeros de polietilenglicol y poli(lactida-co-glicolida), poliuretanos biodegradables, mezclas y copolímeros de los mismos.

30 En otra realización, el agente bioactivo se puede seleccionar del grupo que consiste en ácidos nucleicos, inmunógenos, precursores metabólicos capaces de promover el crecimiento y supervivencia de células y tejidos, agentes antineoplásicos, antihistaminas, agentes cardiovasculares, agentes antiulcerosos, broncodilatadores, vasodilatadores, agentes del sistema nervioso central, y antagonistas narcóticos.

En cierta realización, el procedimiento de emulsión se selecciona del grupo que consiste en aceite en agua y agua en aceite.

En una realización particular, los métodos de la presente invención se pueden poner en práctica con cualquier procedimiento de emulsión conocido.

35 El ion orgánico se selecciona de pamoato, trifluorometil-p-toluato, 2-naftalenosulfonato, 2,3-naftalenodicarboxilato, 1-hidroxi-2-naftoato, 3-hidroxi-2-naftoato, 2-naftoato y salicilsalicilato.

40 En otra realización, la degradación incluye acilación. En una realización particular, la reacción de acilación implica el ataque nucleofílico de un grupo amino de un agente bioactivo dirigido a un carbono carbonílico de un poliéster, tal como poli(d,l-lactida-co-glicolida). Se teoriza que la degradación del agente bioactivo se evita o se reduce en las presentes composiciones mediante la protonación facilitada de nucleófilos potenciales (por ejemplo, grupos amino), haciendo así a los nucleófilos menos aptos para participar en reacciones de acilación con la cadena principal del polímero de PLGA o sus fragmentos.

En otra realización, la degradación incluye lisis del polímero. Una lisis excesiva puede conducir a una pérdida rápida de peso molecular del polímero y a una liberación prematura del agente bioactivo.

45 En otra realización, la estequiometría molar del agente bioactivo con respecto al ion orgánico oscila de alrededor de 0,5 a 2,0. En una realización particular, la estequiometría molar del agente bioactivo con respecto al ion orgánico oscila de alrededor de 1,0 a 1,5.

En otra realización, el contenido de agente bioactivo puede aumentar con respecto al contenido del agente bioactivo de composiciones preparadas mediante el método de la presente invención en ausencia de un ion orgánico.

50 Las ventajas adicionales de la invención se expondrán en parte en la descripción que sigue, y en parte serán obvias a partir de la descripción, o se pueden aprender mediante la práctica de la invención. Las ventajas de la invención se obtendrán y se lograrán por medio de los elementos y combinaciones señalados particularmente en las reivindicaciones anejas. Se ha de entender que tanto la descripción general anterior como la descripción detallada

siguiente son solamente ejemplares y explicativas, y no son restrictivas de la invención como se reivindica.

DESCRIPCIÓN DE REALIZACIONES ILUSTRATIVAS

Definiciones

Para los fines de la presente invención, los siguientes términos tendrán los siguientes significados:

5 Para los fines de la presente invención, el término “biodegradable” se refiere a polímeros que se disuelven o se degradan *in vivo* en un período de tiempo que es aceptable en una situación terapéutica particular. Tal producto disuelto o degradado puede incluir una especie química más pequeña. La degradación puede resultar, por ejemplo, mediante procedimientos enzimáticos, químicos y/o físicos. La biodegradación tarda típicamente menos de cinco años, y habitualmente menos de un año tras la exposición a un pH fisiológico y temperatura, tal como un pH que oscila de 6 a 9 y una temperatura que oscila de 22C a 38C.

10 Para los fines de la presente invención, las expresiones “fase orgánica” y “fase discontinua” son intercambiables, y se refieren a la disolución de disolvente, polímero y agente bioactivo creada en los métodos de la presente invención que se pondrá entonces en contacto con una fase acuosa a través de un procedimiento de emulsión a fin de crear las composiciones de liberación controlada descritas aquí.

15 Para los fines de la presente invención, el término “degradación” se refiere a cualquier modificación indeseada del agente bioactivo, tal como acilación, o del polímero, tal como lisis.

20 Para los fines de la presente invención, las expresiones “fase acuosa” y “fase continua” son intercambiables, y se refieren a la disolución de agua y agente de ion orgánico creada en los métodos de la presente invención, que entonces se pondrá en contacto con una fase orgánica a través de un procedimiento de emulsión a fin de crear las composiciones de liberación controlada descritas aquí. Para los fines de la presente invención, el término “combinando” se refiere a cualquier método de juntar dos o más materiales. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, mezclado, amasado, combinación, confección, homogeneización, incorporación, entremezclado, fusión, unión, revolvimiento, agitación, coalescimiento, integración, cofusión, unión, casamiento, y similar.

25 Para los fines de la presente invención, los intervalos pueden expresar aquí de “alrededor de” o “aproximadamente” un valor particular, y/o hasta “alrededor de” o “aproximadamente” otro valor particular. Cuando se expresa tal intervalo, otra realización incluye del un valor particular al otro valor particular. De forma similar, cuando los valores se expresan como aproximaciones, mediante el uso del antecedente “alrededor de”, se entenderá que el valor particular forma otra realización. Se entenderá además que los puntos finales de cada uno de los intervalos son significativos tanto en relación con el otro punto final, como independientemente del otro punto final.

30 Para los fines de la presente invención, la expresión “agente bioactivo” se refiere a cualquier agente con actividad biológica ya sea *in vivo* o *in vitro*, en el que la actividad biológica se puede detectar como un cambio observable en la salud global o al menos un marcador de salud (es decir, síntoma) de un individuo, como un cambio en un marcador biológico sustituto relevante, o como un cambio en la estructura o conformación química de una molécula fisiológicamente relevante.

35 Para los fines de la presente invención, la expresión “ion orgánico” se refiere a materiales catiónicos y aniónicos. Los iones orgánicos pueden estar presentes en sus formas de sal o de ácido. Los iones orgánicos ejemplares incluyen pamoato y naftoato.

40 Para los fines de la presente invención, una “composición de liberación controlada” se referirá a cualquier formulación con un perfil de liberación diferente del agente bioactivo nativo. Típicamente, los perfiles de liberación incluirán concentraciones fisiológicamente detectables de un agente bioactivo durante un período de al menos una semana, al menos un mes, al menos 45 días, o durante más de 45 días.

45 Además, para los fines de la presente invención, el término “un” o “una” se refiere a una o más de esa entidad; por ejemplo, “una proteína” o “un péptido” se refiere a uno o más de esos compuestos o al menos un compuesto. Como tal, los términos “un” o “una”, “uno o más” y “al menos un” se pueden usar aquí de forma intercambiable. También se ha de observar que las expresiones “que comprende”, “que incluye”, y “que tiene”, se pueden usar de forma intercambiable. Además, un compuesto “seleccionado del grupo que consiste en” se refiere a uno o más de los compuestos en la lista que sigue, incluyendo mezclas (es decir, combinaciones) de dos o más de los compuestos. Según la presente invención, un agente bioactivo aislado o biológicamente puro es un compuesto que se ha retirado de su medio natural. Como tal, “aislado” y “biológicamente puro” no reflejan necesariamente el grado hasta el cual se ha purificado el compuesto. Un compuesto aislado de la presente invención se puede obtener de su fuente natural, se puede producir usando técnicas de biología molecular, o se puede producir mediante síntesis química.

50 Ahora se hará referencia con detalle a ciertas realizaciones de la invención, cuyos ejemplos se ilustran en la figura que se acompaña y en la sección de Ejemplos.

Se describen los componentes usados para preparar las composiciones de liberación controlada descritas aquí.

Éstos y otros materiales se describen aquí, y se entiende que cuando se describen combinaciones, subconjuntos, interacciones, grupos, etc., de estos materiales que aunque la referencia específica de cada una de las diversas permutaciones individuales y colectivas de estos compuestos puede no describirse explícitamente, cada una se contempla y se describe específicamente aquí. Por ejemplo, si se describe y discute un número de agentes bioactivos y se discute un número de modificaciones que se pueden realizar a un número de moléculas que incluyen agentes bioactivos, se contemplan específicamente todas y cada una de las combinaciones y permutaciones del agente bioactivo y las modificaciones que son posibles, excepto que se indique específicamente lo contrario. De este modo, si se describe una clase de moléculas A, B, y C, así como una clase de moléculas D, E, y F, y se describe un ejemplo de una molécula de combinación A-D, entonces, incluso si no se citan individualmente, cada una se contempla individual y colectivamente, queriendo decir que las combinaciones A-E, A-F, B-D, B-E, B-F, C-D, C-E y C-F se consideran descritas. Igualmente, también se describe cualquier subconjunto o combinación de éstas. De este modo, por ejemplo, el subgrupo de A-E, B-F, y C-E se consideraría descrito. Este concepto se aplica a todos los aspectos de esta solicitud, incluyendo, pero sin limitarse a, las etapas en los métodos de obtención y uso de la presente invención.

15 Agentes bioactivos

En una realización de la presente invención, los agentes bioactivos se seleccionan del grupo que consiste en ácidos nucleicos e hidratos de carbono. Las proteínas de uso en la presente invención son insulina, octreotida, y leuprolida. Los ácidos nucleicos de uso en la presente invención incluyen ADN, ARN, ADN modificado químicamente y ARN modificado químicamente, aptámeros, antisentido, ARN de interferencia, y ARN pequeño de interferencia. Los hidratos de carbono incluyen heparina, heparina de bajo peso molecular, y similares. Los péptidos de uso son agonistas de LHRH, leuprolida, somatostatina y octreotida. Las sustancias farmacéuticas de pequeñas moléculas de uso son antihistaminas y agentes cardiovasculares.

En otra realización, el agente bioactivo es un inmunógeno. Tal inmunógeno se puede seleccionar del grupo que consiste en, pero no se limita a, inmunógenos para estimular anticuerpos frente a hepatitis, gripe, sarampión, rubéola, tétano, polio, rabia, y similar.

