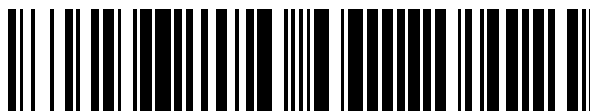


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 927**

51 Int. Cl.:

A61K 9/50	(2006.01)
A61K 38/09	(2006.01)
A61P 5/04	(2006.01)
A61P 15/08	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)
A61K 9/16	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2012 PCT/CN2012/001712**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2013 WO13091283**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2012 E 12860701 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.01.2018 EP 2793865**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas de microesferas de triptorelina**

30 Prioridad:

22.12.2011 CN 201110435894

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

10.04.2018

73 Titular/es:

**SHANDONG LUYE PHARMACEUTICAL CO., LTD.
(100.0%)
No. 9 Baoyuan Road Laishan District
Yantai, Shandong 264003, CN**

72 Inventor/es:

**SUN, KAOXIANG;
SONG, TAO;
WANG, QILIN;
HAN, JIE;
WANG, TAO;
HAN, JIANGBIN;
ZHANG, JIANZHAO y
WANG, SHUJIANG**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 662 927 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

Composiciones farmacéuticas de microesferas de triptorelina

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere al campo de las preparaciones farmacéuticas y particularmente, a una composición de microesferas de triptorelina de liberación sostenida de larga acción, a métodos para preparar la misma y al uso de la misma.

10

Antecedentes de la técnica

La hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), también conocida como hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH), es una hormona decapeptídica muy relacionada con las funciones reproductoras. Cuando se administra una LHRH exógena o un análogo de la misma con una frecuencia de impulso fisiológico (una vez cada 90 minutos) durante un corto periodo y a una pequeña dosis, produce algunos efectos promotores en el sistema hipofiso-gonadal y, por tanto, se usa clínicamente para tratar síntomas tales como la disfunción sexual, anovulación, pubertad retardada, etc. Cuando se administra con una frecuencia de impulso no fisiológico durante un largo periodo y a una gran dosis, puede inhibir la secreción de hormona luteinizante y hormona foliculoestimulante desde la hipofisis, provocando una disminución en la capacidad de secreción de hormonas de las gónadas y la atrofia de los órganos sexuales. Por tanto, se usa clínicamente para abordar algunas enfermedades dependientes de hormonas tales como el cáncer de próstata, el histeromioma, el carcinoma de mama, la adenomiosis, la pubertad precoz, etc. La LHRH y análogos de la misma usados clínicamente en la actualidad incluyen triptorelina, buserelina, ganadorelina, leuprorelina, goserelina, etc.

25

La triptorelina es un análogo sintético de LHRH. La triptorelina modifica la estructura de LHRH sustituyendo la sexta glicina en la LHRH natural con un D-triptófano. Su bioactividad es 100 veces la de LHRH natural, y tiene efectos significativos en el tratamiento de enfermedades tales como cáncer de próstata, adenomiosis, histeromioma, carcinoma de mama etc.

30

La administración de triptorelina para sus indicaciones clínicas típicamente requiere que un paciente esté bajo medicación durante un largo periodo. Por tanto, para mejorar el cumplimiento del paciente, se ha desarrollado triptorelina en preparaciones de liberación sostenida de larga acción. Actualmente, las preparaciones de liberación sostenida de larga acción disponibles en el mercado de triptorelina son inyecciones de microesferas, incluyendo los productos para su administración una vez cada 4 semanas, una vez cada 12 semanas y una vez cada 24 semanas.

35

Se reconoce que la triptorelina debe de administrarse a grandes dosis durante un largo periodo de tiempo para disminuir la capacidad de secreción de hormonas gonadales de la gónada y la atrofia de órganos sexuales, consiguiendo por tanto el propósito de tratar enfermedades tales como cáncer de próstata dependiente de hormonas, etc. (Qinghua Chen *et al.*, Development in research on microsphere drug delivery systems of polypeptide and protein drugs, Foreign Medical Sciences - Section on Pharmacy, 1997, 24(3):129-133). Por consiguiente, a diferencia de la mayoría de otras microesferas farmacéuticas, para las que cuanto menor sea la liberación inicial mejor, una preparación de microesferas de larga acción ideal de triptorelina, después de su inyección, necesita una liberación inicial relativamente grande, para mantener los efectos farmacéuticos hasta una fase posterior del suministro del fármaco. Varias microesferas de análogos de LHRH, que han estado disponibles en el mercado, son principalmente de este modo de liberación de fármaco, por ejemplo, las microesferas de leuprorelina tienen una liberación inicial de hasta por encima de un 20% en 1-2 días (Qinghua Chen *et al.*, Development of research on microsphere drug delivery systems of polypeptide and protein drugs, Foreign Medical Sciences - Section on Pharmacy, 1997, 24(3):129-133), mientras que las microesferas de pamoato triptorelina de Debiopharm S.A. tienen una liberación de fármaco de hasta por encima de un 40% en 1-2 días, durante ese tiempo la concentración de testosterona en el plasma sanguíneo aumenta en la fase temprana de suministro del fármaco, alcanza un valor máximo en aproximadamente el 4.º día y después disminuye hasta un nivel de castración, produciendo por tanto los efectos farmacéuticos del mismo (American FDA documents, FDA solicitud n.º: (NDA)020715).

