

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 642 920**

51 Int. Cl.:

A61K 9/16 (2006.01)

A61K 38/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.03.2014** **E 14160555 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.07.2017** **EP 2781213**

54 Título: **Procedimiento de preparación de microesferas usando un polímero que tiene propiedad de transición sol-gel**

30 Prioridad:

20.03.2013 KR 20130029999

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

20.11.2017

73 Titular/es:

**CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)
330, Dongho-ro, Jung-gu
Seoul 100-400, KR**

72 Inventor/es:

**KIM, YI MI;
PARK, YOUNG JOON;
BAEK, SEUNG HEE y
LIM, SUN KYUNG**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 642 920 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).

DESCRIPCION

Procedimiento de preparación de microesferas usando un polímero que tiene propiedad de transición sol-gel

Campo técnico

- La presente invención se refiere a un procedimiento de preparación de microesferas usando un polímero que tiene una propiedad de transición sol-gel y microesferas preparadas de este modo y, más particularmente, a un procedimiento de preparación de microesferas usando un polímero que tiene una propiedad de transición sol-gel y microesferas preparadas de este modo capaces de impedir que un disolvente en una solución polimérica para un portador se difunda rápidamente en el medio acuoso durante la formación de las microesferas para reducir la porosidad de las microesferas y reducir la rugosidad superficial de las microesferas con el fin de obtener microesferas que tienen forma esférica y para aumentar la relación de encapsulación de una sustancia bioactiva utilizando un polímero que tiene una propiedad de transición sol-gel como un surfactante incluido en un medio acuoso en el que se inyecta una emulsión primaria y gelifica una emulsión secundaria formada después de inyectar la emulsión primaria usando la propiedad de transición sol-gel del polímero utilizado como surfactante.

Técnica antecedente

- Como técnicas de preparación de partículas, los procedimientos generales de preparación incluyen un procedimiento de doble emulsión (W/O/W), un procedimiento de separación de fases, un procedimiento de secado por aspersión, un procedimiento de fluido supercrítico (FSC) y similares. En los últimos años, se ha desarrollado un procedimiento de preparación de partículas monodispersadas mediante el cual se pueden preparar partículas uniformes.
- Un ejemplo representativo del procedimiento de doble emulsión incluye un procedimiento de preparación de partículas finas, que incluye formar una emulsión primaria disolviendo un portador biodegradable en un disolvente y disolviendo un fármaco soluble en agua en una fase acuosa, y luego formando partículas mediante inyección de la emulsión primaria en una solución secundaria en la que se disuelve alcohol polivinílico (APV). La corporación Takeda registró la patente (US 4652441) con respecto al procedimiento de doble emulsión, y se presentaron muchas otras patentes relacionadas con el procedimiento de doble emulsión después de la producción y comercialización en masa. En particular, se han desarrollado procedimientos de preparación de partículas finas cuya relación de encapsulación se mejora de acuerdo con un fármaco y que exhiben un control de liberación inicial optimizando la composición, peso molecular, cambio en el grupo terminal y similares, de un polímero que configura las partículas finas y han sido conocidos como los procedimientos más adecuados hasta la fecha con el fin de encapsular el fármaco soluble en agua. Sin embargo, como desventajas, las partículas exhiben porosidad debido a la temperatura, concentración y velocidad de agitación durante el procedimiento de preparación, lo que conduce a un aumento en la proporción inicial de liberación de fármaco y una disminución en la relación de encapsulación del fármaco. Además, como disolvente que disuelve el polímero, se utiliza cloruro de metileno que tiene una alta toxicidad y su solubilidad en agua es tan baja como 20 g/l (20 °C). Dado que se necesita utilizar un disolvente orgánico que tenga baja solubilidad en agua para encapsular eficazmente el fármaco soluble en agua, los disolventes que pueden seleccionarse para disolver el polímero son limitados.

- Con respecto al procedimiento de separación de fases, se presentó primero una patente (US 4460563) en 1984, y sus productos relacionados incluyen Somatulina LA. El procedimiento de separación de fases es un procedimiento de preparación que incluye la formación de la emulsión primaria en un coacervado con aceite de silicio y similares y luego la formación de partículas mediante curado del polímero. En los últimos años, una tendencia técnica del procedimiento de separación de fases es controlar el tamaño de partícula, la relación de encapsulación y similares de las partículas finas de acuerdo con los cambios en el pH, la temperatura y las composiciones del coacervado. El procedimiento de separación de fases tiene la ventaja de que el tamaño de las partículas puede controlarse solo controlando una composición química sin necesidad de instalaciones especializadas. Sin embargo, tiene la desventaja de que se necesita utilizar una gran cantidad de disolvente, y tiene muchos parámetros cuando se forma el coacervado.

- El procedimiento de secado por aspersión es un procedimiento para formar partículas finas mediante aspersión de una emulsión primaria en aire caliente. Un procedimiento fue desarrollado por Alkermes Corporation en el que la emulsión primaria se rocía en aire caliente para compensar la desventaja de que existe una limitación en el uso de fármacos encapsulados, se detiene mediante LN2 y se extrae con etanol. Después del desarrollo del procedimiento de secado por liofilización, se han desarrollado hasta ahora técnicas similares. Se han desarrollado diversas formas de boquillas de aspersión, y también pueden formarse partículas finas y uniformes utilizando un atomizador, un electrodo, un sonicador y similares. El procedimiento de secado por aspersión tiene la ventaja de que las partículas pueden ser producidas fácilmente en masa, pero tiene el inconveniente de que es difícil formar partículas esféricas y la emulsión primaria necesita ser rociada en aire caliente excepto en el procedimiento de secado por liofilización.

El procedimiento de extracción de fluido supercrítico (FSC) es una técnica de aspersión de la emulsión primaria con un fluido supercrítico usando un fluido supercrítico representativo CO₂ como antidisolvente. El procedimiento de extracción de FSC tiene la ventaja de que es ecológico y no requiere de un procedimiento adicional de eliminación de un disolvente residual y similares, pero tiene la desventaja de que es difícil controlar la distribución del tamaño de partícula durante la producción en masa.

Cuando las partículas se preparan usando un procedimiento de doble emulsión convencional, la etapa de formar partículas inyectando la emulsión primaria en el medio acuoso y difundiendo el disolvente usado en la emulsión primaria en el medio acuoso es muy importante en la preparación de las partículas. En la etapa, se determinan el tamaño de partícula, la porosidad, la rugosidad superficial, la relación de encapsulación y similares de las partículas finas de acuerdo con la velocidad del disolvente que se difunde en el medio acuoso. La velocidad de difusión del disolvente se determina de acuerdo con el tipo de disolvente, la solubilidad en agua del disolvente, la temperatura del medio acuoso y la clase, concentración, velocidad de agitación y similares de un surfactante que configura el medio acuoso.