En otra realización, el agente bioactivo es una sustancia o precursor metabólico capaz de promover el crecimiento y supervivencia de células y tejidos, o de aumentar el funcionamiento de las células. Tal sustancia o precursor metabólico se puede seleccionar del grupo que consiste en, pero no se limita a, una sustancia que promueve el crecimiento de nervios tal como un gangliósido, un factor de crecimiento de nervios, y similar; un agente que promueve el crecimiento de tejido duro o blando, tal como fibronectina, hormona de crecimiento humana, un factor estimulante de colonias, proteína morfogénica ósea, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factores de crecimiento derivados de insulina, factor alfa de crecimiento transformante, factor beta de crecimiento transformante, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de fibroblastos, interleucina-1, factor de crecimiento endotelial vascular, factor de crecimiento de queratinocitos, material óseo seco, y similar.

En otra realización, el agente bioactivo es un agente antineoplásico. En una realización particular, el agente antineoplásico se selecciona del grupo que consiste en, pero no se limita a, metotrexato, 5-fluorouracilo, adriamicina, vinblastina, cisplatino, anticuerpos específicos de tumor conjugados a toxinas, factor de necrosis tumoral, y similar.

En otras realizaciones, el agente bioactivo se selecciona del grupo que consiste en, pero no se limita a, antihistaminas tales como difenhidramina, y similar; agentes cardiovasculares tales como papaverina, estreptocinasa y similar; agentes antiulcerosos tales como yoduro de isopropamida, y similar; broncodilatadores tales como sulfato de metaproteral, aminofilina, y similar; vasodilatadores tales como teofilina, niacina, minoxidilo, y similar; agentes del sistema nervioso central tales como tranquilizantes, agentes bloqueantes B-adrenérgicos, dopamina, y similar; antagonistas narcóticos tales como naltrexona, naloxona, buprenorfina; y otras sustancias similares.

En otra realización, las composiciones de liberación controlada pueden contener combinaciones de dos o más agentes bioactivos. En una realización particular, las composiciones de liberación controlada contienen 5 o menos agentes bioactivos. En otra realización particular, las composiciones de liberación controlada contienen un agente bioactivo.

En una realización particular, el agente bioactivo está en forma de un complejo con el ion orgánico.

En otra realización, los agentes bioactivos de la presente invención pueden incluir diversas formas salinas y derivados que incluyen enlaces covalentes a polímeros hidrófilos tales como poli(etilenglicol) y poli(propilenglicol).

En una realización particular, el agente bioactivo tiene el potencial de mostrar al menos una carga positiva o negativa, o una carga tanto positiva como negativa.

El agente bioactivo es soluble en agua.

En otra realización particular, el agente bioactivo se solubiliza en un disolvente orgánico, incluyendo opcionalmente un codisolvente. El agente bioactivo puede ser soluble en agua y en disolventes orgánicos.

El experto en la técnica apreciará que las cantidades reales de agentes bioactivos a utilizar en un caso particular variarán según el compuesto específico que se utilice, las composiciones particulares formuladas, el modo de aplicación, y el sitio particular y el paciente que se esté tratando. Las dosificaciones para un hospedante dado se pueden determinar usando consideraciones convencionales, por ejemplo mediante comparación habitual de las actividades diferenciales de los compuestos objeto y de un agente bioactivo conocido, por ejemplo por medio de un protocolo farmacológico convencional apropiado. Los médicos y formuladores, expertos en la técnica de determinar dosis de compuestos farmacéuticos, no tendrán problemas a la hora de determinar la dosis según recomendaciones estándar.

Ion orgánico

10 Los iones orgánicos de uso en la presente invención son materiales aniónicos. Los materiales aniónicos se seleccionan de los siguientes ácidos orgánicos y sus sales: pamoico, trifluorometil-p-toluico, 2-naftalenosulfónico, 2,3-naftalenodicarboxílico, 1-hidroxi-2-naftoico, 3-hidroxi-2-naftoico, 2-naftoico, y salicilsalicílico. Las formas salinas de los materiales aniónicos pueden incluir sodio, amonio, magnesio, calcio, y similar.

15 Los agentes de ion orgánico de uso en la presente invención pueden ser solubles en agua y en la fase orgánica hasta el grado requerido para potenciar la eficiencia del encapsulamiento y la carga del fármaco. En una realización particular, la eficiencia del encapsulamiento potenciada y la carga del fármaco se logran mediante una degradación reducida del agente bioactivo. En una realización particular, la concentración del agente de ion orgánico en la fase acuosa oscila de alrededor de 0,5 a 100 mM. En otra realización particular, el ion orgánico oscila de alrededor de 5 a 40 mM.

20 Micropartículas biodegradables

En ciertas realizaciones, la composición de liberación controlada es una micropartícula.

En ciertas realizaciones, un agente bioactivo se asocia con un polímero biodegradable en una forma de micropartículas. En una realización particular, una micropartícula tiene un diámetro menor que 1,0 mm, y típicamente entre 1,0 y 200,0 micrómetros. Las micropartículas incluyen tanto microesferas como microcápsulas, y pueden ser aproximadamente esféricas o pueden tener otras geometrías. Las microesferas son típicamente aproximadamente homogéneas en composición, y las microcápsulas comprenden un núcleo de una composición distinta de una corteza circundante. Para los fines de esta descripción, los términos microesfera, micropartícula y microcápsula se usan de forma intercambiable. En ciertas realizaciones, las micropartículas pueden estar hechas de una variedad de polímeros biodegradables. Los polímeros biodegradables, biocompatibles adecuados incluyen, por ejemplo, poli(lactida)s, poli(glicolida)s, poli(lactida-co-glicolida)s, poli(ácido láctico)s, poli(ácido glicólico)s, poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)s, policaprolactona, policarbonatos, poliesteramidas, polianhídridos, poli(aminoácidos), poliortoésteres, poliacetilos, policianoacrilatos, polieterésteres, poli(dioxanona)s, poli(alquilato de alquileo)s, copolímeros de polietilenglicol y poli(lactida)s o poli(lactida-co-glicolida), poliuretanos biodegradables, mezclas y copolímeros de los mismos.

35 En una realización particular, la micropartícula está hecha de poli(d,l-lactida-co-glicolida) (PLGA). PLGA se degrada cuando se expone a pH fisiológico y se hidroliza para formar ácido láctico y ácido glicólico, que son subproductos normales del metabolismo celular. La velocidad de desintegración de los polímeros de PLGA variará dependiendo del peso molecular del polímero, de la relación de monómeros de lactida a glicolida en la cadena polimérica, y de la estereorregularidad de las subunidades monoméricas. Las mezclas de estereoisómeros L y D que interrumpen la cristalinidad del polímero aumentarán las velocidades de desintegración del polímero. Además, las microesferas pueden contener mezclas de dos o más polímeros biodegradables, de diferente peso molecular y/o relación monomérica.

45 En otras realizaciones alternativas, se pueden usar polímeros biodegradables derivatizados, incluyendo polímeros hidrófilos unidos a PLGA, para formar microesferas. En realizaciones particulares, el polímero hidrófilo se selecciona del grupo que consiste en, pero no se limita a, poli(etilenglicol), poli(propilenglicol) y copolímeros de poli(etilenglicol) y poli(propilenglicol).

Nanopartículas biodegradables

En ciertas realizaciones, la composición de liberación controlada es una nanopartícula.

50 En ciertas realizaciones, el agente bioactivo, con o sin un polímero hidrófilo adjunto, se asocia con partículas submicrométricas biodegradables para la liberación controlada del agente bioactivo. Una nanopartícula tiene un diámetro que oscila desde 20,0 nanómetros hasta alrededor de 2,0 micrómetros, y típicamente está entre 100,0 nanómetros y 1,0 micrómetros.

55 Las nanopartículas se pueden crear de la misma manera que las micropartículas, excepto que se usa mezclado u homogeneización a alta velocidad para reducir el tamaño de las emulsiones de polímero/agente bioactivo hasta menos de 2,0 micrómetros, y típicamente por debajo de 1,0 micrómetros. Se conocen en la técnica métodos alternativos para la producción de nanopartículas, y se pueden emplear para la presente invención.

Producción de composiciones de liberación controlada

5 En una realización, una fase orgánica, que contiene uno o más disolventes, un agente bioactivo y un polímero, se pone en contacto con una fase acuosa, que contiene un ion orgánico. En una realización particular, la fase orgánica incluye adicionalmente un codisolvente. En otra realización particular, la fase acuosa incluye adicionalmente un agente emulsionante. En otra realización particular, el ion orgánico es una sal de un ácido orgánico.

10 En otra realización, la fase orgánica se pone en contacto con la fase acuosa para formar una emulsión, en la que la emulsión comprende gotitas de la fase orgánica dispersas en la fase acuosa. El disolvente se elimina subsiguientemente de las gotitas de la emulsión para formar micropartículas endurecidas. En una realización particular, el disolvente se elimina mediante evaporación. En otra realización particular, el disolvente se elimina mediante extracción en un líquido de extracción; por ejemplo, el líquido de extracción puede ser agua. En todavía otra realización particular, el disolvente se elimina mediante filtración. Las micropartículas endurecidas se pueden recuperar entonces de la fase acuosa y se pueden secar.

15 En todavía otra realización, la emulsión se produce agitando las fases orgánica y acuosa. En otra realización, la emulsión se produce mediante uso de una mezcladora. En una realización particular, la mezcladora es una mezcladora estática. En cierta realización, la emulsión se produce mediante uso de mezclado turbulento. En otra realización, la emulsión se produce sin mezclado turbulento.

20 El procedimiento de emulsión se puede llevar a cabo a cualquier temperatura entre el punto de ebullición y el punto de congelación de los componentes. En una realización, la temperatura oscila desde alrededor de 0°C hasta alrededor de 100°C, y está típicamente entre 5°C y 75°C. En una realización particular, el procedimiento de emulsión se lleva a cabo entre alrededor de 15°C y alrededor de 60°C.

