

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 654 610**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/16** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.08.2009 PCT/US2009/054550**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.02.2010 WO10022293**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.08.2009 E 09791764 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.10.2017 EP 2317982**

54 Título: **Métodos de procesamiento de composiciones que contienen micropartículas**

30 Prioridad:

**20.08.2008 US 195092**

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

**14.02.2018**

73 Titular/es:

**BAXTER INTERNATIONAL INC. (50.0%)  
One Baxter Parkway  
Deerfield, IL 60015, US y  
BAXTER HEALTHCARE S.A. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**DARVARI, RAMIN;  
LAMBERT, ADAM;  
RASHBA-STEP, JULIA, E.;  
YANG, MARK, X.;  
ZHANG, JUNHONG y  
O'CONNELL, ED**

74 Agente/Representante:

**AZNÁREZ URBIETA, Pablo**

ES 2 654 610 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

**Métodos de procesamiento de composiciones que contienen micropartículas**

## ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

5 *Campo Técnico*

La presente descripción se refiere a composiciones y formulaciones que contienen micropartículas y a métodos para procesar dichas composiciones y formulaciones.

*Descripción de Tecnología Relacionada*

10 Las micropartículas, microesferas y microcápsulas, denominadas aquí colectivamente "micropartículas", son partículas sólidas o semisólidas con un diámetro inferior a un milímetro, preferentemente inferior a 100 micras, que se pueden formar con varios materiales, incluyendo, de forma no exclusiva, diversos polímeros y proteínas. Las micropartículas se utilizan en muchas aplicaciones diferentes, principalmente separaciones, diagnóstico y administración de fármacos.

15 Los ejemplos mejor conocidos de micropartículas utilizadas en técnicas de separación son aquellas formadas por polímeros de origen sintético o proteínico, como poliacrilamida, hidroxiapatita o agarosa. Estas micropartículas poliméricas se utilizan normalmente para separar moléculas tales como proteínas en base al peso molecular y/o la carga iónica, o por la interacción con moléculas acopladas químicamente a las micropartículas.

20 En el campo diagnóstico, durante muchos años han estado comercialmente disponibles perlas esféricas o partículas como herramienta para los bioquímicos. Por ejemplo, se han derivado micropartículas con enzimas, sustratos de enzimas o anticuerpos marcados que después han interactuado con una molécula a detectar directa o indirectamente. Existe diversas perlas derivadas comerciales con variados constituyentes y tamaños.

25 En el campo del suministro controlado de fármacos, se encapsulan moléculas dentro de micropartículas o se incorporan en una matriz para proporcionar una liberación controlada de las moléculas. Para producir estas micropartículas a partir de diversos polímeros se utilizan diversas técnicas, incluyendo separación de fases, evaporación de disolvente, emulsión y secado por pulverización. En general, los polímeros forman la estructura soporte de las micropartículas y el fármaco o la molécula de interés se incorpora dentro de la estructura soporte. Ejemplos de polímeros utilizados para la formación de micropartículas incluyen homopolímeros y copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico (PLGA), copolímeros en bloques y polifosfacenos.

30 La Publicación de Patente US nº 2005/0170005 (la publicación '005) describe métodos de separación de fases para formar micropartículas, que incluyen la disolución de un agente activo en uno o más disolventes acuosos y/o miscibles con líquidos acuosos en los que están disueltos uno o más agentes que aumentan la separación de fases con el fin de formar una solución en una sola fase líquida. La solución se somete después a una separación de fases líquida-sólida para que el agente activo forme pequeñas partículas esféricas sólidas (es decir, la fase sólida), mientras que el o los agentes que aumentan la separación de fases y el o los disolventes constituyen la fase líquida. La publicación '005 describe métodos para recoger las micropartículas, incluyendo soluciones de lavado y/o polvos secos que comprenden micropartículas con medios líquidos en los que el agente activo es insoluble y el agente que aumenta la separación de fases, no deseado, es soluble. Los medios líquidos descritos incluyen disolventes orgánicos y fluidos supercríticos. De forma no deseada, estos medios pueden producir daños a cualquier agente activo, en particular a proteínas como anticuerpos, dentro de las micropartículas.

35 La publicación '005 también indica que el lavado de micropartículas que comprenden proteínas, tales como insulina y hGH, con un medio líquido que comprende una solución acuosa que contiene cationes divalentes, tales como  $Zn^{2+}$ , hace que la proteína forme un complejo de solubilidad reducida. La solubilidad de las micropartículas que contienen dichas proteínas es suficientemente baja en la solución de cationes divalentes, pero con frecuencia se observa una aglomeración no deseable de las partículas cuando dichas soluciones se utilizan para su lavado (como resultado de la formación de complejos).

## SUMARIO DE LA INVENCIÓN

50 La presente invención proporciona un método para procesar micropartículas de acuerdo con la reivindicación 1.



aproximadamente 10 micras, entre aproximadamente 1 micra y aproximadamente 10 micras, entre aproximadamente 0,1 nm y aproximadamente 1 micra, entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 1 micra, entre aproximadamente 10 nm y aproximadamente 1 micra, entre aproximadamente 100 nm y aproximadamente 1 micra, entre aproximadamente 0,1 nm y aproximadamente 100 nm, entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 100 nm, entre aproximadamente 10 nm y aproximadamente 100 nm, entre aproximadamente 0,1 nm y aproximadamente 10 nm, entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 10 nm, y/o entre aproximadamente 0,1 nm y aproximadamente 1 nm. El tamaño de partícula geométrico medio se puede medir por métodos de dispersión dinámica de luz (por ejemplo espectroscopía de fotocorrelación, difracción láser, dispersión de luz láser de ángulo pequeño (*low-angle laser light scattering* - LALLS), dispersión de luz láser de ángulo medio (*medium-angle laser light scattering* - MALLS), métodos de ocultación de luz (como el método de análisis Coulter) u otros métodos (como reología o microscopía óptica o electrónica). Las micropartículas para la administración pulmonar tienen un tamaño de partícula aerodinámico determinado mediante medidas de tiempo de vuelo o con Impactador de Cascada Andersen. Las micropartículas de forma esférica se denominan a veces microesferas y nanoesferas. Las micropartículas que tienen una estructura encapsulada se denominan a veces microcápsulas y nanocápsulas. Las micropartículas pueden ser porosas, por ejemplo con uno o más huecos y/o cavidades internos. Otras micropartículas no son porosas y/o están libres de dichos huecos o cavidades. Las micropartículas están parcial o totalmente formadas a partir de uno o más materiales, incluyendo, de forma no exclusiva, agentes activos, vehículos, polímeros, agentes complejantes, agentes estabilizadores, excipientes, iones, humedad, disolventes residuales, impurezas, productos secundarios y/o compuestos relacionados con la producción. Las micropartículas pueden ser cristalinas, amorfas, microcristalinas, nanocristalinas o una combinación de las mismas.

El concepto "agente activo" se refiere a materiales naturales, recombinantes, sintéticos o semisintéticos (por ejemplo compuestos, productos de fermentación, extractos, estructuras celulares) que pueden provocar, directa o indirectamente, uno o más efectos físicos, químicos y/o biológicos, *in vitro* y/o *in vivo*. El agente activo puede prevenir, aliviar, tratar y/o curar condiciones anómalas y/o patológicas de un cuerpo vivo, por ejemplo destruyendo un organismo parásito, o limitando el efecto de una enfermedad o anomalía mediante la alteración material de la fisiología del huésped o parásito. El agente activo puede mantener, aumentar, disminuir, limitar o destruir una función corporal fisiológica. El agente activo puede permitir diagnosticar una condición o estado fisiológico mediante un ensayo *in vitro* y/o *in vivo*. El agente activo puede controlar o proteger un entorno o un cuerpo vivo mediante la atracción, incapacitación, inhibición, eliminación, modificación, rechazo y/o retraso de un animal o microorganismo. El agente activo puede tratar de otro modo (por ejemplo desodorizar, proteger, adornar, acicalar) un cuerpo. Dependiendo de su efecto y/o aplicación, el agente activo también se puede denominar agente bioactivo, agente farmacéutico (como un agente profiláctico, un agente terapéutico), agente diagnóstico, suplemento nutricional y/o agente cosmético, e incluye, de forma no exclusiva, ejemplos tales como profármacos, moléculas de afinidad, moléculas orgánicas sintéticas, polímeros, moléculas de peso molecular de 2 kDa o inferior (como aquellas con un peso molecular de menos de aproximadamente 1,5 kDa, o menos de aproximadamente 1 kDa), macromoléculas (como aquellas con un peso molecular superior a aproximadamente 2 kDa, por ejemplo más de aproximadamente 5 kDa o entre aproximadamente 2 kDa y 5 kDa), compuestos proteínicos, péptidos, vitaminas, esteroides, análogos de esteroides, lípidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, precursores de los mismos y derivados de los mismos. Los agentes activos pueden ser iónicos o no iónicos, pueden ser neutros, tener carga positiva, tener carga negativa o ser dipolares y se pueden utilizar de forma individual o en una combinación de dos o más de los mismos. Los agentes activos pueden ser insolubles o solubles en agua. Los agentes activos pueden tener un punto isoeléctrico de 7,0 o más, pero preferiblemente inferior a 7,0.

El concepto "punto neutro superficial" se refiere al pH de una solución al que la carga superficial neta de una micropartícula es cero.

El concepto "punto isoeléctrico" se refiere al pH de una solución al que la carga neta de una molécula es cero.

El concepto "compuestos proteínicos" se refiere a compuestos naturales, sintéticos, semisintéticos o recombinantes de proteínas o relacionados estructural y/o funcionalmente con éstas, como aquellos que contienen o consisten esencialmente en  $\alpha$ -aminoácidos asociados de forma covalente por enlaces peptídicos. Los compuestos proteínicos incluyen, de forma exclusiva, proteínas globulares (por ejemplo albúminas, globulinas, histonas), proteínas fibrosas (por ejemplo colágenos, elastinas, queratinas), proteínas de enlace (incluyendo aquellas que contienen uno o más componentes no peptídicos, por ejemplo glicoproteínas, nucleoproteínas, mucoproteínas, lipoproteínas, metaloproteínas), proteínas terapéuticas, proteínas de fusión, receptores, antígenos (como antígenos sintéticos o recombinantes), proteínas de superficie virales, hormonas y análogos de hormonas, anticuerpos (como anticuerpos monoclonales o policlonales), enzimas, fragmentos Fab, péptidos cíclicos, péptidos lineales y similares. Las proteínas terapéuticas incluyen, de forma no exclusiva, proteínas morfogenéticas óseas, proteínas de resistencia a fármacos, toxoides, eritropoyetinas, proteínas de la cascada de coagulación sanguínea (por ejemplo Factor VII, Factor VIII, Factor IX, et al.), subtilisina, ovoalbúmina, alfa-1-antitripsina (AAT), DNasa, superóxido dismutasa (SOD), lisozimas, ribonucleasas,

5 hialuronidasa, colagenasa, hormona del crecimiento humano (hGH), eritropoyetina, insulina, factores de crecimiento de tipo insulínico, interferones, glatiramer, factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos, factor estimulador de colonias de granulocitos, desmopresina, agonistas de hormona de liberación de hormona luteinizante (LHRH) (por ejemplo leuprolide, goserelina, buserelina, gonadorrelina, histrelina, nafarelina, deslorelina, fertirelina, triptorelina), antagonistas de LHRH, vasopresina, ciclosporina, calcitonina, hormona paratiroidea, péptidos de hormona paratiroidea, péptidos de tipo glucógeno y análogos de los mismos. Los compuestos proteínicos pueden ser neutros, tener carga positiva, tener carga negativa o ser dipolares y se pueden utilizar de forma individual o en una combinación de dos o más de los mismos.

