

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 635 515**

51 Int. Cl.:

A61K 9/52	(2006.01)
A61K 38/27	(2006.01)
A61K 38/28	(2006.01)
A61K 47/34	(2007.01)
A61K 47/36	(2006.01)
A61P 3/10	(2006.01)
A61P 5/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.02.2009 PCT/JP2009/052951**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **27.08.2009 WO09104706**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.02.2009 E 09713553 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.07.2017 EP 2251006**

54 Título: **Micropartícula y composición farmacéutica de la misma**

30 Prioridad:

22.02.2008 JP 2008041298
 22.02.2008 JP 2008041299
 26.06.2008 JP 2008167026
 26.06.2008 JP 2008167027
 24.09.2008 JP 2008243931
 24.09.2008 JP 2008243932

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.10.2017

73 Titular/es:

TORAY INDUSTRIES, INC. (100.0%)
 1-1, Nihonbashi-Muromachi 2-chome
 Chuo-ku, Tokyo 103-8666, JP

72 Inventor/es:

KAKIZAWA, YOSHINORI;
NISHIO, REIJI;
MICHIZOE, JUNJI;
KOIWA, MASAKAZU;
IDA, NOBUO;
HIRANO, TAISUKE y
KOSHI, YOICHIRO

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Carlos

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 635 515 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

Micropartícula y composición farmacéutica de la misma

5 SECTOR TÉCNICO

La presente invención se refiere a una micropartícula que comprende un aglomerado de partículas que contienen sustancias activas hidrófilas, y una composición farmacéutica de la misma. Particularmente, la presente invención se refiere a una micropartícula y una composición farmacéutica de la misma como un llamado sistema de administración de fármacos. Más particularmente, por ejemplo, la presente invención se refiere a una micropartícula que contiene eficazmente una proteína, un fármaco peptídico, un fármaco de ácido nucleico, y similares de propiedad hidrófila y gran peso molecular, y una composición farmacéutica de la misma.

15 ANTECEDENTES TÉCNICOS

Se desarrollan preparaciones particuladas que tienen fármacos encerrados en partículas finas llamadas nanopartícula, micropartícula, nanoesfera, microesfera o microcápsula, y se intenta utilizarlas como agentes de liberación sostenida para fármacos.

20 Las preparaciones particuladas que utilizan compuestos poliméricos como base incluyen partículas finas compuestas por ácido poliláctico o poli(ácido láctico-ácido glicólico) biodegradable. En estas preparaciones particuladas, es difícil encapsular un fármaco proteico o peptídico de propiedad hidrófila y gran peso molecular mientras que mantiene la bioactividad. Además, cuando se administra en el cuerpo humano, se sabe que el fármaco es liberado de forma masiva en un corto periodo, y este fenómeno se denomina una descarga inicial.

25 Como partículas finas compuestas por un polímero de unión covalente de sacárido y poli(hidroxiácido), la bibliografía de patentes 1 da a conocer una microcápsula para portar una sustancia farmacológicamente activa compuesta por un producto de reacción de poliol y ácido poliláctico. En esta técnica, no se utilizan polisacáridos, y no se menciona nada acerca de la inclusión de un péptido o proteína. La microcápsula fabricada mediante un procedimiento de secado por pulverización liberó el fármaco encapsulado en un 62% en 24 horas. Esta velocidad de liberación es demasiado rápida, y la microcápsula puede aplicarse difícilmente como un agente de liberación sostenida para un fármaco.

35 La bibliografía de patentes 2 y la bibliografía no de patentes 1 dan a conocer una nanopartícula o una nanopartícula compuesta por un material que tiene un polímero biodegradable injertado en polisacáridos, pero estas bibliografías no mencionan nada acerca de una micropartícula compuesta por nanopartículas. La bibliografía de patentes 2 da a conocer, por ejemplo, un procedimiento de emulsión doble ya mencionado en otras bibliografías, como un procedimiento de fabricación de una micropartícula para encapsular una sustancia activa hidrófila, pero no hay ninguna descripción específica, y no se constata la inclusión de un fármaco en una partícula, o la liberación de un fármaco a partir de una partícula. El documento no de patente 1 da a conocer una micropartícula que encapsula una albúmina fabricada mediante el procedimiento de emulsión doble, pero la eficiencia de encapsulación para la cantidad incluida de la albúmina es el 53% o menos, y la baja eficiencia de encapsulación de la sustancia activa hidrófila presenta un problema en el coste de fabricación.

45 La bibliografía de patentes 3 da a conocer una partícula fina que contiene un polímero anfífilo compuesto por polisacáridos y un poliéster alifático, más específicamente una partícula fina compuesta por un núcleo interno de polisacáridos, una capa externa hidrófoba de poliéster alifático, y un modificador de superficie unido a la capa externa hidrófoba. Esta partícula fina no tiene una estructura de aglomeración de partículas finas, y no se muestran ejemplos específicos sobre partículas de diámetro de partícula de unidades micrométricas. La eficiencia de encapsulación de la sustancia hidrófila es del 50% o menos, y esta baja eficiencia de encapsulación es un problema similar al caso anterior.

55 La bibliografía de patentes 4 da a conocer una nanopartícula de diámetro de partícula promedio de menos de 300 nm, compuesta por un polímero de dextrano de origen natural, pero no se muestran ejemplos específicos. Ésta no es una estructura de aglomeración de partículas finas, y el diámetro de partícula promedio es de cientos de nanómetros, y es probable que el fármaco se difunda desde el sitio de administración, y no es preferente como agente de liberación sostenida.

60 Como el polímero para formar partículas, la bibliografía de patentes 5 y la bibliografía de patentes 6 dan a conocer y sugieren la utilización de un polímero de bloques anfífilo que tiene una parte hidrófila tal como polietilenglicol, y una parte hidrófoba tal como poli(ácido láctico-ácido glicólico). Las partículas micelares que utilizan dicho polímero de bloques anfífilo son habitualmente hidrófobas en el interior, e hidrófilas en la capa externa, y son adecuadas para la contención de fármacos de bajo peso molecular hidrófobos, pero no son adecuadas para la contención de sustancias activas hidrófilas, tales como una proteína o un péptido.

65 La bibliografía de patentes 7 y la bibliografía no de patentes 2 dan a conocer intentos de contener una proteína en

una partícula utilizando un polímero de bloques anfífilo, pero la cantidad del fármaco que estará contenido es pequeña, o la descarga inicial es grande, y hasta la fecha la tecnología de fabricación de partículas que tienen propiedades adecuadas como inyección de liberación sostenida de un fármaco hidrófilo aún no está establecida.

5 Bibliografía de patentes 1: Publicación de solicitud de patente japonesa No. 8-19226

Bibliografía de patentes 2: Traducción al japonés de la publicación de solicitud internacional PCT No. 2004-521152

Bibliografía de patentes 3: WO2006/095668

10 Bibliografía de patentes 4: Traducción al japonés de la publicación de solicitud internacional PCT No. 10-511957

Bibliografía de patentes 5: Traducción al japonés de la publicación de solicitud internacional PCT No. 2004-513154

15 Bibliografía de patentes 6: Traducción al japonés de la publicación de solicitud internacional PCT No. 2004-514734

Bibliografía de patentes 7: Traducción al japonés de la publicación de solicitud internacional PCT No. 2000-501084

20 Bibliografía no de patentes 1: Yuichi Oya y otros 3, "Encapsulation and/or Release Behavior of Bovine Serum Albumin within and from Polylactide-Grafted Dextran Microspheres" (Macromolecular Bioscience, 2004, vol. 4, págs. 458-463).

25 Bibliografía no de patentes 2: Anshu Yang y otros 5, "Tumor necrosis factor alpha blocking peptide loaded PEG-PLGA nanopeptides: Preparation and in vitro evaluation" (International Journal of Pharmaceutics, 2007, vol. 331, págs. 123-132).

DIVULGACIÓN DE LA INVENCIÓN

PROBLEMAS A RESOLVER POR LA INVENCIÓN

30 Tal como se ha mencionado anteriormente, se han desarrollado micropartículas utilizando un polímero, y es, por lo tanto, un objetivo primario de la presente invención presentar una micropartícula capaz de encapsular una sustancia activa hidrófila de forma eficiente y, más particularmente, una micropartícula capaz de liberar el fármaco encapsulado a una velocidad apropiada, sin causar descarga inicial significativa.

MEDIOS PARA RESOLVER LOS PROBLEMAS

Los inventores de la presente invención acumularon intensamente estudios para resolver los problemas, y han completado finalmente la presente invención.

40 Es decir, la presente invención se refiere a una micropartícula, según la reivindicación 1, que comprende un aglomerado de partículas que contienen sustancia activa hidrófila, partícula que comprende un polímero anfífilo compuesto por un segmento hidrófobo de poli(hidroxiácido) y un segmento hidrófilo de polisacáridos o polietilenglicol, y una sustancia activa hidrófila, y en la que el número de aglomeración de dichas partículas está en un intervalo de 10 a la séptima potencia de 10. Más particularmente, la presente invención se refiere a una micropartícula que comprende aglomerado de partículas que contienen sustancia activa hidrófila, partícula que tiene un segmento hidrófilo de un polímero anfífilo en el interior y tiene una capa externa del segmento hidrófobo del polímero anfífilo, y un procedimiento de fabricación de la misma, y una composición farmacéutica de la misma.

EFFECTOS DE INVENCIÓN

50 La micropartícula de la presente invención es capaz de encapsular una sustancia activa hidrófila de forma eficiente, y de liberar la sustancia activa hidrófila a una velocidad apropiada en el cuerpo humano, y es, por lo tanto, utilizable como nueva preparación de sistema de administración de fármacos (DDS).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[La figura 1] muestra la liberación de fármaco a partir de micropartículas que encapsulan hormona del crecimiento humana.

60 [La figura 2] muestra la liberación de fármaco a partir de micropartículas de dextrano-PLGA que encapsulan insulina humana.

[La figura 3] muestra una imagen de SEM de micropartículas de dextrano-PLGA.

65 [La figura 4] muestra una imagen de SEM de una micropartícula de polietilenglicol-poli(épsilon-caprolactona).

[La figura 5] muestra los cambios en la evolución temporal de la concentración de fármaco en sangre en ratones a los que se administraron partículas que encapsulan hormona del crecimiento humana por vía subcutánea.

5 [La figura 6] muestra cambios en la evolución temporal de la concentración de fármaco en sangre en ratones a los que se administraron micropartículas que encapsulan hormona del crecimiento humana por vía subcutánea.

[La figura 7] muestra los cambios de peso corporal en ratones a los que se administraron micropartículas que encapsulan hormona del crecimiento humana por vía subcutánea.

10 [La figura 8] muestra cambios en la evolución temporal de la concentración de IGF-1 en sangre en ratones a los que se administraron micropartículas que encapsulan hormona del crecimiento humana por vía subcutánea.

15 [La figura 9] muestra la liberación de fármaco en una solución tampón de micropartículas que encapsulan exendina-4.

[La figura 10] muestra cambios en la evolución temporal de la concentración de fármaco en sangre en ratones a los que se administraron micropartículas que encapsulan exendina-4 por vía subcutánea.

20 [La figura 11] muestra la liberación de fármaco a partir de micropartículas de partículas asociadas que encapsulan hormona del crecimiento humana.

[La figura 12] muestra la relación entre el diámetro de partícula y la cantidad de carbonato de dimetilo añadida en el momento de la preparación de una emulsión de tipo S/Ac/Ag.

25 [La figura 13] muestra resultados de la eficiencia de captura y tasa de contención de micropartículas que encapsulan FD40.

30 [La figura 14] muestra una imagen de SEM de polvo de micropartículas preparado a partir de polímero de PEG-PLGA (5 k-10 k).

[La figura 15] muestra una imagen de SEM de polvo de micropartículas preparado a partir de polímero de PEG-PLGA (5 k-61 k).

35 [La figura 16] muestra el comportamiento de liberación de FD40 a partir de micropartículas que encapsulan FD40.

[La figura 17] muestra el comportamiento de liberación de fármaco a partir de micropartículas que encapsulan insulina humana.

40 [La figura 18] muestra cambios en la evolución temporal de la concentración de fármaco en sangre en ratones a los que se administraron micropartículas que encapsulan hormona del crecimiento humana por vía subcutánea.

[La figura 19] muestra cambios en la evolución temporal de la concentración de fármaco en sangre en ratones a los que se administraron micropartículas que encapsulan hormona del crecimiento humana por vía subcutánea.

45 [La figura 20] muestra cambios en la evolución temporal de la concentración de IGF-1 en sangre en ratones a los que se administraron micropartículas que encapsulan hormona del crecimiento humana por vía subcutánea.

50 [La figura 21] muestra cambios en la evolución temporal de la farmacocinética sanguínea en ratones a los que se administraron micropartículas que encapsulan exendina-4 por vía subcutánea.

[La figura 22] muestra la relación entre el diámetro de partícula y la cantidad de carbonato de dimetilo añadida en el momento de la preparación de emulsión de tipo S/Ac/Ag.

55 **MEJOR MODO PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION**

La presente invención, se caracteriza por la formación de una micropartícula mediante la aglomeración de partículas que contienen sustancia activa hidrófila, partícula que comprende un polímero anfífilo y una sustancia activa hidrófila. En el presente documento, la aglomeración es la unión de dos o más partículas por medio de una fuerza inter-partículas u otra sustancia, y la formación de un conjunto. La fuerza inter-partículas no está particularmente especificada, pero ejemplos utilizables incluyen interacción hidrófoba, puente de hidrógeno y fuerza de van der Waals. La aglomeración no está limitada a un estado de contacto mutuo de partículas, sino que sustancias que tienen una afinidad por partículas pueden estar presentes entre partículas, o partículas pueden distribuirse en una matriz. Como las sustancias que tienen afinidad por partículas o la matriz, es preferente un polímero. En la presente invención, por aglomeración de las partículas que contienen sustancia activa hidrófila, en comparación con una única partícula, se consigue el efecto de que la eficiencia de encapsulación de la sustancia activa hidrófila es mayor.

El diámetro de partícula de las partículas que contienen sustancia activa hidrófila a asociar es variable.

Las micropartículas son partículas que tienen el diámetro de partícula que varía entre submicrómetros y submilímetros. En la presente invención, el diámetro de partícula promedio de las micropartículas no está particularmente limitado, pero en el caso de la administración de las micropartículas mediante inyección al cuerpo humano, cuanto mayor es el diámetro de partícula promedio, mayor es la aguja de la jeringa, y la carga del paciente se incrementa y, por lo tanto, desde el punto de vista de rebajar la carga del paciente, es preferente estar en un intervalo de 1 μm a 50 μm . El diámetro de partícula promedio de las micropartículas puede determinarse mediante análisis de imágenes utilizando un microscopio electrónico de barrido.

El número de aglomeraciones de partículas que contienen sustancia activa hidrófila para componer una micropartícula está en un intervalo de 10 hasta la séptima potencia de 10, preferentemente, en un intervalo de la quinta potencia de 10 hasta la séptima potencia de 10. El número de aglomeraciones se calcula a partir del diámetro de partícula promedio de partículas que contienen sustancia activa hidrófila y el diámetro de partícula promedio de micropartículas.

En la presente invención, el polímero anfífilo está compuesto por un segmento hidrófobo de poli(hidroxiácido) y un segmento hidrófilo de polisacáridos o polietilenglicol. En el presente documento, la propiedad anfífila es un estado que tiene propiedades tanto hidrófilas como hidrófobas, y en cuanto a la propiedad hidrófila, cuando la solubilidad en agua es mayor en cierto segmento que en otros segmentos, se dice que dicho segmento es hidrófilo. Es preferente que un segmento hidrófilo sea soluble en agua, pero si es apenas soluble, es hidrófilo si su solubilidad en agua es mayor que otros segmentos. Se dice que cierto segmento es hidrófobo si la solubilidad en agua es menor que otras partes. Es preferente que un segmento hidrófobo sea insoluble en agua, pero si es soluble, puede ser hidrófobo si la solubilidad en agua es menor que otros segmentos.

Ejemplos específicos de poli(hidroxiácido) del polímero anfífilo incluyen ácido poliglicólico, ácido poliláctico, poli(ácido 2-hidroxi-butírico), poli(ácido 2-hidroxi-valérico), poli(ácido 2-hidroxi-caproico), poli(ácido 2-hidroxi-cáprico), poli(ácido málico), y derivados y copolímeros de estos compuestos de alto peso molecular. Sin embargo, dado que se desea que las micropartículas de la presente invención no tengan efectos significativos en el momento de la administración en el cuerpo humano, también es preferente que el poli(hidroxiácido) del polímero anfífilo sea un polímero de alto peso molecular biocompatible. El polímero de alto peso molecular biocompatible es una sustancia que no tiene efectos significativos sobre el cuerpo humano cuando se administra, y más específicamente, es preferente que la DL50 sea de 2.000 mg/kg o más mediante administración oral del polímero de alto peso molecular en rata.

Como poli(hidroxiácido) del polímero de alto peso molecular biocompatible, es preferente un copolímero de ácido poliláctico, y ácido poliglicólico, o poli(ácido láctico-ácido glicólico). Cuando el poli(hidroxiácido) es un poli(ácido láctico-ácido glicólico), la relación de composición del poli(ácido láctico-ácido glicólico) (ácido láctico/ácido glicólico) (% molar/molar) no está particularmente limitada siempre que se alcancen los objetivos de la presente invención, pero la relación es, preferentemente, de 10/0 a 30/70, o más preferentemente, de 60/40 a 40/60.

Cuando el segmento hidrófilo del polímero anfífilo son polisacáridos, ejemplos de los polisacáridos pueden incluir celulosa, quitosano, goma gellan, ácido alginico, ácido hialurónico, pululano o dextrano, y el más preferente es dextrano.

El polímero anfífilo está compuesto, preferentemente, por polimerización por injerto de una o más cadenas de injerto de poli(hidroxiácido) en una cadena principal de polisacárido. En el presente documento el peso molecular promedio de la cadena principal de polisacárido es, preferentemente, de 1.000 a 100.000, o más preferentemente, de 2.000 a 50.000, y el peso molecular promedio del poli(hidroxiácido) es, preferentemente, de 500 a 100.000, o más preferentemente, de 1.000 a 10.000. El valor de peso molecular promedio del poli(hidroxiácido) respecto al peso molecular promedio de polisacáridos es, preferentemente, de 0,01 veces a 100 veces, más preferentemente, de 0,02 veces a 10 veces, o de la forma más preferente de 0,02 veces a 1 vez.

El número de cadenas de injerto de poli(hidroxiácido) unidas con la cadena principal de polisacáridos es, preferentemente, de 2 a 50. El número de cadenas de injerto puede determinarse a partir del peso molecular promedio de polímero anfífilo de tipo injerto, la cadena principal de polisacáridos, y la cadena de injerto de poli(hidroxiácido).

Cuando el segmento hidrófilo del polímero anfífilo es polietilenglicol, es preferente que el polímero anfífilo sea un polímero de bloques de polietilenglicol y poli(hidroxiácido). En la presente invención, el término "bloque" se refiere a un segmento de parte de una molécula de polímero, que consiste, como mínimo, en cinco o más unidades de monómero, y que es diferente en estructura o configuración química entre un segmento de parte y otro segmento de parte adyacente, y un polímero formado por dos o más bloques acoplados linealmente se denomina un polímero de bloques. Cada bloque que forma un polímero de bloques puede comprender dos o más unidades de monómero, es decir, se puede formar un polímero aleatorio, alterno, o de gradiente. Cuando el segmento hidrófilo del polímero anfífilo es polietilenglicol, es preferente que el polímero anfífilo sea un polímero de bloques que acopla cada uno de

polietilenglicol y polihidroxiácido.

5 Cuando el segmento hidrófilo del polímero anfífilo es polietilenglicol, ejemplos específicos del polietilenglicol a utilizar incluyen polietilenglicol de cadena lineal o ramificado o sus derivados, y un ejemplo preferente de derivado de polietilenglicol es éter monoalquílico de polietilenglicol. El grupo alquilo del éter monoalquílico de polietilenglicol es un grupo alquilo de cadena lineal o ramificado que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, y un grupo alquilo ramificado que tiene de 1 a 4 átomos de carbono es más preferente, y grupos metilo, etilo, propilo e isopropilo se desean particularmente.

10 El peso molecular promedio del polietilenglicol no está particularmente limitado, sino que es, preferentemente, de 2.000 a 15.000, más preferentemente, de 2.000 a 12.000, aún más preferentemente, de 4.000 a 12.000, y, de forma particularmente preferente, de 5.000 a 12.000.

15 Cuando el segmento hidrófilo del polímero anfífilo es polietilenglicol, el peso molecular promedio del poli(hidroxiácido) no está particularmente limitado, sino que es, preferentemente, de 5.000 a 200.000, más preferentemente, de 15.000 a 150.000, o aún más preferentemente, de 20.000 a 100.000. El valor de peso molecular promedio de poli(hidroxiácido) respecto al peso molecular promedio de polietilenglicol es, preferentemente, 1,0 vez o más, más preferentemente, 2 veces o más, de la forma más preferente 4 veces o más y, de forma particularmente preferente, de 4 veces o más a 25 veces o menos.

20 En esta descripción, el peso molecular promedio se refiere al peso molecular promedio en número a menos que se especifique lo contrario, y el peso molecular promedio en número es un peso molecular promedio calculado mediante un procedimiento que no considera la ponderación de magnitud de una molécula, y el peso molecular promedio de polímero anfífilo, polisacáridos y polietilenglicol puede obtenerse como el peso molecular convertido en poliestireno o pululano medido mediante cromatografía de permeación en gel (GPC). El peso molecular promedio de poli(hidroxiácido) puede determinarse a partir de la relación de valor integral máximo de residuo terminal y el valor integral máximo de otros que el residuo terminal, según lo medido mediante medición por resonancia magnética nuclear (¹H-RMN).

25 El polímero anfífilo compuesto por polisacáridos y poli(hidroxiácido) utilizado en la presente invención puede sintetizarse en cualquiera de los procedimientos conocidos, y siempre que pueda formarse una emulsión de fase inversa, el procedimiento de síntesis no está especificado, y puede fabricarse, por ejemplo, en cualquiera de los siguientes procedimientos (1), (2), y (3).

30 (1) En presencia de un catalizador de estaño, se añade un monómero de activación de hidroxiácido a polisacáridos para llevar a cabo una reacción de polimerización, y se añade además poli(hidroxiácido), y se fabrica un polímero anfífilo de tipo injerto [Macromolecules, 31, 1032-1039 (1998)].

35 (2) El grupo hidroxilo de polisacáridos parcialmente no protegidos de los cuales la mayoría del grupo hidroxilo está protegido por un sustituyente es activado por una base, se añade un monómero de activación de hidroxiácido para formar una o más cadenas de injerto compuestas por poli(hidroxiácido), y finalmente el grupo protector se retira, y se fabrica un polímero anfífilo de tipo injerto [Polymer, 44, 3927-3933, (2003)].

40 (3) En polisacáridos, se añade un copolímero de poli(hidroxiácido) para ejecutar una reacción de condensación utilizando un agente deshidratante y/o un agente de activación funcional, y se fabrica un polímero anfífilo de tipo injerto [Macromolecules, 33, 3680-3685 (2000)].