40

45

50

55

60

65

El documento WO 2004/112752 divulga un método para preparar una formulación mixta de microesferas de liberación sostenida con diversas composiciones por un proceso continuo de una etapa. Este método se caracteriza por la preparación de la formulación mixta de microesferas de liberación sostenida con diferentes composiciones por un proceso continuo de una etapa introduciendo de forma continua los líquidos mezclados en una secadora desde los dos o más diferentes líquidos para la preparación de microesferas de liberación sostenida que contienen un polímero biodegradable, un fármaco, un aditivo y un disolvente con diferentes tipos de contenidos o ambos de los componentes, controlando las relaciones de mezcla de los líquidos de acuerdo con el tiempo, a diferencia de un método convencional que incluye el secado por pulverización de una mezcla de microesferas que contienen un polímero biodegradable, un fármaco, un aditivo y un disolvente con una única composición.

Sin embargo, las microesferas de triptorelina preparadas por un proceso doble de emulsión-evaporación del disolvente tienen una liberación inicial muy baja, lo que hace que el fármaco sea incapaz de actuar lo más pronto

posible después de su administración. Por tanto, sigue existiendo la necesidad de desarrollar microesferas de liberación prolongada de triptorelina que consigan un perfil de alta liberación inicial.

Sumario

- 5 En este documento se describen realizaciones dirigidas a microesferas de triptorelina que incorporan glucosa. Como resultado, la liberación inicial del fármaco *in vivo* puede aumentarse, promoviendo por tanto que el fármaco actúe lo más pronto posible. La presente divulgación, por tanto, proporciona una composición farmacéutica de microesferas de liberación sostenida de triptorelina, comprendiendo las microesferas de triptorelina la triptorelina o una sal de la misma, copolímeros de lactida y glicolida, y glucosa, donde el contenido en peso de glucosa es de un 0,1-10%, o un 10 0,5-10%, o un 0,5-5%, o un 0,5-2%, o un 1%; el contenido en peso de triptorelina o la sal de la misma es de un 1-30%, o un 2-20%, o un 5-15%; el contenido en peso de los copolímeros de lactida y glicolida es de un 60-98,9%, o un 75-97,8%, o un 83-94.5%.
- 15 Específicamente, en la composición farmacéutica de microesferas de liberación sostenida de triptorelina de la presente invención, el contenido en peso de triptorelina o la sal de la misma es de un 1-30%, el contenido en peso de copolímeros de lactida y glicolida es de un 60-98,9%, el contenido en peso de glucosa es de un 0,1-10%.
- 20 En la composición farmacéutica de microesferas de liberación sostenida de triptorelina de la presente invención, el contenido en peso de triptorelina o la sal de la misma es de un 2-20%, el contenido en peso de copolímeros de lactida y glicolida es de un 70-97,5%, el contenido en peso de glucosa es de un 0,5-10%.
- 25 En la composición farmacéutica de microesferas de liberación sostenida de triptorelina de la presente invención, el contenido en peso de triptorelina o la sal de la misma es de un 2-20%, el contenido en peso de copolímeros de lactida y glicolida es de un 75-97,5%, el contenido en peso de glucosa es de un 0,5-5%.
- 30 En la composición farmacéutica de microesferas de liberación sostenida de triptorelina de la presente invención, el contenido en peso de triptorelina o la sal de la misma es de un 5-15%, el contenido en peso de copolímeros de lactida y glicolida es de un 83-94,5%, el contenido en peso de glucosa es de un 0,5-2%.
- 35 En la composición farmacéutica de microesferas de liberación sostenida de triptorelina de la presente invención, el contenido en peso de triptorelina o la sal de la misma es de un 10%, el contenido en peso de copolímeros de lactida y glicolida es de un 89%, el contenido en peso de glucosa es de un 1%.
- 40 Las microesferas divulgadas en este documento son: Partículas esféricas o de tipo esférico pequeñas que consisten en fármaco disuelto y (o) dispersado homogéneamente por todo un material polimérico, con un tamaño de partícula que varía de 1-500 μm y generalmente preparado como suspensiones para inyección.