10 El concepto "ácidos nucleicos" se refiere a compuestos naturales, sintéticos, semisintéticos o recombinantes formados, al menos en parte, por dos o más nucleótidos iguales o diferentes, y pueden de cadena sencilla o de cadena doble. Ejemplos de ácidos nucleicos incluyen, de forma no exclusiva, oligonucleótidos (como aquellos de 20 o menos pares de bases, por ejemplo sentido, antisentido o sin sentido), aptámeros, polinucleótidos (por ejemplo sentido, antisentido o sin sentido), ADN (por ejemplo sentido, antisentido o sin sentido), ARN (por ejemplo sentido, antisentido o sin sentido), ARNs, constructos de ácido de nucleótidos, segmentos de cadena sencilla o de cadena doble de los mismos, así como precursores y derivados de los mismos (por ejemplo glicosilados, hiperglicosilados, PEGilados, marcados con FITC, nucleósidos, sales de los mismos). Los ácidos nucleicos pueden ser neutros, tener carga positiva, tener carga negativa o ser dipolares y se pueden utilizar de forma individual o en una combinación de dos o más de los mismos.

20 El término "macromolécula" se refiere a un material que puede proporcionar una estructura tridimensional (por ejemplo terciaria y/o cuaternaria), e incluye vehículos y determinados agentes activos de la presente descripción. Las macromoléculas tienen normalmente un peso molecular de 2 kD o más, por ejemplo más de 5 kD o entre 2 kD y 5 kD. Macromoléculas no exclusivas utilizadas para formar las micropartículas incluyen, entre otras, polímeros, copolímeros, proteínas (por ejemplo enzimas, proteínas recombinantes, albúminas como seroalbúmina humana, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, compuestos proteínicos), péptidos, lípidos, carbohidratos (por ejemplo monosacáridos, disacáridos, polisacáridos), ácidos nucleicos, vectores (por ejemplo virus, partículas virales) y complejos y conjugados de los mismos (por ejemplo asociaciones covalentes y/o no covalentes entre dos macromoléculas tales como complejos o conjugados carbohidrato-proteína, o entre un agente activo y una macromolécula, como complejos o conjugados hapteno-proteína). Las macromoléculas pueden ser neutras, tener carga positiva, tener carga negativa o ser dipolares y se pueden utilizar de forma individual o en una combinación de dos o más de las mismas.

30 El término "vehículo" se refiere a un compuesto, normalmente una macromolécula, que tiene la función principal de proporcionar una estructura tridimensional (incluyendo una estructura terciaria y/o cuaternaria) a las microesferas. El vehículo puede estar o no estar asociado al agente activo (como conjugados o complejos de los mismos) en la formación de micropartículas tal como se describe más arriba. El vehículo también puede proporcionar otras funciones, como ser un agente activo, modificar un perfil de liberación del agente activo de la micropartícula y/u otorgar una o más propiedades particulares a la micropartícula (como contribuir al menos en parte a la carga superficial neta). En un ejemplo, el vehículo es una proteína (por ejemplo una albúmina, como seroalbúmina humana) con un peso molecular de 1.500 Dalton o superior.

40 Los términos "polímero" o "polimérico" se refieren a una molécula natural, recombinante, sintética o semisintética que tiene al menos en una cadena principal, ramificación o estructura de anillo dos o más unidades monoméricas repetidas. Los polímeros incluyen en general dímeros, trímeros, tetrámeros, oligómeros, polímeros de mayor peso molecular, aductos, homopolímeros, copolímeros aleatorios, pseudocopolímeros, copolímeros estadísticos, copolímeros alternos, copolímeros periódicos, bipolímeros, terpolímeros, cuaterpolímeros, otras formas de copolímeros, derivados sustituidos de los mismos y mezclas de los mismos. En un aspecto, los términos polímero y polimérico se refieren a moléculas que tienen 10 o más unidades monoméricas repetidas. Los polímeros pueden ser lineales, ramificados, en bloque, en injerto, monodispersos, polidispersos, regulares, irregulares, tácticos, isotácticos, sindiotácticos, estereorregulares, atácticos, estereobloques, de cadena sencilla, de cadena doble, en estrella, en peine, dendríticos, y/o ionoméricos, pueden ser iónicos o no iónicos, pueden ser neutros, tener carga positiva, tener carga negativa o ser dipolares y se pueden utilizar de forma individual o en una combinación de dos o más de los mismos.

50 El término "esférico" se refiere a una forma geométrica que es al menos "esencialmente esférica". El concepto "esencialmente esférico" significa que la relación entre la dimensión más larga (es decir, una dimensión entre dos puntos del perímetro y que pasa por el centro geométrico de la forma) y la dimensión más corta en cualquier sección transversal que atraviese el centro geométrico es menor de aproximadamente 1,5, por ejemplo menor de aproximadamente 1,33 o menor de aproximadamente 1,25. Por consiguiente, el término "esférico" no requiere la presencia de una línea de simetría. Además, las micropartículas pueden tener textura superficial (como líneas continuas o discretas, islas, celosía, muescas, aberturas en canal, protuberancias pequeñas en escala en comparación con el tamaño global de las micropartículas) y seguir considerándose esféricas. El contacto superficial entre micropartículas se reduce al mínimo cuando las micropartículas son esféricas y, por

tanto, normalmente también se reduce al mínimo la aglomeración no deseable de las mismas. En comparación, las micropartículas son cristales esféricos o escamas normalmente producen una aglomeración observable debida a interacciones iónicas y/o no iónicas en superficies planas relativamente grandes.

5 El término "sólido" se refiere a un estado que incluye al menos esencialmente los estados sólido y/o semisólido, pero que excluye líquidos y gases.

El concepto "temperatura ambiente" se refiere a una temperatura que corresponde aproximadamente a la temperatura ambiente, en general un intervalo entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 40°C, por ejemplo entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 25°C.

10 Los conceptos "formado a partir de" y "formado por" indica un lenguaje abierto. Como tal, se considera que una composición formada a partir de o formada por una lista de componentes enumerados es una composición que comprende al menos dichos componentes enumerados y que además puede incluir otros componentes no enumerados durante la formulación de la composición y/o en el producto final obtenido.

15 A no ser que se especifique expresamente algo distinto, todos los intervalos numéricos, cantidades, valores y porcentajes, por ejemplo para cantidades de materiales, tiempos, temperaturas, condiciones de reacción, proporciones de cantidades, valores de peso molecular (de peso molecular promedio en número  $M_n$  o de peso molecular promedio en peso  $M_w$ ) y otros valores dados a conocer aquí se deben entender como si estuvieran modificados en todos los casos por el término "aproximadamente", si es que el término "aproximadamente" no se utiliza expresamente en combinación con dichos intervalos, cantidades, valores y porcentajes aquí indicados. Por consiguiente, a no ser que se indique lo contrario, los parámetros numéricos establecidos en la  
20 presente descripción y las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar. Como mínimo, cada parámetro numérico debe ser interpretado en vista del número de dígitos significativos indicados y aplicando técnicas de redondeo ordinarias.

25 Aunque los intervalos numéricos y parámetros que establecen el amplio alcance de la descripción son aproximaciones, los valores numéricos expuestos en los ejemplos específicos están indicados con la mayor precisión posible. No obstante, cualquier valor numérico es inherentemente algo incierto debido a la desviación estándar hallada en su análisis de medida respectivo. Además, cuando aquí se exponen intervalos numéricos de alcance variable, se considera que se puede utilizar cualquier combinación de estos valores, incluyendo los valores citados, de acuerdo con las enseñanzas de la descripción.

#### Micropartículas

30 Las micropartículas, materiales y métodos para producir micropartículas, las composiciones y formulaciones que contienen micropartícula, y las utilidades de dichas micropartículas, composiciones y formulaciones incluyen, de forma no exclusiva, lo dado a conocer en las Patentes U.S. nº 5.525.519, 5.554.730, 5.578.709, 5.599.719, 5.981.719, 6.090.925, 6.268.053 y 6.458.387, las Publicaciones U.S. nº 20030059474, 20030064033, 20040043077, 20050048127, 20050142201, 20050142205, 20050142206, 20050147687,  
35 20050170005, 20050233945, 20060018971, 20060024240, 20060024379, 20060260777, 20070092452, 20070207210, y 20070281031. Las micropartículas pueden tener una distribución de tamaño generalmente uniforme, como una distribución de tamaños monodispersa, o una distribución de tamaños polidispersa, y una forma generalmente uniforme, es decir, esencialmente esférica. Una o más características de las micropartículas se pueden ajustar durante la producción mediante la manipulación de una o más variables,  
40 tales como, de forma no exclusiva, la selección de ingredientes o la combinación de éstos, las concentraciones de diferentes ingredientes, la temperatura de reacción, el tiempo de reacción y/o el pH si la reacción tiene lugar en solución acuosa.

45 Las micropartículas son adecuadas para administrar *in vivo*, *ex vivo* y/o *in vitro* un agente activo o una combinación de dos o más agentes activos con perfiles de liberación rápida y/o controlada, y son útiles para una gran variedad de aplicaciones terapéuticas, farmacéuticas, diagnósticas, médicas, medicinales, cosméticas, nutricionales, biocidas, separativas, industriales, comerciales y de investigación, tales como administración de fármacos, vacunación, terapia génica y formación de imágenes histopatológica o *in vivo* de tejidos o tumores. Las micropartículas pueden estar formuladas para ser administradas a un sujeto vía oral, parenteral, mucosal, oftálmica, intravenosa, subcutánea, subdérmica, intradérmica, intraarticular,  
50 intramuscular, pulmonar (incluyendo inhalaciones orales y nasales) y/o tópica. La administración intravenosa incluye el cateterismo y la angioplastia.

Las micropartículas contienen una o más macromoléculas, siendo al menos una de ellas una macromolécula bioactiva consistente en un anticuerpo. La o las macromoléculas (normalmente una o más macromoléculas bioactivas y/o una o más macromoléculas portadoras) pueden corresponder al menos al 1%, 5%, 10%, 20%,  
55 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 98% y hasta el 100%, o menos del 100%, en peso y/o volumen

de la micropartícula, o pueden estar presentes en un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores. Los expertos en la técnica entenderán que la macromolécula puede ser una parte (por ejemplo fragmento, segmento, subunidad) de otra macromolécula mayor. También se entenderá que las macromoléculas incluyen moléculas de afinidad, que puede ser, por ejemplo, las partes de receptor o de ligando de una interacción receptor-ligando. Ejemplos no exclusivos de ligandos incluyen virus, bacterias, polisacáridos o toxinas que actúan como antígenos para generar respuestas inmunitarias cuando son administrados a un animal y provocan la producción de anticuerpos.