45 El polímero anfífilo compuesto por polietilenglicol y poli(hidroxiácido) utilizado en la presente invención puede sintetizarse en cualquiera de los procedimientos conocidos, y siempre que pueda formarse una emulsión de fase inversa, el procedimiento de síntesis no se especifica, y por ejemplo, en presencia de un catalizador de estaño, se añade un monómero de activación de hidroxiácido a polietilenglicol para llevar a cabo una reacción de polimerización para formar poli(hidroxiácido), y se fabrica un polímero de bloques anfífilo [Journal of Controlled Release, 71, 203-211 (2001)].

50 La estructura de la partícula que contiene sustancia activa hidrófila que comprende el polímero anfífilo y la sustancia bioactiva hidrófila no está particularmente limitada, pero siempre que la partícula que contiene sustancia activa hidrófila tenga un segmento hidrófilo de un polímero anfífilo en el interior, y tenga una capa externa de un segmento hidrófobo de un polímero anfífilo, es preferente dado que la sustancia activa hidrófila contenida puede mantenerse de forma más estable.

55 Cuando la partícula que contiene sustancia activa hidrófila es una partícula que tiene un segmento hidrófilo de un polímero anfífilo en el interior, y que tiene una capa externa de un segmento hidrófobo de un polímero anfífilo, es una de las realizaciones preferentes si un modificador de superficie se une a la capa externa de poli(hidroxiácido). En el presente documento, la unión puede ser unión no covalente o unión covalente. La unión no covalente es, preferentemente, interacción hidrófoba, pero puede incluir interacción electrostática, puente de hidrógeno o fuerza de van der Waals, o una combinación de las mismas. En la unión no covalente, la capa externa hidrófoba de

partículas finas que comprenden el polímero anfífilo, y la parte hidrófoba de un modificador de superficie descrito a continuación pueden unirse, preferentemente, entre sí mediante interacción hidrófoba. En este caso, es particularmente preferente que el dispersante de partículas sea agua, solución tampón, solución salina fisiológica, solución acuosa de modificador de superficie, o dispersante de partículas finas de disolvente hidrófilo.

5 El modificador de superficie es, preferentemente, un compuesto capaz de estabilizar la interfase de agua-aceite de la emulsión de tipo S/Ac/Ag, o la interfase de emulsión aceite-aceite de emulsión de tipo S/Ac1/Ac2, y más preferentemente, un compuesto que tiene propiedades para potenciar la estabilidad coloidal de micropartículas. El modificador de superficie puede ser un tipo o una mezcla de varios tipos. En el presente documento, la propiedad de mejorar la estabilidad coloidal significa prevenir o retardar la agregación de micropartículas en el disolvente.

En la presente invención, es preferente que el modificador de superficie sea un compuesto anfífilo o un polímero hidrófilo.

15 El polímero hidrófilo del modificador de superficie de la presente invención es, preferentemente, cualquiera seleccionado entre el grupo que comprende polietilenglicol, polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico, polietilenimina, ácido poliacrílico, ácido polimetacrílico, poli-1,3-dioxolano, polímero de 2-metacrilóil oxietil fosforil colina, poli-1,3,6-trioxano, poliaminoácido, un péptido, una proteína, sacáridos, y análogos de los mismos.

20 Los análogos del polímero hidrófilo pueden incluir un surfactante que tiene un polímero hidrófilo parcialmente modificado mediante un grupo hidrófobo, tal como un alquilo de cadena larga, pero no están particularmente limitados al mismo.

25 Como análogo de polietilenglicol de un modificador de superficie de la presente invención, es preferente utilizar Pluronic (marca registrada) disponible en el mercado de BASF o sus equivalentes.

30 Como poliaminoácido de un modificador de superficie de la presente invención, puede utilizarse, preferentemente, ácido poliaspártico, ácido poliglutámico, o sus análogos. Un análogo que introduce un grupo alquilo de cadena larga en parte de ácido poliaspártico o ácido poliglutámico es particularmente preferente.

Como péptido de un modificador de superficie de la presente invención, puede utilizarse un péptido básico.

35 Como proteína de un modificador de superficie de la presente invención, es preferente gelatina, caseína, o albúmina para mejorar el rendimiento de dispersión de las partículas. Como proteína, un anticuerpo es uno de los ejemplos preferentes.

40 Como sacáridos de un modificador de superficie de la presente invención, son preferentes monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. Como polisacáridos, son preferentes celulosa, quitina, quitosano, goma gellan, ácido algínico, ácido hialurónico, pululano y dextrano. Particularmente, es preferente colesteril pululano en vista de una mejor dispersabilidad de partículas. Son preferentes los análogos de uno cualquiera seleccionado entre el grupo que comprende celulosa, quitina, quitosano, goma gellan, ácido algínico, ácido hialurónico, pululano y dextrano

45 Como modificador de superficie, estos ejemplos de péptido, proteína y sacáridos son particularmente preferentes para ser análogos que modifican parcialmente el grupo hidrófobo de un alquilo de cadena larga, o análogos que modifican el polímero hidrófilo o el compuesto anfífilo.

En el modificador de superficie de la presente invención, el compuesto anfífilo incluye un lípido como uno de los ejemplos preferentes.

50 En el modificador de superficie de la presente invención, el compuesto anfífilo incluye un surfactante como uno de los ejemplos preferentes. Los ejemplos preferentes del surfactante incluyen: agentes activos no iónicos, tales como copolímero de polioxietileno-polipropilenglicol, éster de ácido graso de sacarosa, éster de ácido graso de polietilenglicol, monoéster de ácido graso de polioxietileno sorbitán, diéster de ácido graso de polioxietileno sorbitán, monoéster de ácido graso de polioxietileno glicerina, diéster de ácido graso de polioxietileno glicerina, ácido graso de poliglicerina, aceite de ricino de polioxietileno, aceite de ricino endurecido con polioxietileno; sulfatos de alquilo tales como lauril sulfato sódico, lauril sulfato de amonio, estearil sulfato sódico; o lecitina.

60 En la presente invención, la sustancia activa hidrófila se indica como ejemplo mediante un compuesto de bajo peso molecular, proteína, péptido, ADN, ARN, o ácido nucleico modificante. Incluso un fármaco hidrófobo puede estar contenido en la micropartícula de la presente invención si se hace hidrófila utilizando un agente solubilizante. El agente solubilizante en el presente documento, preferentemente, incluye ciclodextrina y sus análogos.

65 La proteína o el péptido utilizado en la presente invención como sustancia activa hidrófila no está particularmente limitada, pero es preferente una proteína bioactiva o un péptido bioactivo. La proteína bioactiva o el péptido bioactivo incluyen hormona peptídica, citocina, proteína enzimática, o anticuerpo. Y ejemplos específicos incluyen: péptido antagonista del receptor GLP-1 tal como la exendina-4, hormona paratiroidea (PTH), calcitonina, insulina, factor de

crecimiento similar a insulina, angiotensina, glucagón, GLP-1; bombesina, motilina, gastrina, hormona del crecimiento, prolactina (hormona luteotrópica), gonadotropina (hormona gonadotrópica), hormona tirotrópica, hormona adrenocorticotrópica (ACTH), derivado de ACTH (ebiratida), hormona estimulante de los melanocitos, hormona estimulante del folículo (FSH), sermorelina, vasopresina, oxitocina, protirelina, hormona luteinizante (LH), corticotropina, secretina, somatropina, tiotropina (hormona estimulante del tiroides), stomatostatina, hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), G-CSF, eritropoyetina (EPO), trombopoyetina (TPO), potenciador de megacariocitos, HGF, EGF, VEGF, interferón α , interferón β , interferón γ , interleucinas, FGF (factor de crecimiento de fibroblastos), BMP (proteínas de la médula ósea), factor tímico humoral (THF), factor tímico sérico (FTS), superóxido dismutasa (SOD), uroquinasa, lisozima, activador del plasminógeno tisular, asparaquinasa, calicreína, grelina, adiponectina, leptina, péptido diurético de sodio auricular, factor diurético de sodio auricular, péptido diurético de sodio cerebral (BNP), conantocina G, dinorfina, endorfina, kiotorfina, encefalina, neurotensina, angiotensina, bradiquinina, sustancia P, kalidina, hemoglobina, proteína C, factor VIIa, glucocerebrosidasa, estreptoquinasa, estafiloquinasa, timosina, pancreozimina, colecistoquinina, lactógeno de placenta humana, factor de necrosis tumoral (TNF), polimixina B, colistina, gramicidina, bacitracina, timopoyetina, bombecina, ceruleína, timoestimulina, secretina, resistina, hepcidina, neuropéptido Y, neuropéptido S, colecistoquinina-pancreozimina (CCK-PZ), factor nutriente derivado del cerebro (BDNF), vacuna, y similares. Estas proteínas bioactivas o péptidos bioactivos pueden ser proteínas o péptidos naturales, o derivados modificados en parte de su secuencia, o compuestos modificados por polietilenglicol o cadena de azúcar.

20 Cuando la sustancia activa hidrófila es ADN, ARN, o ácido nucleico modificante, puede ser cualquiera de surfactante catiónico, lípido catiónico, polímero catiónico, u otros compuestos complejados con los análogos de los mismos.

En la presente invención, los sacáridos utilizados como sustancia activa hidrófila incluyen ácido hialurónico, heparina, sulfato de dextrano, dextrano o dextrano marcado con FITC (por ejemplo, FD40, etc.).

25 La presente invención también se refiere a un procedimiento para fabricar la micropartícula, según la reivindicación 11, formada por aglomeración de las partículas que contienen sustancia activa hidrófila, comprendiendo el procedimiento:

30 (a) una etapa de formar una emulsión de fase inversa mezclando un disolvente acuoso que contiene la sustancia activa hidrófila y un disolvente orgánico inmiscible en agua que disuelve el polímero anfífilo,
 (b) una etapa de obtener un contenido sólido que contiene la sustancia activa hidrófila retirando el disolvente de la emulsión de fase inversa, y
 (c) una etapa de introducir el contenido sólido o un líquido de dispersión que contiene el contenido sólido en una
 35 fase líquida que contiene el modificador de superficie.

En el procedimiento para fabricar la micropartícula formada por aglomeración de las partículas que contienen sustancia activa hidrófila de la presente invención, la emulsión de fase inversa se forma añadiendo un disolvente acuoso que contiene la sustancia activa hidrófila a un disolvente orgánico inmiscible en agua que disuelve un polímero anfífilo y mezclándolos. Si fuera necesario, es posible utilizar, por ejemplo, un dispositivo de agitación tal como un agitador magnético, un dispositivo de agitación con turbina, un homogeneizador o un dispositivo emulsionante de membrana dotado de una película porosa. El disolvente orgánico inmiscible en agua en la presente invención es un disolvente orgánico cuya solubilidad en agua es 30 g (disolvente orgánico inmiscible en agua)/100 ml (agua) o menos, y otros disolventes orgánicos cuya solubilidad en agua es mayor que el valor especificado se caracterizan como disolventes orgánicos miscibles en agua.

Como la solución acuosa en la etapa (a), se utiliza agua o solución acuosa que contiene una sustancia soluble en agua. La sustancia soluble en agua puede ser cualquiera de sales inorgánicas, sacáridos, sales orgánicas, aminoácidos, y similares.

50 La propiedad del disolvente orgánico inmiscible en agua en la etapa (a) no está particularmente limitada, sino que es, preferentemente, un disolvente capaz de disolver poli(hidroxiácido) como segmento hidrófobo del polímero anfífilo, y de apenas disolver o no disolver el segmento hidrófilo. Es preferente que el disolvente orgánico inmiscible en agua se disipe y se retire mediante liofilización o similar, y es preferente que sea 0,1 g (disolvente orgánico inmiscible en agua)/100 ml (agua) o menos. Los ejemplos específicos del disolvente orgánico inmiscible en agua incluyen acetato de etilo, acetato de isopropilo, acetato de butilo, carbonato de dimetilo, carbonato de dietilo, cloruro de metileno y cloroformo. La relación del disolvente orgánico inmiscible en agua respecto al disolvente acuoso es, preferentemente, de 1.000:1 a 1:1, más preferentemente, de 100:3 a 3:1. La concentración del polímero anfífilo en el disolvente orgánico inmiscible en agua varía con el tipo del disolvente orgánico inmiscible en agua o el polímero anfífilo, pero es, preferentemente, del 0,01 al 90% (p/p), más preferentemente, del 0,1 al 50% (p/p), o aún más preferentemente, del 1 al 20% (p/p).

En la etapa (a), en el proceso de formación de una emulsión de fase inversa mediante el disolvente acuoso que contiene la sustancia activa hidrófila y el disolvente orgánico inmiscible en agua que disuelve el polímero anfífilo, dependiendo del propósito farmacológico, puede formarse una emulsión de fase inversa utilizando un disolvente orgánico inmiscible en agua disolviendo dos o más tipos de polímero anfífilo.

5 En la etapa (a), en el proceso de formación de una emulsión de fase inversa mediante el disolvente acuoso que contiene la sustancia activa hidrófila y el disolvente orgánico inmiscible en agua que disuelve el polímero anfífilo, con el fin de ayudar a la formación de la emulsión de fase inversa y de formar una emulsión de fase inversa uniforme y fina, se puede añadir un agente auxiliar. Dicho agente auxiliar puede ser, preferentemente, un compuesto seleccionado entre el grupo que comprende alcohol alquílico que tiene de 3 a 6 átomos de carbono, alquilamina que tiene de 3 a 6 átomos de carbono, y ácido alquilcarboxílico que tiene de 3 a 6 átomos de carbono. La estructura de cadena alquilo de estos agentes auxiliares no está especificada particularmente, y puede ser aplicable una estructura de cadena lineal o bien una estructura ramificada, o puede ser utilizable un alquilo saturado o un alquilo no saturado. En la presente invención, en particular, terc-butanol, iso-butanol, y pentanol son preferentes como agente auxiliar.

15 El diámetro de partícula promedio de la emulsión de fase inversa en la etapa (a) es variable con el diámetro de partícula de la micropartícula deseada de la presente invención, y no está particularmente limitado, pero para fabricar una micropartícula para una preparación farmacéutica que es una de las aplicaciones de la micropartícula de la presente invención, el límite superior del diámetro de partícula promedio es, preferentemente, 50 μm , más preferentemente, 5 μm , aún más preferentemente, 500 nm, de forma particularmente preferente 150 nm, y de la forma más preferente 100 nm. El límite inferior del diámetro de partícula promedio de la emulsión de fase inversa es, preferentemente, 10 nm, o más preferentemente, 50 nm.

20 A continuación, en el procedimiento de fabricación de una micropartícula, es importante incluir la etapa (b) de obtención de un contenido sólido que contiene la sustancia activa hidrófila retirando el disolvente de la emulsión de fase inversa obtenida en la etapa (a).

25 En la etapa (b), el procedimiento de retirada del disolvente de la emulsión de fase inversa no está particularmente limitado, sino que puede incluir, por ejemplo, calentamiento, secado al vacío, diálisis, liofilización, operación de centrifugado, filtración, re-sedimentación, y una combinación de los mismos.

30 Entre estos procedimientos de retirada del disolvente de la emulsión de fase inversa, la liofilización es particularmente preferente, dado que es pequeño en cambios estructurales debido a la unión de partículas en la emulsión de fase inversa, y es capaz de evitar degeneración debida a alta temperatura de la sustancia activa hidrófila. El estado y el aparato de liofilización incluyen un proceso de congelación y un proceso de secado a presión reducida, y es particularmente preferente que el proceso consista en una etapa de congelación preliminar como un procedimiento ordinario de liofilización, una etapa de secado primaria a presión reducida y baja temperatura, y una etapa de secado secundaria a presión reducida. Por ejemplo, enfriando y congelando por debajo del punto de fusión de la solución acuosa y el disolvente orgánico inmiscible en agua, para componer una emulsión de fase inversa y, a continuación, secando a presión reducida, se obtiene una sustancia activa hidrófila liofilizada que contiene contenido sólido. La temperatura de congelación preliminar puede determinarse apropiadamente mediante experimentos considerando la composición del disolvente y, en general, es preferente que sea de -20°C o menos. El grado de presión reducida en el proceso de secado puede determinarse apropiadamente mediante experimentos considerando la composición disolvente y, en general, es preferente que sea de 3.000 Pa o menos o, más preferentemente, 500 Pa o menos, para la reducción del tiempo de secado. Para la liofilización, es preferente utilizar un aparato de liofilización para laboratorio que tenga una trampa de frío y sea conectable a una bomba de vacío, o un aparato de liofilización al vacío de tipo gradilla utilizado en la fabricación de preparaciones farmacéuticas, y después de la congelación preliminar utilizando nitrógeno líquido o refrigerante, el secado a presión reducida se ejecuta a temperatura refrigerada o temperatura ambiente utilizando una bomba de vacío u otro dispositivo de reducción de la presión.

50 El contenido sólido que contiene la sustancia activa hidrófila obtenida en la etapa (b) se obtiene como un agregado de partículas que contienen sustancia activa hidrófila que comprende el polímero anfífilo, agregado que se adapta a la estructura de la emulsión de fase inversa. En el presente documento, el agregado es una masa irregular que reúne partículas finas mediante fuerza inter-partículas, y se distingue claramente en forma de la micropartícula de la presente invención. El diámetro de partícula promedio de la sustancia activa hidrófila que contiene partículas finas para formar este agregado es variable con el diámetro de partícula de la micropartícula deseada de la presente invención, y no está particularmente limitado, pero para fabricar una micropartícula para una preparación farmacéutica que es una de las aplicaciones de la micropartícula de la presente invención, el límite superior del diámetro de partícula promedio es, preferentemente, 50 μm , más preferentemente, 5 μm , de la forma más preferente 500 nm, especialmente 150 nm, particularmente 100 nm. El límite inferior del diámetro de partícula promedio de la sustancia activa hidrófila que contiene partículas finas es, preferentemente, 10 nm, o más preferentemente, 50 nm.

60 En el procedimiento para fabricar la micropartícula de la presente invención, es importante incluir la etapa (c) de introducir un líquido de dispersión que contiene el contenido sólido en una fase líquida que contiene el modificador de superficie.

65 En la etapa (c), el procedimiento de introducción del líquido de dispersión que contiene el contenido sólido en una fase líquida que contiene el modificador de superficie incluye, por ejemplo, un procedimiento de adición del

contenido sólido a una fase líquida que contiene el modificador de superficie, y un procedimiento de dispersión del contenido sólido una vez en un medio de dispersión, y adición del líquido de dispersión obtenido (suspensión de sólido en aceite (S/Ac)) en una fase líquida que contiene el modificador de superficie.

5 Para dispersar el contenido sólido que contiene la sustancia activa hidrófila una vez en un medio de dispersión, el medio de dispersión no está particularmente limitado, sino que es, preferentemente, un disolvente capaz de disolver poli(hidroxiácido), pero no de disolver sustancialmente el segmento hidrófilo que compone el polímero anfífilo, con el propósito de sostener la estructura de partícula que contiene sustancia activa hidrófila compuesta por el polímero anfífilo que tiene la estructura de la emulsión de fase inversa para componer el contenido sólido que contiene la
10 sustancia activa hidrófila. El disolvente capaz de disolver poli(hidroxiácido), pero no de disolver sustancialmente el segmento hidrófilo es un disolvente cuya solubilidad del segmento hidrófilo en el disolvente es 50 mg/ml o menos, preferentemente, 10 mg/ml o menos.

15 El medio de dispersión puede ser disolvente orgánico inmiscible en agua o disolvente orgánico miscible en agua siempre que tenga las características mencionadas anteriormente, y el disolvente orgánico inmiscible en agua es más preferente. Los ejemplos específicos del disolvente orgánico inmiscible en agua capaz de disolver poli(hidroxiácido) de polímero anfífilo, pero no de disolver sustancialmente en el segmento hidrófilo incluyen acetato de etilo, acetato de isopropilo, acetato de butilo, carbonato de dimetilo, carbonato de dietilo, cloruro de metileno, cloroformo, dioxano, tolueno y xileno.

20 El medio de dispersión para dispersar el contenido sólido que contiene la sustancia activa hidrófila puede contener diversos aditivos solubles en el medio de dispersión, con el propósito de controlar la velocidad de liberación de la sustancia activa hidrófila debido a descomposición o disgregación de las partículas que contienen sustancia activa hidrófila, por ejemplo, un compuesto ácido, un compuesto básico, un polímero anfífilo, o un polímero biodegradable.

25 La fase líquida en la etapa (c) es, preferentemente, capaz de disolver el modificador de superficie, y tiene un punto de ebullición más alto que el medio de dispersión del contenido sólido que contiene la sustancia activa hidrófila, y puede incluir cualquiera del disolvente acuoso, disolvente orgánico inmiscible en agua, y disolvente orgánico miscible en agua. En el presente documento, el disolvente acuoso es agua, o solución acuosa que contiene un
30 componente soluble en agua, y el componente soluble en agua incluye, por ejemplo, sales inorgánicas, sacáridos, sales orgánicas, y aminoácidos; el disolvente orgánico inmiscible en agua incluye, por ejemplo, aceite de silicona, aceite de sésamo, aceite de soja, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de coco, aceite de linaza, aceite mineral, aceite de ricino, aceite de ricino endurecido, parafina líquida, n-hexano, n-heptano, glicerol, y aceite oleico; y el disolvente orgánico miscible en agua incluye, por ejemplo, glicerina, acetona, etanol, ácido acético,
35 dipropilenglicol, trietanol amina y trietilenglicol. En la presente invención, la fase líquida en la etapa (c) es, preferentemente, un disolvente acuoso o un disolvente orgánico miscible en agua. Cuando la fase líquida es un disolvente acuoso, y el medio de dispersión es un disolvente orgánico inmiscible en agua, la suspensión obtenida en la etapa (c) es una llamada emulsión de tipo sólido-en-aceite-agua (S/Ac/Ag), y cuando la fase líquida es disolvente orgánico inmiscible en agua o disolvente orgánico miscible en agua, y no es miscible en el medio de dispersión, es una emulsión de tipo sólido-en-aceite-en-aceite (S/Ac1/Ac2).

40 La relación en volumen de la fase líquida respecto al medio de dispersión para dispersar el contenido sólido que contiene la sustancia activa hidrófila es, generalmente, de 1.000:1 a 1:1.000, o, preferentemente, de 100:1 a 1:100.

45 La concentración del modificador de superficie en la fase líquida de la presente invención es variable con el tipo del modificador de superficie, y es, preferentemente, del 0,01 al 90% (p/v), más preferentemente, del 0,1 al 50% (p/v), o aún más preferentemente, del 5 al 10% (p/v).

50 El modificador de superficie puede unirse a una capa externa de poli(hidroxiácido) del polímero anfífilo de la micropartícula de la presente invención, y la cantidad de unión en este caso es, preferentemente, del 0,0001% al 1% del peso de la micropartícula.

55 En la fase líquida en la etapa (c), además del modificador de superficie, pueden añadirse diversos aditivos dependiendo del propósito farmacológico, tal como agente tamponante, antioxidante, sal, polímero, o azúcar.