La fase orgánica de la presente invención puede contener disolventes que incluyen, pero sin limitarse a, cloruro de metileno, acetato de etilo, alcohol bencílico, acetona, ácido acético, carbonato de propileno, y otros disolventes en los que el polímero biodegradable es soluble. En una realización particular, el disolvente de la fase orgánica se puede seleccionar del grupo que consiste en acetato de etilo y cloruro de metileno.

25 En una realización particular, la fase acuosa puede incluir agua y un emulsionante.

30 En cierta realización, los codisolventes se pueden añadir a la fase orgánica. Opcionalmente se usan para promover la solubilidad del agente bioactivo en la fase orgánica. En una realización particular, se seleccionan del grupo que consiste en, pero no se limita a, dimetilsulfóxido, dimetilformamida, n-metilpirrolidina, PEG₂₀₀, PEG₄₀₀, alcohol metílico, alcohol etílico, alcohol isopropílico y alcohol bencílico. En otra realización particular, el codisolvente puede estar presente entre 0 y 90% p/p del disolvente de la fase orgánica. En otra realización particular, el codisolvente está presente entre 0 y 50% p/p del disolvente de la fase orgánica. El agente bioactivo se puede disolver primero en un volumen apropiado del codisolvente, el cual se añade entonces al disolvente de la fase orgánica, que tiene opcionalmente el polímero biodegradable disuelto en ella, para formar una disolución de todos los componentes de la fase orgánica. Alguien de pericia normal puede ajustar los volúmenes y el orden de adición para lograr la disolución deseada de agente bioactivo y polímero biodegradable. En cierta realización, el agente bioactivo estará presente en la fase orgánica a una concentración de 1-20% p/p. En una realización particular, el polímero biodegradable estará presente en la fase orgánica en una concentración de 2-40% p/p. En otra realización particular, el polímero biodegradable estará presente en la fase orgánica a una concentración de 5-20% p/p.

40 Los iones orgánicos se disuelven en la fase acuosa. En cierta realización, se disuelven a una concentración de entre alrededor de 0,1 mM y alrededor de 1000 mM. En una realización particular, se disuelven a una concentración de entre 1 y 100 mM. La concentración se puede ajustar para cada agente de ion orgánico particular y agente bioactivo para lograr la carga deseada de fármaco y la eficiencia del encapsulamiento.

45 Para estabilizar la emulsión, se puede añadir uno o más agentes emulsionantes a la fase acuosa. Los agentes emulsionantes se pueden seleccionar del grupo que consiste en, pero no se limita a, poli(alcohol vinílico), albúmina, lecitina, vitamina E TPGS, y polisorbatos. Los agentes emulsionantes están presentes en una concentración en la fase acuosa entre 0 y 10% (p/p). En una realización particular, están presentes en una concentración entre 0,5 y 5% p/p.

Formulaciones farmacéuticas

50 Además de los compuestos formulados para la administración parenteral, tal como inyección intravenosa o intramuscular, también se pueden usar otros métodos alternativos de administración de la presente invención, incluyendo, pero sin limitarse a, administración intradérmica, administración pulmonar, administración bucal, administración transdérmica y transmucosal. La administración transmucosal puede incluir, pero no se limita a, oftálmica, vaginal, rectal e intranasal. Todos estos métodos de administración son bien conocidos en la técnica.

55 En una realización particular, la composición de liberación controlada descrita aquí se puede administrar intranasalmente, tal como con disoluciones o pulverizaciones, aerosoles o inhalantes nasales. Las disoluciones nasales son habitualmente disoluciones acuosas diseñadas para ser administradas a los conductos nasales en

gotas o pulverizaciones. Las disoluciones nasales se preparan de manera que sean similares en muchos aspectos a las secreciones nasales. De este modo, las disoluciones nasales acuosas son habitualmente isotónicas y están ligeramente amortiguadas para mantener un pH de 5,5 a 6,5.

5 En cualquiera de las formulaciones se pueden incluir conservantes antimicrobianos, similares a los usados en preparaciones oftálmicas, y estabilizantes farmacéuticos apropiados, si son necesarios. Los conservantes y otros aditivos se pueden seleccionar del grupo que consiste en, pero no se limita a antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes, y similares. Se conocen diversas preparaciones nasales comerciales, e incluyen, por ejemplo, antibióticos y antihistaminas, y se usan para la profilaxis del asma.

10 En otra realización, las composiciones de liberación controlada descritas aquí se aplican tópicamente. Tales composiciones de liberación controlada incluyen, pero no se limitan a, lociones, ungüentos, cremas, geles, gotas, supositorios, pulverizaciones, líquidos y polvos. Pueden ser necesarios o deseables vehículos farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo u oleosas, espesantes, y similares.

Excipientes, vehículos y diluyentes

15 Las composiciones de liberación controlada descritas aquí se pueden formular en cualquier excipiente que el sistema biológico o entidad pueda tolerar. Los ejemplos de tales excipientes incluyen agua, disolución salina, disolución de Ringer, disolución de dextrosa, disolución de Hank, y otras disoluciones salinas fisiológicamente balanceadas acuosas. También se pueden usar vehículos no acuosos, tales como aceites fijos, polietilenglicol y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Otras formulaciones útiles incluyen suspensiones que contienen agentes que potencian la viscosidad, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol o dextrano.

20 Los excipientes también pueden contener cantidades menores de aditivos, tales como sustancias que potencian la isotonicidad y la estabilidad química. Los ejemplos de amortiguadores incluyen amortiguador de fosfato, amortiguador de bicarbonato y amortiguador de Tris, mientras que los ejemplos de conservantes incluyen timerosal, cresoles, formalina y alcohol bencílico.

25 Los vehículos farmacéuticos para las composiciones de liberación controlada descritas aquí son conocidos por los expertos en la técnica. Los utilizados más típicamente son probablemente los vehículos estándar para administración a seres humanos, incluyendo disoluciones tales como agua estéril, disolución salina y disoluciones amortiguadas a pH fisiológico.

30 Las composiciones de liberación controlada descritas aquí se pueden suspender en cualquier disolución acuosa u otro diluyente para inyección en un paciente humano o animal que necesite tratamiento. Las disoluciones de diluyentes acuosos pueden incluir además un potenciador de la viscosidad seleccionado del grupo que consiste en carboximetilcelulosa sódica, sacarosa, manitol, dextrosa, trehalosa, y otros agentes potenciadores de la viscosidad biocompatibles. La viscosidad se puede ajustar a un valor entre 2 centipoise (cp) y 100 cp, preferiblemente entre 4 y 40 cp.

35 En una realización particular, se puede incluir un tensioactivo en el diluyente para potenciar la capacidad de suspensión de la composición de liberación controlada. Los tensioactivos se pueden seleccionar del grupo que consiste en, pero no se limita a, polisorbatos y otros tensioactivos biocompatibles. Los tensioactivos se usan en una concentración de entre 0 y 5% (p/p), preferiblemente entre 0,1 y 1% p/p.

EJEMPLOS

40 Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar realizaciones particulares de la invención. Se debería apreciar por los expertos en la técnica que las técnicas descritas en los ejemplos que siguen representan técnicas descubiertas por los inventores para funcionar bien en la práctica de la invención, y de este modo se pueden considerar modos particulares constitutivos para su práctica.

Ejemplo 1 (Comparativo)

45 Preparación convencional de acetato de octreotida encapsulado en micropartículas de poli(lactida-co-glicolida) (PLGA) usando codisolventes según métodos previamente usados.

50 Se prepararon formulaciones de micropartículas de acetato de octreotida para investigar el efecto de diferentes codisolventes en la fase orgánica. Las formulaciones A-F se prepararon usando una técnica de emulsión de aceite en agua/extracción con disolvente, y se resumen en la Tabla 1. Se disolvió polímero de PLGA (50:50 lactida/glicolida, MW 24.000, 180 mg) en acetato de etilo (EtOAc, 900 μ l), y a la disolución polimérica se añadió acetato de octreotida (20 mg) disuelto en un codisolvente (Tabla 1). La fase orgánica homogénea resultante se añadió a una fase acuosa (2 ml) que contiene 1% de poli(alcohol vinílico) (PVA), y la mezcla se sometió a vórtice durante 15-30 segundos. La emulsión se vertió en una disolución de extracción con disolvente (fosfato de sodio 10 mM, pH 8,0, 150 ml), y se agitó durante cuatro horas para extraer el EtOAc. Las partículas se aislaron mediante filtración, se lavaron con agua, y se secaron con aire toda la noche. Las formulaciones se caracterizaron mediante tamaño de partículas, microscopía electrónica de barrido (SEM), morfología, carga del núcleo de octreotida y perfiles

de liberación *in vitro*.

La formulación D se repitió usando un dispositivo emulsionante, tal como el descrito en la Solicitud PCT número de Serie PCT/US04/11485, que combinó una fase orgánica homogénea (2 ml), que consiste en acetato de octreotida (20 mg), MeOH (100 μ l), polímero de PLGA (50:50 lactida/glicolida, MW 24.000, 180 mg) y ETOAc (1,9 ml), con una fase acuosa de PVA al 1% (4 ml). La emulsión se añadió entonces a una disolución de extracción con disolvente, y se agitó durante cuatro horas para extraer ETOAc. Este procedimiento produjo la formulación D2 (Tabla 1).

Los codisolventes investigados tuvieron una pequeña influencia sobre el tamaño de partículas y la carga del núcleo. Los tamaños de las partículas fueron más grandes con los codisolventes de poli(etilenglicol) (PEG) de mayor viscosidad. Por el contrario, las cargas del núcleo fueron similares para los codisolventes metanol (MeOH) y PEG (formulaciones A-C). Las mayores cargas del núcleo se obtuvieron para el codisolvente MeOH con una etapa de emulsión amortiguada a pH 8 (formulación D2) y para el codisolvente dimetilsulfóxido (DMSO) (formulación F).