En la micropartícula pueden estar presentes uno o más ingredientes aparte de las macromoléculas descritas más arriba y los agentes activos descritos más abajo, incluyendo, de forma no exclusiva, polímeros, agentes complejantes, agentes estabilizadores, excipientes, iones, humedad, disolventes residuales, impurezas, productos secundarios, en una cantidad del 50% o menos, el 30% o menos, el 20% o menos, el 10% o menos, el 5% o menos, o el 2% o menos, o más del 0%, en peso y/o volumen de la micropartícula, o en un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores. Adicionalmente, cualquier ingrediente presente en el medio de reacción/incubación (por ejemplo materiales no volátiles) durante la formación de las micropartículas se puede retirar después esencialmente y así no estar presente en las micropartículas resultantes. Inmediatamente después de su formación (que puede ser o no *in situ*) o en una etapa posterior, las micropartículas se pueden dispersar (por ejemplo como coloides o suspensiones) en una fase sólida continua (por ejemplo un sólido congelado que incluye la dispersión) o en una fase no sólida (por ejemplo un medio fluido, como el medio de reacción/incubación en el que se forman las micropartículas, o un medio de lavado).

Las micropartículas pueden tener una densidad esencialmente igual o diferente (por ejemplo mayor o menor) a la de la fase continua (medida a la misma temperatura, por ejemplo temperatura ambiente). Las densidades de las micropartículas y la fase continua son iguales a su peso respectivo dividido entre su volumen respectivo. Las micropartículas pueden tener una densidad menor, igual o mayor que valores tales como 0,5 g/cm<sup>3</sup>, 0,8 g/cm<sup>3</sup>, 0,95 g/cm<sup>3</sup>, 1,0 g/cm<sup>3</sup>, 1,05 g/cm<sup>3</sup>, 1,1 g/cm<sup>3</sup>, 1,3 g/cm<sup>3</sup>, 1,35 g/cm<sup>3</sup>, 1,5 g/cm<sup>3</sup> y 1,9 g/cm<sup>3</sup>, o en un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores, por ejemplo entre 1,0 g/cm<sup>3</sup> y 1,5 g/cm<sup>3</sup> o entre 1,2 g/cm<sup>3</sup> y 1,5 g/cm<sup>3</sup>. La densidad de las micropartículas se puede medir mediante picnometría de helio a temperatura ambiente, mediante técnicas de gradiente de densidad (por ejemplo utilizando centrifugación o ultracentrifugación) empleando un medio de gradiente adecuado (por ejemplo sales de metales alcalinos, como NaCl, NaBr, NaI, KBr, CsF, CsCl, CsBr, sulfato de cesio, acetato de cesio, trifluoroacetato de cesio, RbCl, y tartrato de potasio; moléculas neutras solubles en agua, como sacarosa, con adición opcional de glucosa, glicerol o aceite mineral; macromoléculas hidrófilas como dextrano, copolímero de sacarosa-epiclorohidrina, y seroalbúmina bovina; otras moléculas sintéticas como sales sódicas o metilglucamínicas de ácido triyodobenzoico y de ácido metrizoico, y metrizamida), y otros métodos conocidos. Los métodos normalizados que implican técnicas de gradiente de densidad incluyen ASTM D1505-03, ASTM D1505-98, e ISO 1183-2.

### 35 Agentes activos

Normalmente, uno o más agentes activos están asociados y/o atrapados de forma covalente y/o no covalente con al menos una parte (por ejemplo el centro o núcleo, uno o más compartimentos distribuidos de forma específica o aleatoria, superficies interiores y/o exteriores) de la micropartícula. Por ejemplo, el o los agentes activos pueden estar asociados y/o atrapados de forma covalente y/o no covalente con al menos una parte o esencialmente la totalidad de las macromoléculas bioactivas y/o macromoléculas portadoras y/o uno o más ingredientes adicionales (por ejemplo con uno o más polímeros, como complejos o conjugados de los mismos). Alternativamente, la propia macromolécula puede comprender un agente activo. En ambos casos, las micropartículas pueden comprender una macromolécula bioactiva sobre una superficie exterior de las mismas.

El agente activo puede incluir un agente farmacéutico. Dependiendo de su efecto y/o aplicación, el agente farmacéutico incluye, de forma no exclusiva, adyuvantes, agentes adrenérgicos, bloqueantes adrenérgicos, adrenocorticoides, adrenolíticos, adrenomiméticos, alcaloides, agentes alquilantes, inhibidores alostéricos, esteroides anabólicos, analépticos, analgésicos, anestésicos, anorexigénicos, antiácidos, agentes antialérgicos, agentes antiangiogénesis, agente antiarrítmicos, agentes antibacterianos, antibióticos, anticuerpos, agentes anticáncer tales como paclitaxel y compuestos derivados, agentes anticolinérgicos, antiolesterinasas, anticoagulantes, anticonvulsivos, agentes antidemencia, antidepresivos, agentes antiidiabéticos, antidiarreicos, antídotos, antiepilépticos, antifolatos, antifúngicos, antígenos, antihelmínticos, antihistaminas, hipolipemiantes, antihipertensores, agentes antiinfecciosos, antiinflamatorios, antipalúdicos, antimetabolitos, agentes antimuscarínicos, antimicobacterianos, antineoplásicos, agentes antiosteoporosis, agentes antipatógenos, agentes antiprotozoicos, moléculas de adhesión, antipiréticos, antirreumáticos, antisépticos, agentes antitiroideos, agentes antiúlceras, antivirales, sedantes ansiolíticos, astringentes, agentes bloqueantes de adrenorreceptores beta, biocidas, factores de coagulación sanguínea, calcitonina, cardiotónicos, quimioterapéuticos, agentes reductores del colesterol, cofactores, corticosteroides, antitusivos, citoquinas, diuréticos, dopaminérgicos, moduladores de receptores de estrógenos, enzimas y cofactores de las mismas, inhibidores enzimáticos, factores de diferenciación de crecimiento, factores de crecimiento, agentes

5 hematológicos, hematopoyéticos, modificadores de hemoglobina, hemostáticos, hormonas y análogos de hormonas, hipnóticos, diuréticos hipotensores, agentes inmunológicos, inmunoestimuladores, inmunosupresores, inhibidores, ligandos, agentes reguladores de lípidos, linfoquinas, muscarínicos, relajantes musculares, agentes bloqueadores neuronales, agentes neurotrópicos, parasimpaticomiméticos, hormona paratiroidea, promotores, prostaglandinas, agentes psicoterapéuticos, psicotrópicos, radiofármacos, receptores, sedantes, hormonas sexuales, esterilizantes, estimulantes, trombopoyéticos, factores tróficos, simpaticomiméticos, agentes tiroideos, vacunas, vasodilatadores, vitaminas, xantinas, así como conjugados, complejos, precursores y metabolitos de los mismos. El agente activo se puede utilizar de forma individual o en combinaciones de dos o más de los mismos. En un ejemplo, el agente activo es un agente profiláctico y/o terapéutico que incluye, de forma no exclusiva, péptidos, carbohidratos, ácidos nucleicos, otros compuestos, precursores y derivados de los mismos y combinaciones de dos o más de ellos. En un aspecto, el agente activo es un agente farmacéutico denominado convencionalmente como molécula pequeña.

15 El agente activo incluye una macromolécula bioactiva que es un anticuerpo, como un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal. También pueden estar incluidos otros agentes activos bioactivos, por ejemplo una macromolécula bioactiva tal como una proteína (incluyendo los compuestos proteínicos arriba descritos), un polipéptido, un carbohidrato, un polinucleótido, un vector (por ejemplo un virus o una partícula viral) o un ácido nucleico, o una combinación de dos o más de los mismos. La macromolécula puede ser natural o sintética. Los ejemplos de proteínas también pueden ser cualquier proteína terapéutica conocida aislada de fuentes naturales o producida mediante métodos sintéticos o recombinantes. Ejemplos de proteínas terapéuticas incluyen, de forma no exclusiva, proteínas de la cascada de coagulación sanguínea (por ejemplo Factor VII, Factor VIII, Factor IX, et al.), subtilisina, ovoalbúmina, alfa-1-antitripsina (AAT), DNasa, superóxido dismutasa (SOD), lisozima, ribonucleasa, hialuronidasa, colagenasa, hormona del crecimiento, eritropoyetina, factores de crecimiento de tipo insulínico o sus análogos, interferones, glatiramer, factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos, factor estimulador de colonias de granulocitos, proteínas PEGiladas, proteínas glicosiladas o hiperglicosiladas, desmopresina, agonistas de LHRH tales como: leuprolide, goserelina, nafarelina, busarelina; antagonistas de LHRH, vasopresina, ciclosporina, calcitonina, hormona paratiroidea, péptidos de hormona paratiroidea e insulina.

30 El agente activo puede incluir un agente cosmético. Ejemplos no limitativos de agentes cosméticos incluyen emolientes, humectantes, inhibidores de radicales libres, antiinflamatorios, vitaminas, despigmentantes, agentes antiacné, antiseborreicos, queratolíticos, adelgazantes, colorantes para la piel y antisolares. Compuestos útiles como agentes cosméticos incluyen, de forma no exclusiva, ácido linoleico, retinol, ácido retinoico, alquil ésteres de ácido ascórbico, ácidos grasos poliinsaturados, ésteres nicotínicos, nicotinato de tocoferol, insaponificables de arroz, semillas de soja o karité, ceramidas, hidroxiácidos tales como ácido glicólico, derivados de selenio, antioxidantes, beta-caroteno, gamma-orizanol y glicerato de estearilo. Los agentes cosméticos pueden ser comerciales y/o se pueden preparar mediante técnicas conocidas. Al igual que más arriba, los diversos agentes activos se pueden utilizar de forma individual o en combinaciones de dos o más de los mismos.

40 El agente activo puede incluir un suplemento nutricional. Ejemplos no limitativos de suplementos nutricionales incluyen proteínas, carbohidratos, vitaminas hidrosolubles (por ejemplo vitamina C, vitaminas de complejo B y similares), vitaminas liposolubles (por ejemplo vitaminas A, D, E, K y similares) y extractos de hierbas. Los suplementos nutricionales pueden ser comerciales y/o se pueden preparar mediante técnicas conocidas. Al igual que más arriba, los diversos agentes activos se pueden utilizar de forma individual o en combinaciones de dos o más de los mismos.

45 El agente activo puede incluir un compuesto con un peso molecular de 2 kDa o menos. Ejemplos no limitativos de estos compuestos incluyen esteroides, agonistas beta, antimicrobianos, antifúngicos, taxanos (agentes antimitóticos y antimicrotubulares), aminoácidos, compuestos alifáticos, compuestos aromáticos y compuestos de urea. Los agentes activos conocidos convencionalmente como moléculas pequeñas (o moléculas orgánicas pequeñas) son agentes activos representativos con un peso molecular de 2 kDa o inferior.