60 En la etapa (c), también es preferente añadir sales inorgánicas en la fase líquida. Es preferente que las sales inorgánicas sean sal de metal alcalino o sal de metal alcalinotérreo, y cloruro sódico es particularmente preferente. La concentración de sales inorgánicas en la fase líquida es, preferentemente, de 0 a 1 M, más preferentemente, de 10 mM a 1 M, o aún más preferentemente, de 10 mM a 100 mM.

65 En la etapa (c), con el fin de producir una micropartícula de un tamaño de partícula más pequeño, la emulsión de tipo sólido en aceite en agua (S/Ac/Ag) o la emulsión de tipo sólido en aceite en aceite (S/Ac1/Ac2) formada puede procesarse mediante una operación de emulsión. El procedimiento de emulsión no está particularmente limitado siempre que pueda fabricarse una emulsión estable. Por ejemplo, el procedimiento incluye un procedimiento de agitación, o un procedimiento utilizando un homogeneizador de alta presión, o un homomezclador de alta velocidad.

- En la etapa (c), cuando el líquido de dispersión obtenido dispersando el contenido sólido que contiene la sustancia activa hidrófila una vez en que el medio de dispersión se añade en la fase líquida que contiene el modificador de superficie, retirando el medio de dispersión, se obtiene una dispersión deseada de la micropartícula formada por aglomeración de las partículas que contienen sustancia activa hidrófila. El procedimiento de retirada del medio de dispersión no está particularmente limitado, sino que puede incluir procedimientos de secado en líquido, diálisis, liofilización, operación de centrifugado, filtración, y re-sedimentación, y secado en líquido o liofilización pueden ser particularmente preferentes. En la etapa (c), cuando se utiliza un disolvente acuoso como fase líquida, se obtiene un dispersante acuoso de la micropartícula en este proceso.
- Retirando la fase líquida del dispersante de micropartícula obtenido en este proceso, puede obtenerse la micropartícula de la presente invención. El procedimiento de retirada de la fase líquida no está particularmente limitado, sino que puede incluir, preferentemente, procedimientos de eliminación por destilación mediante evaporación, diálisis, liofilización, operación de centrifugado y filtración.
- Los campos de aplicación de la micropartícula obtenida en la presente invención son amplios, y versátiles, y se utiliza particularmente como una preparación farmacéutica. Cuando la micropartícula de la presente invención se utiliza como la preparación farmacéutica, aparte de micropartículas, pueden estar contenidos diversos aditivos farmacológicos útiles, y los aditivos utilizables incluyen agente tamponante, antioxidante, sal, polímero, o azúcar.
- Cuando la micropartícula de la presente invención se utiliza como una preparación farmacéutica, el procedimiento de administración incluye, por ejemplo, administración oral y administración parenteral, y la administración parenteral es preferente. La administración parenteral incluye administración hipodérmica, administración intramuscular, administración entérica, administración pulmonar, administración local (nariz, piel, ojo), y administración en cavidades corporales, y las inyecciones hipodérmicas e intramusculares son preferentes en particular. La dosis y el número de veces de administración de la preparación farmacéutica de la presente invención en el cuerpo del paciente pueden seleccionarse apropiadamente dependiendo de la sustancia activa hidrófila, la vía de administración, la edad y el peso corporal del paciente, o la gravedad del síntoma, pero habitualmente una dosis de 0,1 µg a 100 mg, preferentemente, de 1 µg a 10 mg se administra por día por persona adulta.

30 EJEMPLOS

A continuación se muestran ejemplos, pero la presente invención no está limitada a los ejemplos descritos en el presente documento.

35 Ejemplo 1

Síntesis de dextrano-ácido poliláctico (PLA)

40 1.1 Síntesis de TMS-dextrano (compuesto 1)

Se añadió dextrano (NACALAI TESQUE, INC. NAKARAI producto conforme al grado especial estándar, peso molecular promedio en número: 13.000, 5,0 g) a formamida (100 ml), y se calentó a 80°C. En esta solución, se añadió 1,1,1,3,3,3-hexametiltrisilazano (100 ml) por goteo durante 20 minutos. Después del goteo, la solución se agitó durante 2 horas a 80°C. Después de la finalización de la reacción, la solución de reacción se devolvió a temperatura ambiente, y la solución se separó en dos capas mediante un embudo de dispensado. La capa superior se concentró a presión reducida, y se añadió metanol (300 ml), y el contenido sólido obtenido se filtró y se secó, y se obtuvo TMS-dextrano (11,4 g) como contenido sólido de color blanco.

50 1.2 Síntesis de TMS-dextrano-PLA (compuesto 2)

El compuesto 1 (0,5 g) y terc-butoxi potasio (35 mg) se secaron durante 1 hora a presión reducida, y se añadió tetrahidrofurano (20 ml), y la mezcla se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. En esta solución, se añadió gota a gota una solución en tetrahidrofurano (20 ml) de (L)-lactida (4,49 g), y la mezcla se agitó durante 5 minutos. Después de la finalización de la reacción, el disolvente se concentró a presión reducida, y se purificó mediante reprecipitación mediante un sistema de cloroformo-metanol, y se obtuvo TMS-dextrano-PLA (1,9 g) como contenido sólido de color blanco.

60 1.3 Síntesis de dextrano-PLA (compuesto 3)

En una solución en cloroformo (24 ml) del compuesto 2 (1,9 g), se añadieron metanol (10,8 ml) y ácido clorhídrico 12 N (1,2 ml), y se agitaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. El disolvente se eliminó por destilación a presión reducida, y el residuo se disolvió en cloroformo (10 ml), y se añadió gota a gota a éter dietílico enfriado a 0°C, y el producto se depositó. La materia de depósito se eliminó por filtración, y se concentró a presión reducida, y se obtuvo dextrano-PLA (1,6 g). El peso molecular promedio en peso de este polímero fue 48.720, y el peso molecular promedio en número fue 43.530. (Medición por GPC: columna TSK-gel α-5000 × 2, disolvente del sistema DMF, detector del IR, producto estándar, pululano). El peso molecular promedio de la cadena de injerto de

este polímero determinado mediante medición de $^1\text{H-RMN}$ fue 2.300. El número de cadenas de injerto fue de 10 a 12.

Ejemplo 2 Síntesis de dextrano-poli(ácido láctico-ácido glicólico) (PLGA)

2.1 Síntesis de TMS-dextrano-PLGA (compuesto 4, compuesto 5, compuesto 6)

El compuesto 1 (0,5 g) y terc-butoxi potasio (35 mg) se secaron durante 1 hora a presión reducida, y se añadió tetrahidrofurano (10 ml), y la mezcla se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. En esta solución, se añadió gota a gota solución en tetrahidrofurano (15 ml) de (DL)-lactida (1,12 g) y glicólido (0,9 g), y la mezcla se agitó durante 5 minutos. Después de la finalización de la reacción, el disolvente se concentró a presión reducida, y se purificó mediante reprecipitación mediante un sistema de cloroformo-metanol, y se obtuvo TMS-dextrano-PLGA (1,96 g) como contenido sólido de color blanco (compuesto 4). De la misma manera, mediante la cantidad de carga de (DL)-lactida (0,784 g) y glicólido (0,63 g), se sintetizó el compuesto 5, y mediante la cantidad de carga de (DL)-lactida (1,12 g) y glicólido (0,9 g), se sintetizó el compuesto 6.

2.2 Síntesis de dextrano-PLGA (compuesto 7, compuesto 8, compuesto 9)

En una solución en cloroformo (14 ml) del compuesto 4 (1,96 g), se añadieron metanol (6,3 ml) y ácido clorhídrico 12 N (0,7 ml), y se agitaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. El disolvente se eliminó por destilación a presión reducida, y el residuo se disolvió en cloroformo (10 ml), y se añadió gota a gota a éter dietílico enfriado a 0°C , y el producto se depositó. La materia de depósito se eliminó por filtración, y se concentró a presión reducida, y se obtuvo dextrano-PLGA (1,25 g) (compuesto 7). A partir de los compuestos 5 y 6, se obtuvieron productos de dextrano-PLGA de la misma manera, excepto que se utilizó ácido trifluoroacético (compuesto 8, compuesto 9). El peso molecular promedio en peso y el peso molecular promedio en número del polímero de los compuestos 7 a 9 se determinaron mediante medición por GPC (columna Toso TSK-gel α -5000 \times 2, disolvente del sistema DMF, detector del IR, producto estándar, pululano). El peso molecular promedio de la cadena de injerto y el número de cadenas de injerto se determinaron mediante medición de $^1\text{H-RMN}$.

En cuanto al compuesto 7, el peso molecular promedio en peso fue 43.820, el peso molecular promedio en número fue 33.422, el peso molecular de la cadena de injerto fue 1.900, y el número de cadenas de injerto fue de 7 a 10.

En cuanto al compuesto 8, el peso molecular promedio en peso fue 94.088, el peso molecular promedio en número fue 81.250, el peso molecular de la cadena de injerto fue 3.250, y el número de cadenas de injerto fue 21.

En cuanto al compuesto 9, el peso molecular promedio en peso fue 137.695, el peso molecular promedio en número fue 109.630, el peso molecular de la cadena de injerto fue 6.442, y el número de cadenas de injerto fue 15.

Ejemplo 3. Procedimiento de preparación de micropartículas que encapsulan hormona del crecimiento humana (hGH)

Se disolvieron 5 mg de dextrano-ácido poliláctico (PLA) del ejemplo 1 (el peso molecular promedio de dextrano es 13.000, el peso molecular promedio de PLA es 2.300, el número de cadenas de injerto de PLA es de 10 a 12, compuesto 3) o dextrano-poli(ácido láctico-ácido glicólico) (PLGA) del ejemplo 2 (peso molecular promedio de dextrano: 13.000, el peso molecular promedio de PLGA es 19.000, número de cadenas de injerto de PLGA de 7 a 10, compuesto 7) en 100 μl de carbonato de dimetilo para preparar una solución de polímero de 50 mg/ml. En esta solución de polímero, se añadieron 20 μl de terc-butanol, y se añadieron gota a gota 20 μl de solución acuosa de 2 mg/ml de hGH, y se agitó en vórtice para preparar una emulsión de fase inversa. Esta emulsión de fase inversa se congeló de forma preliminar, y se liofilizó utilizando un aparato de liofilización (EYELA, FREEZE DRYER FD-1000), a temperatura de enfriamiento de la trampa de -45°C , y grado de vacío de 20 Pa, durante 24 horas. El contenido sólido obtenido se dispersó en 200 μl de carbonato de dimetilo para preparar una suspensión S/Ac. Esta suspensión S/Ac se añadió gota a gota en 2 ml de solución acuosa que contenía Pluronic F-68 al 10% (una marca registrada de BASF), y se agitó y se emulsionó en un mezclador en vórtice para preparar una emulsión de tipo S/Ac/Ag. A partir de esta emulsión de tipo S/Ac/Ag, el disolvente orgánico inmiscible en agua se retiró mediante secado en líquido, y se obtuvo un líquido de dispersión de micropartículas. El líquido de dispersión de micropartículas se congeló de forma preliminar mediante nitrógeno líquido, y se liofilizó utilizando un aparato de liofilización (EYELA, FREEZE DRYER FD-1000), a temperatura de enfriamiento de la trampa de -45°C , y grado de vacío de 20 Pa, durante 24 horas, y se obtuvo polvo de micropartículas que encapsulan hGH. Las micropartículas obtenidas se observaron mediante un microscopio electrónico de barrido (SEM: HITACHI, S-4800), y se calculó el diámetro de partícula promedio, y el diámetro de partícula promedio de las micropartículas fue 4,0 μm .

Ejemplo 4. Medición de la eficiencia de encapsulación de fármacos de micropartículas que encapsulan hormona del crecimiento humana (hGH)

Se pesaron 20 mg de micropartículas que encapsulan hormona del crecimiento humana preparadas en el

procedimiento del ejemplo 3 utilizando polímero de dextrano-PLA (compuesto 3) o dextrano-PLGA (compuesto 7) utilizando un tubo Eppendorf de 1,5 ml, y se disolvieron en 1 ml de solución tampón A (PBS que contenía albúmina de suero bovino al 0,1%, Pluronic F-68 al 0,1% (una marca registrada de BASF), y azida sódica al 0,02%), y se centrifugaron durante 10 minutos a $18.000 \times g$, y se separaron en partículas (precipitación) y un sobrenadante. El sobrenadante se recogió en otro tubo, y las partículas se suspendieron de nuevo en 1 ml de solución tampón, y la operación de centrifugado y la separación en partículas y un sobrenadante se llevaron a cabo de nuevo en las mismas condiciones. Esta operación de limpieza se repitió una vez más (un total de tres veces de operación de centrifugado), y la concentración de hormona del crecimiento humana de cada sobrenadante recogido mediante las operaciones de centrifugado se midió utilizando un kit de ELISA (fabricado por R&D Systems). A partir de la cantidad cargada de hGH en el momento de la preparación de partículas (peso de partícula 20 mg), la cantidad total de hGH de tres sobrenadantes mediante operaciones de centrifugado se sustrajo, y la eficiencia de encapsulación se calculó según la fórmula a continuación.

$$\text{Eficiencia de encapsulación (\%)} = \frac{(\text{cantidad de hGH cargada (ng)} - \text{cantidad total de hGH en el sobrenadante (ng)})}{\text{cantidad de hGH cargada (ng)}} \times 100$$

En micropartículas de dextrano-PLA o micropartículas de dextrano-PLGA, la eficiencia de encapsulación de la hGH fue del 92,6% en micropartículas de dextrano-PLA, y del 85,7% en micropartículas de dextrano-PLGA, y se demostró que el fármaco proteico puede encapsularse a una elevada frecuencia en ambas partículas.

Ejemplo 5. Análisis de velocidad de liberación de fármaco in vitro a partir de micropartículas que encapsulan hormona del crecimiento humana (hGH)

Las micropartículas centrifugadas tres veces en el ejemplo 4 se suspendieron y se dispersaron en 1,2 ml de solución tampón A. A partir de esta solución, una parte (40 μ l) se transfirió a otro tubo, y se centrifugó durante 10 minutos a $18.000 \times g$ para precipitar las partículas, y 30 μ l de sobrenadante se recogieron en un tubo diferente (muestra a 0 horas). La suspensión de partículas restantes se colocó en un tubo Eppendorf de 1,5 ml, y se inclinó a uno y otro lado y se mezcló lentamente en una incubadora a 37°C, utilizando un rotador a una velocidad de 6 rpm. A partir de esta solución, una pequeña parte (40 μ l) se dispersó a intervalos de tiempo específicos, y el sobrenadante se separó de forma similar mediante operación de centrifugado. En la muestra de sobrenadante recogida en cada tiempo, la concentración de hGH se midió utilizando el kit de ELISA, y la cantidad de liberación (%) se calculó en la fórmula a continuación.

$$\text{Cantidad de liberación (\%)} = \frac{(\text{concentración de hGH en el sobrenadante (ng/ml)} \times 1,2 \text{ (ml)})}{\text{cantidad de hGH encapsulada (ng) en 20 mg de partículas}} \times 100$$

La figura 1 muestra cambios en la evolución temporal de la liberación de fármaco a partir de micropartículas fabricadas utilizando polímero de dextrano-PLA o dextrano-PLGA. En ambas partículas, apenas se observó descarga inicial, y el fármaco fue liberado linealmente en proporción al lapso de tiempo, y se observó un perfil favorable. El tiempo requerido para la liberación del 50% del fármaco fue de aproximadamente 1 mes en la micropartícula de dextrano-PLA, y de aproximadamente 1 semana en la micropartícula de dextrano-PLGA, y se sugirió que la velocidad de liberación puede controlarse seleccionando el tipo de poli(hidroxiácido).

Ejemplo 6. Procedimiento de preparación de micropartículas que encapsulan insulina humana

Se disolvieron 5 mg de dextrano-PLA (el peso molecular promedio de dextrano es 13.000, el peso molecular promedio de PLA es 2.300, el número de cadenas de injerto de PLA es de 10 a 12, compuesto 3) o dextrano-PLGA (el peso molecular promedio de dextrano es 13.000, el peso molecular promedio de PLGA es 19.000, número de cadenas de injerto de PLGA de 7 a 10, compuesto 7) en 100 μ l de carbonato de dimetilo para preparar una solución de polímero de 50 mg/ml. En esta solución de polímero, se añadieron 20 μ l de terc-butanol, y se añadieron gota a gota 20 μ l de solución acuosa de 2 mg/ml de insulina humana, y se agitó en vórtice para preparar una emulsión de fase inversa. Esta emulsión de fase inversa se congeló de forma preliminar mediante nitrógeno líquido, y se liofilizó utilizando un aparato de liofilización (EYELA, FREEZE DRYER FD-1000), a temperatura de enfriamiento de la trampa de -45°C, y grado de vacío de 20 Pa, durante 24 horas. El contenido sólido obtenido se dispersó en 200 μ l de carbonato de dimetilo para preparar una suspensión S/Ac. Esta suspensión S/Ac se añadió gota a gota en 2 ml de solución acuosa que contenía Pluronic F-68 al 10% (una marca registrada de BASF), y se agitó y se emulsionó en un mezclador en vórtice para preparar una emulsión de tipo S/Ac/Ag. A partir de esta emulsión de tipo S/Ac/Ag, el disolvente orgánico inmiscible en agua se retiró mediante secado en líquido, y se obtuvo un líquido de dispersión de micropartículas. El líquido de dispersión de micropartículas se congeló de forma preliminar mediante nitrógeno líquido, y se liofilizó utilizando un aparato de liofilización (EYELA, FREEZE DRYER FD-1000), a temperatura de enfriamiento de la trampa de -45°C, y grado de vacío de 20 Pa, durante 24 horas, y se obtuvo polvo de micropartículas que encapsulan insulina humana. Las micropartículas obtenidas se observaron mediante un microscopio electrónico de barrido (SEM: HITACHI, S-4800), y se calculó el diámetro de partícula promedio, y el diámetro de partícula promedio fue de 6,4 μ m en las micropartículas obtenidas a partir del compuesto 3, y 5,3 μ m en las micropartículas obtenidas a partir del compuesto 7.

Ejemplo 7. Medición de eficiencia de encapsulación de fármacos de micropartículas que encapsulan insulina humana

5 Se pesaron 20 mg de micropartículas que encapsulan insulina humana preparadas en el procedimiento del ejemplo 6 utilizando polímero de dextrano-PLGA (compuesto 7) utilizando un tubo Eppendorf de 1,5 ml, y se disolvieron en 1 ml de solución tampón A (PBS que contenía albúmina de suero bovino al 0,1%, Pluronic F-68 al 0,1% (una marca registrada de BASF), y azida sódica al 0,02%), y se centrifugaron durante 10 minutos a 18.800 × g, y se separaron en partículas (precipitación) y un sobrenadante. El sobrenadante se recogió en otro tubo, y las partículas se suspendieron de nuevo in 1 ml de solución tampón, y la operación de centrifugado y la separación en partículas y un sobrenadante se llevaron a cabo de nuevo en las mismas condiciones. Esta operación de limpieza se repitió una vez más (un total de tres veces de operación de centrifugado), y la concentración de insulina humana de cada sobrenadante recogido mediante las operaciones de centrifugado se midió mediante el procedimiento de ELISA en sándwich. A partir de la cantidad cargada de insulina humana en el momento de la preparación de partículas (por peso de partículas de 20 mg), la cantidad total de insulina humana de tres sobrenadantes mediante operaciones de centrifugado se sustrajo, y la eficiencia de encapsulación se calculó según la fórmula a continuación.

$$\text{Eficiencia de encapsulación (\%)} = \frac{(\text{cantidad de insulina cargada (ng)} - \text{cantidad total de insulina en el sobrenadante (ng)})}{\text{cantidad de insulina cargada (ng)}} \times 100$$

20 En micropartículas de dextrano-PLA o micropartículas de dextrano-PLGA, la eficiencia de encapsulación de insulina humana fue del 75,7%, y se demostró que el fármaco puede encapsularse a una elevada eficiencia.

Ejemplo 8. Análisis de velocidad de liberación de fármaco in vitro a partir de micropartículas que encapsulan insulina humana

25 Las micropartículas centrifugadas tres veces en el ejemplo 7 se suspendieron y se dispersaron en 1,2 ml de solución tampón A. A partir de esta solución, una parte (40 µl) se transfirió a otro tubo, y se centrifugó durante 10 minutos a 18.800 × g para precipitar las partículas, y 30 µl de sobrenadante se recogieron en un tubo diferente (muestra a 0 horas). La suspensión de partículas restantes se colocó en un tubo Eppendorf de 1,5 ml, y se inclinó a uno y otro lado y se mezcló lentamente en una incubadora a 37°C, utilizando un rotador a una velocidad de 6 rpm. A partir de esta solución, una pequeña parte (40 µl) se dispersó a intervalos de tiempo específicos, y el sobrenadante se separó de forma similar mediante operación de centrifugado. En la muestra de sobrenadante recogida en cada tiempo, la concentración de insulina humana se midió mediante el procedimiento de ELISA en sándwich, y la cantidad de liberación (%) se calculó en la fórmula a continuación.

$$\text{Cantidad de liberación (\%)} = \frac{(\text{concentración de insulina humana en el sobrenadante (ng/ml)} \times 1,2 \text{ (ml)})}{\text{cantidad de insulina humana encapsulada (ng) en 20 mg de partículas}} \times 100$$

35 La figura 2 muestra cambios en la evolución temporal de la liberación de insulina humana. Apenas se observó descarga inicial, y el fármaco fue liberado linealmente en proporción al lapso de tiempo, y se observó un perfil favorable. El tiempo requerido para la liberación del 50% del fármaco fue de aproximadamente 6 días.

40 Ejemplo 9. Cambios en la evolución temporal de la morfología de la micropartícula

Se pesaron 5 mg de micropartículas que encapsulan hGH preparadas en el ejemplo 3 en un tubo Eppendorf, y se dispersaron en 1 ml de Milli-Q, y se separaron de forma centrífuga durante 30 minutos a 13.000 rpm, y se privaron del sobrenadante, y se dispersaron de nuevo en 1 ml de Milli-Q, y se separaron de forma centrífuga, y las micropartículas se limpiaron. En la solución de suspensión de micropartículas incubada durante un tiempo especificado, se añadió 1 ml de Milli-Q, y la solución se separó de forma centrífuga durante 30 minutos a 13.000 rpm, se privó del sobrenadante, y se dispersó de nuevo en 1 ml de Milli-Q, y se separó de forma centrífuga, y las micropartículas se limpiaron. Las micropartículas obtenidas después de la limpieza se dispersaron en 100 µl de Milli-Q, y 3 µl del líquido de dispersión de micropartículas se añadieron gota a gota sobre un sustrato de silicio, y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos, y se secaron durante 3 horas en un desecador. A continuación, utilizando un dispositivo de pulverización de iones (HITACHI, E-1030), se depositó platino sobre la superficie de muestra (tiempo de depósito 15 segundos), y la forma y el estado superficial de la micropartícula se observaron mediante un microscopio electrónico de barrido (SEM: HITACHI, S-4800), a un voltaje de aceleración de 1 kV y una corriente de sonda elevada.

55 Tal como se muestra en la figura 3, justo después de la fabricación, la superficie era lisa y esférica, y las partículas estaban obviamente deformadas después de la incubación durante 13 días a 37°C, se formaron muchos poros, y se demostró que las partículas se descompusieron gradualmente junto con el progreso de liberación del fármaco.