En la etapa anterior, con el fin de aumentar la velocidad a la cual se difunde el disolvente en el medio acuoso, puede usarse un procedimiento de selección de un disolvente que tiene una alta solubilidad en agua, el aumento de la temperatura del medio acuoso, la reducción de la concentración del surfactante que configura el medio acuoso, o similares. Cuando se incrementa la velocidad de difusión del disolvente, se acorta el tiempo de curado del polímero que constituye el portador y, por lo tanto, aumenta la porosidad de las partículas, el tamaño de partícula es relativamente grande y la relación de encapsulación disminuye. Como resultado, un disolvente que tiene una alta solubilidad en agua tal como acetato de etilo se difunde en el medio acuoso a una velocidad rápida, dando como resultado dificultad en la formación de una forma esférica, una baja relación de encapsulación y la formación fácil de partículas porosas. Por consiguiente, cuando se usa el disolvente que tiene alta solubilidad en agua, la concentración del medio acuoso se incrementa o se disminuye la temperatura para evitar que el disolvente se difunda al medio acuoso a una velocidad rápida. En el documento US 6.565.777, se describe un procedimiento de etapas múltiples para preparar partículas finas usando acetato de etilo. Este es un procedimiento para formar partículas reduciendo inicialmente el volumen del medio acuoso para impedir que el acetato de etilo se difunda en el medio acuoso a una velocidad rápida antes de formar las partículas finas y luego evaporar el disolvente residual diluyendo las partículas con una gran cantidad de medio acuoso. Sin embargo, es desventajoso en que el rendimiento se reduce hasta 10 a 20 %. Por consiguiente, con el fin de formar las partículas mediante diversos procedimientos sin limitar el disolvente, la demanda por una técnica capaz de controlar el tiempo de difusión del disolvente es muy alta.

Con el fin de curar el polímero y difundir el disolvente en el medio acuoso, generalmente se lleva a cabo un procedimiento de agitación. El procedimiento de agitación incluye procedimientos tales como agitación a temperatura ambiente, agitación con calentamiento, agitación con presión, y similares. En el caso de agitación a temperatura ambiente, el tiempo de agitación durante la producción en masa se incrementa y se libera un fármaco soluble en agua después de agitar durante un largo tiempo, lo que conduce a una disminución de la relación de encapsulación. Durante la agitación con calentamiento, se incrementa la velocidad de curado del polímero y se reduce el tiempo de agitación, pero el polímero presenta porosidad y disminuye su contenido. Durante la agitación a presión, el disolvente se difunde en el medio acuoso y se evapora simultáneamente por presión, y por lo tanto el disolvente se puede evaporar en un tiempo rápido, y se pueden preparar partículas finas apropiadas según las directrices sobre disolventes residuales en productos farmacéuticos. Sin embargo, durante la agitación a presión, cuando el volumen de reacción es grande, es difícil alcanzar un vacío deseado y el grado de vacío disminuye, y el polímero necesita ser tratado cuidadosamente para evitar la formación de burbujas en el disolvente durante la agitación bajo el control del vacío. Particularmente, cuando se incluye el surfactante, el fenómeno de burbujeo es más grave y, por tanto, es necesario mantener las condiciones para controlar una presión de vacío. Con el fin de resolver estos problemas, en el documento US 7.029.700, se usó un procedimiento de enfriamiento del medio acuoso completo y eliminación del disolvente bajo despresurización. Además, en el documento US 6.020.004, se divulga un procedimiento de preparación para obtener microesferas por enfriamiento y liofilización de la emulsión primaria. El documento WO 9852547 A1 divulga un procedimiento w/o/w de preparación de microesferas de quitosano, que usa glutaraldehído como un agente de entrecruzamiento en la emulsión secundaria.

Bajo los antecedentes, los presentes inventores han confirmado que se pueden obtener microesferas que tienen una forma esférica usando un polímero que tiene una propiedad de transición sol-gel como un surfactante incluido en un medio acuoso en el que se inyecta una emulsión primaria con el fin de gelificar una emulsión secundaria formada después de inyectar la emulsión primaria, evitando así que un disolvente en una solución polimérica para un portador se difunda rápidamente en el medio acuoso durante la formación de las microesferas para reducir la porosidad de las microesferas y reducir la rugosidad superficial de las microesferas, y se pueda también lograr fácilmente una alta relación de encapsulación de las microesferas sin restricción a la selección del disolvente u otra agitación o evaporación del disolvente. Por lo tanto, se ha completado la presente invención basándose en estos hechos. Además, en el procedimiento de preparación de microesferas de acuerdo con la presente invención, ya que se puede obtener una cantidad deseada de microesferas en una relación de bajo volumen de la emulsión secundaria con respecto a la emulsión primaria, se puede mejorar la eficiencia del procedimiento innovador mediante una

reducción del volumen de reacción.

Divulgación

Problema técnico

5 Un objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento de preparación de microesferas capaces de obtener partículas finas que tengan una forma esférica, e incrementar una relación de encapsulación de una sustancia bioactiva.

Se divulgan microesferas preparadas por el procedimiento de preparación.

Otra divulgación adicional es un sistema de suministro de fármacos que contiene las microesferas como un componente activo.

10 Solución técnica

Con el fin de resolver los problemas de la técnica anterior, la presente invención proporciona un procedimiento de preparación de microesferas en las que una sustancia bioactiva está encapsulada en un polímero para un portador. Aquí, el procedimiento incluye las siguientes etapas:

15 1) formar una emulsión secundaria inyectando una emulsión primaria, en la cual la sustancia bioactiva y el polímero para un portador se mezclan, en un medio acuoso en el que se disuelve un polímero que tiene una propiedad de transición sol-gel (Etapas 1); y

2) realizar una reacción de gelificación sobre la emulsión secundaria (Etapas 2).

Preferiblemente, el procedimiento de preparar microesferas puede incluir además la eliminación de un disolvente residual y un medio acuoso y recolectar las microesferas después de la Etapa 2) (Etapas 3).

20 La presente invención se caracteriza porque puede impedirse que un disolvente en una solución polimérica para un portador se difunda rápidamente al medio acuoso durante la formación de las microesferas para reducir la porosidad de las microesferas y reducir la rugosidad superficial de las microesferas con el fin de para obtener microesferas que tengan una forma de esfera, y se pueda aumentar una relación de encapsulación de una sustancia bioactiva, utilizando un polímero que tiene una propiedad de transición sol-gel como un surfactante incluido en un medio acuoso en el que se inyecta una emulsión primaria y gelifica una emulsión secundaria formada después de inyectar la emulsión primaria utilizando la propiedad de transición sol-gel del polímero utilizado como surfactante.