50 El agente activo también puede incluir un agente diagnóstico. Los agentes diagnósticos incluyen, de forma no exclusiva, agentes de formación de imágenes por rayos X y medios de contraste. Ejemplos no limitativos de agentes de formación de imágenes por rayos X incluyen 3,5-diacetamido-2,4,6-triyodobenzoato de etilo (WIN-8883, etil éster de ácido diatraxoico); 6-etoxi-6-oxohexil-3,5-bis(acetamido)-2,4,6-triyodobenzoato (WIN 67722); 2-(3,5-bis(acetamido)-2,4,6-triyodobenzoiloxi)-butirato de etilo (WIN 16318); diatrizoxiacetato de etilo (WIN 12901); 2-(3,5-bis(acetamido)-2,4,6-triyodobenzoiloxi)propionato de etilo (WIN 16923); 2-(3,5-bis(acetamido)-2,4,6-triyodobenzoiloxi)-acetamida de N-etilo (WIN 65312); 2-(3,5-bis(acetamido)-2,4,6-triyodobenzoiloxi)acetamida de isopropilo (WIN 12855); 2-(3,5-bis(acetamido)-2,4,6-triyodobenzoiloximalonato de dietilo (WIN 67721); 2-(3,5-bis(acetamido)-2,4,6-triyodobenzoiloxi)fenil-acetato de etilo (WIN 67585); [[3,5-bis(acetilamino)-2,4,5-triyodobenzoil]oxi]bis(1-metil) éster de ácido propanodioico, (WIN 68165) y 3,5-bis(acetilamino)-2,4,6-triyodo-4-(etil-3-etoxi-2-butenato) éster de ácido benzoico (WIN 68209). Los agentes



de contraste preferentes se desintegran deseablemente de forma relativamente rápida bajo condiciones fisiológicas, reduciendo así al mínimo cualquier respuesta inflamatoria asociada a las partículas. La desintegración puede ser el resultado de hidrólisis enzimática, solubilización de ácidos carboxílicos bajo pH fisiológico u otros mecanismos. Por consiguiente, pueden ser preferibles ácidos carboxílicos yodados poco solubles tales como yodipamida, ácido diatrizoico y ácido metrizoico, junto con especies yodadas hidrolíticamente lábiles tales como WIN 67721, WIN 12901, WIN 68165 y WIN 68209 u otros.

En una realización específica, el agente activo puede incluir un agente terapéutico para la prevención y/o el tratamiento de afecciones pulmonares. Ejemplos no limitativos de estos agentes incluyen esteroides, agonistas beta, agentes antifúngicos, compuestos antimicrobianos, broncodilatadores, agentes antiasmáticos, agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINE), AAT y agentes para tratar la fibrosis quística. Ejemplos no limitativos de esteroides para la prevención y/o el tratamiento de afecciones pulmonares incluyen, de forma no exclusiva, beclometasona (como dipropionato de beclometasona), fluticasona (como propionato de fluticasona), budesonida, estradiol, fludrocortisona, flucinonida, triamcinolona (como acetónido de triamcinolona), flunisolida y sales de los mismos. Ejemplos no limitativos de agonistas beta para la prevención y/o el tratamiento de afecciones pulmonares incluyen xinafoato de salmeterol, fumarato de formoterol, levalbuterol, bambuterol, tulobuterol y sales de los mismos. Ejemplos no limitativos de agentes antifúngicos para la prevención y/o el tratamiento de afecciones pulmonares incluyen itraconazol, fluconazol, anfotericina B y sales de los mismos.

Los agentes activos se pueden utilizar en una combinación de dos o más de los mismos. Ejemplos de combinaciones no limitativas incluyen un esteroide y un agonista beta, por ejemplo propionato de fluticasona y salmeterol, budesonida y formoterol, etc. Los expertos en la técnica conocen bien muchas otras combinaciones de agentes terapéuticamente activos viables.

#### Material no volátil

Las composiciones que contienen las micropartículas pueden contener al menos un material no volátil, siendo las estructuras químicas y/o composiciones del o de los materiales no volátiles diferentes a las de la o las macromoléculas que forman las micropartículas.

En general, los materiales no volátiles tienen un punto de ebullición y/o un punto de inflamación superior a aproximadamente 100°C, superior a aproximadamente 150°C y/o superior a aproximadamente 200°C. Los materiales no volátiles pueden ser naturales, sintéticos, semisintéticos o recombinantes. El o los materiales no volátiles son polímeros no iónicos solubles en líquidos acuosos (por ejemplo solubles en agua) y/o miscibles con líquidos acuosos (por ejemplo miscibles con agua) o sales de dichos materiales no iónicos. Los polímeros no iónicos pueden ser hidrófilos o anfifílicos. El o los materiales no volátiles pueden reducir ventajosamente, de forma independiente o colectiva, la solubilidad de una o más macromoléculas en la fase continua o en el o los fluidos dentro de las mismas. Cuando están presentes en la fase continua, el o los materiales no volátiles normalmente no desnaturalizan ni interactúan de forma covalente y/o iónica con la o las macromoléculas en las micropartículas. Adicionalmente, cuando están presentes en la fase continua, el o los materiales no volátiles normalmente no forman complejos, conjugados, agregados y/o aglomerados entre sí, ni se unen de otro modo, por ejemplo por vía covalente, iónica y/u otras interacciones. Además, el o los materiales no volátiles en la fase continua normalmente no experimentan gelificación (por ejemplo formando un hidrogel), ni por sí mismos ni con otros ingredientes presentes en la fase continua. En general, el o los materiales no volátiles tienen independientemente pesos moleculares iguales o superiores a valores tales como 200 dalton, 300 dalton, 400 dalton, 600 dalton, 800 dalton, 1.000 dalton, 1.500 dalton, 2.000 dalton, 2.500 dalton, 3.000 dalton, 3.500 dalton, 4.000 dalton, 5.000 dalton, 8.000 dalton, y 10.000 dalton, o hasta aproximadamente 3.000 kilodalton (kd), o en un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores, por ejemplo entre 200 dalton y 10.000 dalton, entre 1.000 dalton y 1.500 dalton, entre 1.000 dalton y 2.000 dalton, entre 1.000 dalton y 2.500 dalton, entre 1.000 dalton y 3.000 dalton, entre 1.000 dalton y 3.500 dalton, entre 1.000 dalton y 4.000 dalton, entre 1.000 dalton y 5.000 dalton, entre 1.000 dalton y 8.000 dalton, entre 1.000 dalton y 10.000 dalton, entre 1.500 dalton y 2.000 dalton, entre 1.500 dalton y 2.500 dalton, entre 1.500 dalton y 3.000 dalton, entre 1.500 dalton y 3.500 dalton, entre 1.500 dalton y 4.000 dalton, entre 1.500 dalton y 5.000 dalton, entre 1.500 dalton y 8.000 dalton, entre 1.500 dalton y 10.000 dalton, entre 2.000 dalton y 2.500 dalton, entre 2.000 dalton y 3.000 dalton, entre 2.000 dalton y 3.500 dalton, entre 2.000 dalton y 4.000 dalton; entre 2.000 dalton y 5.000 dalton, entre 2.000 dalton y 8.000 dalton, entre 2.000 dalton y 10.000 dalton, etc.

Ejemplos no limitativos de materiales no volátiles para la fase continua incluyen los polímeros no iónicos solubles en agua y/o miscibles con agua dados a conocer en las Patentes U.S. nº 5.525.519, 5.554.730, 5.578.709, 5.599.719, 5.981.719, 6.090.925, 6.268.053 y 6.458.387, las Publicaciones U.S. nº 20030059474, 20030064033, 20040043077, 20050048127, 20050142201, 20050142205, 20050142206, 20050147687, 20050170005, 20050233945, 20060018971, 20060024240, 20060024379, 20060260777, 20070092452, 20070207210, y 20070281031. Normalmente, el o los materiales no volátiles son no iónicos y pueden ser hidrófilos, anfifílicos, solubles en líquidos acuosos, miscibles con líquidos acuosos y/o solubles o miscibles en

un fluido soluble en líquidos acuosos o miscible con líquidos acuosos a una temperatura de 40°C o inferior. Ejemplos no limitativos de materiales no volátiles adecuados pueden ser lineales, ramificados o cíclicos y pueden incluir poliéteres no iónicos, copoliéteres no iónicos, poliésteres no iónicos, copoliésteres no iónicos, copolímeros de poliéter-poliéster no iónicos, polímeros vinílicos no iónicos, polímeros que contienen pirrolidona no iónicos, carbohidratos poliméricos no iónicos, derivados y sales de los mismos, y combinaciones de dos o más de ellos. Ejemplos no limitativos de poliéteres no iónicos y copoliéteres no iónicos (incluyendo copolímeros y terpolímeros) incluyen, de forma no exclusiva, poliéteres con grupos terminales hidroxílicos (por ejemplo, poliéteralcoholes, poliéterpolioles, poliéteres con extremos encapsulados con óxido de etileno diferentes a los polietilenglicoles y derivados de los mismos con extremos encapsulados con alquilo (por ejemplo metilo, etilo, propilo, butilo, etc.), como polialquilenglicoles (por ejemplo polioxi-1,2-alquilenglicoles como polietilenglicoles y polipropilenglicoles, así como politrimetilenglicol éteres y politetrametilenglicol éteres), copoliéteres con grupos terminales hidroxílicos (por ejemplo copoliéteralcoholes, copoliéterpolioles, copoliéteres con extremos encapsulados con óxido de etileno) y derivados de los mismos con extremos encapsulados con alquilo (por ejemplo metilo, etilo, propilo, butilo, etc.), tales como copoliéteres de bloques de dos o más óxidos de 1,2-alquileo diferentes (por ejemplo copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno como poloxámeros) y copoliéteres de uno o más óxidos de 1,2-alquileo y uno o más de los compuestos tetrahidrofurano, tetrahidropirano y 1,3-propanodiol (por ejemplo copolímeros de (polietilenglicol)-politrimetilenglicol éter), copolímeros de (polietilenglicol)-(politetrametilenglicol éter)). Ejemplos no limitativos de poliésteres no iónicos y copoliésteres no iónicos (incluyendo copolímeros y terpolímeros) incluyen poliésteres con grupos terminales hidroxílicos (por ejemplo poliésterpolioles, copoliésterpolioles, poliésteres con extremos encapsulados con óxido de etileno o con grupos terminales polioxietilénicos, y determinados poliésteres de silicona, tales como polioxietilén-gliceril ésteres de ácido dicarboxílico, polioxietilensorbitol ésteres de ácido dicarboxílico, polioxietilenglicol y polioxietilenalquil ésteres de ácido dicarboxílico. Ejemplos no limitativos de copolímeros de poliéter-poliéster no iónicos (incluyendo terpolímeros) incluyen, de forma no exclusiva, copolímeros en bloque de una o más lactonas y/o ácidos dicarboxílicos y uno o más óxidos de 1,2-alquileo, derivados de esterificación de los poliéteres no iónicos y copoliéteres no iónicos aquí descritos, y derivados de eterificación de los poliésteres no iónicos y copoliésteres no iónicos aquí descritos, como copolímeros en bloques de (polietilenglicol)-policaprolactona. Ejemplos no limitativos de polímeros vinílicos no iónicos (incluyendo copolímeros y terpolímeros) incluyen, de forma no exclusiva, alcoholes polivinílicos, homopolímeros y copolímeros (incluyendo terpolímeros) de (alq)acrilatos de hidroxialquilo (por ejemplo acrilato de hidroxietilo, acrilato de hidroxipropilo, metacrilato de hidroxietilo, metacrilato de hidroxipropilo), (alq)acrilatos de oligo-oxialquileo (por ejemplo acrilatos de oligo-oxietileno, metacrilatos de oligo-oxietileno) y/o (alq)acrilatos de oligo-oxialquileo con extremos encapsulados con alquilo (por ejemplo encapsulados con metilo), polivinilpirrolinas y homopolímeros y copolímeros que contienen alqueniil- pirrolidona.