60 Ejemplo comparativo 1

Se disolvieron 5 mg de polietilenglicol-poli(épsilon-caprolactona) (el peso molecular promedio de polietilenglicol es

5.000, el peso molecular promedio de poli(épsilon-caprolactona) es 37.000) se disolvieron en 100 μ l de carbonato de dimetilo para preparar una solución de polímero de 50 mg/ml. En esta solución de polímero, se añadieron 20 μ l de terc-butanol, y se añadieron gota a gota 20 μ l de solución acuosa de 2 mg/ml de hGH, y se agitó en vórtice para preparar una emulsión de fase inversa. Esta emulsión de fase inversa se congeló de forma preliminar mediante nitrógeno líquido, y se liofilizó utilizando un aparato de liofilización (EYELA, FREEZE DRYER FD-1000), a temperatura de enfriamiento de la trampa de -45°C, y grado de vacío de 20 Pa, durante 24 horas. El contenido sólido obtenido se dispersó en 200 μ l de carbonato de dimetilo para preparar una suspensión S/Ac. Esta suspensión S/Ac se añadió gota a gota en 2 ml de solución acuosa que contenía Pluronic F-68 al 10% (una marca registrada de BASF), y se agitó y se emulsionó en un mezclador en vórtice para preparar una emulsión de tipo S/Ac/Ag. A partir de esta emulsión de tipo S/Ac/Ag, el disolvente orgánico inmiscible en agua se retiró mediante secado en líquido, y se obtuvo un líquido de dispersión de micropartículas. El líquido de dispersión de micropartículas se congeló de forma preliminar mediante nitrógeno líquido, y se liofilizó utilizando un aparato de liofilización (EYELA, FREEZE DRYER FD-1000), a temperatura de enfriamiento de la trampa de -45°C, y grado de vacío de 20 Pa, durante 24 horas, y se obtuvo polvo de micropartículas que encapsulan hGH. Las micropartículas obtenidas se observaron mediante un microscopio electrónico de barrido (SEM: HITACHI, S-4800), y se calculó el diámetro de partícula promedio, y el diámetro de partícula promedio de las micropartículas fue 8,0 μ m.

Se pesaron 5 mg del polvo de micropartículas preparadas que encapsulan hGH se pesaron utilizando un tubo Eppendorf, y se dispersaron en 1 ml de Milli-Q, y se centrifugaron durante 30 minutos a 13.000, se privaron del sobrenadante, y se dispersaron de nuevo en 1 ml de Milli-Q, y se separaron de forma centrífuga de forma similar, y las micropartículas se limpiaron. Las micropartículas obtenidas después de la limpieza se dispersaron en 100 μ l de Milli-Q, y se añadieron gota a gota 5 μ l del líquido de dispersión de micropartículas sobre un sustrato de silicio, y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos, y se secaron durante 3 horas en un desecador. A continuación, utilizando un dispositivo de pulverización de iones (HITACHI, E-1030), se depositó platino sobre la superficie de muestra (tiempo de depósito 15 segundos), y la forma y el estado superficial de la micropartícula se observaron mediante un microscopio electrónico de barrido (SEM: HITACHI, S-4800), a un voltaje de aceleración de 1 kV y una corriente de sonda elevada.

Tal como se muestra en la figura 4, a diferencia de la micropartícula de dextrano-PLGA en el ejemplo 9, después de la incubación durante 21 días a 37°C, las partículas apenas habían cambiado morfológicamente, y se produjo un problema en el rendimiento de liberación de la sustancia activa hidrófila.

Ejemplo 10. Administración hipodérmica de micropartículas que encapsulan hormona del crecimiento humana (hGH) en ratón

Se disolvieron 25 mg de dextrano-ácido poliláctico (PLA) (el peso molecular promedio de dextrano es 13.000, el peso molecular promedio de PLA es 2.300, el número de cadenas de injerto de PLA es de 10 a 12, compuesto 3) o dextrano-poli(ácido láctico-ácido glicólico) (PLGA) (el peso molecular promedio de dextrano es 13.000, peso molecular promedio de PLGA 19.000, el número de cadenas de injerto de PLGA es de 7 a 10, compuesto 7) en 500 μ l de carbonato de dimetilo para preparar una solución de polímero de 50 mg/ml. En esta solución de polímero, se añadieron 100 μ l de terc-butanol, y se añadieron gota a gota 250 μ l de solución acuosa de 10 mg/ml de hGH, y se agitó en vórtice para preparar una emulsión de fase inversa. Esta emulsión de fase inversa se congeló de forma preliminar, y se liofilizó utilizando un aparato de liofilización (EYELA, FREEZE DRYER FD-1000), a temperatura de enfriamiento de la trampa de -45°C, y grado de vacío de 20 Pa, durante 24 horas. El contenido sólido obtenido se dispersó en 1 ml de carbonato de dimetilo para preparar una suspensión S/Ac. Esta suspensión S/Ac se añadió gota a gota en 10 ml de solución acuosa que contenía Pluronic F-68 al 10% (una marca registrada de BASF), y se agitó y se emulsionó en un mezclador en vórtice para preparar una emulsión de tipo S/Ac/Ag. A partir de esta emulsión de tipo S/Ac/Ag, el disolvente orgánico inmiscible en agua se retiró mediante secado en líquido, y se obtuvo un líquido de dispersión de micropartículas. El líquido de dispersión de micropartículas se congeló de forma preliminar mediante nitrógeno líquido, y se liofilizó utilizando un aparato de liofilización (EYELA, FREEZE DRYER FD-1000), a temperatura de enfriamiento de la trampa de -45°C, y grado de vacío de 20 Pa, durante 24 horas, y se obtuvo polvo de micropartículas que encapsulan hGH. Las micropartículas obtenidas se observaron mediante un microscopio electrónico de barrido (SEM: HITACHI, S-4800), y se calculó el diámetro de partícula promedio, y el diámetro de partícula promedio fue de 4,9 μ m en las micropartículas obtenidas a partir del compuesto 3, y 4,2 μ m en las micropartículas obtenidas a partir del compuesto 7.

Se suspendieron 300 mg de las micropartículas preparadas y se dispersaron en 3 ml de solución fisiológica tamponada con fosfato (PBS), y se centrifugaron durante 5 minutos a 80 \times g para precipitar micropartículas, y el sobrenadante se transfirió a otro tubo. El sobrenadante se centrifugó de nuevo durante 5 minutos a 80 \times g para precipitar las partículas restantes, y el sobrenadante se retiró. Mediante redispersión en 1 ml de PBS después de la primera vez de precipitación por centrifugado y una segunda vez de precipitación por centrifugado, la misma operación de limpieza por centrifugado se repitió tres veces, y la hormona del crecimiento no encapsulada en las micropartículas se retiró. Finalmente, la precipitación se dispersó de nuevo en 200 μ l de PBS, y se obtuvo una solución de administración. La cantidad de hormona del crecimiento encapsulada en micropartícula de dextrano-PLA y microcápsula de dextrano-PLGA se midió mediante un kit de ELISA y se determinó la concentración en la solución

de limpieza, y se sustrajo de la cantidad cargada, y se determinó la cantidad encapsulada en 300 mg de partículas administradas por ratón, y la micropartícula de dextrano-PLA fue de 590 µg, y las micropartículas de dextrano-PLGA fueron de 536 µg.

5 Esta solución se inyectó por vía hipodérmica en dos posiciones en el lomo de ratones Balb/C macho de 10 semanas de vida, y se tomaron muestras de la sangre a intervalos de tiempo específicos a partir de la vena caudal. En la sangre muestreada, se añadió heparina de concentración final de 3,3 UI/ml, y se recogió el plasma mediante separación por centrifugado durante 5 minutos a 5.000 rpm, y la concentración de hormona del crecimiento en plasma se midió utilizando un kit de ELISA.

10 A modo de comparación, una solución de proteínas de hormona del crecimiento humana no granulada (700 µg/0,2 ml) se administró por vía hipodérmica en ratón, y se tomaron muestras de la sangre de forma similar.

15 Con el fin de suprimir la producción de anticuerpos mediante administración de hormona del crecimiento humana, que es una proteína distinta para ratón, tres días antes de la administración de la partícula, un inmunosupresor, hidrato de Tacrolimus (Astellas) se administró por vía hipodérmica a una dosis de 26 µg/ratón, y seguidamente 13 µg/ratón se administraron por vía hipodérmica en el momento de la administración del fármaco, y 3 días y 7 días más tarde.

20 La figura 5 muestra cambios en la evolución temporal de la concentración de hormona del crecimiento humana en plasma. En el ratón al que se le administró fármaco no granulada, el nivel en sangre 1 hora después de la administración era muy alto, más de 5.000 ng/ml, y a continuación, cayó súbitamente, hasta un nivel de un día antes de la administración. Por otro lado, en el ratón al que se le administró el fármaco de micropartícula preparado utilizando polímero de dextrano-PLA, un aumento transitorio del nivel en sangre justo después de la administración se suprimió a 200 ng/ml o menos, y durante siete días consecutivos, el nivel en sangre se mantuvo a niveles elevados. En micropartículas de dextrano-PLA, no se observó en absoluto aumento transitorio de la concentración después de la administración, y una concentración en sangre casi específica se mantuvo durante siete días, y se observó un excelente rendimiento de liberación sostenida.

30 Ejemplo 11. Administración hipodérmica de micropartículas que encapsulan hormona del crecimiento humana (hGH) en ratón (evaluación de la actividad farmacológica)

35 Se disolvieron 2 mg de dextrano-poli(ácido láctico-ácido glicólico) (PLGA) (el peso molecular promedio de dextrano es 13.000, el peso molecular promedio de PLGA es 1.900, el número de cadenas de injerto de PLGA es de 7 a 10, compuesto 7) en 500 µl de carbonato de dimetilo para preparar una solución de polímero de 50 mg/ml. En esta solución de polímero, se añadieron 100 µl de terc-butanol, y se añadieron gota a gota 250 µl de solución acuosa de 10 mg/ml de hGH, y se agitó en vórtice para preparar una emulsión de fase inversa. Esta emulsión de fase inversa se congeló de forma preliminar mediante nitrógeno líquido, y se liofilizó utilizando un aparato de liofilización (EYELA, FREEZE DRYER FD-1000), a temperatura de enfriamiento de la trampa de -45°C, y grado de vacío de 20 Pa, durante 24 horas. El contenido sólido obtenido se dispersó en 1 ml de carbonato de dimetilo para preparar una suspensión S/Ac. Esta suspensión S/Ac se añadió gota a gota en 10 ml de solución acuosa que contenía Pluronic F-68 al 10% (una marca registrada de BASF), y se agitó y se emulsionó en un mezclador en vórtice para preparar una emulsión de tipo S/Ac/Ag. A partir de esta emulsión de tipo S/Ac/Ag, el disolvente orgánico inmiscible en agua se retiró mediante secado en líquido, y se obtuvo un líquido de dispersión de micropartículas. El líquido de dispersión de micropartículas se congeló de forma preliminar mediante nitrógeno líquido, y se liofilizó utilizando un aparato de liofilización (EYELA, FREEZE DRYER FD-1000), a temperatura de enfriamiento de la trampa de -45°C, y grado de vacío de 20 Pa, durante 24 horas, y se obtuvo polvo de micropartículas que encapsulan hGH. Las micropartículas obtenidas se observaron mediante un microscopio electrónico de barrido (SEM: HITACHI, S-4800), y se calculó el diámetro de partícula promedio, y el diámetro de partícula promedio de las micropartículas obtenidas fue de 4,1 µm.

50 300 mg de las micropartículas preparadas se suspendieron y se dispersaron en 3 ml de solución fisiológica tamponada con fosfato (PBS), y las partículas se precipitaron mediante separación por centrifugado durante 5 minutos a 80 × g, y un sobrenadante se transfirió a otro tubo. El sobrenadante se separó de forma centrífuga de nuevo durante 5 minutos a 80 × g, y las partículas restantes se precipitaron, y el sobrenadante se retiró. La primera precipitación por centrifugado y la segunda precipitación por centrifugado se combinaron, y se dispersaron de nuevo en 1 ml de PBS, y, de forma similar, se llevó a cabo una tercera operación de centrifugado, y la hormona del crecimiento no encapsulada en las partículas se retiró. Finalmente, la precipitación se dispersó de nuevo en 200 µl de PBS para preparar una solución de administración.

60 Esta solución se inyectó por vía hipodérmica en el lomo de ratones a los que se les había extraído la glándula pituitaria de 8 semanas (de Japan SLC), y se tomaron muestras de la sangre a intervalos específicos a partir de la vena caudal. En la sangre muestreada, se añadió heparina de concentración final de 3,3 UI/ml, y se centrifugó durante 5 minutos a 5.000 rpm, y el plasma se recogió, y la concentración de hormona del crecimiento en plasma y la concentración de IGF-1 de ratón se midieron mediante procedimiento de ELISA.

65

A modo de comparación, una solución de proteínas de hormona del crecimiento humana no granulada (700 µg/0,2 ml) se administró por vía hipodérmica en ratón, y se tomaron muestras de la sangre de forma similar.

5 Con el fin de suprimir la producción de anticuerpos mediante administración de hormona del crecimiento humana, que es una proteína extraña para el ratón, tres días antes de la administración de la partícula, un inmunosupresor, hidrato de Tacrolimus (Astellas) se administró por vía hipodérmica a 26 µg/ratón, y seguidamente 13 µg/ratón se administraron por vía hipodérmica en el momento de la administración del fármaco, y 3 días y 7 días más tarde.

10 La figura 6 muestra cambios en la evolución temporal de la concentración de hormona del crecimiento humana en plasma. En el ratón al que se le administró fármaco no granulada, el nivel en sangre 1 hora después de la administración era muy alto, y a continuación, cayó súbitamente, hasta un nivel de dos días antes de la administración. Por otro lado, en la micropartícula de dextrano-PLGA, un aumento de la concentración transitorio justo después de la administración se suprimió a la baja, y durante diez días consecutivos después de la administración, la concentración en plasma se mantuvo en niveles altos. En este momento, los cambios de peso corporal del ratón se muestran en la figura 7. En el ratón al que se le administró la hormona del crecimiento en solitario, el peso corporal aumentado se suprimió a aproximadamente el 5%, pero en el ratón al que se le administraron las micropartículas de dextrano-PLGA, el peso corporal se incrementó en aproximadamente un 20%.

20 La figura 8 muestra la concentración de IGF-1 en plasma. La concentración de IGF-1 en plasma se correlaciona con la concentración de hormona del crecimiento humana en sangre, y en el ratón al que se le administraron las micropartículas de dextrano-PLGA, se mantuvieron niveles altos durante diez días después de la administración.

Ejemplo 12. Análisis de la velocidad de liberación de fármaco en solución tampón a partir de micropartículas que encapsulan exendina-4 (agonista del receptor GLP-1)

25 Se disolvieron 25 mg de dextrano-poli(ácido láctico-ácido glicólico) (PLGA) (el peso molecular promedio de dextrano es 13.000, el peso molecular promedio de PLGA es 3.250 (compuesto 8) o 6.442 (compuesto 9), el número de cadenas de injerto de PLGA es 21 (compuesto 8) o 15 (compuesto 9) en 500 µl de carbonato de dimetilo para preparar una solución de polímero de 50 mg/ml. En esta solución de polímero, se añadieron 100 µl de terc-butanol, y se añadieron gota a gota 250 µl de 10 mg/ml de exendina-4 (sintetizada por encargo con Sigma Genosys), y se agitó en vórtice para preparar una emulsión de fase inversa. Esta emulsión de fase inversa se congeló de forma preliminar mediante nitrógeno líquido, y se liofilizó utilizando un aparato de liofilización (EYELA, FREEZE DRYER FD-1000), a temperatura de enfriamiento de la trampa de -45°C, y grado de vacío de 20 Pa, durante 24 horas. El contenido sólido obtenido se dispersó en 1 ml de carbonato de dimetilo para preparar una suspensión S/Ac. Esta suspensión S/Ac se añadió gota a gota en 10 ml de solución acuosa que contenía Pluronic F-68 al 10% (una marca registrada de BASF), y se agitó y se emulsionó en un mezclador en vórtice para preparar una emulsión de tipo S/Ac/Ag. A partir de esta emulsión de tipo S/Ac/Ag, el disolvente orgánico inmiscible en agua se retiró mediante secado en líquido, y se obtuvo un líquido de dispersión de micropartículas. El líquido de dispersión de micropartículas se congeló de forma preliminar mediante nitrógeno líquido, y se liofilizó utilizando un aparato de liofilización (EYELA, FREEZE DRYER FD-1000), a temperatura de enfriamiento de la trampa de -45°C, y grado de vacío de 20 Pa, durante 24 horas, y se obtuvo polvo de micropartículas que encapsulan exendina-4. Las micropartículas obtenidas se observaron mediante un microscopio electrónico de barrido (SEM: HITACHI, S-4800), y se calculó el diámetro de partícula promedio, y el diámetro de partícula promedio fue 4,3 µm en el compuesto 8, y 4,5 µm en el compuesto 9.

45 Estas micropartículas se limpiaron tres veces según el procedimiento en el ejemplo 4, y se suspendieron y se dispersaron en 1,2 ml de solución tampón A. A partir de esta solución, una parte (40 µl) se transfirió a otro tubo, y se centrifugó durante 10 minutos a 18.000 × g para precipitar las partículas, y 30 µl de sobrenadante se recogieron en un tubo diferente (muestra a 0 horas). La suspensión de partículas restantes se colocó en un tubo Eppendorf de 1,5 ml, y se inclinó a uno y otro lado y se mezcló lentamente en una incubadora a 37°C, utilizando un rotador a una velocidad de 6 rpm. A partir de esta solución, una pequeña parte (40 µl) se dispersó a intervalos de tiempo específicos, y el sobrenadante se separó de forma similar mediante operación de centrifugado. En la muestra de sobrenadante recogida en cada tiempo, la concentración de exendina-4 se midió mediante el procedimiento de ELISA, y la cantidad de liberación (%) se calculó en la fórmula a continuación.

50 Cantidad de liberación (%) =
$$\frac{\text{(concentración de exendina-4 en el sobrenadante (ng/ml) x 1,2 (ml))}}{\text{cantidad de exendina-4 encapsulada (ng) en 20 mg de partículas}} \times 100$$

55 La figura 9 muestra cambios en la evolución temporal de la liberación de fármaco a partir de micropartículas fabricadas utilizando cada polímero de dextrano-PLGA. En ambas micropartículas, apenas se observó descarga inicial, y el fármaco fue liberado linealmente en proporción al lapso de tiempo, y se observó un perfil favorable.

60 Ejemplo 13. Administración hipodérmica de micropartículas que encapsulan exendina-4 (agonista del receptor GLP-1) en ratón

Se suspendieron 300 mg de micropartículas en el ejemplo 12 y se dispersaron en 3 ml de solución fisiológica

5 tamponada con fosfato (PBS), y las micropartículas se precipitaron mediante operación de centrifugado durante 5 minutos a $80 \times g$, y un sobrenadante se transfirió a otro tubo. El sobrenadante se separó de forma centrífuga de nuevo durante 5 minutos a $80 \times g$, y las partículas restantes se precipitaron, y el sobrenadante se retiró. La primera precipitación por centrifugado y la segunda precipitación por centrifugado se combinaron, y se dispersaron de nuevo en 1 ml de PBS, y, de forma similar, se llevó a cabo una tercera operación de centrifugado, y la exendina-4 no encapsulada en las partículas se retiró. Finalmente, la precipitación se dispersó de nuevo en 200 μ l de PBS para preparar una solución de administración.

10 Esta solución se inyectó por vía hipodérmica en el lomo de ratones SCID de 8 semanas de vida (CB 17/lcr-Prkdcscid/CrlCrk) (de Crea Japan Inc.), y se tomaron muestras de la sangre a intervalos específicos a partir de la vena caudal. En la sangre muestreada, se añadió heparina de concentración final de 3,3 UI/ml, y se centrifugó durante 5 minutos a 5.000 rpm, y el plasma se recogió, y la concentración de exendina-4 en plasma se midió mediante procedimiento de ELISA. A modo de comparación, una solución de exendina-4 no graduada (700 μ g/0,2 ml) se administró por vía hipodérmica en ratón, y se tomaron muestras de la sangre de forma similar.

15 La figura 10 muestra cambios en la evolución temporal de la concentración de exendina-4 en plasma. En el ratón al que se le administró fármaco no granulado, el nivel en sangre 1 hora después de la administración era muy alto y, a continuación, cayó súbitamente, hasta un nivel de antes de la administración. Por otro lado, en la micropartícula de dextrano-PLGA, un aumento de la concentración transitorio después de la administración se suprimió a la baja, y durante cinco semanas consecutivas después de la administración, la concentración en plasma se mantuvo en niveles altos.

Ejemplo 14. Síntesis de dextrano-poli(ácido láctico-ácido glicólico) (PLGA)

25 14.1 Síntesis de TMS-dextrano-PLGA (compuesto 10, compuesto 11, compuesto 12, compuesto 13)

30 El compuesto 1 (0,5 g) y terc-butoxi potasio (35 mg) se secaron durante 1 hora a presión reducida, y se añadió tetrahidrofurano (10 ml), y la mezcla se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. En esta solución, se añadió gota a gota una solución en tetrahidrofurano (15 ml) de (DL)-lactida (0,558 g) y glicólido (0,45 g), y la mezcla se agitó durante 5 minutos. Después de la finalización de la reacción, el disolvente se concentró a presión reducida, y se purificó mediante reprecipitación mediante un sistema de cloroformo-metanol, y se obtuvo TMS-dextrano-PLGA (1,96 g) como contenido sólido de color blanco (compuesto 10).

35 En un procedimiento similar, mediante la cantidad de carga de (DL)-lactida (0,67 g) y glicólido (0,54 g), se sintetizó el compuesto 11.

En un procedimiento similar, mediante la cantidad de carga de (DL)-lactida (0,781 g) y glicólido (0,629 g), se sintetizó el compuesto 12.

40 En un procedimiento similar, mediante la cantidad de carga de (DL)-lactida (1,123 g) y glicólido (0,9 g), se sintetizó el compuesto 13.

14.2 Síntesis de dextrano-PLGA (compuesto 14, compuesto 15, compuesto 16, compuesto 17)

45 En solución en cloroformo (10 ml) del compuesto 10, se añadió ácido trifluoroacético (1 ml), y se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. El disolvente se eliminó por destilación a presión reducida, y el residuo se disolvió en cloroformo (10 ml), y se añadió gota a gota a éter dietílico enfriado a 0°C, y el producto se depositó. La materia de depósito se eliminó por filtración, y se concentró a presión reducida, y se obtuvo dextrano-PLGA (0,44 g) (compuesto 14).

50 A partir de los compuestos 11, 12, y 13, se obtuvieron productos de dextrano-PLGA mediante un procedimiento similar (compuesto 5, compuesto 16, compuesto 17). El peso molecular promedio en peso y el peso molecular promedio en número del polímero de los compuestos 14 a 17 se determinaron mediante medición por GPC (columna Toso TSK-gel α -5000 \times 2, disolvente del sistema DMF, detector del IR, producto estándar, pululano). El peso molecular promedio de la cadena de injerto y el número de cadenas de injerto se determinaron mediante medición de ^1H -RMN.