- 45 Los copolímeros de lactida y glicolida también se mencionan como poli(lactida-co-glicolida), abreviado como PLGA. La relación molar de lactida a glicolida en dicho PLGA es de 90:10 a 40:60; o de 75:25 a 40:60, o de 60:40 a 40:60, o de 50:50.
- 50 La viscosidad intrínseca de PLGA es de 0,10-0,70 dl/g, preferiblemente en el intervalo de 0,15-0,50 dl/g y de forma óptima en el intervalo de 0,20-0,35 dl/g. Un método para medir la viscosidad intrínseca de PLGA es el siguiente: preparar una solución de aproximadamente un 0,5% (p/v) de PLGA en cloroformo y determinar la viscosidad intrínseca de PLGA a 30°C usando un viscosímetro de capilar de vidrio Cannon-Fenske.
- 55 El PLGA descrito en la presente invención puede tener un peso molecular de 5000-100 000 Dalton, preferiblemente de 10 000-75 000 Dalton y más preferiblemente 15 000-40 000 Dalton. Como se usa en este documento, la expresión "peso molecular" se refiere a "peso molecular promedio en peso".
- 60 Como se usa en este documento, la relación molar de lactida a glicolida y la viscosidad intrínseca de PLGA se muestran a continuación en paréntesis. Por ejemplo, "PLGA (75/25, 0,5, 75 000)" representan poli(lactida-co-glicolida) con una relación molar de lactida a glicolida de 75:25, una viscosidad intrínseca de 0,5 dl/g y un peso molecular de 75 000 Dalton.
- 65 La cantidad de carga del fármaco descrita en la presente invención es la cantidad de carga de fármaco real, que se calcula de la siguiente manera: cantidad de carga de fármaco = [cantidad de fármaco en microesferas/(cantidad de fármaco en microesferas + cantidad de polímeros)] x 100%.
- La sal de triptorelina en la microesfera de liberación sostenida proporcionada por la presente invención puede ser una sal hidrosoluble tal como acetatos etc.
- Las microesferas de liberación sostenida de triptorelina proporcionadas por la presente invención se preparan por un proceso doble convencional de emulsión-evaporación del disolvente, donde la glucosa se añade en una fase acuosa interna y un proceso preferido es el siguiente: se disuelve PLGA en diclorometano para formar una fase oleosa, se

5 pesan la triptorelina y la glucosa y se disuelven en agua desionizada para formar una fase acuosa; la fase acuosa se añade a la fase oleosa y después se somete a emulsificación por cizallamiento para obtener una emulsión primaria de agua/aceite. Después, la emulsión primaria se añade a solución de poli(alcohol vinílico) (PVA), se emulsiona homogéneamente para obtener una doble emulsión de agua/aceite/agua, después se elimina el disolvente orgánico de la misma y el residuo se lava y se filtra para obtener las microesferas.

La presente invención proporciona además un uso de las microesferas de triptorelina en la preparación de fármacos para tratar el cáncer de próstata, la precocidad sexual, la adenomiosis, la infertilidad femenina y el histeromioma.

10 Las microesferas proporcionadas por la presente invención pueden prepararse en forma de polvo estéril, donde el polvo estéril comprende la composición de microesferas de triptorelina y manitol, y puede prepararse de la siguiente manera: se aclara la composición de microesferas de triptorelina con agua para inyección y se transfiere a una placa de liofilización, se añade manitol y una cantidad apropiada de agua para inyección a la misma, se coloca la placa de liofilización en un liofilizador para la liofilización; y se somete el producto liofilizado a tamizado y mezcla, llenado
15 aséptico y tapado, para obtener el polvo estéril. Antes de administrarse a un paciente, el polvo estéril se suspende en un disolvente de dispersión farmacéuticamente aceptable, donde el disolvente de dispersión puede ser uno o más de un agente de suspensión, un regulador del pH, un agente ajuste isoosmótico y un tensioactivo, junto con agua para inyección; el agente de suspensión puede ser uno o más de carboximetilcelulosa de sodio, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, alginato de sodio y glicerol; el agente de ajuste isoosmótico puede ser uno o más de cloruro de sodio, glucosa, manitol y sorbitol; y el tensioactivo es un tensioactivo no iónico, tal como la serie polisorbato (por ejemplo, polisorbato 80, polisorbato 60, etc.) o copolímeros de tres bloques de poli(propilenglicol) flanqueado por poli(etilenglicol), vendidos con la marca registrada Poloxamer (por ejemplo, Poloxamer 188, etc.).