Ejemplos no limitativos de carbohidratos poliméricos no iónico (incluyendo oligoméricos) (con un peso molecular de 200 dalton a 5.000.000 dalton, por ejemplo 1.000 dalton, 3.000 dalton, 5.000 dalton, 10.000 dalton, 30.000 dalton, 50.000 dalton, 100.000 dalton, 300.000 dalton, 500.000 dalton, 1.000.000 dalton o 3.000.000 dalton, o en un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores) y derivados de los mismos incluyen, de forma no exclusiva, almidón, amilopectina (polisacáridos ramificados), amilosa (polisacáridos lineales), celulosa, goma guar, polisacáridos guar, goma xantana, dextrinas (por ejemplo ciclodextrinas, maltodextrinas), dextranos, polidextrosas, goma gellan, pululano, celodextrinas, beta-glucanos y derivados de los mismos, por ejemplo ésteres no iónicos formados por esterificación, incluyendo, de forma no exclusiva, benzoatos y alcanooatos tales como acetatos, propionatos, butiratos, y hexanoatos; o éteres no iónicos formados por eterificación, tales como éteres de almidón no iónicos, éteres de amilopectina no iónicos, éteres de amilosa no iónicos, éteres de celulosa no iónicos, éteres guar no iónicos, ésteres de almidón no iónicos, ésteres de amilopectina no iónicos, ésteres de amilosa no iónicos, ésteres de celulosa no iónicos, éter ésteres de almidón no iónicos, éster ésteres de almidón no iónicos, éter ésteres de celulosa no iónicos y éster ésteres de celulosa no iónicos. Ejemplos no limitativos de éteres de almidón no iónicos incluyen alquilalmidones tales como metilalmidones, etilalmidones, propilalmidones y butilalmidones; hidroxialquilalmidones como hidroxietilalmidones (por ejemplo tetraalmidón, pentaalmidón, hetaalmidón), hidroxipropilalmidones, hidroxibutilalmidones e hidroxipentilalmidones; así como alquilhidroxialquilalmidones como metilhidroxietilalmidones, metilhidroxipropil-almidones y etilhidroxipropilalmidones. Ejemplos no limitativos de éteres de amilopectina no iónicos y éteres de amilosa no iónicos incluyen hidroxietilamilopectinas, hidroxipropilamilopectinas, hidroxietilamilosas e hidroxipropilamilosas. Ejemplos no limitativos de éteres de celulosa no iónicos incluyen alquil celulosas tales como metilcelulosas, etilcelulosas, propilcelulosas, isopropilcelulosas y butilcelulosas; hidroxialquilcelulosas como hidroxietilcelulosas, hidroxipropilcelulosas, hidroxisopropilcelulosas, hidroxibutilcelulosas e hidroxipentilcelulosas; así como alquilhidroxialquilcelulosas como metilhidroxietil-celulosas, metilhidroxipropilcelulosas, metilhidroxibutilcelulosas, etilhidroxietil-celulosas, etilhidroxipropilcelulosas, propilhidroxietilcelulosas, propilhidroxipropil-celulosas, isopropilhidroxipropilcelulosas, butilhidroxipropilcelulosas, pentilhidroxipropilcelulosas y hexilhidroxipropilcelulosas. Ejemplos no limitativos de éteres guar no iónicos incluyen alquilguar polisacáridos tales como metilguar polisacáridos, etilguar polisacáridos, propilguar polisacáridos y butilguar polisacáridos; hidroxialquilguar polisacáridos tales como hidroxietilguar polisacáridos e hidroxipropilguar polisacáridos; así

como alquilhidroxialquilguar polisacáridos tales como metilhidroxietilguar polisacáridos, metilhidroxipropilguar polisacáridos, etilhidroxipropilguar polisacáridos. Otros carbohidratos poliméricos no iónicos incluyen metilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxietilmetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, etilhidroxietilcelulosa, metiletilhidroxietilcelulosa, butilglicidil éter hidroxietilcelulosa, laurilglicidil éter hidroxietilcelulosa, hidroximetilhidroxietilcelulosa, hidroxietilcelulosa modificada con butil glicidil éter, metilhidroxietilcelulosa, metilhidroxipropilcelulosa, ésteres de almidón (por ejemplo almidón modificado con anhídrido alquilsuccínico, acetatos de almidón y alquenilsuccinatos de almidón), ésteres de celulosa (monobutiratos y monopropionatos de celulosa), éter-ésteres de celulosa (ésteres de ácido hidroxialquilcelulosa-2-hidroxicarboxílico), poli(3-hidroxioxetanos). Ejemplos no limitativos de ésteres de carbohidrato poliméricos no iónicos incluyen aquellos que tienen un grado de sustitución entre 0,5 y 1,0, por ejemplo entre 0,7 y 0,9, y son solubles en agua. También se pueden utilizar sales iónicas de los materiales arriba mencionados, si pueden prepararse. Por ejemplo, también se pueden utilizar sales de polisacáridos solubles en agua y/o miscibles con agua, tales como sulfato de dextrano, sulfato de dextrina y alginato de sodio.

#### No disolvente

Para posibilitar y/o facilitar la separación de las micropartículas de los otros componentes de la composición que las contiene, o al menos el o los materiales no volátiles de la misma, se pueden utilizar uno o más no disolventes de forma individual o en una combinación de dos o más de los mismos. Los componentes no disolventes se seleccionan de modo que el o los materiales no volátiles de la composición sean más solubles en el no disolvente y/o miscibles con el mismo que las micropartículas. Como tales, el o los no disolventes pueden ser adecuados como sistemas de solubilidad diferencial para separar (por ejemplo, extraer, lavar, excluir, desplazar, retirar) dichos materiales de las micropartículas utilizando técnicas no limitativas tales como lavado (por ejemplo lavado por centrifugación), diafiltración, filtración, diálisis, electroforesis, o una combinación de las mismas.

En general, las micropartículas son esencialmente insolubles en el no disolvente. Más específicamente, las micropartículas tienen una solubilidad en el no disolvente tal que no más de un 25% en peso de las micropartículas se disuelven cuando las micropartículas se dispersan en el no disolvente, por ejemplo menos de un 20% en peso, menos de un 17,5% en peso, menos de un 15% en peso, menos de un 12,5% en peso, menos de un 10% en peso, menos de un 7,5% en peso, menos de un 5% en peso, menos de un 1% en peso, o un intervalo entre dos de estos valores, por ejemplo entre un 1% en peso y un 25% en peso, entre un 5% en peso y un 25% en peso, entre un 7,5% en peso y un 25% en peso, entre un 10% en peso y un 25% en peso, entre un 12,5% en peso y un 25% en peso, entre un 15% en peso y un 25% en peso, entre un 17,5% en peso y un 25% en peso, entre un 20% en peso y un 25% en peso, etc.

El material no volátil debería ser más soluble en el no disolvente que las micropartículas. Por ejemplo, el o los materiales no volátiles pueden tener una solubilidad en el no disolvente de un 10% en peso o más, tal como valores menores, iguales o mayores que un 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, o en un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores. Adicionalmente, el o los materiales no volátiles pueden ser totalmente miscibles con el no disolvente.

El no disolvente o al menos el líquido no acuoso contenido en el mismo tienen generalmente una LD<sub>50</sub> oral en ratas mayor de 1,6 g/kg de peso corporal, tal como 1,7 g/kg o más, 1,8 g/kg o más, 2 g/kg o más, 2,5 g/kg o más, 3 g/kg o más, 4 g/kg o más, 5 g/kg o más, o en un intervalo entre dos de estos valores. Normalmente, el no disolvente está libre de cualquier material que tenga una LD<sub>50</sub> oral en ratas de 1,6 g/kg de peso corporal o menos. Adicional o alternativamente, el no disolvente o al menos el líquido no acuoso contenido en el mismo pueden tener una exposición diaria permitida en humanos de 50 mg/día o más.

El no disolvente comprende una solución acuosa que incluye al menos un catión multivalente que comprende cationes Zn<sup>2+</sup>. El no disolvente puede presentar otros cationes multivalentes (por ejemplo divalentes, trivalentes), por ejemplo seleccionados entre cationes metálicos multivalentes, incluyendo, de forma no exclusiva, Ba<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cr<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup>, Fe<sup>3+</sup> y combinaciones de dos o más de los mismos. En general, el o los cationes multivalentes están presentes en el no disolvente en una concentración de 0,01 mM a 50 mM, o incluso mayor, por ejemplo en concentraciones tales como 0,05 mM, 0,1 mM, 0,2 mM, 0,5 mM, 1 mM, 1,5 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 80 mM, 100 mM, o en un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores, por ejemplo entre 0,01 mM y 100 mM, entre 0,01 mM y 80 mM, entre 0,01 mM y 20 mM, entre 0,01 mM y 10 mM, entre 0,01 mM y 5 mM, entre 0,01 mM y 2 mM, entre 0,01 mM y 1,5 mM, entre 0,01 mM y 1 mM, entre 0,01 mM y 0,5 mM, entre 0,01 mM y 0,2 mM, entre 0,01 mM y 0,1 mM, entre 0,01 mM y 0,05 mM, etc. Ventajosamente se ha comprobado que no disolventes que contienen estos cationes multivalentes reducen la solubilidad de micropartículas en solución acuosa sin que ello afecte negativamente a su actividad.

El no disolvente puede contener además uno o más cationes orgánicos volátiles. Ejemplos no limitativos de cationes orgánicos volátiles incluyen un catión amonio, cationes dialquilamonio (por ejemplo catión

dimetilamonio), cationes trialkilamonio (por ejemplo catión trimetilamonio) y combinaciones de los mismos. En otro ejemplo, el o los no disolventes pueden contener además uno o más aniones adecuados, tal como uno o más aniones no quelantes de cationes multivalentes. Ejemplos no limitativos de aniones no quelantes incluyen acetato, ascorbato, aspartato, bicarbonato, carbonato, cloruro, formato, salicilato, succinato, sulfato y combinaciones de dos o más de los mismos. Normalmente, el no disolvente está libre (por ejemplo contiene menos de un 0,50% en peso, menos de un 0,25% en peso y/o un 0% en peso) de agentes quelantes para el o los cationes multivalentes libres. Ejemplos no limitativos de dichos agentes quelantes incluyen dietilditiocarbamato (DEDTC), ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), TPEN (N,N,N',N'-tetraquis(2-piridilmetil)etilendiamina), DMPS (ácido 2,3-dimercapto-1-propanosulfónico), 1,10-fenantrolina, diferoximina, goma arábiga, citrato, malato, lactato, picolinato, gluconato, glucosa, glutatión, histidina, cisteína, fosfato y tampón Tris.