60 En cuanto al compuesto 14, el peso molecular promedio en peso fue 99.462, el peso molecular promedio en número fue 85.101, el peso molecular promedio en número de la cadena de injerto fue 2.167, y el número de cadenas de injerto fue 33.

65 En cuanto al compuesto 15, el peso molecular promedio en peso fue 107.779, el peso molecular promedio en número fue 92.134, el peso molecular promedio en número de la cadena de injerto fue 3.127, y el número de cadenas de injerto fue 25.

En cuanto al compuesto 16, el peso molecular promedio en peso fue 121.281, el peso molecular promedio en

número fue 101.873, el peso molecular promedio en número de la cadena de injerto fue 3.000, y el número de cadenas de injerto fue 30.

5 En cuanto al compuesto 17, el peso molecular promedio en peso fue 144.838, el peso molecular promedio en número fue 122.151, el peso molecular promedio en número de la cadena de injerto fue 4.864, y el número de cadenas de injerto fue 22.

Ejemplo 15. Procedimiento de preparación de micropartículas que encapsulan hormona del crecimiento humana (hGH)

10 Se disolvieron 5 mg de cada dextrano-poli(ácido láctico-ácido glicólico) (polímero de dextrano-PLGA, compuestos 14 a 17) del ejemplo 14 en 100 µl de carbonato de dimetilo para preparar una solución de polímero de 50 mg/ml. En esta solución de polímero, se añadieron 20 µl de terc-butanol, y se añadieron gota a gota 50 µl de solución acuosa de 1 mg/ml de hGH, y se agitó en vórtice para preparar una emulsión de fase inversa. Esta emulsión de fase inversa se congeló de forma preliminar mediante nitrógeno líquido, y se liofilizó utilizando un aparato de liofilización (EYELA, FREEZE DRYER FD-1000), a temperatura de enfriamiento de la trampa de -45°C, y grado de vacío de 20 Pa, durante 24 horas. El contenido sólido obtenido se dispersó en 200 µl de carbonato de dimetilo para preparar una suspensión S/Ac. Esta suspensión S/Ac se añadió gota a gota en 2 ml de solución acuosa que contenía Pluronic F-68 al 10% (una marca registrada de BASF), y se agitó y se emulsionó en un mezclador en vórtice para preparar una emulsión de tipo S/Ac/Ag. A partir de esta emulsión de tipo S/Ac/Ag, el disolvente orgánico inmiscible en agua se retiró mediante secado en líquido, y se obtuvo un líquido de dispersión de micropartículas. El líquido de dispersión de micropartículas se congeló de forma preliminar mediante nitrógeno líquido, y se liofilizó utilizando un aparato de liofilización (EYELA, FREEZE DRYER FD-1000), a temperatura de enfriamiento de la trampa de -45°C, y grado de vacío de 20 Pa, durante 24 horas, y se obtuvo polvo de micropartículas que encapsulan hGH. Las micropartículas obtenidas se observaron mediante un microscopio electrónico de barrido (SEM: HITACHI, S-4800), y se calculó el diámetro de partícula promedio, y el diámetro de partícula promedio de las micropartículas estaba dentro de un intervalo de 1,0 a 10 µm.

30 Ejemplo 16. Medición de eficiencia de encapsulación de fármacos de micropartículas que encapsulan hormona del crecimiento humana (hGH)

35 Se pesaron 20 mg de micropartículas que encapsulan hormona del crecimiento humana preparada en el procedimiento del ejemplo 15 utilizando cada polímero de dextrano-PLGA (compuestos 14 a 17) utilizando un tubo Eppendorf de 1,5 ml, y se disolvieron en 1 ml de solución tampón A (PBS que contenía albúmina de suero bovino al 0,1%, Pluronic F-68 al 0,1% (una marca registrada de BASF), y azida sódica al 0,02%), y se centrifugaron durante 10 minutos a 18.000 × g, y se separaron en partículas (precipitación) y un sobrenadante. El sobrenadante se recogió en otro tubo, y las partículas se suspendieron de nuevo en 1 ml de solución tampón, y la operación de centrifugado y la separación en partículas y un sobrenadante se llevaron a cabo de nuevo en las mismas condiciones. Esta operación de limpieza se repitió una vez más (un total de tres veces de operación de centrifugado), y la concentración de hormona del crecimiento humana de cada sobrenadante recogido mediante las operaciones de centrifugado se midió utilizando un kit de ELISA (fabricado por R&D Systems). A partir de la cantidad cargada de hGH en el momento de la preparación de partículas (peso de partícula 20 mg), se sustrajo la cantidad total de hGH de tres sobrenadantes mediante operaciones de centrifugado, y la eficiencia de encapsulación se calculó según la fórmula a continuación.

45 Eficiencia de encapsulación (%) =
$$\frac{\text{cantidad de hGH cargada (ng)} - \text{cantidad total de hGH en el sobrenadante (ng)}}{\text{cantidad de hGH cargada (ng)}} \times 100$$

50 En micropartículas de dextrano-PLGA, la eficiencia de encapsulación de hGH fue del 87,5% en micropartículas del compuesto 14, el 94,2% en micropartículas del compuesto 15, el 95,7% en micropartículas del compuesto 16, y el 97,5% en micropartículas del compuesto 17, y se demostró que el fármaco proteico puede encapsularse a una elevada frecuencia en todas las micropartículas.

Ejemplo comparativo 2

55 Fabricación de partículas que encapsulan hormona del crecimiento y medición de eficiencia de encapsulación de fármacos

60 Se disolvieron 10 mg de dextrano-poli(ácido láctico-ácido glicólico)(PLGA) (compuesto 14 o compuesto 17) en 2 ml de acetato de etilo para preparar una solución de polímero. En esta solución de polímero, se añadieron gota a gota 100 µl de solución acuosa de 0,5 mg/ml de hGH, y se agitó. Después de la operación de agitación, la solución se añadió a 20 ml de dioxano. El disolvente se evaporó, y la solución se concentró a aproximadamente 2 ml, y el líquido de dispersión de partículas se añadió a agua que contenía 500 mg de Pluronic F-68 (una marca registrada de BASF). La muestra se liofilizó, y se añadió 1 ml de agua a 50 mg de la muestra, y las partículas se dispersaron de nuevo, y se obtuvieron partículas que contenían sustancia activa hidrófila no asociadas. El diámetro de partícula promedio de las partículas se midió mediante un procedimiento de dispersión de luz dinámica utilizando un aparato

ELS-Z (fabricado por Otsuka Denshi), y la eficiencia de encapsulación de fármacos se determinó igual que en el ejemplo 16.

5 Como resultado, en las partículas del compuesto 14, el diámetro de partícula promedio fue 190,5 nm, y la eficiencia de encapsulación fue el 73%, y en las partículas del compuesto 17, el diámetro de partícula promedio fue 197,5 nm, y la eficiencia de encapsulación fue el 70%, y la eficiencia de encapsulación fue menor que en las micropartículas del ejemplo 16.

10 Ejemplo 17. Análisis de la velocidad de liberación de fármaco in vitro a partir de micropartículas que encapsulan hormona del crecimiento humana (hGH)

15 Las partículas limpiadas tres veces en el ejemplo 16 se suspendieron y se dispersaron en 1,2 ml de solución tampón A. A partir de esta solución, una parte (40 μ l) se transfirió a otro tubo, y se centrifugó durante 10 minutos a 18.000 \times g para precipitar las partículas, y 30 μ l de sobrenadante se recogieron en un tubo diferente (muestra a 0 horas). La suspensión de partículas restantes se colocó en un tubo Eppendorf de 1,5 ml, y se inclinó a uno y otro lado y se mezcló lentamente en una incubadora a 37°C, utilizando un rotador a una velocidad de 6 rpm. A partir de esta solución, una pequeña parte (40 μ l) se dispersó a intervalos de tiempo específicos, y el sobrenadante se separó de forma similar mediante operación de centrifugado. En la muestra de sobrenadante recogida en cada tiempo, la concentración de hGH se midió mediante el kit de ELISA, y la cantidad de liberación (%) se calculó en la fórmula a continuación.

$$20 \text{ Cantidad de liberación (\%)} = \frac{\text{(concentración de hGH en el sobrenadante (ng/ml) } \times \text{ 1,2 (ml))}}{\text{cantidad de hGH encapsulada (ng) en 20 mg de partículas}} \times 100$$

25 La figura 11 muestra cambios en la evolución temporal de la liberación de fármaco a partir de micropartículas fabricadas en el ejemplo 15. En estas micropartículas, apenas se observó descarga inicial, y el fármaco fue liberado linealmente en proporción al lapso de tiempo, y se observó un perfil favorable. El tiempo requerido para la liberación del 50% del fármaco fue de aproximadamente 6 días en micropartículas del compuesto 14, aproximadamente 9 días en micropartículas del compuesto 15, aproximadamente 16 días en micropartículas del compuesto 16, y aproximadamente 1 mes en micropartículas del compuesto 17, y se sugirió que la velocidad de liberación podría controlarse cambiando la cantidad cargada de lactida y glicólido en el momento de la síntesis de TMS-dextrano-PLGA.

30 Ejemplo 18. Procedimiento de preparación de micropartículas que encapsulan dextrano marcado con fluoresceína (FD40) con diámetro de partícula diferente

35 5 mg de dextrano-poli(ácido láctico-ácido glicólico) (PLGA) (compuesto 7) del ejemplo 2 se disolvieron en 100 μ l de carbonato de dimetilo para preparar una solución de polímero de 50 mg/ml. En esta solución de polímero, se añadieron 20 μ l de terc-butanol, y se añadieron gota a gota 20 μ l de solución acuosa de 1 mg/ml de FD40, y se agitó en vórtice para preparar una emulsión de fase inversa. Esta emulsión de fase inversa se congeló de forma preliminar mediante nitrógeno líquido, y se liofilizó utilizando un aparato de liofilización (EYELA, FREEZE DRYER FD-1000), a temperatura de enfriamiento de la trampa de -45°C, y grado de vacío de 20 Pa, durante 24 horas. El contenido sólido obtenido se dispersó en 50 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 350 μ l, 500 μ l, 1 ml, 2 ml y 6 ml de carbonato de dimetilo para preparar una suspensión S/Ac. Esta suspensión S/Ac se añadió gota a gota en 2 ml de solución acuosa que contenía Pluronic F-68 al 10% (una marca registrada de BASF), y se agitó y se emulsionó en un mezclador en vórtice para preparar una emulsión de tipo S/Ac/Ag. A partir de esta emulsión de tipo S/Ac/Ag, el disolvente orgánico inmiscible en agua se retiró mediante secado en líquido, y se obtuvo un líquido de dispersión de micropartículas. El líquido de dispersión de micropartículas se congeló de forma preliminar mediante nitrógeno líquido, y se liofilizó utilizando un aparato de liofilización (EYELA, FREEZE DRYER FD-1000), a temperatura de enfriamiento de la trampa de -45°C, y grado de vacío de 20 Pa, durante 24 horas, y se obtuvo polvo de micropartículas que encapsulan FD40. Las micropartículas obtenidas se observaron mediante un microscopio electrónico de barrido (SEM: HITACHI, S-4800), y se calculó el diámetro de partícula promedio.

55 La figura 12 muestra la correlación entre el diámetro de partícula promedio y la cantidad de carbonato de dimetilo añadida en el momento de la preparación de la emulsión de tipo S/Ac/Ag. En un intervalo de 50 μ l a 500 μ l, junto con el aumento de la cantidad de carbonato de dimetilo, se observó declive del diámetro de partícula promedio. De 500 μ l a 6 ml, casi no se observó ninguna diferencia en el diámetro de partícula promedio.

Ejemplo 19. Síntesis de polímero de PEG-PLGA (serie PEG2k)

60 Se mezclaron éter monometílico de polietilenglicol (fabricado por NOF Corp., SUNBRIGHT MEH-20H, peso molecular promedio en número: 1.862, Mw/Mn = 1,03), (DL)-lactida, y glicólido en la composición especificada mostrada en la tabla 1, y se calentaron a 140°C. Después de agitar durante 20 minutos, se añadió octilato de estaño (II) (el 0,05% en peso respecto a éter monometílico de polietilenglicol), y se agitó durante 3 horas a 180°C. La solución de reacción se devolvió a temperatura ambiente, y se disolvió en cloroformo (a una concentración de

aproximadamente 100 mg/ml), y se precipitó de nuevo y se refinó en éter dietílico enfriado a 0°C, y el contenido sólido obtenido se filtró, se descomprimió y se secó, y se obtuvo polímero de PEG-PLGA como contenido sólido de color blanco o marrón pálido. El peso molecular promedio en número de este polímero se determinó mediante ¹H-RMN (tabla 1).

5

[Tabla 1]

Tabla 1. Cantidad cargada de materia prima y resultados de la reacción de la síntesis de polímero de PEG-PLGA (serie PEG2k)

Cantidad cargada (g)			Rendimiento (g)	Peso molecular (¹ H-RMN)	Composición de polímero (peso molecular de PEG)-(peso molecular de PLGA)
PEG	(DL)-lactida	Glicólido			
0,8	1,44	1,16	4,74	13500	2k-11,5k
0,4	1,44	1,16	2,65	23560	2k-21,5k
0,2	1,44	1,16	2,52	52700	2k-50,7k

10

Ejemplo 20. Síntesis de polímero de PEG-PLGA (serie PEG5k)

Se mezclaron éter monometílico de polietilenglicol (fabricado por NOF Corp., SUNBRIGHT MEH-20H, peso molecular promedio en número: 5.128, Mw/Mn = 1,02), (DL)-lactida, y glicólido en la composición especificada mostrada en la tabla 2, y se calentaron a 140°C. Después de agitar durante 20 minutos, se añadió octilato de estaño (II) (el 0,05% en peso respecto a éter monometílico de polietilenglicol), y se agitó durante 3 horas a 180°C. La solución de reacción se devolvió a temperatura ambiente, y se disolvió en cloroformo (a una concentración de aproximadamente 100 mg/ml), y se precipitó de nuevo y se refinó en éter dietílico enfriado a 0°C, y el contenido sólido obtenido se filtró, se descomprimió y se secó, y se obtuvo polímero de PEG-PLGA como contenido sólido de color blanco o marrón pálido. El peso molecular promedio en número de este polímero se determinó mediante ¹H-RMN (tabla 2).

15

20

[Tabla 2]

Tabla 2. Cantidad cargada de materia prima y resultados de la reacción de síntesis de polímero de PEG-PLGA (serie PEG5k)

Cantidad cargada (g)			Rendimiento (g)	Peso molecular (¹ H-RMN)	Composición de polímero (peso molecular de PEG)-(peso molecular de PLGA)
PEG	(DL)-lactida	Glicólido			
0,5	0,72	0,58	1,31	15.600	5k-10k
0,5	1,44	1,16	2,51	28.400	5k-23k
0,33	1,44	1,16	2,1	37.500	5k-32,5k
0,6	2,88	2,32	5,5	44.400	5k-39,4k
0,27	1,44	1,16	2,62	52.000	5k-47k
0,2	1,44	1,16	2,52	66.000	5k-61k
0,3	2,16	1,74	4,07	69.935	5k-65k
0,8	2,16	1,74	3,79	59.555	5k-55k
0,1	1,15	0,93	-	109.381	5k-105k

25

Ejemplo 21. Síntesis de polímero de PEG-PLGA (serie PEG10k)

Se mezclaron éter monometílico de polietilenglicol (fabricado por NOF Corp., SUNBRIGHT MEH-10H, peso molecular promedio en número: 9.975, Mw/Mn = 1,02), (DL)-lactida, y glicólido en la composición especificada mostrada en la tabla 3, y se calentaron a 140°C. Después de agitar durante 20 minutos, se añadió octilato de estaño (II) (el 0,05% en peso respecto a éter monometílico de polietilenglicol), y se agitó durante 3 horas a 180°C. La solución de reacción se devolvió a temperatura ambiente, y se disolvió en cloroformo (a una concentración de aproximadamente 100 mg/ml), y se precipitó de nuevo y se refinó en éter dietílico enfriado a 0°C, y el contenido sólido obtenido se filtró, se descomprimió y se secó, y se obtuvo polímero de PEG-PLGA como contenido sólido de color blanco o marrón pálido. El peso molecular promedio en número de este polímero se determinó mediante ¹H-RMN (tabla 3).

30

35

[Tabla 3]

5 Tabla 3. Cantidad cargada de materia prima y resultados de la reacción de síntesis de polímero de PEG-PLGA (serie PEG10k)

Cantidad cargada (g)			Rendimiento (g)	Peso molecular (¹ H-RMN)	Composición de polímero (peso molecular de PEG)-(peso molecular de PLGA)
PEG	(DL)-lactida	Glicólido			
0,5	1,44	1,16	2,3	49000	10k-39k
0,25	1,44	1,16	2,48	105000	10k-95k

Ejemplo 22. Procedimiento de preparación de micropartículas que encapsulan FD40

10 Se disolvieron 5 mg del polímero de PEG-PLGA preparado en los ejemplos 19 a 21 en 100 µl de carbonato de dimetilo para preparar una solución de polímero de 50 mg/ml. En esta solución de polímero, se añadieron 20 µl de terc-butanol, se añadió una cantidad específica de solución acuosa de 10 mg/ml de FD40 tal como se muestra en la tabla 4, y se agitó para preparar una emulsión de fase inversa. Esta emulsión de fase inversa se congeló de forma preliminar mediante nitrógeno líquido, y se liofilizó utilizando un aparato de liofilización (EYELA, FREEZE DRYER FD-1000), a temperatura de enfriamiento de la trampa de -45°C, y grado de vacío de 20 Pa, durante 24 horas. El contenido sólido obtenido se dispersó en 200 µl de carbonato de dimetilo para preparar una suspensión S/Ac. Esta suspensión S/Ac se añadió gota a gota en 2 ml de solución acuosa que contenía Pluronic F-68 al 10% (una marca registrada de BASF), y se agitó y se emulsionó en un mezclador en vórtice para preparar una emulsión de tipo S/Ac/Ag. A partir de esta emulsión de tipo S/Ac/Ag, el disolvente orgánico inmiscible en agua se retiró mediante secado en líquido, y se obtuvo un líquido de dispersión de micropartículas. El líquido de dispersión de micropartículas se congeló de forma preliminar mediante nitrógeno líquido, y se liofilizó utilizando un aparato de liofilización (EYELA, FREEZE DRYER FD-1000), a temperatura de enfriamiento de la trampa de -45°C, y grado de vacío de 20 Pa, durante 24 horas, y se obtuvo polvo de micropartículas que encapsulan FD40, y una parte del mismo se observó mediante un microscopio electrónico de barrido (SEM: HITACHI, S-4800), y se calculó el diámetro de partícula promedio (tabla 4). Imágenes de SEM del polvo preparado a partir del polímero de PEG-PLGA de 5k a 10k se muestran en la figura 14, e imágenes de SEM del polvo preparado a partir del polímero de PEG-PLGA de 5k a 61k se muestran en la figura 15.

[Tabla 4]

30 Tabla 4. Cantidad de solución acuosa de FD40 a añadir a cada polímero, y diámetro de partícula promedio de las micropartículas obtenidas.

Composición de PEG-PLGA	Cantidad de solución acuosa de FD40 (µl)	Diámetro de partícula promedio (µm)
2k-11,5k	13	-
2k-21,5k	12	-
2k-50,7k	12	-
5k-10k	20	-
5k-23k	20	4,6
5k-32,5k	20	4,3
5k-39,4k	20	-
5k-47k	20	4,2
5k-61k	20	3,9
5k-65k	20	3,2
10k-39k	18	4,8
10k-95k	15	4,5

Ejemplo 23. Medición de la eficiencia de encapsulación de micropartículas que encapsulan FD40

35 Se pesó una micropartícula (5 mg) que encapsula FD40 preparada en el procedimiento del ejemplo 22 utilizando el polímero de PEG-PLGA utilizando un tubo Eppendorf de 1,5 ml, y se dispersó en Milli-Q (1 ml), y se centrifugó durante 30 minutos, y se separó en un sobrenadante que contenía FD40 no encapsulado y partículas que

encapsulan FD40, y se recogió. Las partículas que encapsulan FD40 recogidas se disolvieron en N,N-dimetilformamida (250 μ l), y las partículas se disgregaron. El sobrenadante que contenía FD40 no encapsulado y solución de N,N-dimetilformamida (50 μ l) que contenía FD40 encapsulado se añadieron a Milli-Q (3 ml) individualmente, y se agitaron bien, y FD40 se determinó cuantitativamente utilizando un espectrofotómetro fluorescente (HORIBA, Fluoro MAX-3, longitud de onda de excitación 495 nm, longitud de onda fluorescente 520 nm), y se calculó la eficiencia de encapsulación en el volumen de recogida completo.

La figura 13 muestra la eficiencia de encapsulación de FD40 en micropartículas preparadas a partir de polímero de PEG-PLGA. En todas las series de 2k, 5k, 10k de peso molecular de PEG, cuando el peso molecular de PLG era alto, la eficiencia de encapsulación tendía a ser alta. En particular, en la serie PEG5k, a 5k-65k, la eficiencia de encapsulación era muy alta, siendo de aproximadamente el 90%. La eficiencia de encapsulación era de aproximadamente el 55% en 10k-95k (PLGA/PEG = 9,5) casi a una misma relación de peso molecular que 5k-47k *OKGA/PEG = 9,4) de eficiencia de encapsulación alta (aproximadamente el 80%), la eficiencia de encapsulación era de aproximadamente el 55%.

Ejemplo comparativo 3. Fabricación de partículas que encapsulan FD40

Se disolvieron 10 mg de polímero de PEG-PLGA (5k-61k) en 2 ml de acetato de etilo para preparar una solución de polímero. En esta solución de polímero, se añadieron gota a gota 100 μ l de solución de 2 mg/ml de hormona del crecimiento, y se agitó. Después de la operación de agitación, la solución se añadió a 20 ml de dioxano. El disolvente se evaporó, y se concentró a aproximadamente 2 ml, y el líquido de dispersión de partículas se añadió a agua que contenía 500 mg de Pluronic F-68 (una marca registrada de BASF). La muestra se liofilizó, y se añadió 1 ml de agua a 50 mg de la muestra, y las partículas se dispersaron de nuevo, y se obtuvieron partículas que contenían sustancia activa hidrófila no asociadas. El diámetro de partícula promedio de las partículas se midió mediante un procedimiento de dispersión de luz dinámica utilizando un aparato ELS-Z (fabricado por Otsuka Denshi), y la eficiencia de encapsulación de fármacos se determinó igual que en el ejemplo 23.

Como resultado, la eficiencia de encapsulación de FD40 fue del 48%, el diámetro de partícula promedio fue 203,8 nm, y la eficiencia de encapsulación fue menor que en las micropartículas del ejemplo 23.

Ejemplo 24. Análisis de la velocidad de liberación de FD40 in vitro a partir de micropartículas que encapsulan FD40

Con el fin de evaluar la relación entre el comportamiento de liberación sostenida y la longitud de la cadena de PLGA para componer el polímero de la partículas de PEG-PLGA, el comportamiento de liberación se evaluó en partículas de 5k-23k, 5k-32,5k, 5k-47k, y 5k-61k, de las micropartículas que encapsulan el FD40 preparadas en el ejemplo 22.