Las cinéticas de liberación *in vitro* se midieron en disolución salina amortiguada con fosfato (PBS, pH 7,2, 37°C) o en acetato de sodio 100 mM (NaOAc, pH 4,0, 37°C). En la Tabla 2 se muestra un ejemplo (Formulación D2). Los sistemas del codisolvente PEG mostraron el estallido peptídico inicial más elevado (8-10%), mientras que las formulaciones restantes tuvieron un estallido inicial en el intervalo de 2-3%. Todas las formulaciones liberaron péptido durante al menos 6 semanas, aunque hubo una disminución en las velocidades de liberación relativas para las formulaciones preparadas con disolventes apróticos polares (formulaciones E-F) que dan como resultado una liberación total más lenta del péptido con respecto a las otras formulaciones.

Mediante cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC) seguido de incubación en el medio de liberación (PBS, pH 7,2, 37°C) después de 49 días, se midió que el acetato de octreotida como el péptido libre estaba intacto en un 95%. Por el contrario, la incubación de formulaciones de micropartículas de PLGA de acetato de octreotida produjo 55% de especies peptídicas modificadas tras 70 días en el medio de liberación (PBS, pH 7,2, 37°C, Tabla 2). El análisis de HPLC mostró que las nuevas entidades peptídicas fueron más hidrófobas que el acetato de octreotida nativo. El análisis de HPLC(MS reveló masas consistentes con la acilación del péptido progenitor mediante el polímero de PLGA. Las masas encontradas fueron consistentes con la acilación aleatoria, por ejemplo péptido más uno o dos monómeros de ácido glicólico o láctico en cualquier combinación. Puede ser que los productos de acilación surjan del ataque sobre fragmentos de PLGA o la cadena principal polimérica mediante restos nucleofílicos en octreotida. A un menor pH, probablemente estos restos estarían protonados, reduciendo su capacidad nucleofílica, y consiguientemente la cantidad de producto acilado. Se observó que la formación de subproductos acilados para micropartículas de PLGA de acetato de octreotida incubadas en amortiguador de acetato de sodio 100 mM (NaOAc, pH 4,0) se redujo hasta 1,25% a 49 días, en marcado contraste con los resultados para el amortiguador de PBS (55%).

Tabla 1. Encapsulamiento de acetato de octreotida en micropartículas de PLGA.

	Codisolvente en fase orgánica	Composición de fase acuosa	Tamaño mediano de las partículas	Carga del núcleo (efic. del encaps.)	Estallido (%)	Liberación de péptido total (Acilado)
A	PEG ₂₀₀ (100 μ l)	1 % PVA	49 μ m	2,83% (28%)	7,96	72,6% (44%)
B	PEG ₄₀₀ (100 μ l)	1% PVA	76 μ m	3,20% (32%)	10,4	63,0% (48%)
C	MeOH (50 μ l)	1% PVA	25 μ m	2,75% (28%)	2,91	65,7% (50%)
D	MeOH (100 μ l)	1% PVA + 10 mM PO ₄ (pH8)	34 μ m	5,57% (56%)	2,58	65,1% (50%)
D2	MeOH (100 μ l)	1%PVA+10 mM PO ₄ (pH8)	60 μ m	5,66% (57%)	1,90	85,8% (55%)
E	DMF (100 μ l)	1% PVA	38 μ m	3,41% (34%)	1,97	50,3% (33%)
F	DMSO (100 μ l)	1% PVA	38 μ m	4,88% (49%)	2,74	43,4% (36%)

Tabla 2. Liberación *in vitro* de las formulaciones D2 y AG. El amortiguador de NaOAc contiene NaOAc 100 mM (pH 4,0), 0,02% de Tween-20 y 0,05% de NaN₃. PBS es disolución salina amortiguada con fosfato (pH 7,2) que contiene 0,02% de Tween-20 y 0,05% de NaN₃. Las muestras se incubaron en una incubadora de baño de agua agitado (150 Hz) a 37C. Los valores de liberación del péptido y del péptido acilado se dan como porcentaje acumulativo liberado.

Formulación D2		
NaOAc 100 mM (pH 4)		
Día	% de péptido liberado	% de péptido acilado liberado
0	0,0	0,0
1	5,55	0,15
3	13,75	0,78
6	53,47	4,11
10	71,74	5,16
14	72,19	5,26

20	72,21	5,28
24	72,22	5,30
29	72,22	5,30
34	72,22	5,30
42	72,22	5,30
48	72,22	5,30
PBS (pH 7)		
Día	% de péptido liberado	% de péptido acilado liberado
0	0,0	0,0
1	1,81	0,08
3	3,09	0,22
6	4,87	0,59
10	7,54	1,98
14	10,42	4,29
20	17,81	10,51
24	20,69	14,06
29	23,86	18,86
34	26,21	23,12
42	32,91	28,73
48	35,13	32,14
57	36,50	35,10
64	37,83	37,41
71	38,42	45,82
78	38,58	46,37
85	38,64	46,70
Formulación AG		
PBS (pH 7)		
Día	% de péptido liberado	% de péptido acilado liberado
0	0,0	0,0
1	8,04	0,33
2	9,09	0,47
6	12,27	0,65
15	17,75	1,23
24	20,03	1,78
29	23,78	2,66
35	36,16	5,62
42	43,80	8,15
49	51,17	11,13
57	61,47	15,57
64	67,63	18,16

Ejemplo 2 (Comparativo)

Producción de sales de ácidos orgánicos insolubles en agua (complejos) de octreotida y encapsulamiento en micropartículas de PLGA según métodos previamente usados.

- 5 Se investigaron los agentes de ion orgánico, en los que el ion orgánico se complejó inicialmente con acetato de octreotida para formar una sal insoluble en agua, seguido del encapsulamiento en micropartículas de PLGA.

10 Dodecilsulfato de sodio (SDS). Se preparó un complejo de octreotida-SDS disolviendo acetato de octreotida (100 mg) en H₂O (500 µl). SDS (1,5 equiv., 43,2 mg) disuelto en H₂O (500 µl) se añadió gota a gota a la disolución de acetato de octreotida con vórtice a temperatura ambiente. Se formó inmediatamente un precipitado. La muestra se centrifugó a 10.000 rpm durante 1 minuto, y el sobrenadante se eliminó mediante una pipeta. El precipitado se lavó con agua fría y se liofilizó, proporcionando un complejo de octreotida-SDS (95,3 mg). El análisis de RP-HPLC mostró un ensanchamiento pronunciado del pico de octreotida, indicando la formación del complejo de octreotida/SDS. Las formulaciones G-I se prepararon usando una técnica de emulsión de aceite en agua/extracción con disolvente. Se disolvió polímero de PLGA (MW 24.000, 180 mg) en EtOAc (900 µl). El complejo de octreotida/SDS se disolvió en MeOH (100 µl) y se añadió a la disolución polimérica. Esto dio como resultado una fase orgánica heterogénea. En el caso de la formulación I (Tabla 3), se añadió una alícuota adicional de MeOH (100 µl) para producir una fase orgánica homogénea. La fase orgánica resultante se añadió a una fase acuosa (2 ml) que contiene 1% de PVA, y la mezcla se sometió a vórtice durante 15-30 segundos. La emulsión se vertió en una disolución de extracción con disolvente (fosfato sódico 10 mM, pH 8,0, 150 ml), y se agitó durante cuatro horas para extraer EtOAc. Las partículas se aislaron mediante filtración, se lavaron con agua y se secaron en aire toda la noche. Las formulaciones se caracterizaron mediante tamaño de partículas, morfología de SEM, carga del núcleo de octreotida y perfiles de

liberación *in vitro*.

La carga del núcleo medida para las formulaciones G-I preparadas a partir del complejo de octreotida/SDS fueron relativamente bajas, entre 0,6-2,6% (Tabla 3). También, el tamaño de la mediana de las partículas se redujo en aproximadamente 40% con respecto a formulaciones (A-F) preparadas con acetato de octreotida.

5 Los perfiles de liberación *in vitro* de formulaciones G-I en PBS fueron bastante similares. Cada una tuvo un estallido inicial de aproximadamente 20%, seguido de tres semanas de 1,5% de liberación/semana. Después de tres semanas, la velocidad de liberación aumento hasta aproximadamente 7,0% de liberación/semana, culminando en aproximadamente 80% de liberación de péptido total a las 9 semanas.

10 El ensayo de liberación de PBS *in vitro* con estas formulaciones dio como resultado la liberación de cantidades similares de péptido acilado (40-55%) y péptido total, en comparación con acetato de octreotida (formulaciones A-F).

Tabla 3. Complejo de octreotida-SDS en la fase orgánica.

Formulación	Codisolvente en la fase orgánica	Tamaño mediano de las partículas	Carga del núcleo (efic. del encaps.)	Estallido (Acilado)
G	MeOH (100 µl)	11,4 µm	0,61% (6,1%)	20,3% (49%)
H	MeOH (100 µl)	12,4 µm	0,75% (7,5%)	21,2% (40%)
I	MeOH (200 µl)	12,9 µm	2,64% (2,6%)	20,2% (42%)

15 Ácido benzoico. Las formulaciones (J-M) se prepararon usando uno a diez equivalentes de ácido benzoico codisoluelto en la fase orgánica con PLGA. Se disolvieron polímero de PLGA (MW 24.000, 180 mg) y ácido benzoico (2,4-24 mg) en EtOAc (900 µl). El acetato de octreotida se disolvió en MeOH (100 µl) y se añadió a la disolución polimérica produciendo una fase orgánica homogénea. La fase orgánica resultante se añadió a una fase acuosa (2 ml) que contiene 1% de PVA, y la mezcla se sometió a vórtice durante 15-30 segundos. La emulsión se vertió en una disolución de extracción con disolvente (fosfato de sodio 10 mM, pH 8,0, 150 ml), y se agitó durante cuatro horas para extraer EtOAc. Las partículas se aislaron mediante filtración, se lavaron con agua y se secaron en aire toda la noche. Las cargas de los núcleos midieron entre 0,88-1,67% a lo largo del intervalo de 1-10 equivalentes añadidos de ácido benzoico por equivalente de acetato de octreotida (Tabla 4).