Además, la presente invención tiene el efecto de que no hay limitación al disolvente porque cualquier disolvente que tenga alta solubilidad en agua se puede usar utilizando un procedimiento de gelificación de la emulsión secundaria como se ha descrito anteriormente.

30 Además, la presente invención se caracteriza porque el disolvente residual y el medio acuoso pueden ser eliminados a una velocidad rápida evaporando completamente el disolvente residual y el medio acuoso, por ejemplo, usando un procedimiento de secado al vacío y similares, sin un procedimiento de agitación durante la etapa de eliminación del disolvente residual y el medio acuoso después de la gelificación y el medio acuoso mismo puede usarse opcionalmente mediante el secado completo del medio acuoso sin un procedimiento de lavado.

35 Además, puesto que el disolvente se evapora a una velocidad rápida sin agitación, se puede lograr una excelente relación de encapsulación a pesar del pequeño volumen de reacción. Debido a una reducción significativa en el volumen de reacción, la presente invención puede aplicarse fácilmente a la producción en masa.

Además, la presente invención tiene el efecto de controlar el tamaño de las partículas mediante el control de la concentración de un polímero surfactante que tiene una propiedad de transición sol-gel incluida en el medio acuoso.

40 Como etapa de formación de la emulsión secundaria por inyección de la emulsión primaria, en la que la sustancia bioactiva y el polímero para el portador se mezclan, en el medio acuoso en el que se disuelve el polímero que tiene la propiedad de transición sol-gel, la Etapa 1 es formar la emulsión secundaria inyectando la emulsión primaria que incluye la sustancia bioactiva y el polímero para el portador en la solución en la que se disuelve el polímero que tiene la propiedad de transición sol-gel como surfactante en el medio acuoso.

45 El término "sustancia bioactiva" usado en la presente invención significa un material que sirve para rectificar una condición anormal causada debido a deficiencia o secreción excesiva de un material implicado en la regulación

funcional *in vivo*, como material para mejorar o suprimir las funciones de un cuerpo vivo cuando los organismos manejan sus vidas.

En la presente invención, la sustancia bioactiva puede ser al menos una seleccionada del grupo que consiste en homólogos de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH), péptidos y sales de los mismos. En forma detallada, entre las sustancias bioactivas, pueden usarse como antagonistas goserelina, acetato de leuprolida, triptorelina, buserelina, nafarelina y similares como agonistas de los homólogos de LHRH, y cetorelix, argitida y similares. Además, tanto los fármacos solubles en agua como los insolubles en agua, tales como proteínas, ADN y fármacos químicos, pueden usarse como la sustancia bioactiva sin limitación. Además, las sustancias bioactivas pueden usarse solas o en una combinación de dos o más de las mismas.

De acuerdo con la presente invención, puesto que el disolvente de la solución polimérica para el portador se controla para ser dispersado en el medio acuoso por la reacción de gelificación como se ha descrito anteriormente, la clase de disolventes utilizados para disolver el polímero para el portador no está particularmente limitada. Por ejemplo, en la presente invención, la emulsión primaria puede prepararse disolviendo el polímero para el portador en al menos un disolvente seleccionado del grupo que consiste en cloruro de metileno, cloroformo, acetronitrilo, dimetilsulfóxido, dimetilformamida y acetato de etilo, pero la presente invención no está limitada a los mismos.

El término "polímero para el portador" utilizado en la presente invención significa un polímero que sirve para transportar la sustancia bioactiva con el fin de liberar la sustancia bioactiva.

En la presente invención, como polímero para el portador, se pueden usar polímeros generales. Preferiblemente, el polímero para el portador puede ser un polímero biodegradable. En detalle, el polímero para el portador puede ser al menos uno seleccionado del grupo que consiste en poliéster tal como poliláctido (PLA), poliglicólido (PGA), poliláctido-co-glicólido (PLGA), poliortoéster, polianhídrido, poliaminoácido, poliactal, policianoacrilato, policaprolactona, polidioxanona, alquilato de polialquileño y similares, pero el presente no está limitado a los mismos.

En la presente invención, los ejemplos del medio acuoso utilizable en la Etapa 1) pueden incluir agua, pero no se limitan a agua, siempre que pueda disolver el fármaco.

Generalmente, un surfactante se añade a la emulsión secundaria para un procedimiento de doble emulsión para facilitar la formación de las partículas. Más típicamente, se puede tomar como ejemplo el alcohol polivinílico que es un surfactante no iónico. Pueden usarse polisorbato, poloxámero, polietilenglicol y similares, pero la presente invención no está limitada a los mismos. En la presente invención, se desarrolló un procedimiento de preparación que incluye formar partículas usando el polímero que tiene la propiedad de transición sol-gel como surfactante en lugar de un surfactante general y gelificar las partículas para evaporar rápidamente el disolvente. Generalmente, cuando se inyecta la emulsión primaria en la emulsión secundaria, el polímero para el portador se cura a una velocidad rápida y un volumen de la emulsión secundaria necesita alcanzar de 100 a 200 veces o más un volumen de la emulsión primaria con el fin de evaporar el disolvente. Cuando la relación de volumen es baja, la velocidad de curado del polímero para el portador disminuye, y la eficiencia de encapsulación del fármaco disminuye en consecuencia. En la presente invención, la relación en volumen es de aproximadamente 10 a 20 veces, pero puesto que la emulsión secundaria se gelifica de tal manera que el disolvente se evapora a una velocidad rápida sin agitar, aunque el volumen de reacción es pequeño, aumenta la eficiencia de encapsulación.

El término "polímero que tiene la propiedad de transición de sol-gel" usado en la presente invención significa un polímero en el que un estado de sol se convierte en un estado de gel por estímulos específicos. Los estímulos específicos pueden variar de acuerdo con el tipo de polímeros, y pueden incluir, por ejemplo, un cambio de temperatura, un cambio de presión, un cambio en pH o adición de sales, y similares, pero la presente invención no está limitada a los mismos.