Las micropartículas se almacenaron, justo después de la preparación, en estado liofilizado a -30°C, y se devolvieron a temperatura normal antes de la utilización. Se pesaron exactamente 20 mg de polvo de partículas, y se colocaron en un tubo de 1,5 ml (tubo Eppendorf), y se añadió 1 ml de tampón de ensayo (azida sódica al 0,02%, Pluronic F-68 al 0,1% (una marca registrada de BASF), y albúmina de suero bovino al 0,1% añadidos a solución en PBS), y se agitaron firmemente mediante un mezclador táctil y se suspendieron. A continuación, utilizando una máquina centrífuga de alta velocidad de Hitachi (CF16RX), la solución se centrifugó durante 10 minutos a 18.900 \times g, y se retiraron 950 μ l de fracción sobrenadante que contenía FD40 no encapsulado, y se añadieron de nuevo 950 μ l de tampón de ensayo, y las partículas se suspendieron y centrifugaron, y la operación de limpieza de partículas se repitió un total de tres veces.

En las partículas limpiadas tres veces, se añadieron 950 μ l de tampón de ensayo una vez más, y las partículas se suspendieron, y 100 μ l de cada una se dispensaron en un tubo de 1,5 ml. En cada tubo, se añadieron 900 μ l de tampón de ensayo para obtener una solución total de 1 ml, que se incubó en una incubadora a 37°C mientras se hacía rotar a 10 rpm por medio de un rotador. Cada tubo incubado se centrifugó secuencialmente durante 10 minutos a 18.900 \times g, y se dispensaron 950 μ l de sobrenadante, y se almacenaron a 4°C hasta el momento de la medición de la intensidad fluorescente.

La intensidad fluorescente de la solución muestreada se midió utilizando una cubeta desechable de 3 ml (KARTELL) y HORIBA Fluoro MAX-3, a una longitud de onda de excitación de 494 nm y una longitud de onda fluorescente de 512 nm, y la relación de liberación sostenida se determinó a partir de la relación de la cantidad de FD40 utilizada en la preparación de las partículas.

La figura 16 muestra la cantidad de liberación de FD40 a partir de las diversas micropartículas determinadas por la evaluación de liberación. El eje de abscisas indica el tiempo de incubación, y el eje de ordenadas representa la relación de liberación respecto a la cantidad cargada. En partículas 5k-23k cortas en la cadena de PLGA, aproximadamente el 40% de la cantidad cargada se liberó en el plazo de 1 día en el periodo de incubación inicial, y en un mes, casi toda la cantidad fue liberada excepto la parte de descarga inicial. Por el contrario, a medida que la longitud de la cadena de PLGA se vuelve más grande, la cantidad de liberación inicial disminuía, y en micropartículas de 5k-61k, la cantidad de liberación en un primer día del periodo inicial era del 10% o menos.

Ejemplo 25. Medición de eficiencia de encapsulación de fármacos de micropartículas que encapsulan insulina humana

5 Utilizando el polímero de PEG-PLGA (5k-61k) preparado en el ejemplo 20, se prepararon micropartículas que encapsulan insulina humana en el mismo procedimiento que en el ejemplo 22. Las micropartículas obtenidas (20 mg) se pesaron utilizando un tubo Eppendorf de 1,5 ml, y se disolvieron en 1 ml de solución tampón A (PBS que contenía albúmina de suero bovino al 0,1%, Pluronic F-68 al 0,1% (una marca registrada de BASF), y azida sódica al 0,02%), y se centrifugaron durante 10 minutos a 18.800 × g, y se separaron en partículas (precipitación) y un sobrenadante. El sobrenadante se recogió en otro tubo, y las partículas se suspendieron de nuevo en 1 ml de solución tampón A, y la operación de centrifugado y la separación en partículas y un sobrenadante se llevaron a cabo de nuevo en las mismas condiciones. Esta operación de limpieza se repitió una vez más (un total de tres veces de operación de centrifugado), y la concentración de insulina humana de cada sobrenadante recogido mediante las operaciones de centrifugado se midió mediante el procedimiento de ELISA en sándwich.

15 El procedimiento de ELISA en sándwich se llevó a cabo en el siguiente procedimiento. Se inmovilizó anticuerpo monoclonal anti-insulina humana (fabricado por Fitzgerald, N.º de clon E6E5) sobre una placa de ELISA (Maxisorp de Nunc Corp.) a una concentración de 5 µg/ml, y 50 µl de solución tampón de ELISA (solución tampón clorato Tris 0,1 M que contenía BSA al 0,25% y Tween 20 al 0,05%, pH 8,0) y se añadieron 50 µl de muestra de medición o muestra estándar diluida en solución de dilución de ELISA (PBS que contenía BSA al 0,25% y Tween 20 al 0,05%), y la solución se hizo reaccionar a temperatura ambiente agitando durante 1 hora. La placa se limpió tres veces en una solución de limpieza (PBS que contenía Tween 20 al 0,05%), y el reactivo que no reaccionó se retiró, y se añadieron 0,5 µg/ml de anticuerpo monoclonal antihumano marcado con biotina (fabricado por Fitzgerald, N.º de clon D4B8), y conjugado de estreptavidina-HRP (fabricado por Zymed), y las soluciones se hicieron reaccionar a temperatura ambiente agitando durante 1 hora y 15 minutos. Después de cada reacción, la placa se limpió tres veces en una solución de limpieza (PBS que contenía Tween 20 al 0,05%), y el reactivo que no reaccionó se retiró. Finalmente, se añadió el sustrato de HRP, y la actividad de enzima HRP del conjugado combinado se determinó mediante colorimetría, y tomando como base la curva de trabajo preparada a partir de del desarrollo del color de insulina estándar, se determinó la concentración de insulina en la muestra.

30 A partir de la cantidad cargada de insulina humana en el momento de la preparación de partículas (por peso de partículas de 20 mg), se sustrajo la cantidad total de insulina humana de tres sobrenadantes mediante operaciones de centrifugado, y la eficiencia de encapsulación se calculó según la fórmula a continuación.

35 Eficiencia de encapsulación (%) =
$$\frac{\text{(cantidad de insulina cargada (ng)) - cantidad total de insulina en los sobrenadantes (ng)}}{\text{cantidad de insulina cargada (ng)}} \times 100$$

El diámetro de partícula promedio de las micropartículas obtenidas fue 4,7 µm. La eficiencia de encapsulación de insulina humana en micropartículas fue 86,75, y se demostró que el fármaco proteico podría estar contenido a una eficiencia alta.

40 Ejemplo 26. Análisis de velocidad de liberación de fármaco in vitro a partir de micropartículas que encapsulan insulina humana

45 Las micropartículas centrifugadas tres veces en el ejemplo 25 se suspendieron y se dispersaron en 1,0 ml de solución tampón A. A partir de esta solución, se dispensaron 0,1 ml de cada una en diez tubos Eppendorf (1,5 ml de capacidad), y se añadieron 0,9 ml de solución tampón A en cada tubo, y se diluyeron 10 veces. Justo después de la dilución, un tubo se centrifugó durante 10 minutos a 18.800 × g para precipitar las partículas, y un sobrenadante se recogió en un tubo diferente (muestra a 0 horas). Los nueve tubos restantes se inclinaron a uno y otro lado y se mezclaron lentamente en una incubadora a 37°C, utilizando un rotador a una velocidad de 6 rpm. A intervalos de tiempo específicos, cada tubo se centrifugó de forma similar, y el sobrenadante se separó. En la muestra de sobrenadante recogida en cada tiempo, la concentración de insulina se midió mediante el procedimiento de ELISA en sándwich, y la cantidad de liberación de insulina (%) se calculó en la fórmula a continuación.

50 Cantidad de liberación (%) =
$$\frac{\text{(concentración de insulina en el sobrenadante (ng/ml))} \times 1 \text{ (ml)}}{\text{cantidad de insulina encapsulada (ng) en 20 mg de partículas}} \times 100$$

55 La figura 17 muestra cambios en la evolución temporal de la liberación de insulina. Junto con el lapso de tiempo, el fármaco fue liberado gradualmente, y la velocidad de liberación aumentó después de 30 días, y la mayoría del fármaco se liberó en aproximadamente 60 días.

60 Ejemplo 27. Administración hipodérmica de micropartículas que encapsulan hormona del crecimiento humana (hGH) en ratón

Se disolvieron 25 mg de polímero de PEG-PLGA en 500 µl de carbonato de dimetilo para preparar una solución de polímero de 50 mg/ml. En esta solución de polímero, se añadieron 100 µl de terc-butanol, y se dejaron caer gota a

5 gota 250 μ l de solución acuosa de 10 mg/ml de hGH, y se agitó en vórtice para preparar una emulsión de fase inversa. Esta emulsión de fase inversa se congeló de forma preliminar mediante nitrógeno líquido, y se liofilizó utilizando un aparato de liofilización (EYELA, FREEZE DRYER FD-1000), a temperatura de enfriamiento de la trampa de -45°C, y grado de vacío de 20 Pa, durante 24 horas. El contenido sólido obtenido se dispersó en 1 ml de carbonato de dimetilo para preparar una suspensión S/Ac. Esta suspensión S/Ac se añadió gota a gota en 10 ml de solución acuosa que contenía Pluronic F-68 al 10% (una marca registrada de BASF), y se agitó y se emulsionó en un mezclador en vórtice para preparar una emulsión de tipo S/Ac/Ag. A partir de esta emulsión de tipo S/Ac/Ag, el disolvente orgánico inmiscible en agua se retiró mediante secado en líquido, y se obtuvo un líquido de dispersión de micropartículas. El líquido de dispersión de micropartículas se congeló de forma preliminar mediante nitrógeno líquido, y se liofilizó utilizando un aparato de liofilización (EYELA, FREEZE DRYER FD-1000), a temperatura de enfriamiento de la trampa de -45°C, y grado de vacío de 20 Pa, durante 24 horas, y se obtuvo polvo de micropartículas que encapsulan hGH. El diámetro de partícula promedio de las micropartículas obtenidas fue 6,0 μ m.

15 Se suspendieron 300 mg de las micropartículas preparadas y se dispersaron en 3 ml de solución fisiológica tamponada con fosfato (PBS), y se centrifugaron durante 5 minutos a 80 \times g para precipitar micropartículas, y un sobrenadante se transfirió a otro tubo. El sobrenadante se centrifugó de nuevo durante 5 minutos a 80 \times g para precipitar las partículas restantes, y el sobrenadante se retiró. La primera precipitación por centrifugado y la segunda precipitación por centrifugado se combinaron, y se dispersaron de nuevo en 1 ml de PBS, y la misma operación de limpieza por centrifugado se repitió tres veces en total, y se retiró la hormona del crecimiento no encapsulada en las micropartículas. Finalmente, la precipitación se dispersó de nuevo en 200 μ l de PBS, y se obtuvo una solución de administración. La cantidad de hormona del crecimiento encapsulada en partículas de PEG-PLGA se midió mediante un kit de ELISA, y se sustrajo de la cantidad cargada, y se determinó la cantidad encapsulada en 300 mg de partículas administradas por ratón, y se obtuvieron 700 μ g de micropartículas de PEG-PLGA.

25 Esta solución se inyectó por vía hipodérmica en dos posiciones en el lomo de ratones Balb/C macho de 10 semanas de vida, y se tomaron muestras de la sangre a intervalos de tiempo específicos a partir de la vena caudal. En la sangre muestreada, se añadió heparina de concentración final de 3,3 UI/ml, y se recogió el plasma mediante separación por centrifugado durante 5 minutos a 5.000 rpm, y la concentración de hormona del crecimiento en plasma se midió utilizando un kit de ELISA.

30 A modo de comparación, una solución de proteínas de hormona del crecimiento humana no granulada (700 μ g/0,2 ml) se administró por vía hipodérmica en ratón, y se tomaron muestras de la sangre de forma similar.

35 Con el fin de suprimir la producción de anticuerpos mediante administración de hormona del crecimiento humana, que es una proteína extraña para el ratón, tres días antes de la administración de la partícula, un inmunosupresor, hidrato de Tacrolimus (Astellas) se administró por vía hipodérmica a 26 μ g/ratón, y seguidamente 13 μ g/ratón se administraron por vía hipodérmica en el momento de la administración del fármaco, y 3 días y 7 días más tarde.

40 La figura 18 muestra cambios en la evolución temporal de la concentración de hormona del crecimiento humana en plasma. En el ratón al que se le administró fármaco no granulada, el nivel en sangre 1 hora después de la administración era muy alto, más de 5.000 ng/ml, y a continuación, cayó súbitamente, hasta un nivel de un día antes de la administración. Por otro lado, en el ratón al que se le administró el fármaco de micropartícula preparado utilizando polímero de PEG-PLGA, un aumento transitorio del nivel en sangre justo después de la administración se suprimió a 100 ng/ml o menos, y durante siete días consecutivos, el nivel en sangre se mantuvo a niveles elevados.

45 Ejemplo 28. Fabricación de micropartículas añadiendo sal a la fase líquida en la etapa (c)

50 En 100 μ l de solución de 50 mg/ml de polímero de PEG-PLGA (5k-61k)/carbonato de dimetilo, se añadieron 20 μ l de terc-butanol, y se añadieron 20 μ l de solución acuosa de 10 mg/ml de FD40, y la mezcla se agitó para preparar una solución de micela inversa (emulsión Ag/Ac). La solución obtenida se congeló de forma preliminar mediante nitrógeno líquido, y se liofilizó durante una noche utilizando un aparato de liofilización, y se obtuvo un contenido sólido que contenía FD40. En el contenido sólido obtenido que contenía FD40, se añadieron 200 μ l de carbonato de dimetilo, y se agitó en vórtice durante 10 segundos para preparar una suspensión S/Ac, y se añadió gota a gota en 2 ml de solución acuosa que contenía Pluronic F-68 al 10% (una marca registrada de BASF) junto con cloruro sódico a una concentración especificada (0 M, 10 mM, 50 mM, 1 M), y se agitó y se emulsionó en vórtice durante 30 segundos para preparar una solución de emulsión de tipo S/Ac/Ag. A partir de la solución de emulsión de tipo S/Ac/Ag obtenida, el disolvente orgánico inmiscible en agua se retiró utilizando un evaporador (se evacuó a 30 hPa, y se evacuó y se retiró por destilación durante 5 minutos) para preparar una materia dispersada en agua de micropartículas que contienen FD40. La solución acuosa dispersa de micropartículas que contienen FD40 se congeló de forma preliminar mediante nitrógeno líquido, y se liofilizó durante una noche utilizando un aparato de liofilización, y se obtuvo polvo de micropartículas que contenían FD40. Las micropartículas obtenidas se observaron mediante un microscopio electrónico de barrido (SEM: HITACHI, S-4800), y se calculó el diámetro de partícula promedio, y en todas las condiciones de concentración de cloruro sódico, el diámetro de partícula promedio de micropartículas fue 6,5 μ m.

65

Se presaron 20 mg del polvo de micropartículas que contenían FD40 obtenido, y se dispersaron en 1 ml de solución tampón de PBS (que contenía Pluronic F-68 al 0,1% (una marca registrada de BASF), BSA al 0,1%, y azida sódica al 0,01%), y se centrifugaron (14.000 rpm, 10 minutos). Después de la recogida del sobrenadante, las micropartículas se suspendieron de nuevo en 1 ml de solución tampón de PBS, y se centrifugaron, y las micropartículas se limpiaron adicionalmente dos veces más. Las micropartículas limpiadas se suspendieron de nuevo en 1 ml de solución tampón de PBS, se dispensaron a 900 µl cada una en tubos Eppendorf de 1,5 ml, y se añadieron 900 µl de solución tampón de PBS, y la solución se incubó a 37°C, y se recogieron muestras después de 24 horas. Las muestras recogidas se centrifugaron durante 10 minutos a 14.000 rpm, y el FD40 contenido en el sobrenadante se midió utilizando un espectrofotómetro fluorescente (HORIBA, Fluoro MAX-3, longitud de onda de excitación 495 nm, longitud de onda fluorescente 520 nm), y se calculó la cantidad de liberación. La cantidad de FD40 en el sobrenadante recogido en el momento de la limpieza se midió de forma similar, y la eficiencia de encapsulación se calculó a partir de la cantidad cargada.

La eficiencia de encapsulación fue del 73%, 97%, 84%, y 82% a concentraciones de cloruro sódico de 0 M, 10 mM, 50 mM y 1 M. La cantidad de liberación en 1 día fue del 14%, 7%, 15% y 11% a concentraciones de cloruro sódico de 0 M, 10 mM, 50 mM y 1 M, y a la concentración de cloruro sódico de 10 mM, la eficiencia de encapsulación era la más alta, y la cantidad de liberación en 1 día (descarga inicial) era menor.

Ejemplo 29. Administración hipodérmica de micropartículas que encapsulan hormona del crecimiento humana (hGH) en ratón (evaluación de la actividad farmacológica)

Se disolvieron 25 mg de cada polímero de PEG-PLGA (5k-55k) y polímero de PEG-PLGA (5k-105k) del ejemplo 20 en 500 µl de carbonato de dimetilo para preparar una solución de polímero de 50 mg/ml. En esta solución de polímero, se añadieron 100 µl de terc-butanol, y se añadieron gota a gota 250 µl de solución acuosa de 10 mg/ml de hGH, y se agitó en vórtice para preparar una emulsión de fase inversa. Esta emulsión de fase inversa se congeló de forma preliminar mediante nitrógeno líquido, y se liofilizó utilizando un aparato de liofilización (EYELA, FREEZE DRYER FD-1000), a temperatura de enfriamiento de la trampa de -45°C, y grado de vacío de 20 Pa, durante 24 horas. El contenido sólido obtenido se dispersó en 1 ml de carbonato de dimetilo para preparar una suspensión S/Ac. Esta suspensión S/Ac se añadió gota a gota en 10 ml de solución acuosa que contenía Pluronic F-68 al 10% (una marca registrada de BASF), y se agitó y se emulsionó en un mezclador en vórtice para preparar una emulsión de tipo S/Ac/Ag. A partir de esta emulsión de tipo S/Ac/Ag, el disolvente orgánico inmiscible en agua se retiró mediante secado en líquido, y se obtuvo un líquido de dispersión de micropartículas. El líquido de dispersión de micropartículas se congeló de forma preliminar mediante nitrógeno líquido, y se liofilizó utilizando un aparato de liofilización (EYELA, FREEZE DRYER FD-1000), a temperatura de enfriamiento de la trampa de -45°C, y grado de vacío de 20 Pa, durante 24 horas, y se obtuvo polvo de micropartículas que encapsulan hGH. Las micropartículas obtenidas se observaron mediante un microscopio electrónico de barrido (SEM: HITACHI, S-4800), y se calculó el diámetro de partícula promedio, y el diámetro de partícula promedio de las micropartículas obtenidas fue 4,2 µm en las micropartículas de polímero de PEG-PLGA (5k-55k) (micropartículas 5k-55k), y 7,5 µm en las micropartículas de polímero de PEG-PLGA (5k-105k) (micropartículas 5k-105k).

Se suspendieron 300 mg de cada una de las micropartículas preparadas anteriormente y se dispersaron en 3 ml de solución fisiológica tamponada con fosfato (PBS), y las partículas se precipitaron mediante separación por centrifugado durante 5 minutos a 80 × g, y un sobrenadante se transfirió a otro tubo. El sobrenadante se separó de forma centrífuga de nuevo durante 5 minutos a 80 × g, y las partículas restantes se precipitaron, y el sobrenadante se retiró. La primera precipitación por centrifugado y la segunda precipitación por centrifugado se combinaron, y se dispersaron de nuevo en 1 ml de PBS y, de forma similar, se llevó a cabo una tercera operación de centrifugado, y la hormona del crecimiento no encapsulada en las partículas se retiró. Finalmente, la precipitación se dispersó de nuevo en 200 µl de PBS para preparar una solución de administración.

Esta solución se inyectó por vía hipodérmica en el lomo de ratones ICR con la glándula pituitaria extraída de 8 semanas de edad (de Japan SLC), y se tomaron muestras de la sangre a intervalos específicos a partir de la vena caudal. En la sangre muestreada, se añadió heparina de concentración final de 3,3 UI/ml, y se centrifugó durante 5 minutos a 5.000 rpm, y el plasma se recogió, y la concentración de hormona del crecimiento en plasma y la concentración de IGF-1 de ratón se midieron mediante procedimiento de ELISA.

A modo de comparación, una solución de proteínas de hormona del crecimiento humana no granulada (700 µg/0,2 ml) se administró por vía hipodérmica en ratón, y se tomaron muestras de la sangre de forma similar.

Con el fin de suprimir la producción de anticuerpos mediante la administración de hormona del crecimiento humana, que es una proteína extraña para el ratón, tres días antes de la administración de la partícula, un inmunosupresor, hidrato de Tacrolimus (Astellas) se administró por vía hipodérmica a 26 µg/ratón, y seguidamente 13 µg/ratón se administraron por vía hipodérmica en el momento de la administración del fármaco, y dos veces una semana más tarde.

La figura 19 muestra cambios en la evolución temporal de la concentración de hormona del crecimiento humana en

plasma. En el ratón al que se le administró fármaco no granulado, el nivel en sangre 1 hora después de la administración era muy alto y, a continuación, cayó súbitamente, hasta un nivel de un día antes de la administración. Por otro lado, en el ratón al que se le administró el fármaco de micropartícula fabricado utilizando polímero de PEG-PLGA, un aumento de la concentración transitorio justo después de la administración se suprimió a la baja, aproximadamente 1/100 del nivel en el ratón al que se le administró fármaco no granulado, y durante más de nueve días consecutivos después de la administración, el nivel en sangre se mantuvo a niveles elevados.

La figura 20 muestra la concentración de IGF-1 en plasma durante este periodo de tiempo. La concentración de IGF-1 en plasma era elevada después de la administración tanto en micropartículas 5k-55k como micropartículas 5k-105k, y se mantuvieron niveles altos durante 7 días en micropartículas 5k-55k, y más de 14 días en micropartículas 5k-105k.

Ejemplo 30. Administración hipodérmica de micropartículas que encapsulan exendina-4 (agonista del receptor GLP-1) en ratón

Se disolvieron 25 mg de polímero de PEG-PLGA (5k-61k) en el ejemplo 20 en 500 μ l de carbonato de dimetilo para preparar una solución de polímero de 50 mg/ml. En esta solución de polímero, se añadieron 100 μ l de terc-butanol, y se añadieron gota a gota 250 μ l de 10 mg/ml exendina-4 (sintetizada por encargo con Sigma Genosys), y se agitó en vórtice para preparar una emulsión de fase inversa. Esta emulsión de fase inversa se congeló de forma preliminar mediante nitrógeno líquido, y se liofilizó utilizando un aparato de liofilización (EYELA, FREEZE DRYER FD-1000), a temperatura de enfriamiento de la trampa de -45°C , y grado de vacío de 20 Pa, durante 24 horas. El contenido sólido obtenido se dispersó en 1 ml de carbonato de dimetilo para preparar una suspensión S/Ac. Esta suspensión S/Ac se añadió gota a gota en 10 ml de solución acuosa que contenía Pluronic F-68 al 10% (una marca registrada de BASF), y se agitó y se emulsionó en un mezclador en vórtice para preparar una emulsión de tipo S/Ac/Ag. A partir de esta emulsión de tipo S/Ac/Ag, el disolvente orgánico inmiscible en agua se retiró mediante secado en líquido, y se obtuvo un líquido de dispersión de micropartículas. El líquido de dispersión de micropartículas se congeló de forma preliminar mediante nitrógeno líquido, y se liofilizó utilizando un aparato de liofilización (EYELA, FREEZE DRYER FD-1000), a temperatura de enfriamiento de la trampa de -45°C , y grado de vacío de 20 Pa, durante 24 horas, y se obtuvo polvo de micropartículas que encapsulan exendina-4. Las micropartículas obtenidas se observaron mediante un microscopio electrónico de barrido (SEM: HITACHI, S-4800), y se calculó el diámetro de partícula promedio, y el diámetro de partícula promedio de las micropartículas fue 6,0 μ m.