20 Ácido pamoico. Se preparó un complejo de octreotida-pamoato disolviendo ácido pamoico (19,4 mg, 0,05 mmoles) en NaOH 0,2 N (500 µl), para proporcionar la sal de pamoato de sodio. Se disolvió acetato de octreotida (100 mg, 0,10 mmoles) en agua desionizada (100 µl), y se añadió gota a gota con vórtice suave a la disolución de sal de pamoato de sodio. Esto produjo un precipitado amarillo claro floculante. El precipitado se peletizó mediante centrifugación, y el sobrenadante se eliminó mediante pipeta. El pelete se lavó con agua (1,0 ml), se resuspendió en agua, y se liofilizó hasta un polvo amarillo claro (113 mg). La relación de octreotida/pamoato de esta preparación fue 1,71 según se midió mediante RP-HPLC.

25 Se preparó un segundo complejo de octreotida-pamoato disolviendo ácido pamoico (19,4 mg, 0,05 mmoles) en NaOH 0,4 N (250 µl) y dioxano (250 µl) para proporcionar una disolución de pamoato de sodio en dioxano/agua (1:1). El acetato de octreotida (50 mg, 0,05 mmoles) se disolvió en dioxano/agua (1:1, 200 µl). La disolución de acetato de octreotida se añadió gota a gota al pamoato de sodio con agitación, para proporcionar una disolución homogénea, amarillo claro. Este material se liofilizó hasta sequedad proporcionando un polvo amarillo claro (65 mg). La relación de octreotida/pamoato de esta preparación fue 1,02, según se midió mediante RP-HPLC. Estas dos preparaciones se usaron para preparar nuevas formulaciones de micropartículas de PLGA.

Tabla 4. Ácido benzoico y acetato de octreotida en fase orgánica.

Formulación	Codisolvente en la fase orgánica	Relación de ácido benzoico: acetato de octreotida	Tamaño mediano de las partículas	Carga del núcleo (efic. del encaps.)
J	MeOH (100 µl)	1	21,8 µm	1,36% (14%)
K	MeOH (100 µl)	2	19,5 µm	0,88% (8,8%)
L	MeOH (100 µl)	5	18,8 µm	1,61% (16%)
M	MeOH (100 µl)	10	17,9 µm	1,67% (17%)

40 Se prepararon formulaciones de micropartículas (Tabla 5, Q-W) mediante un método de emulsión de aceite en agua/extracción con disolvente. Se disolvió polímero de PLGA (MW 24.000, 180 mg) en EtOAc (1000 µl). Se disolvió pamoato de octreotida (20 o 40 mg) en alcohol bencílico (BnOH, 1000 µl) y se añadió a la disolución polimérica, produciendo una fase orgánica homogénea. La fase orgánica resultante se combinó con una fase acuosa de PVA al 1% en una relación de 1:2 para proporcionar una emulsión. La emulsión se recogió directamente en una disolución de extracción con disolvente de PVA al 0,3% (150 ml), y se agitó durante cuatro horas para extraer EtOAc. Las micropartículas endurecidas se recogieron mediante filtración, se lavaron con agua, se secaron con aire y se almacenaron a 4°C.

45

5 La caracterización de las formulaciones (Tabla 5) reveló que la relación inicial de octreotida/pamoato de 1,7 tuvo poco efecto sobre la eficiencia del encapsulamiento y la carga del núcleo con respecto a las formulaciones preparadas con la relación de octreotida/pamoato de 1,02. Por el contrario, el cambio del codisolvente a alcohol bencílico incrementó la eficiencia del encapsulamiento en aproximadamente 60% con respecto a metanol (por ejemplo Formulación S en comparación con T).

Los perfiles de liberación *in vitro* de estas formulaciones en PBS demostraron que el péptido total liberado (79-92%, Tabla 5 Q-T) es comparable a las micropartículas de acetato de octreotida en PLGA obtenidas mediante métodos convencionales (formulaciones D, F, Tabla 1), mientras que la cantidad de péptido acilado liberado (28-40%, Tabla 5, Q-T) disminuyó ligeramente con respecto a las formulaciones convencionales (44-55%, Tabla 1, A-D).

10 Las formulaciones preparadas usando la relación de octreotida/pamoato de 1:1 no mostraron una dependencia tan fuerte de la eficiencia del encapsulamiento y de la carga del núcleo sobre la naturaleza de codisolvente como las formulaciones de relación 1,7 anteriores. Las diferencias en la solubilidad para los complejos con diferentes relaciones de octreotida/pamoato en el codisolvente se proponen como una explicación para esta observación. El material con mayor relación de octreotida/pamoato tuvo una mayor solubilidad en alcohol bencílico con respecto a metanol, dando como resultado una mayor eficiencia del encapsulamiento. Por el contrario, se encontró que no hubo diferencia significativa en la solubilidad en metanol frente al alcohol bencílico para el complejo 1:1 de octreotida/pamoato. Esto dio como resultado eficiencias de encapsulamiento similares y cargas del núcleo independientes de los codisolventes.

20 Los perfiles de liberación *in vitro* de estas formulaciones 1:1 (U-W) reveló tendencias similares como se explica anteriormente, a saber, que el porcentaje total de péptido liberado (85-110%, Tabla 5, U-W) es nuevamente comparable con las formulaciones convencionales (Ejemplo 1) (aprox. 85%, Tabla 2), mientras que la cantidad de producto acilado liberado (35-44% Tabla 5, U-W) disminuyó algo con respecto a las formulaciones convencionales (44-55%, Tabla 1, A-D2).

25 El análisis de la relación molar de octreotida/pamoato final mostró una amplia variación entre las formulaciones ensayadas (Tabla 5), con un intervalo desde 2,1:1 (formulación W) hasta alrededor de 200:1 (formulación R). En todos los casos, la relación es más del doble de la relación de octreotida/pamoato del complejo de sal peptídica de partida. De este modo, el uso de una sal de pamoato preformada del péptido octreotida produjo relaciones molares muy variables de octreotida/pamoato en la formulación de liberación sostenida final.

Tabla 5. Micropartículas de pamoato de octreotida preparadas usando complejo preformado.

Formulación	Relación inicial (final) de octreotida/pamoato	Codisolvente en la fase orgánica	Tamaño mediano de las partículas	Carga del núcleo (efic. del encaps.)	Liberación de péptido total (Acilado)
Q	1.7:1 (4.4:1)	MeOH (100 µl)	40 µm	6,52% (65%)	88,6% (28,1%)
R	1.7:1 (201:1)	MeOH (500 µl)	34 µm	3,34% (33%)	79,2% (38,9%)
S	1.7:1 (13:1)	BnOH (200 µl)	31 µm	8,29% (83%)	87,2% (39,7%)
T	1.7:1 (21:1)	MeOH (200 µl)	37 µm	5,03% (50%)	91,5% (32,2%)
U	1:1 (5.3:1)	MeOH (200 µl)	48 µm	4,93% (49%)	92,3% (37,3%)
V	1:1 (5.4:1)	BnOH (200 µl)	48 µm	4,76% (48%)	110% (44,4%)
W	1:1 (2.1:1)	BnOH (200 µl)	44 µm	5,01% (25%)	84,9% (35,0%)

30 Ejemplo 3

Encapsulamiento de acetato de octreotida en microesferas de PLGA usando sales de ácido orgánico en la fase de emulsión acuosa según la presente invención.

35 Sorprendentemente, se descubrió que el uso de una sal de ácido orgánico en la fase acuosa del procedimiento de emulsionamiento permitió el uso de un péptido soluble en agua, y eliminó la necesidad de preparar especies complejadas en una etapa independiente antes de preparar la disolución. La presente invención proporcionó beneficios añadidos tales como una carga de núcleo de fármaco incrementada, una relación consistente de octreotida/ion orgánico, y menor degradación del péptido durante la liberación *in vitro*.

40 Las formulaciones de micropartículas se prepararon mediante un método de emulsión de aceite en agua/extracción con disolvente. El polímero de PLGA (MW 24.000, 140-180 mg) se disolvió en EtOAc (1000 µl). Se disolvió acetato de octreotida (20-60 mg) en BnOH (1000 µl), y se añadió a la disolución polimérica produciendo una fase orgánica homogénea. La fase orgánica resultante se combinó con una fase acuosa de PVA al 1% que contiene pamoato disódico 10-50 mM, para proporcionar una emulsión. La emulsión se recogió directamente en una disolución de extracción con disolvente de PVA al 0,3% (150 ml), y se agitó durante cuatro horas para extraer EtOAc. Las micropartículas endurecidas se recogieron mediante filtración, se lavaron con agua, se secaron con aire y se almacenaron a 4°C. Esto dio como resultado una relación final de octreotida/pamoato de aproximadamente 1-1,5 en la formulación de micropartículas, medido mediante RP-HPLC (Tabla 6).

Se investigaron los efectos de diversos efectos de diversos parámetros experimentales sobre la carga del núcleo, incluyendo la relación de fase orgánica a fase acuosa, la naturaleza del codisolvente, y el volumen del codisolvente. Se encontró que BnOH es un codisolvente más adecuado que MeOH. También es posible usar BnOH en mayores volúmenes que MeOH, puesto que MeOH indujo precipitación del polímero en la fase orgánica. BnOH también condujo a un pequeño incremento en la carga del núcleo frente a MeOH (Formulación Y, AB, Tabla 6). Sin embargo, el uso de BnOH sin el ion orgánico en la fase acuosa no proporcionó cargas del núcleo o eficiencias del encapsulamiento elevadas (AI, Tabla 6). También se encontró que el incremento de la relación de fase acuosa a orgánica incrementó ligeramente la eficiencia del encapsulamiento cuando se usó BnOH como el codisolvente (Formulaciones AE, AF, Tabla 6). En todos los casos, la relación molar de octreotida a pamoato se agrupó estrechamente entre 1,0 y 1,5, en contraste con las formulaciones del Ejemplo 2 (Tabla 5), en las que el uso de un complejo preformado de octreotida/pamoato condujo a variaciones amplias de la relación final de octreotida/pamoato de 2,1 a alrededor de 200.