20 Las microesferas de liberación sostenida de triptorelina proporcionadas por la presente invención se usan para inyección intramuscular o subcutánea, siendo la dosis de administración de la misma de 3,75 mg/28 días (calculada por la cantidad de

Breve descripción de los dibujos

30 Figura 1: un gráfico logarítmico de las curvas de concentración-tiempo en sangre *in vivo* de perro de microesferas de triptorelina en el ejemplo de ensayo 1;
Figura 2: un gráfico de las curvas de liberación *in vitro* de microesferas de triptorelina en el ejemplo de ensayo 2;
Figura 3: un gráfico de curvas de concentración-tiempo de testosterona en suero de rata de microesferas de triptorelina en el ejemplo de ensayo 3;
35 Figura 4: un gráfico de curvas de liberación *in vitro* de microesferas de triptorelina en el ejemplo de ensayo 4;
Figura 5: un gráfico de curvas de concentración-tiempo de testosterona en suero de rata de microesferas de triptorelina en el ejemplo de ensayo 5;
Figura 6: un gráfico de curvas de liberación *in vitro* de microesferas de triptorelina en el ejemplo de ensayo 6;
Figura 7: un gráfico de curvas de concentración-tiempo de testosterona en suero de rata de microesferas de triptorelina en el ejemplo de ensayo 7.

Descripción detallada

45 La presente divulgación se ilustrará adicionalmente por los siguiente ejemplos y ejemplos de ensayo, que no limitarán el alcance de la presente invención de ninguna manera.

Ejemplo 1

50 Se pesaron 1,76 g de PLGA (50/50, 0,51, 75 000) y se disolvieron en 6 ml de diclorometano para formar una fase oleosa, se pesaron 200 mg de acetato de triptorelina y 40 mg de glucosa y se disolvieron en 0,6 ml de agua para formar una fase acuosa; y después la fase oleosa se añadió a la fase acuosa para dar una mezcla que se emulsionó a 17 500 r.p.m. durante 60 s para obtener una emulsión primaria. La emulsión primaria se añadió a 1000 ml de una solución de PVA al 0,5% a 6°C a través de un inyector en condiciones de homogeneización a 1500 r.p.m. y después se emulsionó de forma homogénea durante 2 min para obtener una emulsión doble. La emulsión doble se transfirió a una mezcladora en soporte voladizo que rota a una velocidad de 600 r.p.m. y se agitó durante 5 h para volatilizar y eliminar el disolvente orgánico; el residuo se filtró por un tamiz, se lavó con agua desionizada y se liofilizó para obtener microesferas pulverizables. Las microesferas tenían una cantidad de carga de fármaco de un 9,42% y una eficacia de atrapamiento de un 94,2%.

Ejemplo 2

60 Se pesaron 1,46 g de PLGA (65/35, 0,37, 45 000) y se disolvieron en 10 ml de diclorometano para formar una fase oleosa, se pesaron 400 mg de acetato de triptorelina y 140 mg de glucosa y se disolvieron en 1,0 ml de agua para formar una fase acuosa; y después la fase acuosa se añadió a la fase oleosa para dar una mezcla que se emulsionó a 15 000 r.p.m. durante 60 s para obtener una emulsión primaria. La emulsión primaria se añadió a 1000 ml de una solución de PVA al 1,0% a 6°C a través de un inyector en condiciones de homogeneización a 1800 r.p.m. y después

se emulsionó de forma homogénea durante 4 min para obtener una emulsión doble. La emulsión doble se transfirió a una mezcladora en soporte voladizo que rota a una velocidad de 600 r.p.m. y se agitó durante 5 h para volatilizar y eliminar el disolvente orgánico; y el residuo se filtró por un tamiz, se lavó con agua desionizada y se liofilizó para obtener microesferas pulverizables. Las microesferas tenían una cantidad de carga de fármaco de un 17,82% y una eficacia de atrapamiento de un 89,1%.