Se suspendieron 300 mg de las micropartículas preparadas y se dispersaron en 3 ml de solución fisiológica tamponada con fosfato (PBS), y las partículas se precipitaron mediante separación por centrifugado durante 5 minutos a $80 \times g$, y un sobrenadante se transfirió a otro tubo. El sobrenadante se separó de forma centrífuga de nuevo durante 5 minutos a $80 \times g$, y las partículas restantes se precipitaron, y el sobrenadante se retiró. La primera precipitación por centrifugado y la segunda precipitación por centrifugado se combinaron, y se dispersaron de nuevo en 1 ml de PBS, y, de forma similar, se llevó a cabo una tercera operación de centrifugado, y la exendina-4 no encapsulada en las partículas se retiró. Finalmente, la precipitación se dispersó de nuevo en 200 μ l de PBS para preparar una solución de administración.

Esta solución se inyectó por vía hipodérmica en dos posiciones en el lomo de ratones Balb/C macho de 10 semanas de vida (de Japan SLC), y se tomaron muestras de la sangre a intervalos de tiempo específicos a partir de la vena caudal. En la sangre muestreada, se añadió heparina de concentración final de 3,3 UI/ml, y se recogió el plasma mediante separación por centrifugado durante 5 minutos a 5.000 rpm, y la concentración de hormona del crecimiento en plasma se midió mediante el procedimiento de ELISA.

A modo de comparación, una solución de exendina-4 no graduada (700 μ g/0,2 ml) se administró por vía hipodérmica en ratón, y se tomaron muestras de la sangre de forma similar.

Con el fin de suprimir la producción de anticuerpos mediante administración de exendina-4, que es una proteína distinta para ratón, tres días antes de la administración de la partícula, un inmunosupresor, hidrato de Tacrolimus (Astellas), se administró por vía hipodérmica a una dosis de 26 μ g/ratón, y seguidamente se administraron 13 μ g/ratón por vía hipodérmica en el momento de la administración del fármaco, y dos veces una semana más tarde.

La figura 21 muestra cambios en la evolución temporal de la concentración de exendina-4 en plasma. En el ratón al que se le administró fármaco no granulado, el nivel en sangre 1 hora después de la administración era muy alto y, a continuación, cayó súbitamente, hasta un nivel de un día antes de la administración. Por otro lado, en el ratón al que se le administró el fármaco de micropartícula preparada utilizando polímero de PEG-PLGA, un aumento transitorio del nivel en sangre justo después de la administración se suprimió a aproximadamente menos de 1/100, y el nivel en sangre se mantuvo a niveles elevados durante un mes.

Ejemplo 31. Preparación de micropartículas que encapsulan dextrano marcado con fluoresceína (FD40) con diámetro de partícula diferente

5 Se disolvieron 5 mg de polímero de PEG-PLGA (5k-55k) en el ejemplo 20 en 100 μ l de carbonato de dimetilo para preparar una solución de polímero de 50 mg/ml. En esta solución de polímero, se añadieron 20 μ l de terc-butanol, y se añadieron gota a gota 20 μ l de solución acuosa de 1 mg/ml de FD40, y se agitó en vórtice para preparar una emulsión de fase inversa. Esta emulsión de fase inversa se congeló de forma preliminar mediante nitrógeno líquido, y se liofilizó utilizando un aparato de liofilización (EYELA, FREEZE DRYER FD-1000), a temperatura de enfriamiento de la trampa de -45°C, y grado de vacío de 20 Pa, durante 24 horas. El contenido sólido obtenido se dispersó en 50
10 μ l, 200 μ l y 500 μ l de carbonato de dimetilo para preparar una suspensión S/Ac. Esta suspensión S/Ac se añadió gota a gota en 2 ml de solución acuosa que contenía Pluronic F-68 al 10% (una marca registrada de BASF), y se agitó y se emulsionó en un mezclador en vórtice para preparar una emulsión de tipo S/Ac/Ag. A partir de esta emulsión de tipo S/Ac/Ag, el disolvente orgánico inmiscible en agua se retiró mediante secado en líquido, y se obtuvo un líquido de dispersión de micropartículas. El líquido de dispersión de micropartículas se congeló de forma preliminar mediante nitrógeno líquido, y se liofilizó utilizando un aparato de liofilización (EYELA, FREEZE DRYER FD-1000), a temperatura de enfriamiento de la trampa de -45°C, y grado de vacío de 20 Pa, durante 24 horas, y se obtuvo polvo de micropartículas que encapsulan FD40. Las micropartículas obtenidas se observaron mediante un microscopio electrónico de barrido (SEM: HITACHI, S-4800), y se calculó el diámetro de partícula promedio.

20 La figura 22 muestra la correlación entre el diámetro de partícula promedio y la cantidad de carbonato de dimetilo añadida en el momento de la preparación de emulsión de tipo S/Ac/Ag. En un intervalo de 50 μ l a 500 μ l, junto con el aumento de cantidad de carbonato de dimetilo, se observó declive del diámetro de partícula promedio.

25 **APLICABILIDAD INDUSTRIAL**

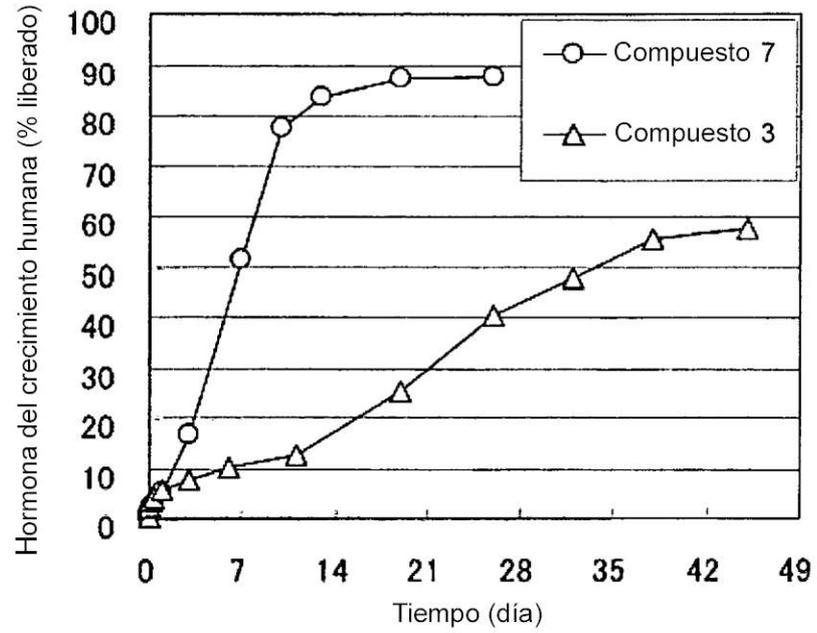
Una micropartícula de la presente invención libera una sustancia activa hidrófila a una velocidad apropiada en el cuerpo humano, y es útil como preparación farmacéutica de sistema de administración de fármacos (DDS).

30

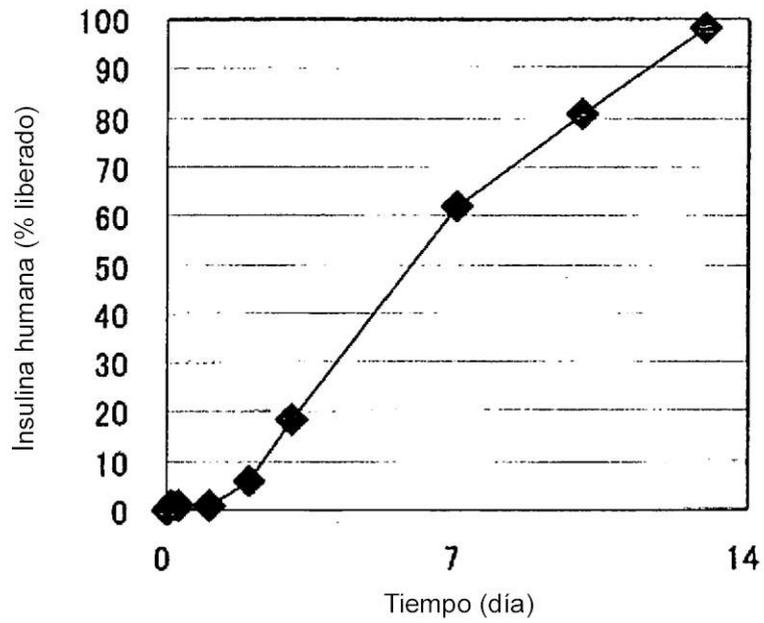
REIVINDICACIONES

- 5 1. Micropartícula, que comprende un aglomerado de partículas que contienen sustancia activa hidrófila, partícula que comprende un polímero anfífilo compuesto por un segmento hidrófobo de poli(hidroxiácido) y un segmento hidrófilo de polisacárido o polietilenglicol, y una sustancia activa hidrófila, y en la que el número de aglomeración de dichas partículas está en el intervalo de 10 a la séptima potencia de 10.
- 10 2. Micropartícula, según la reivindicación 1, en la que la partícula que contiene sustancia activa hidrófila tiene un segmento hidrófilo de polímero anfífilo en el interior, y tiene una capa externa de un segmento hidrófobo de polímero anfífilo.
- 15 3. Micropartícula, según la reivindicación 1 ó 2, en la que el polímero anfífilo es un polímero anfífilo de tipo injerto compuesto por una cadena principal de polisacárido y una o varias cadenas de injerto de poli(hidroxiácido).
4. Micropartícula, según la reivindicación 3, en la que la cadena principal de polisacárido es dextrano.
5. Micropartícula, según la reivindicación 1 ó 2, en la que el polímero anfífilo es un polímero de bloques compuesto por polietilenglicol y poli(hidroxiácido).
- 20 6. Micropartícula, según la reivindicación 5, en la que el peso molecular promedio del polietilenglicol es de 2.000 a 15.000.
- 25 7. Micropartícula, según la reivindicación 5 ó 6, en la que la relación del peso molecular promedio de poli(hidroxiácido) respecto al peso molecular promedio de polietilenglicol es de 4 o más.
8. Micropartícula, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el poli(hidroxiácido) es poli(ácido láctico-ácido glicólico).
- 30 9. Micropartícula, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que el diámetro de partícula promedio es de 1 a 50 μm .
10. Micropartícula, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la sustancia activa hidrófila es un péptido o una proteína.
- 35 11. Procedimiento para fabricar una micropartícula, que comprende:
 (a) una etapa de formar una emulsión de fase inversa mezclando un disolvente acuoso que contiene la sustancia activa hidrófila y un disolvente orgánico inmiscible en agua que disuelve un polímero anfífilo,
 (b) una etapa de obtener un contenido sólido que contiene una sustancia activa hidrófila retirando el disolvente de la emulsión de fase inversa, y
 40 (c) una etapa de introducir un líquido de dispersión que contiene el contenido sólido en una fase líquida que contiene un modificador de superficie.
12. Procedimiento, según la reivindicación 11, en el que el disolvente se retira de la emulsión de fase inversa mediante un procedimiento de liofilización.
- 45 13. Procedimiento, según la reivindicación 11 ó 12, en el que el medio de dispersión del líquido de dispersión que contiene el contenido sólido es un disolvente capaz de disolver poli(hidroxiácido) y que es 10 mg/ml o menos en la solubilidad de un segmento hidrófilo para componer un polímero anfífilo.
- 50 14. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que la fase líquida es un disolvente acuoso o bien un disolvente orgánico miscible en agua.
15. Preparación farmacéutica que comprende la micropartícula, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
- 55

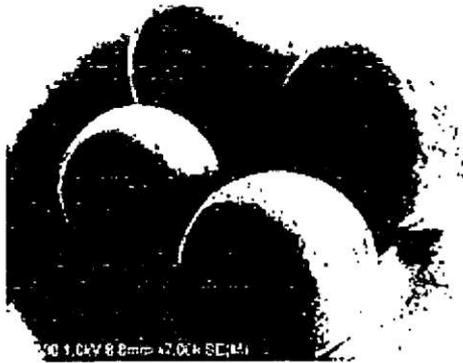
[Fig. 1]



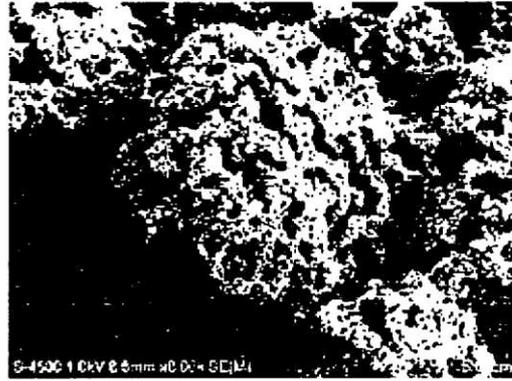
[Fig. 2]



[Fig. 3]



Justo después de la preparación



13 días más tarde

[Fig. 4]

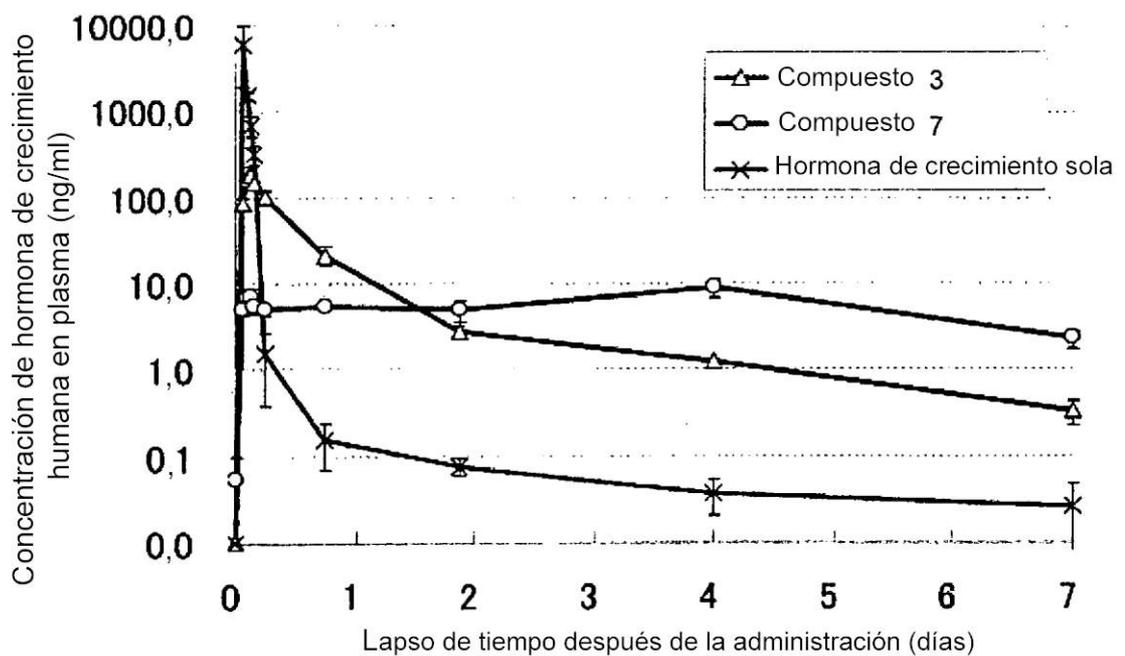


Justo después de la preparación

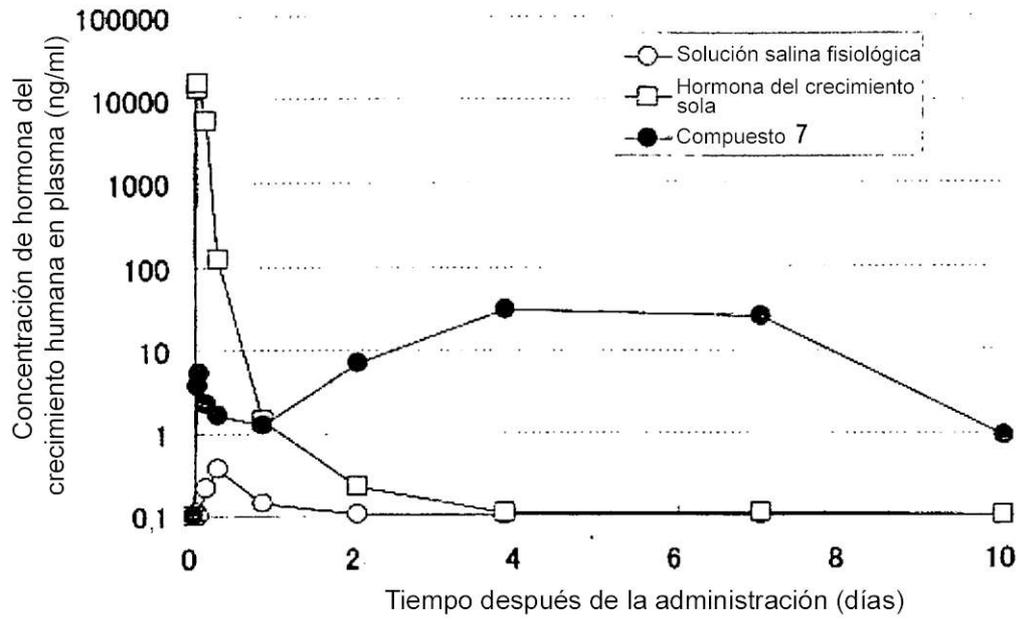


21 días más tarde

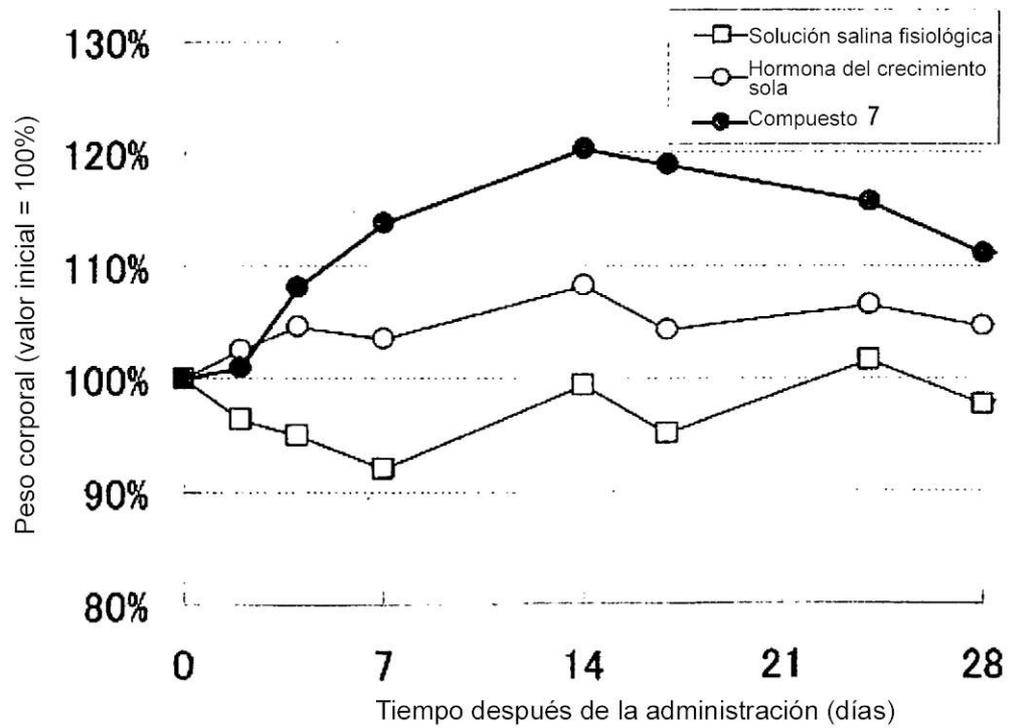
[Fig. 5]



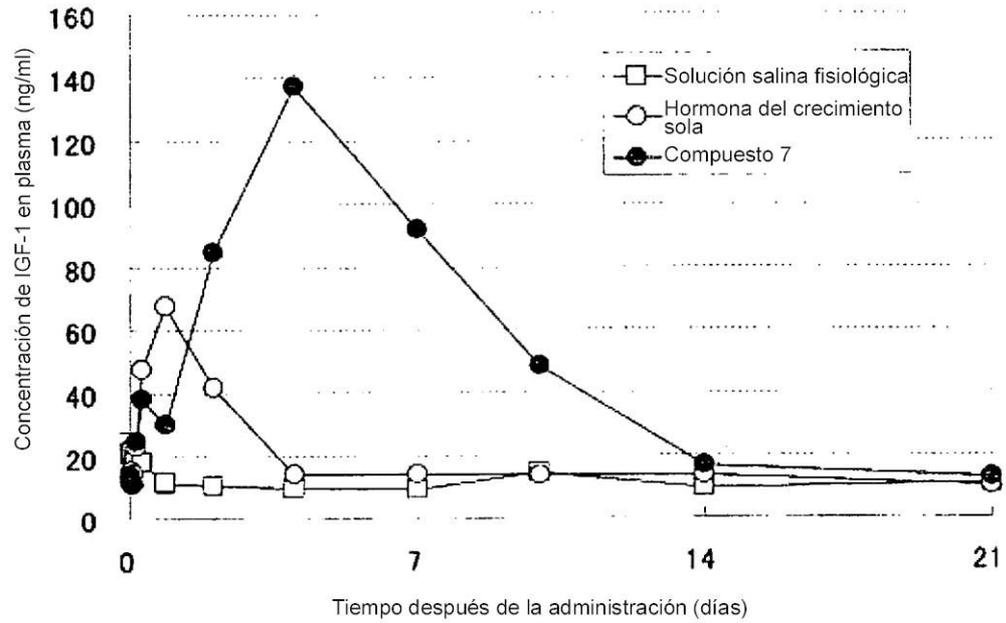
[Fig. 6]



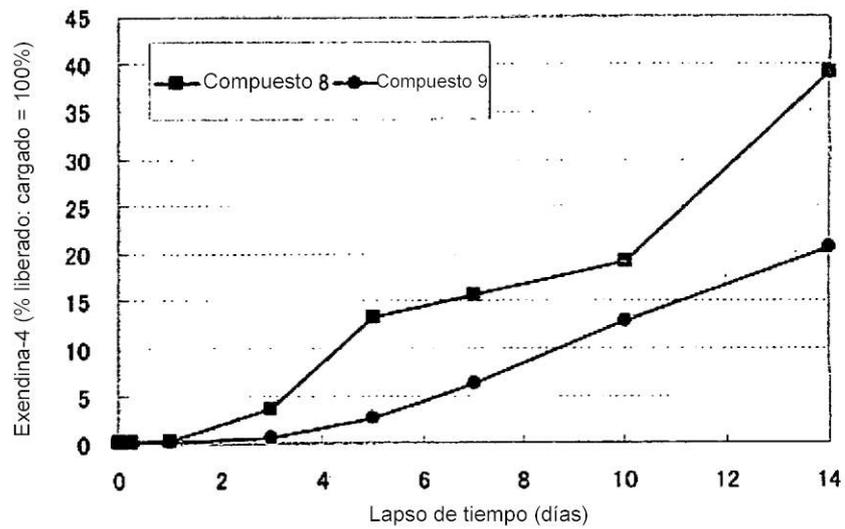
[Fig. 7]