Significativamente, el producto con cargas del núcleo de fármaco predecibles y elevadas, que oscilan de 5-17,5%, se pudo formar con el método de la presente invención, (formulaciones AD, AG, AH, Tabla 6), en contraste con los métodos de la técnica anterior de los Ejemplos 1 y 2, en los que la carga del núcleo de fármaco máxima lograda fue alrededor de 8% (Tabla 5 – S), con promedios que oscilan de 2-6% (Tablas 1-5). Además, las composiciones de la presente invención tienen estequiometría consistente para la relación molar de agente bioactivo a ion orgánico (Tabla 6). Esto contrasta con las composiciones obtenidas usando métodos previos (Tabla 5). Además, la producción relativa de péptido acilado es menor para micropartículas obtenidas con el ion orgánico en la fase acuosa (Tabla 2, Tabla 6) que para las micropartículas obtenidas con el uso de octreotida-pamoato preformado (Tabla 5) o acetato de octreotida (Tabla 2).

Tabla 6. Micropartículas de complejo de octreotida-pamoato mediante un procedimiento *in situ*.

Formulación (relación final de octreotida/ pamoato)	Aporte de acetato de octreotida	Codisolvente	Relación de fase orgánica/ acuosa	Tamaño mediano de las partículas	Carga del núcleo (efic. del encaps.)	Liberación de péptido total (Acilado)
X (1.09:1)	40 mg	MeOH (200 µl)	1:4	79 µm	8,52% (46,8%)	98,8% (15,7%)
Y (0.86:1)	20 mg	MeOH (200 µl)	1:10	71 µm	5,13% (51%)	120% (30,6%)
Z (1.09:1)	20 mg	BnOH (1000 µl)	1:2	44 µm	7,61% (76%)	97,1% (4,11%)
AA (1.01:1)	20 mg	BnOH (1000 µl)	1:2	59 µm	6,79% (6,8%)	101% (12,7%)
AB (1.11:1)	20 mg	BnOH (500 µl)	1:2	45 µm	6,19% (62%)	97,1% (14,8%)
AC (1.14:1)	20 mg	BnOH (1000 µl)	1:2	47 µm	7,51% (75%)	96,8% (13,4%)
AD (1.11:1)	40 mg	BnOH (1000 µl)	1:2	53 µm	12,7% (64%)	101% (16,1%)
AE (1.41:1)	60 mg	BnOH (500 µl)	1:2	45 µm	9,51% (32%)	103% (26,1 %)
AF (1.16:1)	60 mg	BnOH (500 µl)	1:4	50 µm	12,0% (40%)	108% (21,7%)
AG (1.39:1)	60 mg	BnOH (1000 µl)	1:2	39 µm	17,2% (57%)	92,5% (20,7%)
AH (1.36:1)	60 mg	BnOH (1000 µl)	1:2	37 µm	17,5% (57%)	111% (25,0%)
AI	60 mg	BnOH (1000 µl)	1:2	40 µm	6,85% (23%)	ND

Se exploró el efecto de la concentración de ácido orgánico en la fase acuosa para determinar los parámetros de fabricación óptimos. Se disolvió polímero de PLGA (MW 24.000, 160 mg) en EtOAc (1000 µl). Se disolvió acetato de octreotida (40 mg) en BnOH (1000 µl), y se añadió a la disolución polimérica produciendo una fase orgánica homogénea. La fase orgánica resultante se combinó con una fase acuosa de PVA al 1% que contiene pamoato sódico 20 o 50 mM, para proporcionar una emulsión. La emulsión se recogió directamente en una disolución de extracción con disolvente de PVA al 0,3% (150 ml), y se agitó durante cuatro horas para extraer EtOAc. Las micropartículas endurecidas se recogieron mediante filtración, se lavaron con agua, se secaron en aire y se almacenaron a 4°C. Las Formulaciones AJ-AL muestran que pamoato disódico 20 o 50 mM no tuvo ningún efecto sobre la carga del núcleo con respecto a pamoato disódico 10 mM (Tabla 7). Sin embargo, la concentración de pamoato disódico en la fase acuosa tuvo un efecto medible en la liberación de PBS *in vitro* del “día uno”. La formulación preparada usando pamoato disódico 50 mM dio como resultado un estallido del 15% (Formulación AL, Tabla 7), en comparación con menos de 4% de estallido para formulaciones preparadas con el ion orgánico 20 mM (Formulaciones AJ, AK, Tabla 7). Esto sugiere que el ion orgánico en exceso en la fase acuosa es perjudicial para el comportamiento de liberación *in vitro* de las formulaciones.

Tabla 7. El efecto de la concentración del ion orgánico sobre la formación de micropartículas de octreotida-pamoato.

Formulación (relación final de octreotida/ pamoato)	Conc. de pamoato de sodio	Relación de fase orgánica/ acuosa	Tamaño mediano de las partículas	Carga del núcleo (efic. del encaps.)	Liberación de estallido de PBS	Liberación de péptido total (Acilado)
AJ (1.33:1)	20 mM	1:1	33 µm	13,3% (67%)	3,77%	108% (25,7%)
AK (1.29:1)	20 mM	1:2	41 µm	13,3% (67%)	3,38%	106% (22,4%)

AL (1.29:1)	50 mM	1:2	54 μ m	12,8% (64%)	15,0%	110% (26,8%)
-------------	-------	-----	------------	-------------	-------	--------------

Se investigaron iones orgánicos alternativos, además de pamoato, para explorar la utilidad general de la presente invención. Se prepararon formulaciones de micropartículas mediante un método de emulsión de aceite en agua/extracción con disolvente. Se disolvió polímero de PLGA (MW 24.000, 160 mg) en EtOAc (1000 μ l). Se disolvió acetato de octreotida (40 mg) en BnOH (1000 μ l), y se añadió a la disolución polimérica produciendo una fase orgánica homogénea. La fase orgánica resultante se combinó con una fase acuosa de PVA al 1% que contiene ácido orgánico 10-20 mM como su sal sódica, para proporcionar una emulsión. La emulsión se recogió directamente en una disolución de extracción con disolvente de PVA al 0,3% (150 ml), y se agitó durante cuatro horas para extraer EtOAc. Las micropartículas endurecidas se recogieron mediante filtración, se lavaron con agua, se secaron en aire y se almacenaron a 4°C. Esto dio como resultado formulaciones de micropartículas con cargas del núcleo de octreotida entre 6,8 y 15,3%, según se mide mediante RP-HPLC (Tabla 8). Los efectos de los iones orgánicos ensayados sobre la carga del núcleo son reveladores. Las Formulaciones AM-AP no muestran incremento en la carga del núcleo medida con respecto al control que contiene pamoato de sodio (Formulaciones AT, AU, AY, Tabla 8). Por el contrario, las formulaciones AQ-AS, AV-AX y AZ-BB, que emplearon ácidos orgánicos que oscilan desde ácido cólico a compuestos aromáticos bicíclicos, proporcionaron cargas de núcleo de péptido comparables a ácido pamoico (Tabla 8). Estos resultados implican que los ácidos orgánicos con propiedades fisicoquímicas se pueden sustituir por ácido pamoico para producir formulaciones de micropartículas comparables.

Tabla 8. El efecto de diversos ácidos orgánicos (sales sódicas) en la fase acuosa sobre la formación de micropartículas de complejo de octreotida.

Formulación	Sal sódica de ácido orgánico (conc.)	Tamaño de las partículas	Carga del núcleo (efic. del encaps.)	Liberación de péptido total (Acilado)
AM	Succínico (10 mM)	34,1	7,74% (39%)	99,9% (53,4%)
AN	Benzoico (10 mM)	32 μ m	6,88% (34%)	105% (56,7%)
AO	Salicílico (10 mM)	34 μ m	7,78% (39%)	106% (54,0%)
AP	Trifluorometil-p-toluico (10 mM)	33 μ m	8,92% (45%)	107% (50,7%)
AQ	Cólico (20 mM)	60 μ m	13,2% (66%)	104% (47,2%)
AR	2-Naftalenosulfónico (20 mM)	38 μ m	11,6% (58%)	110% (42,6%)
AS	2,3-Naftalenodicarboxílico (10mM)	38 μ m	13,1% (66%)	109% (47%)
AT	Pamoico (10 mM)	45 μ m	13,8 (69%)	98,5% (37%)
AU	Pamoico (10 mM)	43 μ m	14,2% (71%)	97,5% (31%)
AV	1-Hidroxi-2-naftoico (20 mM)	42 μ m	15,3% (76%)	152% (25,7%)
AW	3-Hidroxi-2-naftoico (20 mM)	40 μ m	14,6% (72%)	105% (20,8%)
AX	2-Naftoico (20 mM)	39 μ m	13,4% (67%)	134% (32,9%)
AY	Pamoico (10 mM)	46 μ m	14,4% (72%)	103% (22%)
AZ	2-Naftalenosulfónico (20 mM)	36 μ m	10,8% (54%)	138% (33,0%)
BA	2,3-Naftalenodicarboxílico (10 mM)	46 μ m	12,1% (61%)	97,8% (25%)
BB	Salicilsalicílico (20 mM)	39 μ m	12,4% (62%)	114% (23,2%)

20

Las formulaciones AM, AN, AO y AQ no forman parte de la invención.

Ejemplo 4

Encapsulamiento de péptidos adicionales en microesferas de PLGA usando sales de ácidos orgánicos en la fase de emulsión acuosa según la presente invención.

25 Se formuló acetato de leuprolida en micropartículas de PLGA según la presente invención como se describe en los ejemplos más abajo. Los resultados de estas investigaciones demuestran la utilidad de la presente invención en relación con la mayor carga del núcleo y la eficiencia del encapsulamiento (Formulación B1 frente a BJ-BK) con respecto a la metodología convencional (Tabla 9).