En la presente invención, el polímero que tiene la propiedad de transición sol-gel puede utilizarse sin limitación, siempre y cuando pueda permitir la transición sol-gel y facilitar la formación de las partículas. En detalle, el polímero que tiene la propiedad de transición sol-gel puede ser al menos uno seleccionado del grupo que consiste en metil celulosa, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), etilhidroxietilcelulosa (EHEC), xiloglucano, quitosano, poli(N-isopropilamida) (PNIPAM), poli(ácido N-isopropilamida-co-acrílico), poloxámero (PEO-PPO-PEO), Poloxámero-g-PAA, PAA-g-poloxámero, PEO-PLGA-PEO y alcohol polivinílico.

Como la etapa de realización de la reacción de gelificación con respecto a la emulsión secundaria, la Etapa 2) es gelificar la emulsión secundaria con el fin de reducir la velocidad de difusión del disolvente difundido en el medio acuoso.

En la Etapa 2), la solubilidad del disolvente se disminuye rápidamente por gelificación de la emulsión secundaria y, por tanto, las partículas pueden formarse independientemente de los tipos de disolventes.

En la Etapa 2), la gelificación puede llevarse a cabo adecuadamente por procedimientos conocidos de acuerdo con el tipo de polímero que tiene la propiedad de transición sol-gel usada como se describe en la Etapa 1). Por ejemplo, en el caso de la metilcelulosa, la emulsión secundaria puede gelificarse añadiendo NaCl a una concentración apropiada o añadiendo NaCl y calentando, y en el caso del poloxámero, la emulsión secundaria puede gelificarse calentando preferiblemente entre 35 y 50° C, y lo más preferiblemente a 40 °C, que varía según el tipo y concentración de poloxámeros. Además, en el caso de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), etilhidroxietilcelulosa (EHEC), xiloglucano, quitosano, poli(N-isopropilamida) (PNIPAM), poli(ácido N-isopropilamida-co-acrílico), Poloxámero-g-PAA, PAA-g-poloxámero, PEO-PLGA-PEO y alcohol polivinílico, la emulsión secundaria puede gelificarse calentando a una concentración adecuada para la gelificación y a una temperatura apropiada. En algunos casos, se puede añadir opcionalmente un aditivo tal como NaCl, y puede controlarse opcionalmente el pH.

Como etapa de recolección de las microesferas eliminando el disolvente residual y el medio acuoso, la Etapa 3) es recoger las microesferas eliminando el disolvente del material gelificado.

Preferiblemente, la eliminación del disolvente residual y el medio acuoso de la Etapa 3) se puede realizar usando un procedimiento de secado al vacío. En detalle, el procedimiento de secado al vacío se puede realizar evaporando el disolvente bajo un vacío en un intervalo de 0 a 0,99 Torr.

En la Etapa 3), el disolvente residual y el medio acuoso pueden eliminarse a una velocidad rápida evaporando completamente el disolvente residual y el medio acuoso usando el procedimiento de secado al vacío, y en algunos casos, el medio acuoso mismo puede ser usado secando completamente el medio acuoso sin realizar un procedimiento de lavado. Como tal, de acuerdo con el procedimiento de preparación de la presente invención, ya que puede omitirse un procedimiento de agitación que se realiza generalmente para eliminar el disolvente, es posible superar los inconvenientes del procedimiento de doble emulsión porque la relación de encapsulación disminuye debido a la liberación del fármaco encapsulado durante el procedimiento de agitación, o el disolvente residual permanece.

Otra ventaja del procedimiento de preparación según la presente invención es que un disolvente que puede disolver el polímero para el portador que forma las microesferas no está limitado. Cuando se usan acetato de etilo, acetona y similares que tienen una alta miscibilidad debido a la alta solubilidad en agua en el procedimiento convencional de doble emulsión, no pueden formarse esferas o la relación de encapsulación puede ser muy baja, al menos de aproximadamente 50 %. Existen varios factores como las causas, pero, entre ellas, esto se debe a que el disolvente se difunde rápidamente en el medio acuoso antes de que las microesferas se formen en forma esférica. Con el fin de formar las esferas y aumentar la relación de encapsulación, la solubilidad en agua del disolvente necesita ser reducida. En la presente invención, el polímero que tiene la propiedad de transición sol-gel se disuelve en el medio acuoso a una concentración apropiada, y la emulsión primaria se inyecta a la misma para formar una emulsión secundaria, y luego la emulsión secundaria se gelifica completamente para reducir la solubilidad del disolvente. Mediante el procedimiento de preparación, el uso de acetato de etilo tiene la ventaja de que la relación de encapsulación es de 70 a 100 % en peso, y las partículas pueden formarse uniformemente con un tamaño de partícula de 5 a 10 µm.

Además, las partículas finas uniformes y pequeñas que tienen un tamaño de partícula en un intervalo de 1 a 10 µm pueden formarse controlando la concentración del polímero que tiene la propiedad de transición sol-gel. Además, cuando se forma la emulsión secundaria, el volumen de reacción puede reducirse significativamente de 1/10 a 1/20 de aquel del procedimiento de preparación convencional, y por lo tanto es muy ventajoso para la producción en masa.

Además, la divulgación proporciona microesferas en las que la sustancia bioactiva está encapsulada en el polímero para el portador preparado por el procedimiento.

Es decir, las microesferas en las que la sustancia bioactiva está encapsulada en el polímero para el portador se forman emulsionando el polímero para el portador y la sustancia bioactiva con el polímero que tiene la propiedad de transición sol-gel.

Además, el sistema de suministro de fármacos incluye las microesferas como un componente activo.

El sistema de suministro de fármacos puede incluir un portador farmacéuticamente aceptable y un regulador de pH.

El sistema de suministro de fármacos puede ser en forma de una inyección, pero la presente invención no está limitada a la misma.

Cuando el sistema de suministro de fármacos puede ser en forma de una inyección, el portador farmacéuticamente aceptable es agua para inyección y el regulador de pH puede ser un ácido tal como ácido clorhídrico o una base tal como hidróxido de sodio. En este caso, el pH de la inyección se puede regular preferiblemente entre

aproximadamente 6,0 y 8,0, y más preferiblemente entre aproximadamente 7,2 y 7,8.

Además, la sustancia bioactiva está encapsulada en el polímero para el portador. En este caso, las microesferas se forman emulsionando el polímero para el portador y la sustancia bioactiva por medio del polímero que tiene la propiedad de transición sol-gel.

- 5 El polímero para el portador, la sustancia bioactiva y el polímero que tiene la propiedad de transición sol-gel se pueden describir de la misma manera que en el procedimiento de preparación de microesferas.