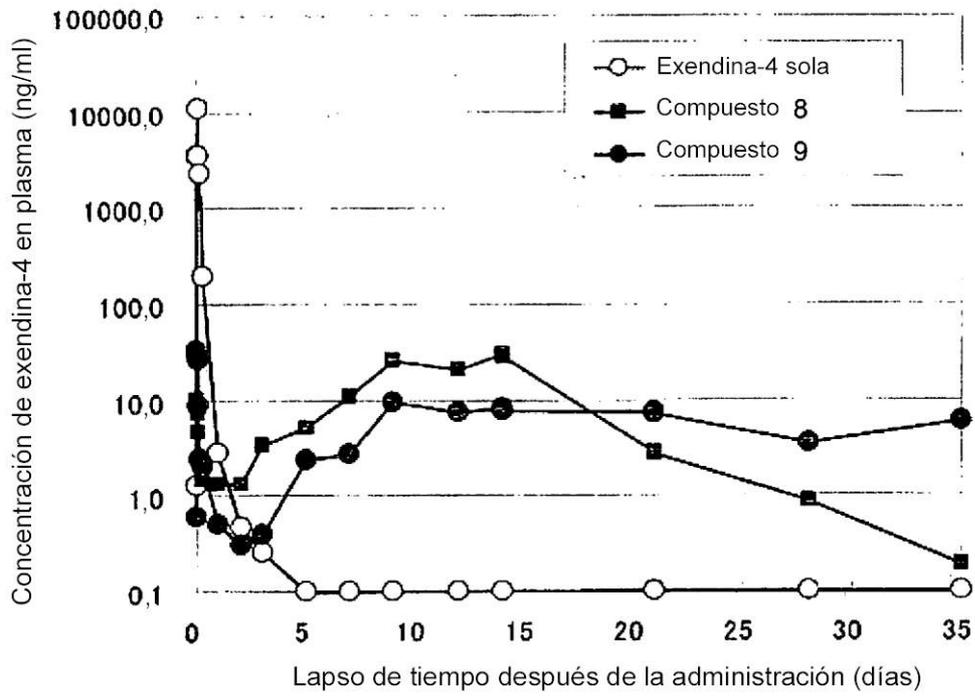
[Fig. 8]



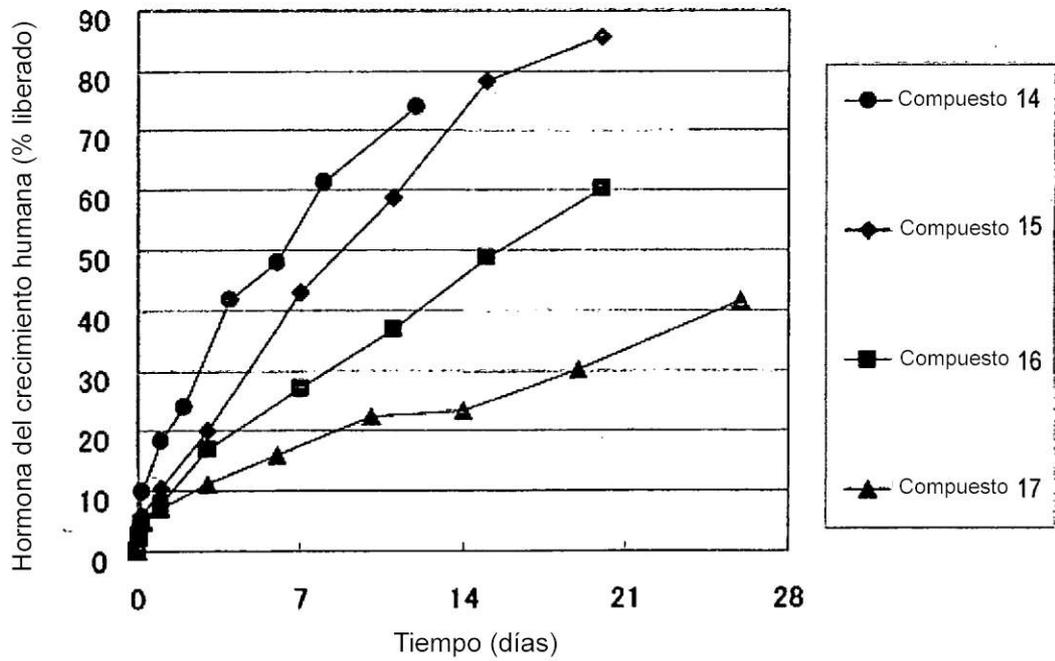
[Fig. 9]



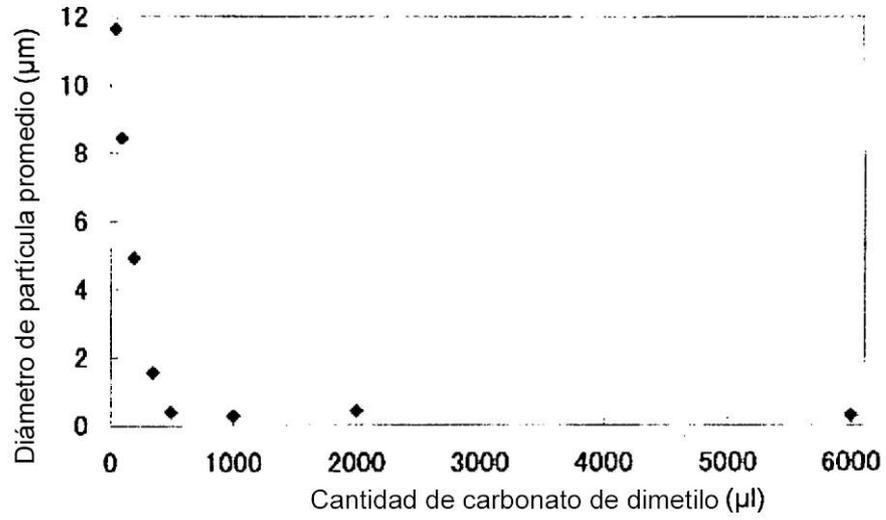
[Fig. 10]



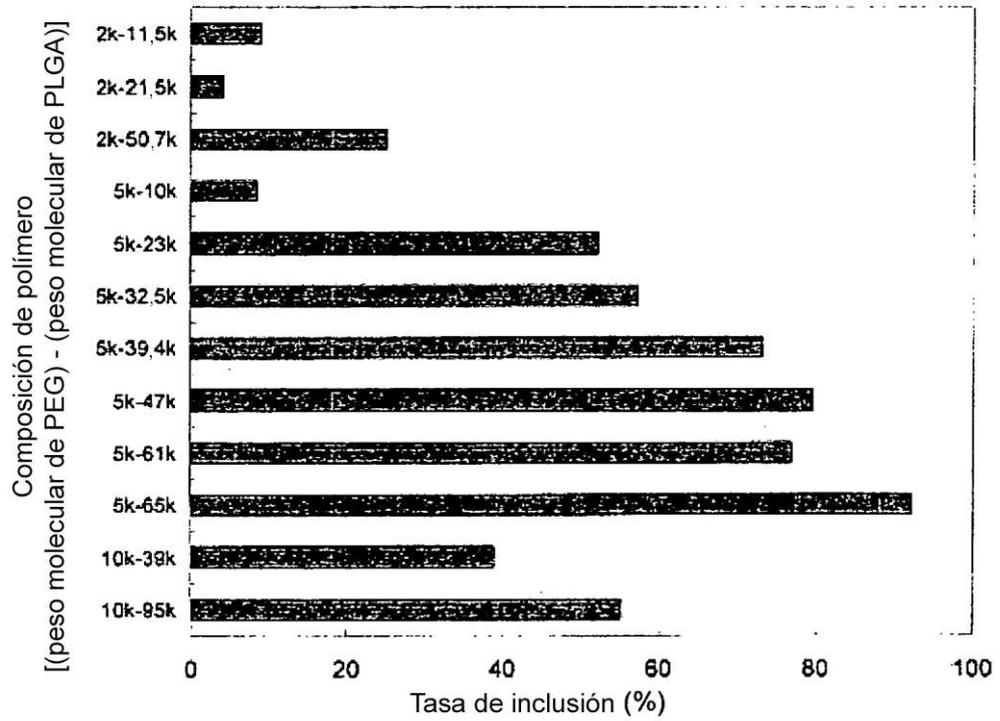
[Fig. 11]



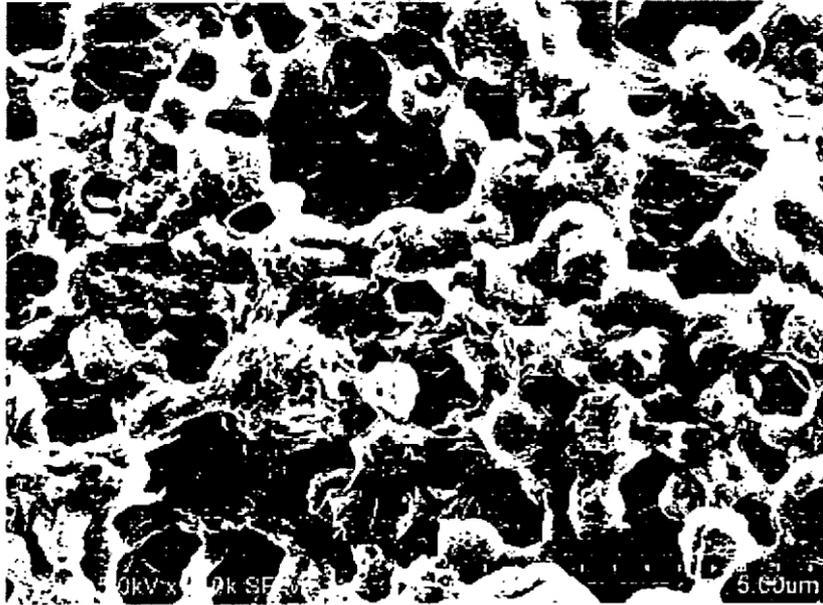
[Fig. 12]



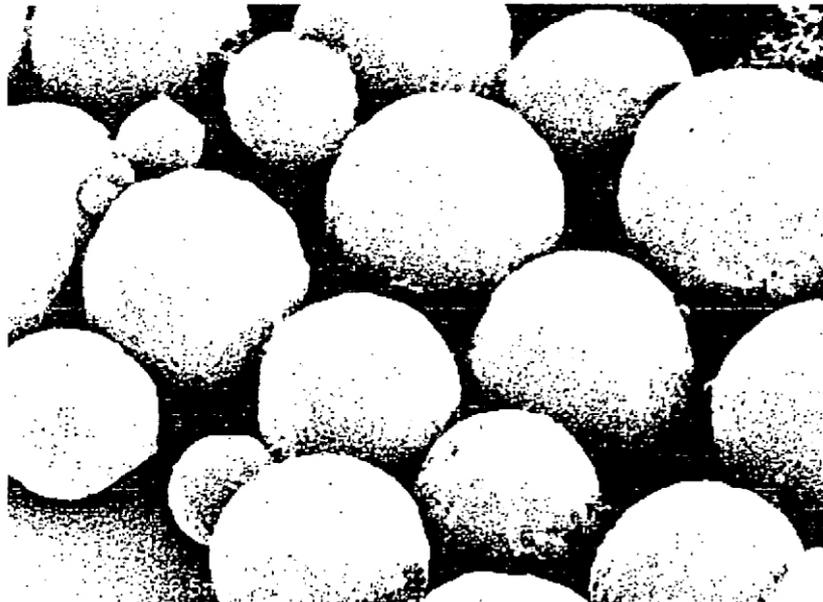
[Fig. 13]



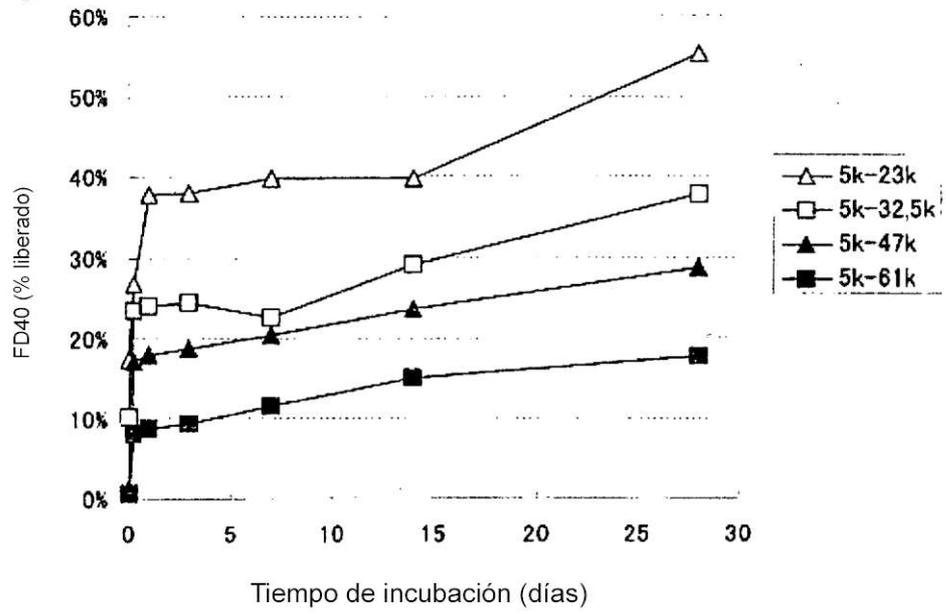
[Fig. 14]



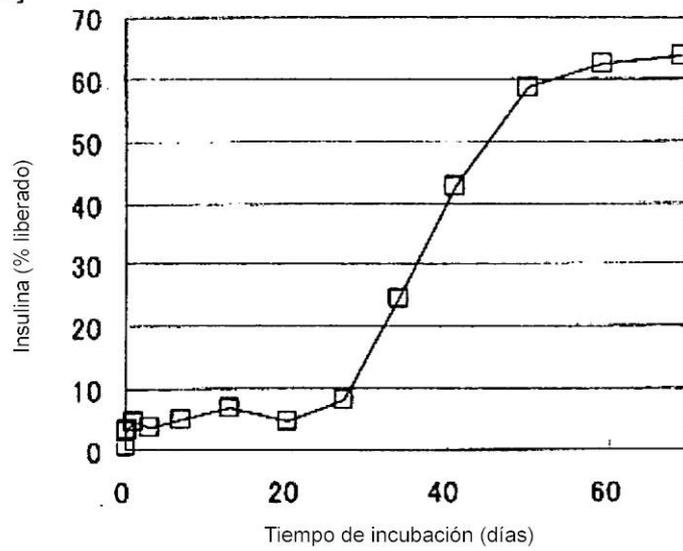
[Fig. 15]



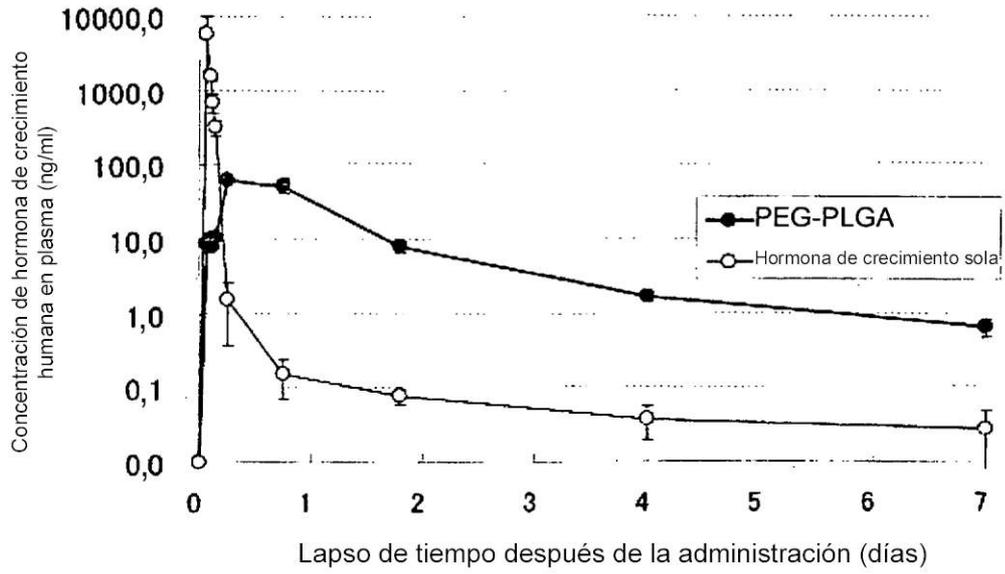
[Fig. 16]



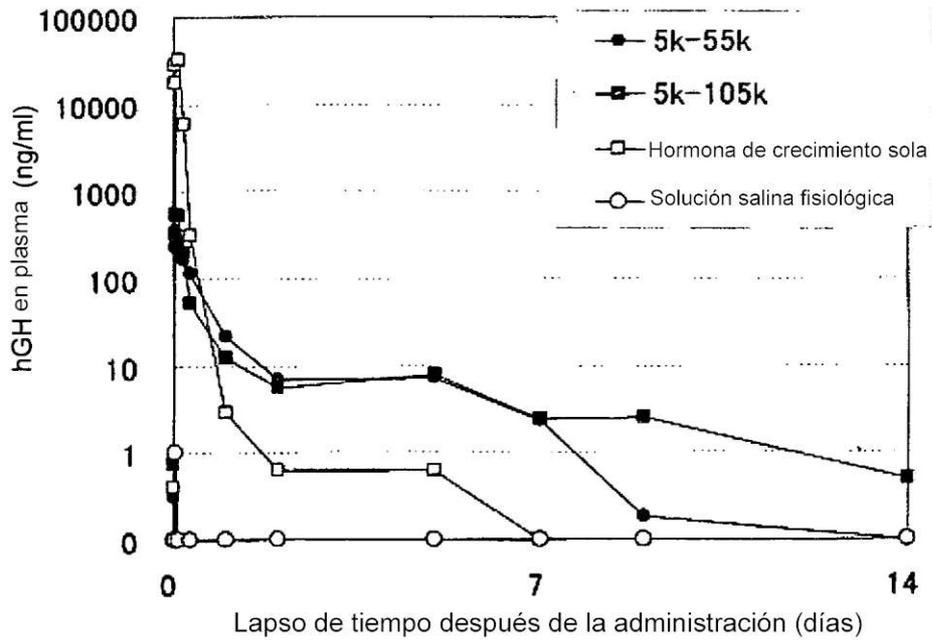
[Fig. 17]



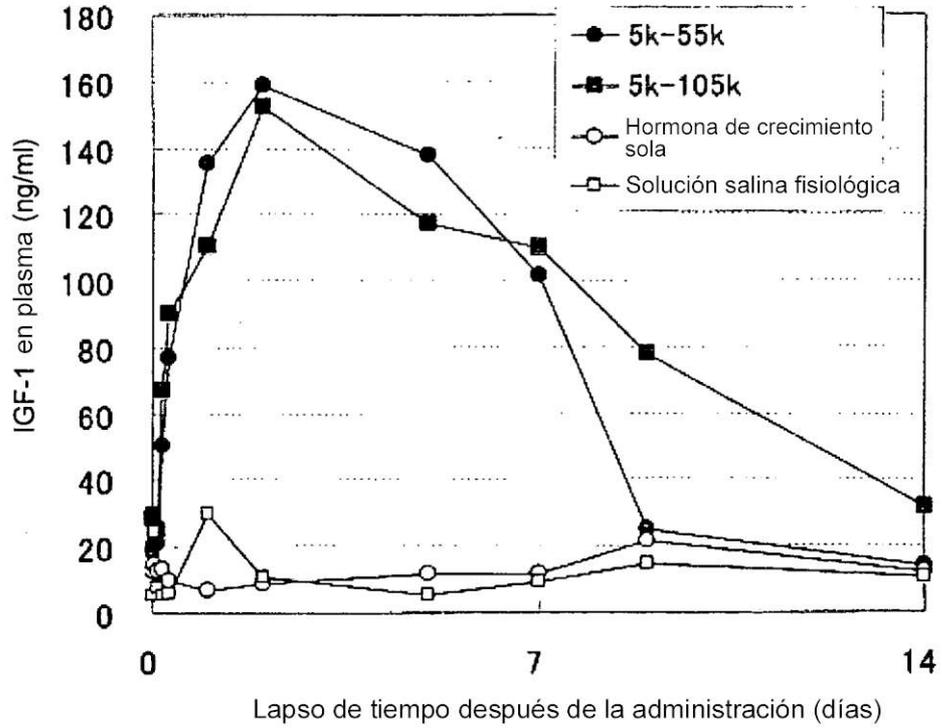
[Fig. 18]



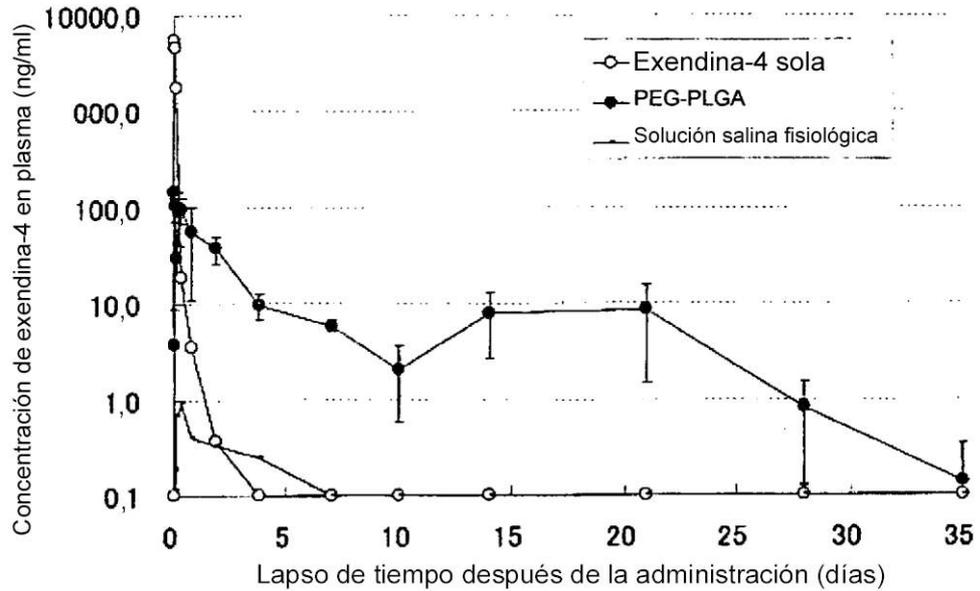
[Fig. 19]



[Fig. 20]



[Fig. 21]



[Fig. 22]