30 Formulación B1 (leuprolida) – Método de encapsulamiento convencional. Se disolvió polímero de PLGA (MW 24.000, 160 mg) en CH_2Cl_2 (1000 μ l). Se disolvió acetato de leuprolida (40 mg) en BnOH (1000 μ l), y se añadió a la disolución polimérica produciendo una fase orgánica homogénea. La fase orgánica resultante se combinó con una fase acuosa de PVA al 1% para proporcionar una emulsión. La emulsión se recogió directamente en una disolución de extracción con disolvente de PVA al 0,3% (150 ml), y se agitó durante cuatro horas para extraer EtOAc. Las micropartículas endurecidas se recogieron mediante filtración, se lavaron con agua, se secaron en aire y se almacenaron a 4°C. Esto proporcionó la formulación B1 (140 mg, rendimiento 70,0%) con un tamaño de partículas de la mediana de 50,1 μ m. La carga del núcleo (1,99%), la eficiencia del encapsulamiento (9,95%) y el estallido *in vitro* (1,63%) se determinaron mediante el ensayo de RP-HPLC.

35

Formulación BJ (leuprolida) – Método de encapsulamiento asistido por ion orgánico. Se disolvió polímero de PLGA (MW 24.000, 160 mg) en CH₂Cl₂ (1000 µl). Se disolvió acetato de leuprolida (40 mg) en BnOH (1000 µl), y se añadió a la disolución polimérica produciendo una fase orgánica homogénea. La fase orgánica resultante se combinó con una fase acuosa de PVA al 1% que contiene pamoato disódico 10 mM, para proporcionar una emulsión. La emulsión se recogió directamente en una disolución de extracción con disolvente de PVA al 0,3% (100 ml), y se agitó durante 10 minutos. Se añadió una segunda disolución de extracción que consiste en isopropanol al 2% (200 ml), y se agitó durante cuatro horas adicionales. Las micropartículas endurecidas se recogieron mediante filtración, se lavaron con agua, se secaron en aire y se almacenaron a 4°C. Esto proporcionó la formulación BJ (157 mg, rendimiento 78,5%) con un tamaño de partículas de la mediana de 54,0 µm. La carga del núcleo (9,4%), la eficiencia del encapsulamiento (47,0%) y el estallido *in vitro* (5,31%) se determinaron mediante el ensayo de RP-HPLC.

Formulación BK (leuprolida) – Método asistido por ion orgánico

Se preparó una formulación de micropartículas mediante un método de emulsión de aceite en agua/extracción con disolvente. Se disolvió polímero de PLGA (MW 24.000, 160 mg) en CH₂Cl₂ (1000 µl). Se disolvió acetato de leuprolida (40 mg) en BnOH (1000 µl), y se añadió a la disolución polimérica produciendo una fase orgánica homogénea. La fase orgánica resultante se combinó con una fase acuosa de PVA al 1% que contiene pamoato disódico 50 mM, para proporcionar una emulsión. La emulsión se recogió directamente en una disolución de extracción con disolvente de PVA al 0,3% (100 ml), y se agitó durante 10 minutos. Se añadió una disolución de extracción secundaria que consiste en isopropanol al 2% (200 ml), y se agitó durante cuatro horas adicionales. Las micropartículas endurecidas se recogieron mediante filtración, se lavaron con agua, se secaron en aire y se almacenaron a 4°C. Esto proporcionó la formulación BK (120 mg, rendimiento 60,0%) con un tamaño de partículas de la mediana de 43,1 µm. La carga del núcleo (10,6%), la eficiencia del encapsulamiento (53,0%) y el estallido *in vitro* (21,1%) se determinaron mediante el ensayo de RP-HPLC.

La Tabla 9 muestra que la carga del núcleo y la eficiencia del encapsulamiento de los diferentes péptidos aumentaron por la presencia de un ion orgánico.

Tabla 9. Micropartículas de complejo de péptido-pamoato mediante un procedimiento *in situ*.

Formulación	Péptido	Conc. de pamoato	Carga del núcleo	Efic. del encaps.
BI	Leuprolida	0 mM	2,0%	10,0%
BJ	Leuprolida	10 mM	9,4%	47,0%
BK	Leuprolida	50 mM	10,6%	53,0%

Ejemplo 5

Encapsulamiento de insulina en micropartículas de PLGA usando sales de ácidos orgánicos en una fase de emulsión acuosa.

Dodecilsulfato de sodio (comparativo): Formulaciones de micropartículas se prepararon usando un método de emulsión de agua en aceite/extracción con disolvente. La fase orgánica consistió en polímero de PLGA (MW 11.800, 150 mg) e insulina pegilada (50 mg) disueltos en CH₂Cl₂ (2 ml). La fase acuosa consistió en PVA al 1% y SDS 14 mM. Las fases orgánica y acuosa homogéneas se combinaron en una relación de 1:5 para producir una emulsión de fase orgánica en fase acuosa. La emulsión se recogió directamente en una disolución de extracción con disolvente de PVA al 0,3% (100 ml), y se agitó durante 10 minutos antes de añadir 100 ml de IPA al 2%. La disolución de extracción con disolvente se agitó entonces durante 3 horas adicionales para extraer CH₂Cl₂. Las micropartículas endurecidas se recogieron mediante filtración, se lavaron con agua, se secaron en aire y se almacenaron a -20°C. La micropartícula resultante tuvo una carga del núcleo de 21% (eficiencia del encapsulamiento, 84%). Estas micropartículas se caracterizaron mediante un gran estallido *in vitro* de 50% a 24 h en PBS a 37°C.

Pamoato disódico: Se prepararon formulaciones de micropartículas usando un método de emulsión de aceite en agua/extracción con disolvente. La fase orgánica consistió en polímero de PLGA (MW 11.800, 75 mg) e insulina pegilada (25 mg) disueltos en CH₂Cl₂ (1 ml). La fase acuosa consistió en PVA al 1% y pamoato disódico 10 mM. Las fases orgánica y acuosa homogéneas se combinaron en una relación de 1:5 para producir una emulsión de fase orgánica en fase acuosa. La emulsión se recogió directamente en una disolución de extracción con disolvente de PVA al 0,3% (50 ml), y se agitó durante 10 minutos antes de añadir agua (100 ml). La disolución de extracción con disolvente se agitó entonces durante 3 horas para extraer CH₂Cl₂. Las micropartículas endurecidas se recogieron mediante filtración, se lavaron con agua, se secaron en aire y se almacenaron a -20°C. Las micropartículas resultantes tuvieron una carga del núcleo de 18% (eficiencia del encapsulamiento, 78%), y una relación final de insulina pegilada/pamoato de 1:2. En contraste con las micropartículas obtenidas con SDS, estas micropartículas tuvieron un bajo estallido *in vitro* de 5% en PBS a 37°C.

Ejemplo 6

Evaluación de la farmacocinética de octreotida en micropartículas de PLGA tras la administración a ratas Sprague Dawley.

Se midieron los niveles de suero sanguíneo para octreotida liberada a partir de formulaciones de micropartículas de PLGA inyectadas subcutáneamente en ratas. Los animales (n = 6/grupo) se trataron una vez mediante inyección subcutánea de un único nivel de dosis (~8-10 mg/kg) de seis formulaciones de micropartículas de PLGA de octreotida diferentes. A las horas 1 y 6, y en los días 1, 4, 7, 11, 14, 20, 28, 42 y 54, se obtuvieron muestras de suero de cada animal para evaluar la farmacocinética de la octreotida. Las concentraciones de suero se midieron mediante un kit de radioinmunoensayo libre de extracción comercialmente disponible (#S-2211) (Peninsula Labs). El Límite de Cuantificación (LOQ) del ensayo fue 0,1 ng/ml. Las concentraciones séricas medias de octreotida para cada punto de tiempo se dan en la Tabla 10. A continuación se describe la preparación de las formulaciones de PLGA de octreotida ensayadas.

Tabla 10. Niveles séricos medios de octreotida (ng/ml) tras un único tratamiento subcutáneo en ratas.

Formulación	Dosis (mg/kg)	Día de la muestra					
		0	0,04	0,25	1	4	7
BC	10,2	0,00	39,75	3,83	0,62	1,44	3,07
BD	8,9	0,00	39,95	4,00	0,95	1,66	3,41
BE	9,7	0,00	36,35	4,09	2,04	2,13	2,59
BF	8,6	0,00	39,75	3,89	1,33	2,54	3,06
BG	9,2	0,00	29,70	3,82	2,06	1,85	2,28
BH	9,4	0,00	39,80	4,13	2,90	3,70	3,64
	11	14	20	28	42	54	
BC	3,71	3,42	3,51	1,95	0,39	0,00	
BD	3,64	3,44	2,03	1,04	0,45	0,00	
BE	2,89	2,94	2,19	1,81	3,09	0,90	
BF	3,16	2,89	1,43	0,64	1,52	0,00	
BG	1,96	2,00	1,70	0,97	2,24	1,39	
BH	3,54	3,44	2,34	1,70	1,63	0,05	

Preparación y caracterización de formulaciones de octreotida usadas en el estudio de animal.

Formulación BC

Se disolvió polímero de PLGA (MW 24.000, 720 mg) en EtOAc (4000 µl). Se disolvió acetato de octreotida (80 mg) en BnOH (4000 µl), y se añadió a la disolución polimérica produciendo una fase orgánica homogénea. La fase orgánica resultante se combinó con una fase acuosa de PVA al 1% que contiene pamoato disódico 10 mM, para proporcionar una emulsión. La emulsión se recogió directamente en una disolución de extracción con disolvente de PVA al 0,3% (600 ml), y se agitó durante cuatro horas para extraer EtOAc. Las micropartículas endurecidas se recogieron mediante filtración, se lavaron con agua, se secaron en aire y se almacenaron a 4°C. Esto proporcionó la formulación BC (754 mg, rendimiento 94%) con un tamaño de partículas de la mediana de 55,0 µm. La carga del núcleo (8,5%), la eficiencia del encapsulamiento (85,0%) y el estallido *in vitro* (7,4%) se determinaron mediante el ensayo de RP-HPLC.