Efectos de la invención

De acuerdo con la presente invención, se puede evitar que el disolvente de la solución polimérica para el portador se difunda rápidamente en el medio acuoso antes de la formación de las microesferas para reducir la porosidad de las microesferas y reducir la rugosidad superficial de las microesferas con el fin de obtener microesferas que tengan una forma de esfera y se puede aumentar la relación de encapsulación de una sustancia bioactiva inyectando la emulsión primaria que incluye la solución acuosa de la sustancia bioactiva y la solución polimérica para el portador disuelto en el disolvente en la solución del polímero que tiene la propiedad de transición sol-gel en el medio acuoso para formar una emulsión secundaria, seguido por gelificación de la emulsión secundaria y eliminación del disolvente para recoger las microesferas. Además, el disolvente que tiene alta solubilidad en agua se puede usar a través de un procedimiento de gelificar completamente la emulsión secundaria, y puede usarse sin limitación. Adicionalmente, el disolvente residual y el medio acuoso pueden eliminarse a una velocidad rápida por evaporación del disolvente residual y todo el medio acuoso usando un procedimiento de secado al vacío durante la eliminación del disolvente después de la gelificación y, en algunos casos, el propio medio acuoso puede usarse por secado completo del medio acuoso sin realizar un procedimiento de lavado. Además, el tamaño de las partículas puede controlarse mediante el control la concentración del polímero que tiene la propiedad de transición sol-gel incluida en el medio acuoso, y puede omitirse un procedimiento de agitación. Además, el volumen de reacción de las partículas puede reducirse significativamente y, por lo tanto, pueden producirse fácilmente en masa las partículas.

Breve descripción de los dibujos

25 La Figura 1 es una fotografía de microscopio electrónico de barrido (SEM) de superficies de microesferas preparadas de acuerdo con los Ejemplos 2 y 5 y el Ejemplo Comparativo 2. En este caso, la Figura 1A representa microesferas usando metilcelulosa del Ejemplo 2, la Figura 1B representa microesferas usando poloxámero del Ejemplo 5, y la FIG. 1C representa microesferas del Ejemplo Comparativo 2, y

30 La Figura 2 es un gráfico que ilustra un resultado del ensayo de liberación *in vitro* de las microesferas preparadas según los Ejemplos 1 a 5. En este caso, ▲ representa microesferas del Ejemplo 1, □ representa microesferas del Ejemplo 2, ○ representa microesferas del Ejemplo 3, ◆ representa microesferas del Ejemplo 4, y ■ representa microesferas del Ejemplo 5.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

35 En lo sucesivo, las configuraciones y efectos de la presente invención se describirán con más detalle con referencia a los Ejemplos, pero los Ejemplos simplemente pretenden ejemplificar la presente invención, y el ámbito de la presente invención no se limita solamente a los Ejemplos.

Ejemplo 1: Preparación de microesferas que contienen acetato de leuprolida usando gelificación de metilcelulosa

40 Se disolvieron 100 mg de acetato de leuprolida en 100 µl de agua destilada y después se mezclaron con una solución polimérica en la que se disolvieron 900 mg de PLGA (Resomer RG502H) en 1 ml de acetato de etilo para preparar una emulsión primaria. La emulsión primaria preparada se dispersó en 20 ml de una solución de agua destilada que contenía metilcelulosa al 10 % previamente preparada usando un homogeneizador. Se formó una emulsión secundaria y después se gelificó añadiendo 1 g de NaCl y aumentando la temperatura a 40 °C. El disolvente residual y el medio se eliminaron después de 2 horas al vacío para preparar microesferas solidificadas. Las microesferas preparadas se lavaron con agua destilada varias veces y después se liofilizaron.

Ejemplo 2: Preparación de microesferas que contienen acetato de leuprolida usando gelificación de metilcelulosa

50 Se disolvieron 90 mg de acetato de leuprolida en 100 µl de agua destilada y después se mezclaron con una solución polimérica en la que se disolvieron 810 mg de PLGA (Resomer RG502H) en 1 ml de acetato de etilo para preparar una emulsión primaria. La emulsión primaria preparada se dispersó en 20 ml de una solución de agua destilada que contenía metilcelulosa al 7,5 % previamente preparada usando un homogeneizador. Se formó una emulsión secundaria y después se gelificó añadiendo 1 g de NaCl y aumentando la temperatura a 40 °C. El disolvente residual

y el medio se eliminaron después de 2 horas al vacío para preparar microesferas solidificadas. Las microesferas preparadas se lavaron con agua destilada varias veces y después se liofilizaron.

Ejemplo 3: Preparación de microesferas que contienen acetato de leuprolida usando gelificación de metilcelulosa

Se disolvieron 160 mg de acetato de leuprolida en 100 µl de agua destilada y después se mezclaron con una solución polimérica en la que se disolvieron 640 mg de PLGA (Resomer RG502H) en 1 ml de acetato de etilo para preparar una emulsión primaria. La emulsión primaria preparada se dispersó en 20 ml de una solución de agua destilada que contenía metilcelulosa al 7,5 % previamente preparada usando un homogeneizador. Se formó una emulsión secundaria y después se gelificó añadiendo 1 g de NaCl y aumentando la temperatura a 40 °C. El disolvente residual y el medio se eliminaron después de 2 horas al vacío para preparar microesferas solidificadas. Las microesferas preparadas se lavaron con agua destilada varias veces y después se liofilizaron.

Ejemplo 4: Preparación de microesferas que contienen acetato de leuprolida usando gelificación de metilcelulosa

Se disolvieron 160 mg de acetato de leuprolida en 150 µl de agua destilada y después se mezclaron con una solución polimérica en la que se disolvieron 640 mg de PLGA (Lakeshore 5050DLG2A) en 1 ml de acetato de etilo para preparar una emulsión primaria. La emulsión primaria preparada se dispersó en 20 ml de una solución de agua destilada que contenía metilcelulosa al 7,5 % previamente preparada usando un homogeneizador. Se formó una emulsión secundaria y después se gelificó añadiendo 1 g de NaCl y aumentando la temperatura a 40 °C. El disolvente residual y el medio se eliminaron después de 2 horas al vacío para preparar microesferas solidificadas. Las microesferas preparadas se lavaron con agua destilada varias veces y después se liofilizaron.

Ejemplo 5: Preparación de microesferas que contienen acetato de leuprolida usando gelificación de poloxámero

Se disolvieron 100 mg de acetato de leuprolida en 100 µl de agua destilada y luego se mezclaron con una solución polimérica en la que se disolvieron 900 mg de PLGA (PLGA5005) en 1 ml de acetato de etilo para preparar una emulsión primaria. La emulsión primaria preparada se dispersó en 20 ml de una solución de agua destilada que contenía poloxámero al 18 % previamente preparado (poloxámero 407) usando un homogeneizador. La emulsión secundaria se formó y después se gelificó aumentando la temperatura a 40 °C. A continuación, el disolvente residual y el medio se eliminaron después de 2 horas al vacío para preparar microesferas solidificadas. Las microesferas preparadas se lavaron con agua destilada varias veces y después se liofilizaron.