Normalmente, el no disolvente está libre (por ejemplo contiene menos de un 0,50% en peso, menos de un 0,25% en peso y/o un 0% en peso) de líquidos orgánicos, incluyendo, de forma no exclusiva, alcoholes, cetonas, nitrilos, éteres, alcanos y similares. Ventajosamente, el no disolvente puede ser farmacéuticamente aceptable (por ejemplo y así dichos no disolventes también pueden utilizarse como diluyente para inyección u otra vía de administración para seres humanos después de transferir micropartículas a los mismos).

El no disolvente puede tener un pH por encima del punto neutro superficial de las micropartículas, de tal modo que, cuando se combina con una composición que comprende múltiples micropartículas sólidas para formar una mezcla que contiene una o más fases líquidas y las micropartículas sólidas, la fase líquida de dicha mezcla (o más generalmente, la propia mezcla o suspensión) tenga un pH por encima del punto neutro superficial de la micropartícula. De modo similar, cuando se utiliza en relación con micropartículas que contienen una o más macromoléculas bioactivas, el no disolvente puede tener un pH por encima del punto isoeléctrico de la macromolécula bioactiva, de tal modo que, cuando se combina con la composición que comprende múltiples micropartículas sólidas para formar una mezcla que contiene una o más fases líquidas y las micropartículas sólidas, cualquier fase líquida resultante (o más generalmente, la propia mezcla) tenga un pH superior al punto isoeléctrico de la molécula bioactiva contenida en el mismo. Por tanto, el no disolvente puede contener un agente de ajuste del pH tal como una base o un tampón, además del catión multivalente. Como saben los expertos en la técnica, el punto neutro superficial de una partícula y el punto isoeléctrico de cualquier macromolécula particular se pueden determinar fácilmente utilizando métodos rutinarios, por ejemplo los descritos en la Publicación de Patente U.S. nº 20060260777. Normalmente, el pH de la mezcla es al menos 0,3 unidades de pH mayor, por ejemplo al menos 0,5, al menos 0,8 y/o al menos 1 unidad de pH mayor que el punto neutro superficial de las micropartículas y/o el punto isoeléctrico de la macromolécula contenida en las mismas. Los no disolventes con un pH mayor de 7, tal como igual o mayor de 7,3, 7,5, 7,8, 8, 8,5, 9, o en un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores, son adecuados normalmente para su uso en los métodos de la invención.

#### Exposición de la composición al no disolvente y retirada del material no volátil

Cuando la composición se combina con el no disolvente y/o se expone de otro modo al mismo, las características físicas y/o químicas del no disolvente permiten la solvatación del material o de los materiales no volátiles en la composición por el no disolvente, mientras que las micropartículas se mantienen intactas (ya que las micropartículas son menos solubles que el material no volátil en el no disolvente). Retirando las fases líquidas resultantes, las micropartículas se pueden separar eficazmente del material o los materiales no volátiles y, en algunos casos, de otro u otros componentes de la composición original. Técnicas representativas, no limitativas, útiles para retirar partes de las fases líquidas y/o separar de otro modo las micropartículas de la composición o de uno o más componentes de la misma incluyen lavado, filtración (incluyendo ultrafiltración), diálisis, diafiltración, separación de fases (por ejemplo centrifugación), electroforesis, y extracción magnética, y combinaciones de dos o más de estas técnicas. La centrifugación incluye además ultracentrifugación, centrifugación de flujo continuo y lavado por centrifugación reiterada, y se puede realizar opcionalmente en combinación con métodos de retirada de líquidos, incluyendo, de forma no exclusiva, decantación y aspiración.

Determinados componentes de la composición se pueden retirar mediante técnicas seleccionadas. Por ejemplo, el o los materiales no volátiles de la composición se pueden retirar esencialmente siguiendo uno, dos o más lavados reiterados (por ejemplo lavado por centrifugación reiterada o diafiltración reiterada) utilizando el no disolvente, por ejemplo, normalmente se puede retirar al menos un 50%, tal como un 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o más (por ejemplo un 100%) del material no volátil. Adicionalmente, agua y/u otros componentes liofilizables de la composición, si están presentes, se pueden retirar parcial o completamente utilizando liofilización.

El proceso para separar las micropartículas de la composición (o al menos una parte del material no volátil) dentro de la misma se lleva a cabo normalmente a una temperatura superior a la temperatura de congelación de la composición o de cualquier componente de ésta (o de la fase continua cuando se está procesando una

dispersión), e inferior a la temperatura de degradación de las micropartículas o la macromolécula bioactiva dentro de la misma, tal como a temperatura ambiente o por debajo de la misma, o por encima o por debajo de temperaturas tales como 40°C, 37°C, 30°C, 25°C, 20°C, 15°C, 10°C, 5°C, 2°C, 0°C, -5°C, -10°C, -15°C, -20°C, o en un intervalo entre dos cualesquiera de estas temperaturas.

- 5 El método de procesamiento puede implicar la utilización de un segundo no disolvente en el que las micropartículas son esencialmente insolubles pero que es diferente al primer no disolvente en una o más de las siguientes características (pero por lo demás igual): (1) pH, (2) fuerza iónica, y (3) concentración del catión multivalente libre. Por ejemplo, el segundo no disolvente puede tener una o más de las siguientes características en relación con el primer disolvente (pero por lo demás igual que el mismo): (1) un pH más alto,  
 10 (2) una menor fuerza iónica y (3) una concentración más baja del o de los cationes multivalentes libres. En otro ejemplo, el segundo no disolvente puede estar libre del o de los cationes multivalentes libres presentes en el primer no disolvente. En otro ejemplo, el método de procesamiento de la dispersión puede incluir adicionalmente: proporcionar un tercer no disolvente en el que las micropartículas son esencialmente insolubles, siendo el tercer no disolvente diferente del segundo no disolvente en una o más de las siguientes características; (1) pH, (2) fuerza iónica, y (3) concentración del o de los cationes multivalentes libres. Las concentraciones de sales tampón, si están presentes en los no disolventes, también pueden variar.

- En un ejemplo, a temperatura ambiente o por debajo de ésta (tal como 2-8°C), la composición es una dispersión y se somete a un proceso de concentración basado en diafiltración utilizando un no disolvente como medio de diafiltración para intercambiarlo con al menos una parte del o de los componentes de la fase continua  
 20 (incluyendo el o los materiales no volátiles y/o el disolvente) y retirar así dicha parte. Por consiguiente, el volumen de la fase continua se puede reducir para concentrar las micropartículas antes de llevar a cabo un secado (por ejemplo mediante liofilización o secado por aire), reduciendo así el tiempo y el coste del procesamiento. Para el proceso de concentración se puede utilizar un aparato de diafiltración que contiene una bomba peristáltica, un recipiente de depósito, un cartucho de fibras huecas, y tubos, tal como saben los expertos en la técnica. De modo similar, también se puede utilizar un lavado por centrifugación.

- Como un resultado no limitativo de la retirada de uno o más componentes de la fase continua, mediante el proceso de concentración se puede formar una dispersión intermedia que contiene las micropartículas y el no disolvente, pudiendo aumentarse de forma considerable la concentración de las micropartículas contenidas en la misma (por ejemplo una concentración 2 veces mayor o más, 5 veces mayor o más, 10 veces mayor o más,  
 30 20 veces mayor o más, o 40 veces mayor o más) en relación con la de la dispersión original, a 1 g/ml o más, tal como 10 mg/ml o más. El o los materiales no volátiles (por ejemplo polímeros no iónicos) en la fase continua original se pueden retirar parcial o totalmente durante este proceso de concentración. Por tanto, la fase continua de la nueva dispersión se puede diferenciar de la fase continua de la dispersión original en que está al menos esencialmente libre del o de los materiales no volátiles contenidos en ésta. Por ejemplo, la fase continua de la nueva dispersión puede contener menos de un 5% en peso o volumen del o de los materiales no volátiles, por ejemplo valores menores o iguales al 3%, 2%, 1%, 0,5%, o éstos pueden estar presentes en un intervalo entre dos cualesquiera de dichos valores después de llevar a cabo una o más de las etapas anteriores. Las micropartículas se pueden suspender libremente en la nueva dispersión o pueden estar en forma de uno o más agregados resuspendibles (tales como bandas isopícnicas o pellas sólidas).

- 40 La dispersión intermedia concentrada se puede procesar después utilizando técnicas tales como dilución y/o lavado por centrifugación reiterado utilizando el mismo no disolvente que forma la dispersión intermedia o un no disolvente diferente (tal como los aquí descritos) para retirar adicionalmente el o los materiales no volátiles (por ejemplo polímeros no iónicos), si queda alguno presente. El proceso de separación puede resultar en una nueva dispersión que contiene las micropartículas y el no disolvente utilizado durante el proceso de separación,  
 45 con una concentración de las micropartículas en un intervalo de 1 mg/ml a 50 g/ml, tal como 5 g/ml a 20 g/ml, por ejemplo aproximadamente 10 g/ml. Esta nueva suspensión se puede almacenar y/o utilizar como tal, u opcionalmente se puede procesar adicionalmente para retirar el no disolvente y obtener las micropartículas en forma de un polvo seco. Las técnicas para retirar el no disolvente incluyen, de forma no exclusiva, diversas técnicas de secado (por ejemplo secado al aire, liofilización, criodesecación, secado en fase líquida, secado por pulverización tal como secado por pulverización en frío, secado criogénico, liofilización por pulverización, secado supercrítico, tal como secado de fluido supercrítico, secado en lecho fluidizado), y combinaciones de  
 50 dos o más de estas técnicas.