Formulación BD

Se disolvió polímero de PLGA (MW 24.000, 680 mg) en EtOAc (4000 µl). Se disolvió acetato de octreotida (120 mg) en BnOH (4000 µl), y se añadió a la disolución polimérica produciendo una fase orgánica homogénea. La fase orgánica resultante se combinó con una fase acuosa de PVA al 1% que contiene pamoato disódico 10 mM, para proporcionar una emulsión. La emulsión se recogió directamente en una disolución de extracción con disolvente de PVA al 0,3% (600 ml), y se agitó durante cuatro horas para extraer EtOAc. Las micropartículas endurecidas se recogieron mediante filtración, se lavaron con agua, se secaron en aire y se almacenaron a 4°C. Esto proporcionó la formulación BD (694 mg, rendimiento 94%) con un tamaño de partículas de la mediana de 58,7 µm. La carga del núcleo (11,8%), la eficiencia del encapsulamiento (78,7%) y el estallido *in vitro* (4,1%) se determinaron mediante el ensayo de RP-HPLC.

Formulación BE

Se disolvió polímero de PLGA (MW 24.000, 680 mg) en EtOAc (4000 µl). Se disolvió acetato de octreotida (120 mg) en BnOH (4000 µl), y se añadió a la disolución polimérica produciendo una fase orgánica homogénea. La fase orgánica resultante se combinó con una fase acuosa de PVA al 1% que contiene pamoato disódico 10 mM, para proporcionar una emulsión. La emulsión se recogió directamente en una disolución de extracción con disolvente de PVA al 0,3% (600 ml), y se agitó durante cuatro horas para extraer EtOAc. Las micropartículas endurecidas se recogieron mediante filtración, se lavaron con agua, se secaron en aire y se almacenaron a 4°C. Esto proporcionó la formulación BE (727 mg, rendimiento 91%) con un tamaño de partículas de la mediana de 52,2 µm. La carga del núcleo (11,6%), la eficiencia del encapsulamiento (77,3%) y el estallido *in vitro* (2,75%) se determinaron mediante el ensayo de RP-HPLC.

Formulación BF

5 Se disolvió polímero de PLGA (MW 24.000, 640 mg) en EtOAc (4000 μ l). Se disolvió acetato de octreotida (160 mg) en BnOH (4000 μ l), y se añadió a la disolución polimérica produciendo una fase orgánica homogénea. La fase orgánica resultante se combinó con una fase acuosa de PVA al 1% que contiene pamoato disódico 10 mM, para proporcionar una emulsión. La emulsión se recogió directamente en una disolución de extracción con disolvente de PVA al 0,3% (600 ml), y se agitó durante cuatro horas para extraer EtOAc. Las micropartículas endurecidas se recogieron mediante filtración, se lavaron con agua, se secaron en aire y se almacenaron a 4°C. Esto proporcionó la formulación BF (766 mg, rendimiento 95,8%) con un tamaño de partículas de la mediana de 47,7 μ m. La carga del núcleo (14,7%), la eficiencia del encapsulamiento (73,5%) y el estallido *in vitro* (5,5%) se determinaron mediante el ensayo de RP-HPLC.

Formulación BG

15 Se disolvió polímero de PLGA (MW 28.000, 640 mg) en EtOAc (4000 μ l). Se disolvió acetato de octreotida (160 mg) en BnOH (4000 μ l), y se añadió a la disolución polimérica produciendo una fase orgánica homogénea. La fase orgánica resultante se combinó con una fase acuosa de PVA al 1% que contiene pamoato disódico 10 mM, para proporcionar una emulsión. La emulsión se recogió directamente en una disolución de extracción con disolvente de PVA al 0,3% (600 ml), y se agitó durante cuatro horas para extraer EtOAc. Las micropartículas endurecidas se recogieron mediante filtración, se lavaron con agua, se secaron en aire y se almacenaron a 4°C. Esto proporcionó la formulación BG (715 mg, rendimiento 89,3%) con un tamaño de partículas de la mediana de 48,7 μ m. La carga del núcleo (11,9%), la eficiencia del encapsulamiento (59,5%) y el estallido *in vitro* (2,3%) se determinaron mediante el ensayo de RP-HPLC.

Formulación BH

25 Se disolvió polímero de PLGA (MW 14.000, 560 mg) en EtOAc (4000 μ l). Se disolvió acetato de octreotida (240 mg) en BnOH (4000 μ l), y se añadió a la disolución polimérica produciendo una fase orgánica homogénea. La fase orgánica resultante se combinó con una fase acuosa de PVA al 1% que contiene pamoato disódico 10 mM, para proporcionar una emulsión. La emulsión se recogió directamente en una disolución de extracción con disolvente de PVA al 0,3% (600 ml), y se agitó durante cuatro horas para extraer EtOAc. Las micropartículas endurecidas se recogieron mediante filtración, se lavaron con agua, se secaron en aire y se almacenaron a 4°C. Esto proporcionó la formulación BH (680 mg, rendimiento 85,0%) con un tamaño de partículas de la mediana de 40,6 μ m. La carga del núcleo (17,4%), la eficiencia del encapsulamiento (58,0%) y el estallido *in vitro* (6,8%) se determinaron mediante el ensayo de RP-HPLC.

30 En todos los casos, la liberación del agente bioactivo *in vivo* ocurrió durante al menos 42 días, y en algunos casos durante tanto como 54 días.

REIVINDICACIONES

1. Un método para obtener una composición de liberación controlada, que comprende las etapas de:
 - combinar un agente bioactivo soluble en agua y un polímero en una fase orgánica;
 - combinar un ion orgánico en una fase acuosa; y
 - 5 combinar las fases orgánica y acuosa resultantes usando un procedimiento de emulsión para producir una composición de liberación controlada;
- en el que dicho ion orgánico se selecciona del grupo que consiste en pamoato, trifluorometil-p-toluato, 2-naftalenosulfonato, 2,3-naftalenodicarboxilato, 1-hidroxi-2-naftoato, 3-hidroxi-2-naftoato, 2-naftoato, y salicilsalicilato;
- y en el que dicho agente bioactivo se selecciona del grupo que consiste en ácidos nucleicos, hidratos de carbono, agonistas de LHRH, octreotida, insulina, leuprolida, somatostatina, inmunógenos, precursores metabólicos capaces de promover el crecimiento y supervivencia de células y tejidos, agentes antineoplásicos, antihistaminas, agentes cardiovasculares, agentes antiulcerosos, broncodilatadores, vasodilatadores, agentes del sistema nervioso central, y antagonistas narcóticos.
2. Un método para obtener una composición de liberación controlada según la reivindicación 1, que comprende:
 - 15 combinar una fase orgánica que comprende un agente bioactivo soluble en agua y un polímero con una fase acuosa que comprende dicho ion orgánico usando un procedimiento de emulsión,
 - en el que dicho ion orgánico está presente en una fase acuosa para reducir la degradación de dicho agente bioactivo; y
 - recuperar dicha composición.
 - 20 3. Un método según la reivindicación 1, en el que dicha composición de liberación controlada es una micropartícula que comprende un agente bioactivo soluble en agua en un polímero, comprendiendo dicho método las etapas de:
 - a) combinar un polímero biodegradable y una fase orgánica;
 - b) combinar un agente bioactivo soluble en agua y dicha fase orgánica;
 - c) combinar dicho ion orgánico y una fase acuosa;
 - 25 d) poner en contacto las fases orgánica y acuosa a través del uso de un procedimiento de emulsión; y
 - e) recuperar dichas micropartículas.
 4. Un método según la reivindicación 1, que comprende:
 - a) combinar un agente bioactivo soluble en agua con una fase orgánica;
 - b) combinar un polímero con dicha fase orgánica;
 - 30 c) combinar dicho ion orgánico con una fase acuosa; y
 - d) poner en contacto las fases orgánica y acuosa resultantes a través del uso de un procedimiento de emulsión para producir una composición de liberación controlada que incluye un complejo de ion orgánico-agente bioactivo.
 - 35 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además un codisolvente en dicha fase orgánica.
 6. El método de la reivindicación 5, en el que dicho codisolvente se selecciona del grupo que consiste en dimetilsulfóxido, dimetilformamida, n-metilpirrolidinona, PEG200, PEG400, alcohol metílico, alcohol etílico, alcohol isopropílico y alcohol bencílico.
 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además un agente emulsionante en dicha fase acuosa.
 - 40 8. El método de la reivindicación 7, en el que dicho agente emulsionante se selecciona del grupo que consiste en poli(alcohol vinílico), albúmina, lecitina, vitamina E-TPGS, y polisorbatos.
 9. El método de la reivindicación 7, en el que dicho agente emulsionante está en una concentración final que oscila de 0,1 a 10% (p/p).

10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha fase orgánica comprende un disolvente seleccionado del grupo que consiste en cloruro de metileno, acetato de etilo, alcohol bencílico, acetona, ácido acético y carbonato de propileno.
- 5 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho ion orgánico está en una concentración final que oscila de 0,1 a 1000 mM.
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 4, en el que dicha composición de liberación controlada se selecciona del grupo que consiste en micropartículas y nanopartículas.
13. El método de la reivindicación 12, en el que dichas micropartículas y nanopartículas son biodegradables.
- 10 14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho polímero se selecciona del grupo que consiste en poli(lactida)s, poli(glicolida)s, poli(lactida-coglicolida)s, poli(ácido láctico)s, poli(ácido glicólico)s, poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)s, policaprolactona, policarbonatos, poliesteramidas, polianhídridos, poli(aminoácidos), poliortoésteres, poliacetilos, policianoacrilatos, polieterésteres, poli(dioxanona)s, poli(alquilato de alquileo)s, copolímeros de polietilenglicol y poliortoéster, poliuretanos biodegradables, mezclas y copolímeros de los mismos.
- 15 15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho procedimiento de emulsión se selecciona del grupo que consiste en aceite en agua y agua en aceite.
16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho ion orgánico se selecciona del grupo que consiste en trifluorometil-p-toluate, 2-naftalenosulfonato, 2,3-naftalenodicarboxilato, 1-hidroxi-2-naftoato, 3-hidroxi-2-naftoato, 2-naftoato y salicilsalicilato.
- 20 17. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la estequiometría molar del agente bioactivo con respecto al ion orgánico oscila de 1,0 a 1,5.