Ejemplo 6: Preparación de microesferas que contienen acetato de leuprolida usando gelificación de poloxámero

Se disolvieron 60 mg de acetato de leuprolida en 100 µl de agua destilada y después se mezclaron con una solución polimérica en la que se disolvieron 540 mg de PLGA (Resomer RG502H) en 1 ml de acetato de etilo para preparar una emulsión primaria. La emulsión primaria preparada se dispersó en 20 ml de una solución de agua destilada que contenía poloxámero al 18 % previamente preparado (poloxámero 407) usando un homogeneizador. La emulsión secundaria se formó y después se gelificó aumentando la temperatura a 40 °C. A continuación, el disolvente residual y el medio se eliminaron después de 2 horas al vacío para preparar microesferas solidificadas. Las microesferas preparadas se lavaron con agua destilada varias veces y después se liofilizaron.

Ejemplo 7: Preparación de microesferas que contienen acetato de leuprolida usando gelificación de poloxámero

Se disolvieron 200 mg de acetato de leuprolida en 300 µl de agua destilada y luego se mezclaron con una solución polimérica en la que se disolvieron 800 mg de PLGA (Resomer RG503H) en 3 ml de acetato de etilo para preparar una emulsión primaria. La emulsión primaria preparada se dispersó en 20 ml de una solución de agua destilada que contenía poloxámero al 20 % previamente preparado (poloxámero 407) usando un homogeneizador. La emulsión secundaria se formó y después se gelificó aumentando la temperatura a 40 °C. A continuación, el disolvente residual y el medio se eliminaron después de 2 horas al vacío para preparar microesferas solidificadas. Las microesferas preparadas se lavaron con agua destilada varias veces y después se liofilizaron.

Ejemplo Comparativo 1: Preparación de microesferas que contienen acetato de leuprolida usando el procedimiento de doble emulsión convencional

Se disolvieron 50 mg de acetato de leuprolida en 100 µl de agua destilada y después se mezclaron con una solución polimérica en la que se disolvieron 450 mg de PLGA (Lakeshore 7525DLPLG2A) en 1 ml de cloruro de metileno para preparar una emulsión primaria. La emulsión primaria preparada se dispersó en 200 ml de una solución de agua destilada que contenía alcohol polivinílico al 1 % previamente preparado (peso molecular de 30.000 a 50.000) usando un homogeneizador. La emulsión secundaria se formó, y luego se agitó durante 2 horas para eliminar el disolvente residual y el medio acuoso. Las microesferas solidificadas se lavaron con agua destilada varias veces y después se liofilizaron.

Ejemplo comparativo 2: Preparación de microesferas que contienen acetato de leuprolida usando un procedimiento de doble emulsión convencional

Se disolvieron 100 mg de acetato de leuprolida en 100 µl de agua destilada y luego se mezclaron con una solución polimérica en la que se disolvieron 900 mg de PLGA (Lakeshore 7525DLPLG2A) en 1 ml de cloruro de metileno para preparar una emulsión primaria. La emulsión primaria preparada se dispersó en 350 ml de una solución de agua destilada que contenía alcohol polivinílico al 1 % previamente preparado (peso molecular de 30.000 a 50.000) usando un homogeneizador. La emulsión secundaria se formó, y luego se agitó durante 2 horas para eliminar el disolvente residual y el medio acuoso. Las microesferas solidificadas se lavaron con agua destilada varias veces y después se liofilizaron.

Ejemplo comparativo 3: Preparación de microesferas que contienen acetato de leuprolida usando acetato de etilo como disolvente polimérico

Cuando se prepararon microesferas con acetato de etilo mediante los procedimientos de los Ejemplos Comparativos 1 y 2, las partículas esféricas no se formaron, y la relación de encapsulación fue inferior al 10 %. Como resultado, se observó que las microesferas no se prepararon por el procedimiento de doble emulsión convencional. Por consiguiente, con el fin de preparar las microesferas con acetato de etilo, se usó un procedimiento de múltiples etapas para formar microesferas en este Ejemplo Comparativo. Se disolvieron 50 mg de acetato de leuprolida en 100 µl de agua destilada y después se mezclaron con una solución polimérica en la que se disolvieron 500 mg de PLGA (Lakeshore 7525DLPLG2A) en 1 ml de cloruro de metileno para preparar una emulsión primaria. La emulsión primaria preparada se dispersó en 6 ml de una solución de agua destilada que contenía alcohol polivinílico al 1 % previamente preparado (peso molecular de 30.000 a 50.000) y NaCl al 10 % usando un homogeneizador. La emulsión secundaria formada se añadió a 10 ml de una solución de agua destilada que contenía alcohol polivinílico al 1 % y NaCl al 10 % para formar una emulsión terciaria y la emulsión terciaria se añadió a 200 ml de agua destilada que contenía alcohol polivinílico al 1 % y NaCl al 10 % y se agitó durante 3 horas. Las microesferas solidificadas se lavaron con agua destilada varias veces y después se liofilizaron.

Los componentes y contenidos de las microesferas preparadas en los Ejemplos 1 a 7 y los Ejemplos Comparativos 1 y 2 se resumen en la siguiente Tabla 1.

Tabla 1

Clasificación	Conc. de PLGA (mg/ml)	Disolvente para PLGA	Cantidad añadida de API (% en peso)	Disolvente para API (DW, v/v)	Surfactante en medio acuoso	Conc. de surfactante (%)	Volumen del medio acuoso (ml)
Ejemplo 1	900	Acetato de etilo	10	10	Metil celulosa	10	20
Ejemplo 2	810	Acetato de etilo	10	10	Metil celulosa	7,5	20
Ejemplo 3	640	Acetato de etilo	20	10	Metil celulosa	7,5	20
Ejemplo 4	640	Acetato de etilo	20	15	Metil celulosa	7,5	20
Ejemplo 5	900	Acetato de etilo	10	15	poloxámero	18	20
Ejemplo 6	540	Acetato de etilo	10	10	poloxámero	18	20
Ejemplo 7	800	Acetato de etilo	20	10	poloxámero	20	20
Ejemplo Comparativo 1	450	Cloruro de metileno	10	10	Alcohol polivinílico	1	200

Ejemplo Comparativo 2	900	Cloruro de metileno	10	10	Alcohol polivinílico	1	350
Ejemplo Comparativo 3	500	Acetato de etilo	10	10	Alcohol polivinílico	1	200

Ejemplo Experimental 1: Determinación de formas superficiales de microesferas que contienen acetato de leuprolida

5 Las superficies de las microesferas preparadas en los Ejemplos 2 y 5 y el Ejemplo Comparativo 2 se observaron bajo un microscopio electrónico de barrido (SEM). Los resultados medidos se ilustran en las Figuras 1A, 1B y 1C, respectivamente.