- En un ejemplo, una dispersión fluida (por ejemplo una suspensión) que contiene múltiples micropartículas, tales como microesferas sólidas, se dispersa en una fase continua que contiene agua o una solución acuosa (tal como una solución tampón, opcionalmente con uno o más cationes polivalentes) con uno o más materiales no volátiles (por ejemplo polímeros no iónicos) solubilizados dentro de la misma. Opcionalmente, la dispersión se puede congelar a una temperatura de -20°C o menos, preferiblemente -40°C o menos, tal como aproximadamente -60°C, y liofilizar durante un período de tiempo suficiente (tal como un día o más, preferiblemente 3 días) para retirar esencialmente toda el agua y cualquier otra sustancia liofilizable, para

- 5 obtener una dispersión sólida (por ejemplo una torta liofilizada) en la que las micropartículas pueden estar dispersadas en una fase continua sólida del o de los materiales no volátiles. Tanto la dispersión fluida original como la dispersión sólida se pueden exponer a uno o más no disolventes de la presente descripción, por ejemplo mediante combinación de las micropartículas con el no disolvente seguida de agitación, de modo que las micropartículas se pueden dispersar en una sola fase líquida que contiene el no disolvente (y que opcionalmente también contiene una parte de la fase continua de la dispersión fluida original o toda ella). El o los materiales no volátiles se pueden disolver o solubilizar de otro modo en el no disolvente mientras que las micropartículas permanecen dispersadas como una fase sólida. La nueva dispersión se puede someter a centrifugación retirando el sobrenadante por aspiración o decantación, retirando así al menos una parte del o de los materiales no volátiles solubilizados dentro de la misma de las micropartículas. Las micropartículas se pueden lavar por centrifugación opcionalmente más de una vez con el mismo no disolvente o con uno o más no disolventes diferentes, si así se desea. Los eventuales no disolventes residuales en las micropartículas retenidas se pueden retirar mediante secado de las micropartículas utilizando uno o más medios de secado conocidos por los expertos en la técnica (por ejemplo bajo corriente de nitrógeno o vacío).
- 10
- 15 Tal como se ha descrito anteriormente, las propiedades físicas y/o químicas de o de los no disolventes se pueden elegir de modo que resulte relativamente simple, conveniente y/o rentable retirar la parte restante del o de los no disolventes de las micropartículas (por ejemplo mediante liofilización, diafiltración, secado al aire, o combinaciones de estas técnicas) para obtener, por ejemplo, un polvo seco de las micropartículas. Alternativa o adicionalmente, el no disolvente puede ser adecuado como vehículo para el almacenamiento y/o los usos finales previstos de las micropartículas, con lo que la retirada es innecesaria o solo es deseable una retirada parcial.
- 20

#### Fase continua

- 25 La fase continua de una dispersión multifásica procesada de acuerdo con los métodos descritos puede no ser sólida, por ejemplo puede contener un fluido o una mezcla de dos o más fluidos (por ejemplo, una mezcla homogénea de dos o más líquidos, pudiendo al menos un primer líquido ser soluble en al menos un segundo líquido o ser miscible con éste). Ejemplos no limitativos de fluidos adecuados incluyen fluidos acuosos (por ejemplo agua H<sub>2</sub>O, D<sub>2</sub>O, tampones acuosos y otras soluciones acuosas), fluidos no acuosos (por ejemplo fluidos orgánicos, tampones orgánicos) y combinaciones de dos o más de los anteriores. En un aspecto, la fase continua no sólida puede ser esencialmente acuosa, por ejemplo puede contener más de un 10% en volumen, como un 25% o más, un 50% o más, o un 75% o más, de agua. La fase continua puede ser parcial o totalmente acuosa o miscible con líquidos acuosos, inmiscible con líquidos acuosos, soluble en agua o insoluble en agua.
- 30

- 35 Cuando se mide a la misma temperatura ambiente, tal como 20°C o 25°C, la fase continua o el o los líquidos contenidos en la misma tienen normalmente una densidad similar o igual o menor que la de la fase dispersada de las micropartículas dentro de ella. En la mayoría de los casos, la fase continua o el o los líquidos contenidos en la misma tienen una densidad menor que la de las micropartículas. Por ejemplo, la fase continua o el o los líquidos contenidos en la misma pueden tener una densidad a temperatura ambiente menor o igual que valores tales como 1,10 g/cm<sup>3</sup>, 1,05 g/cm<sup>3</sup>, 1,0 g/cm<sup>3</sup>, 0,95 g/cm<sup>3</sup>, 0,9 g/cm<sup>3</sup>, 0,8 g/cm<sup>3</sup>, 0,7 g/cm<sup>3</sup>, 0,6 g/cm<sup>3</sup>, o en un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores.
- 40

- 45 La fase continua puede contener además uno o más ingredientes solubilizados dentro de la misma, que frecuentemente no están esencialmente incorporados en las micropartículas, incluyendo, de forma no exclusiva, material(es) no volátiles, sales, iones, reactivos en exceso, excipientes (por ejemplo azúcares, polioles, agentes tensioactivos) y/o compuestos relacionados con la producción. No obstante, se ha de señalar que el material no volátil también puede estar presente sobre la fase dispersa o dentro de la misma, por ejemplo, el material no volátil puede estar atrapado dentro de poros de las micropartículas y/o asociado de otro modo con las micropartículas. Adicionalmente, estos ingredientes pueden ser utilizados en el no disolvente aquí descrito. Ejemplos no limitativos de sales incluyen acetato de amonio, bicarbonato de amonio y otras sales tampón conocidas por los expertos en la técnica. Ejemplos no limitativos de azúcares incluyen trehalosa, sacarosa, lactosa y otros carbohidratos conocidos por los expertos en la técnica. Ejemplos no limitativos de polioles incluyen manitol y otros alcoholes de azúcar conocidos por los expertos en la técnica. El o los fluidos y/o solutos de la fase continua pueden ser, de forma independiente, parcial o totalmente miscibles con líquidos acuosos, inmiscibles con líquidos acuosos, solubles en agua y/o insolubles en agua.
- 50

#### Fase dispersa

- 55 La fase dispersa de una dispersión multifásica procesada de acuerdo con los métodos descritos puede incluir micropartículas sólidas. Normalmente es preferible que las micropartículas sean esencialmente insolubles en el no disolvente y/o esencialmente inmiscibles con el mismo, por ejemplo con una solubilidad en éste a temperatura ambiente de menos del 10% en peso, por ejemplo del 5% en peso o menos, del 3% en peso o

menos, del 1% en peso o menos, del 0,5% en peso o menos, del 0,1% en peso o menos, del 0,05% en peso o menos, del 0,01% en peso o menos, o en un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores.

- 5 La fase dispersa puede incluir además otros materiales en asociación con las micropartículas sólidas, por ejemplo un material, sal o excipiente no volátil añadido durante la formación de las micropartículas. En general no se desea la presencia de estos materiales en las micropartículas aisladas y, en consecuencia, de forma deseable se retiran de la dispersión. Por consiguiente, es deseable que estos materiales tengan solubilidades relativamente elevadas en el no disolvente.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar la invención, pero no para limitar su alcance.

#### **Ejemplo 1**

- 10 Una solución de macromoléculas bioactivas de un anticuerpo policlonal (2,1 mg/ml de inmunoglobulina intravenosa IGIV en tampón de acetato de amonio 100 mM a pH 5,8) y una solución que contenía un material no volátil (24% poloxámero 188 en tampón de acetato de amonio 100 mM a pH 5,8) se precalentaron a 50°C o menos (por ejemplo 48°C, 45°C) y se mezclaron en una relación en volumen 1:1. La mezcla transparente (1,2 mg/ml de IGIV, 12% poloxámero 188, acetato de amonio 100 mM, pH 5,8) se enfrió después a una temperatura  
15 entre 0 y 5°C (introducida en un congelador a -20°C durante 10 minutos para llegar a 4°C o 2°C, pero no congelarla) para formar una suspensión de 1 mg/ml de microesferas de IGIV. Una parte alícuota de la suspensión de microesferas de IGIV se mezcló con una primera solución de lavado (12% poloxámero 188, salicilato de sodio 300 mM, sulfato de zinc 48 mM, pH no ajustado, enfriada a aproximadamente 4°C) en una relación en volumen de 1:1. La suspensión mezclada se centrifugó a 4°C de modo que las microesferas  
20 formaron una pella. El sobrenadante se decantó y la pella de microesferas se resuspendió en un volumen de una segunda solución de lavado (salicilato de sodio 400 mM, sulfato de zinc 48 mM). Mediante microscopía óptica se confirmó que la morfología de las microesferas de IGIV en la resuspensión era igual que la de las microesferas de IGIV en la suspensión original.

#### **Ejemplo 2**

- 25 Se preparó una solución de macromoléculas bioactivas de un anticuerpo policlonal (2,1 mg/ml de IGIV en tampón de acetato de amonio 100 mM a pH 5,8) dializando una solución al 10% de IGIV contra tampón de acetato de amonio 100 mM (pH 5,8) a 4°C a lo largo de la noche. La solución de macromoléculas y una solución polimérica (24% poloxámero 188 en tampón de acetato de amonio 100 mM a pH 5,8) se precalentaron (baño de agua caliente) a 50°C y se mezclaron en una relación en volumen 1:1. La mezcla transparente se enfrió  
30 después a una temperatura de aproximadamente 4°C para formar una suspensión de 1 mg/ml de microesferas de IGIV. En una relación en volumen de 1:1, tres partes alícuotas de la suspensión de microesferas de IGIV se mezclaron por separado con tres no disolventes (acetato de zinc 2 mM, acetato de amonio 100 mM) a pH 7,3, 7,5 y 7,8, respectivamente. Las suspensiones mezcladas se centrifugaron a 3.000 rpm y a 4°C durante 5 minutos. Los sobrenadantes se retiraron y las pellas de microesferas se lavaron por centrifugación otras dos  
35 veces con los mismos no disolventes respectivos. Las pellas de microesferas resultantes se lavaron por centrifugación dos veces con 6 ml, y se resuspendieron en 3 ml, de una solución tampón (acetato de amonio 0,2 mM, pH 8,05). Las mediciones de la concentración de proteínas (OD280) de los sobrenadantes de cada etapa de lavado demostraron un aumento hasta de un 18% de las microesferas disueltas en solución. Se cree que un lavado a temperaturas más bajas reducirá significativamente la cantidad de disolución. También se  
40 llevaron a cabo estudios de integridad disolviendo las microesferas lavadas en PBS y analizando las soluciones mediante HPLC utilizando PBS como tampón de corriente. Los contenidos de monómeros de las soluciones eran mayores del 90% para cada uno de los tres no disolventes diferentes, y eran mayores en cada caso que el propio material de partida, indicando que esencialmente no se produjo ninguna degradación (por ejemplo formación de dímeros) en la macromolécula bioactiva como resultado del proceso de lavado.

#### **Ejemplo 3**

- Una solución de macromoléculas bioactivas de un anticuerpo policlonal (2,8 mg/ml de IGIV en tampón de acetato de amonio 100 mM a pH 5,2) y una solución de un material no volátil (28% PEG 3350 en tampón de acetato de amonio 100 mM a pH 5,2) se precalentaron (baño de agua caliente) a 45°C y se mezclaron en una relación en volumen 1:1. La mezcla transparente se enfrió después a aproximadamente 4°C para formar una  
50 suspensión de 1,4 mg/ml de microesferas de IGIV. A 4°C, unas partes alícuotas de la suspensión de microesferas de IGIV se lavaron por centrifugación por separado y de forma reiterada con diversos no disolventes que contenían en cada caso acetato de zinc 2 mM, acetato de amonio 10 mM y 250 mM, y con pH de 6,5 a 8,5. Después, las pellas de microesferas de IGIV recogidas se resuspendieron en los segundos no disolventes o se liofilizaron.