10 A partir de los resultados de las mediciones, se observó que las microesferas de los Ejemplos 2 y 5 usando gelificación de metilcelulosa y poloxámero tenían una superficie relativamente lisa debido a la pequeña porosidad de las superficies de las microesferas y mostraban una distribución de tamaño de partícula uniforme. En comparación, en el caso de las microesferas preparadas por el procedimiento convencional de doble emulsión que usa alcohol polivinílico, se observó la porosidad de la superficie, y dichas superficies eran desiguales y se observaron partículas grandes de formas irregulares.

15 Mientras tanto, se observó que las microesferas preparadas de acuerdo con los Ejemplos 1 y 5 tenían tamaños de partícula pequeños, en comparación con las microesferas preparadas de acuerdo con los Ejemplos 2, 3 y 4 (no mostradas).

Ejemplo Experimental 2: Medición de la cantidad de encapsulación de acetato de leuprolida de las microesferas

20 Para la relación de encapsulación del fármaco, se disolvió completamente una cantidad predeterminada de las microesferas en sulfóxido de dimetilo (DMSO) y luego se filtró a través de un filtro de jeringa para usar un líquido de ensayo, y se midió el contenido del fármaco que se encapsuló en las microesferas usando HPLC. En este caso, para el análisis por HPLC, se utilizaron columnas C18 (150 mm de largo x 4,6 mm de diámetro interno, 5 µm) y columna C18 Gemini-NX (4,0 mm de largo x 3,0 mm de diámetro interno). Un disolvente y una fase móvil de una muestra fueron soluciones acuosas (pH 7,0) de carbonato de potasio y acetonitrilo al 25 % (ACN) y se detectaron a UV 220 nm.

25 El contenido de los fármacos en las microesferas preparadas se midió para determinar las relaciones de encapsulación. A continuación, se enumeran las relaciones de encapsulación en la siguiente Tabla 2.

Tabla 2

Clasificación	Relación de encapsulación de fármaco (% en peso)
Ejemplo 1	79,8
Ejemplo 2	89,3
Ejemplo 3	88,0
Ejemplo 4	100,0
Ejemplo 5	83,6
Ejemplo 7	83,6
Ejemplo comparativo 1	99
Ejemplo comparativo 2	45,3
Ejemplo comparativo 3	30

Como se describe en la Tabla 2, se observó que la mayor parte de la formulación de microesferas de la presente invención tenía una relación de encapsulación de fármaco de 70 a 100 % en peso incluso cuando se usó acetato de etilo que era un disolvente que tenía una alta solubilidad en agua para disolver un polímero. Por otra parte, cuando no se utilizó el polímero que tenía la propiedad de transición sol-gel de acuerdo con la presente invención, se observó que las microesferas mostraban un rendimiento de encapsulación del fármaco en el intervalo de 45 a 99,5 % en peso cuando se usó cloruro de metileno que era un disolvente que tiene alta toxicidad, pero una relación de encapsulación del fármaco de no más de 30 % en peso cuando se usó acetato de etilo.

Ejemplo Experimental 3: Ensayo de liberación *in vitro* de microesferas que contienen acetato de leuprolida

A continuación, se realizó un ensayo de liberación *in vitro* de microesferas que contenían acetato de leuprolida de la presente invención.

En primer lugar, se prepararon 1.000 ml de una solución de ensayo poniendo 200 ml de ácido láctico de 0,1 mol/l, 5 ml de polisorbato 80 al 20 % (p/v) y 200 ml de alcohol polivinílico al 2 % (p/v) (PVA) en el mismo recipiente y añadiendo agua destilada. A continuación, se pusieron 100 mg de las microesferas preparadas en un tubo de ensayo de vidrio de 120 ml y se añadieron 100 ml de la solución de ensayo. A continuación, se selló el recipiente con un tapón de caucho, y e inmediatamente se mezcló y agitó la mezcla resultante. A continuación, se cerró el recipiente con una tapa de aluminio. Se extrajo 1 ml de cada suspensión utilizando una jeringa de vidrio provista de una aguja con un calibre 23 después de 1, 9 y 48 horas mientras se incubaba a $48 \pm 0,5$ °C. A continuación, se utilizó inmediatamente el sobrenadante obtenido por centrifugación como líquido de ensayo y se analizó con HPLC, y los resultados de liberación de fármaco se enumeran en la Tabla 3 y se muestran en la Fig. 3.

Tabla 3

Tiempo	Ejemplo 1	Ejemplo 2	Ejemplo 3	Ejemplo 4	Ejemplo 5	Ejemplo comparativo 1	Ejemplo comparativo 2
1 hora	14,9	6,3	2,1	9,3	13,1	9,6	10,4
9 horas	52,8	32,3	34,2	42,4	60,4	33,4	39,7
48 horas	89,6	90,0	85,3	102,7	85,1	87,1	88,4

La tasa de liberación (%) varió de acuerdo con diversos factores complejos, pero generalmente, cuanto más rápida es la tasa de difusión de los fármacos y menor el tamaño de partícula (puesto que las partículas más pequeñas tienen un área superficial mayor que las partículas grandes con el mismo peso), más rápido liberarían las partículas los fármacos.

Como se enumera en la Tabla 3, se pudo observar que las microesferas preparadas de acuerdo con la presente invención tenían una relación de liberación total del 85 % o más, lo que indicaba que las microesferas de Ejemplos mostraban un comportamiento de liberación similar a las microesferas de los Ejemplos Comparativos a pesar de la alta cantidad de encapsulación del fármaco.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de preparación de microesferas, en el que una sustancia bioactiva está encapsulada en un polímero para un portador, que comprende:
5 1) formar una emulsión secundaria inyectando una emulsión primaria, en la que la sustancia bioactiva y el polímero para un portador se mezclan, en un medio acuoso en el que se disuelve un polímero que tiene una propiedad de transición sol-gel (Etapa 1); y
2) realizar una reacción de gelificación sobre la emulsión secundaria con el fin de reducir la velocidad de difusión de un disolvente en la emulsión primaria difundida en el medio acuoso (Etapa 2).
10 2. El procedimiento de preparación de microesferas de la reivindicación 1, que comprende, además: eliminar un disolvente residual y un medio acuoso y recoger las microesferas después de la Etapa 2) (Etapa 3).
15 3. El procedimiento de preparación de microesferas de la reivindicación 1, en el que la sustancia bioactiva es al menos una seleccionada del grupo que consiste en homólogos de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH), péptidos y sales de los mismos.
4. El procedimiento de preparación de microesferas de la reivindicación 3, en el que la sustancia bioactiva es al menos una seleccionada del grupo que consiste en goserelina, acetato de leuprolida, triptorelina, buserelina, nafarelina, cetorelix y argitida.
20 5. El procedimiento de preparación de microesferas de la reivindicación 1, en el que la emulsión primaria se prepara disolviendo el polímero para el portador en al menos un disolvente seleccionado del grupo que consiste en cloruro de metileno, cloroformo, acetonitrilo, dimetilsulfóxido, dimetilformamida y acetato de etilo.
25 6. El procedimiento de preparación de microesferas de la reivindicación 1, en el que el polímero para el portador es un polímero biodegradable
7. El procedimiento de preparación de microesferas de la reivindicación 6, en el que el polímero para el portador es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en poliláctido, poliglicólido y poli(láctido-co-glicólido).
30 8. El procedimiento de preparación de microesferas de la reivindicación 1, en el que el polímero que tiene la propiedad de transición sol-gel es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en metil celulosa, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), etilhidroxietilcelulosa (EHEC), xiloglucano, quitosano, poli(N-isopropilamida) (PNIPAM), poli(ácido N-isopropilamida-co-acrílico), poloxámero (PEO-PPO-PEO), Poloxámero-g-PAA, PAA-g-poloxámero, PEO-PLGA- PEO y alcohol polivinílico.
35 9. El procedimiento de preparación de microesferas de la reivindicación 2, en el que la eliminación del disolvente residual y el medio acuoso de la Etapa 3) se realizan evaporando el disolvente residual y el medio acuoso bajo un vacío en el intervalo de 0 a 131,989 Pa.
40

FIG. 1A

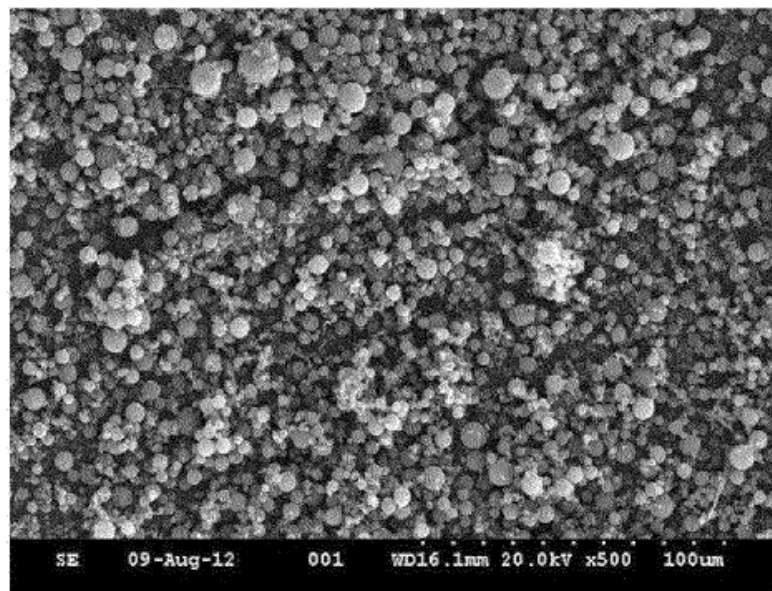


FIG. 1B

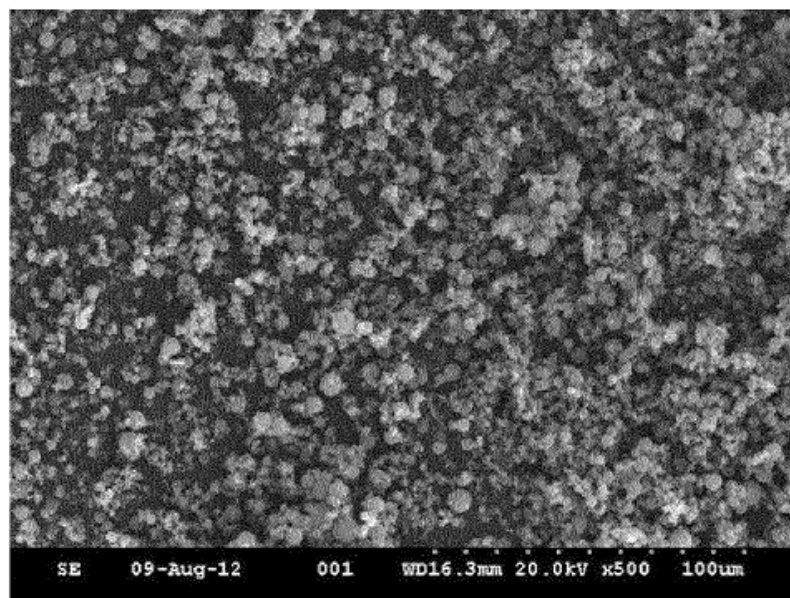


FIG. 1C

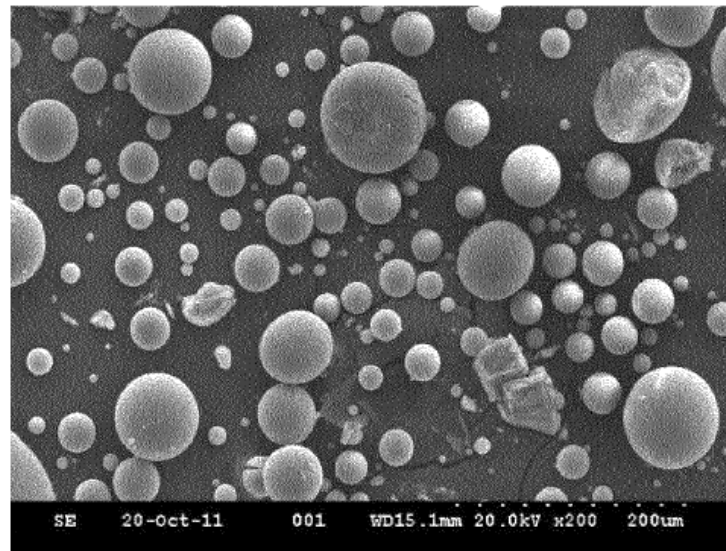


FIG. 2