#### **Ejemplo 4**

Una solución de macromoléculas bioactivas de un anticuerpo monoclonal (2 mg/ml de anticuerpo anti factor VIII, anti-FVIII, en tampón de acetato de amonio 100 mM a pH 5,8) se obtuvo dializando una solución en PBS del anticuerpo (pH 7,1, Baxter Hayward) contra tampón de acetato de amonio 100 mM (pH 5,8) a 4°C durante 2 días. Una solución de un material no volátil (24% poloxámero 188 en tampón de acetato de amonio 100 mM a pH 5,8) se precalentó (baño de agua caliente) a 45°C. Las soluciones de macromoléculas y polimérica se mezclaron con cuidado (utilizando inversión) en una relación en volumen de 1:1. La mezcla transparente se equilibró (baño de agua caliente) a 45°C y después se enfrió a aproximadamente 2-4°C (pero no se congeló) para formar una suspensión de 1 mg/ml de microesferas de anti-FVIII. Unas partes alícuotas individuales de la suspensión de microesferas se lavaron por centrifugación 3 veces con un primer no disolvente y dos veces con un segundo no disolvente de acuerdo con la siguiente tabla y las microesferas se recogieron y liofilizaron.

Muestras	Primera solución de lavado	Segunda solución de lavado
Muestra A	Tampón A	Tampón C
Muestra B	Tampón A	Tampón D
Muestra C	Tampón B	Tampón C
Muestra D	Tampón B	Tampón D
Tampón A - acetato de zinc 2 mM, acetato de amonio 100 mM, pH 7,5 Tampón B - acetato de zinc 2 mM, acetato de amonio 100 mM, pH 8,0 Tampón C - acetato de zinc 0,2 mM, acetato de amonio 10 mM, pH 8,0 Tampón D - acetato de zinc 0,2 mM, acetato de amonio 10 mM, pH 8,8		

Se llevaron a cabo estudios de integridad disolviendo las microesferas lavadas en PBS y analizando las soluciones mediante HPLC y midiendo la actividad de unión mediante ELISA. Los dos experimentos mostraron perfiles similares para controlar microesferas lavadas con agua destilada (pH 10,2 con acetato de amonio) y una mezcla 60:40 de alcohol terc-butílico y agua.

15 **Ejemplo 5**

Una solución de macromoléculas (2 mg/ml de anti-FVIII en tampón de acetato de sodio 200 mM con pH 5,5) y una solución de un material no volátil (24% PEG 3350 en tampón de acetato de sodio 100 mM a pH 5,2) se precalentaron (baño de agua caliente) a 45°C y se mezclaron en una relación en volumen 1:1. La mezcla transparente se enfrió después a aproximadamente 4°C para formar una suspensión de 1 mg/ml de microesferas de anti-FVIII. A 4°C, unas partes alícuotas de la suspensión de microesferas de anti-FVIII se diafiltraron por separado contra diferentes no disolventes en varios múltiplos del volumen de las partes alícuotas, conteniendo cada una de las primeras soluciones de lavado acetato de zinc 2 mM, acetato de amonio 10 mM y 250 mM, y pH 6,5 a 8,5. Las suspensiones intermedias de microesferas de anti-FVIII resultantes se diafiltraron después por separado contra diferentes segundos no disolventes en varios múltiplos del volumen de las suspensiones intermedias, conteniendo cada una de las segundas soluciones de lavado acetato de zinc 2 mM, acetato de amonio 10 mM y 250 mM, y pH 6,5 a 8,5. Las suspensiones finales de microesferas anti-FVIII resultantes se concentraron y liofilizaron por separado.

**Ejemplo 6**

En este ejemplo premonitorio, 25 ml de una solución de macromoléculas (8 mg/ml de anticuerpo monoclonal en tampón de acetato de amonio 50 mM a pH 5,8) y 15 ml de una solución de material no volátil (29% PEG 3350 en tampón de acetato de sodio 50 mM a pH 5,8) se precalientan (baño de agua caliente) a una temperatura entre 40°C y 50°C (por ejemplo 45°C) y se mezclan. Después, la mezcla transparente (5 mg/ml de anticuerpo monoclonal, 11% PEG 3355, acetato de amonio 50 mM, pH 5,8) se enfría a aproximadamente 4°C a lo largo de 1 hora para formar una suspensión de 5 mg/ml de microesferas de anticuerpo monoclonal. A temperatura ambiente o por debajo de la misma (por ejemplo 4°C), la suspensión de microesferas monoclonales se extingue con un volumen igual de un primer no disolvente (acetato de zinc 2 mM, acetato de amonio 250 mM, pH 7,5) y después se concentra a 10 ml utilizando diafiltración. La suspensión de microesferas concentrada se diafiltra contra 3 intercambios de volumen (10 ml cada uno) de un segundo no disolvente (acetato de cobre 2 mM, acetato de amonio 100 mM, pH 7,5) y después 3 intercambios de volumen (10 ml cada uno) de un tercer tampón de lavado (acetato de hierro (II) 2 mM, acetato de amonio 25 mM, pH 7,5). La suspensión de microesferas resultante se carga con 0,2 ml de solución de sacarosa al 8% (como estabilizador) y se liofiliza.

**Ejemplo 7**

En este ejemplo premonitorio, una solución de macromoléculas (1-40 mg/ml de macromoléculas en un tampón de reacción que contiene sal tampón 10-2000 mM con un pH inferior a 7) y una solución de un material no volátil (polímero no iónico al 10-50% en el mismo tampón de reacción de la solución de macromoléculas) se precalientan (baño de agua caliente) a una temperatura entre 40°C y 50°C o más (menos de 100°C) y se mezclan. Después, la mezcla transparente se enfría a 10°C o menos, pero no se congela, para formar una



- suspensión de microesferas de macromoléculas. A temperatura ambiente o por debajo de ésta, pero por encima de la temperatura de congelación de la suspensión de microesferas, la suspensión de microesferas se lava (por ejemplo por centrifugación y/o diafiltración, entre otros medios) con al menos un primer no disolvente (que contiene 1-2000 mM de un catión metálico multivalente libre, tal como un catión de zinc, y que tiene un pH superior a aproximadamente 6, y que opcionalmente contiene además 10-250 mM de un catión orgánico volátil tal como un catión de amonio y/o 10 mM o más de un anión no quelante tal como acetato). El producto del lavado (por ejemplo pella, filtrado, suspensión) se lava opcionalmente con un segundo no disolvente, un tercer no disolvente o más no disolventes que se diferencian del primer no disolvente en una o más de las siguientes características: (1) concentración del catión metálico multivalente libre, (2) concentración del catión orgánico volátil, si está presente, (3) concentración del anión no quelante, si está presente, (4) pH, y (5) fuerza iónica. Al final de todos los lavados se pueden añadir opcionalmente uno o más estabilizadores (por ejemplo azúcares, agentes tensioactivos, sales, polioles) a las microesferas recogidas y éstas se pueden resuspender en uno de los no disolventes, o se pueden liofilizar en un polvo seco, para su almacenamiento y/o uso final (por ejemplo administración a un ser humano).
- 15 Como macromolécula se puede utilizar cualquier ácido nucleico, incluyendo, de forma no exclusiva, ácidos nucleicos antisentido y ARNsi. Ejemplos de oligodesoxinucleótidos antisentido (anti-CD40, anti-CD80, anti-CD86) a utilizar como macromoléculas están comercialmente disponibles en preparaciones liofilizadas purificadas por HPLC. Estos oligonucleótidos están fosforotionados en la cadena principal de oligonucleótido y están disponibles en Integrated DNA Technologies, (Coralville, IA). Ejemplos de moléculas de ARNsi están formados por estructuras dobles no modificadas que tienen opcionalmente una cadena marcada con un tinte fluorescente. Preparaciones de moléculas de ARNsi adecuadas purificadas por HPLC y liofilizadas están comercialmente disponibles en Dharmacon (Dharmacon, Lafayette, CO).
- 25 Es de esperar que a los expertos en la técnica se les ocurran numerosas modificaciones y variaciones de la invención en vista de la descripción adjunta. Por consiguiente, la invención solo debe estar sometida a las limitaciones que aparecen en las reivindicaciones adjuntas.

**Reivindicaciones**

1. Método para procesar micropartículas que comprende:
  - 5 proporcionar una composición que comprende múltiples micropartículas sólidas y al menos un material no volátil;
  - proporcionar un no disolvente que comprende una solución acuosa que contiene al menos un catión multivalente libre, incluyendo cationes  $Zn^{2+}$  no complejados;
  - exponer la composición al no disolvente para formar una mezcla que contiene una o más fases líquidas y las micropartículas sólidas; y
  - 10 retirar al menos una parte de la o las fases líquidas reteniendo al menos las micropartículas, retirando así al menos una parte del material no volátil de la composición, donde el material no volátil es más soluble en el no disolvente que las micropartículas, donde el material no volátil comprende un polímero no iónico soluble en líquidos acuosos o un polímero no iónico miscible con líquidos acuosos,
  - 15 donde las micropartículas sólidas comprenden al menos una macromolécula bioactiva que es un anticuerpo, y donde las micropartículas sólidas tienen forma esférica.
2. Método según la reivindicación 1, donde las micropartículas sólidas son esencialmente insolubles en el no disolvente, preferiblemente donde las micropartículas sólidas son menos de un 20 por ciento en peso (% en peso) solubles en el no disolvente.
3. Método según la reivindicación 1 o 2, donde las micropartículas sólidas son menos de un 20 por ciento en peso (% en peso) solubles en el no disolvente y son solubles en una solución acuosa que es igual que el no disolvente pero que está libre del catión multivalente libre.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde las etapas de exposición y/o retirada comprenden lavado por centrifugación, diafiltración, filtración, diálisis, electroforesis o una combinación de las mismas.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la macromolécula bioactiva se selecciona entre anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el no disolvente está libre de agentes quelantes para el catión multivalente.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, el catión multivalente está presente en el no disolvente en una concentración de 0,01 mM a 50 mM, preferiblemente de 0,2 mM a 2 mM.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el no disolvente comprende además uno o más aniones no quelantes seleccionados entre el grupo consistente en acetato, ascorbato, aspartato, bicarbonato, carbonato, cloruro, formato, salicilato, succinato, sulfato y combinaciones de dos o más de los mismos.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde las micropartículas sólidas comprenden la macromolécula bioactiva al menos sobre una superficie exterior de la micropartícula sólida.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde la actividad de la macromolécula bioactiva se mantiene esencialmente igual antes y después de las etapas de exposición y retirada.
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde el material no volátil se selecciona entre el grupo consistente en poliéteres no iónicos, copoliéteres no iónicos, poliésteres no iónicos, copoliésteres no iónicos, copolímeros de poliéter-poliéster no iónicos, almidón, celulosa, goma guar, éteres de almidón no iónicos, éteres de celulosa no iónicos, éteres de guar no iónicos, ésteres de almidón no iónicos, ésteres de celulosa no iónicos, eterésteres de almidón no iónicos, eterésteres de celulosa no iónicos, polímeros vinílicos no iónicos y combinaciones de los mismos.
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que adicionalmente comprende el aislamiento de las micropartículas.
13. Método según la reivindicación 12, que adicionalmente comprende el secado de las micropartículas aisladas en un polvo, preferiblemente comprendiendo el secado la liofilización de las micropartículas.