Ejemplo 3

Se pesaron 1,698 g de PLGA (75/25, 0,50, 70 000) y se disolvieron en 12 ml de diclorometano para formar una fase oleosa, se pesaron 300 mg de acetato de triptorelina y 2 mg de glucosa y se disolvieron en 1,2 ml de agua para formar una fase acuosa; y después la fase oleosa se añadió a la fase acuosa para dar una mezcla que se emulsionó a 13 500 r.p.m. durante 90 s para obtener una emulsión primaria. La emulsión primaria se añadió a 1000 ml de una solución de PVA al 2,0% a 4°C a través de un inyector en condiciones de homogeneización a 1500 r.p.m. y después se emulsionó de forma homogénea durante 3 min para obtener una emulsión doble. La emulsión doble se transfirió a una mezcladora en soporte voladizo que rota a una velocidad de 500 r.p.m. y se agitó durante 5 h para volatilizar y eliminar el disolvente orgánico; y el residuo se filtró por un tamiz, se lavó con agua desionizada y se liofilizó para obtener microesferas pulverizables. Las microesferas tenían una cantidad de carga de fármaco de un 13,71% y una eficacia de atrapamiento de un 91,4%.

Ejemplo 4

Se pesaron 1,50 g de PLGA (75/25, 0,50, 70 000) y se disolvieron en 12 ml de diclorometano para formar una fase oleosa, se pesaron 300 mg de acetato de triptorelina y 200 mg de glucosa y se disolvieron en 1,2 ml de agua para formar una fase acuosa; y después la fase oleosa se añadió a la fase acuosa para dar una mezcla que se emulsionó a 17 500 r.p.m. durante 90 s para obtener una emulsión primaria. La emulsión primaria se añadió a 1000 ml de una solución de PVA al 1,0% a 4°C a través de un inyector en condiciones de homogeneización a 2000 r.p.m. y después se emulsionó de forma homogénea durante 4 min para obtener una emulsión doble. La emulsión doble se transfirió a una mezcladora en soporte voladizo que rota a una velocidad de 400 r.p.m. y se agitó durante 5 h para volatilizar y eliminar el disolvente orgánico; y el residuo se filtró por un tamiz, se lavó con agua desionizada y se liofilizó para obtener microesferas pulverizables. Las microesferas tenían una cantidad de carga de fármaco de un 13,52% y una eficacia de atrapamiento de un 90,13%.

Ejemplo 5

Se pesaron 1,88 g de PLGA (50/50, 0,25, 26 000) y se disolvieron en 10 ml de diclorometano para formar una fase oleosa, se pesaron 100 mg de acetato de triptorelina y 20 mg de glucosa y se disolvieron en 1,0 ml de agua para formar una fase acuosa; y después la fase oleosa se añadió a la fase acuosa para dar una mezcla que se emulsionó a 15 000 r.p.m. durante 90 s para obtener una emulsión primaria. La emulsión primaria se añadió a 1000 ml de una solución de PVA al 1,0% a 6°C a través de un inyector en condiciones de homogeneización a 2100 r.p.m. y después se emulsionó de forma homogénea durante 2 min para obtener una emulsión doble. La emulsión doble se transfirió a una mezcladora en soporte voladizo que rota a una velocidad de 600 r.p.m. y se agitó durante 5 h para volatilizar y eliminar el disolvente orgánico; y el residuo se filtró por un tamiz, se lavó con agua desionizada y se liofilizó para obtener microesferas pulverizables. Las microesferas tenían una cantidad de carga de fármaco de un 4,59% y una eficacia de atrapamiento de un 91,8%.

Ejemplo 6

Se pesaron 1,80 g de PLGA (50/50, 0,25, 26 000) y se disolvieron en 10 ml de diclorometano para formar una fase oleosa, se pesaron 100 mg de acetato de triptorelina y 100 mg de glucosa y se disolvieron en 1,0 ml de agua para formar una fase acuosa; y después la fase oleosa se añadió a la fase acuosa para dar una mezcla que se emulsionó a 15 000 r.p.m. durante 90 s para obtener una emulsión primaria. La emulsión primaria se añadió a 1000 ml de una solución de PVA al 1,0% a 6°C a través de un inyector en condiciones de homogeneización a 2100 r.p.m. y después se emulsionó de forma homogénea durante 2 min para obtener una emulsión doble. La emulsión doble se transfirió a una mezcladora en soporte voladizo que rota a una velocidad de 600 r.p.m. y se agitó durante 5 h para volatilizar y eliminar el disolvente orgánico; y el residuo se filtró por un tamiz, se lavó con agua desionizada y se liofilizó para obtener microesferas pulverizables. Las microesferas tenían una cantidad de carga de fármaco de un 4,67% y una eficacia de atrapamiento de un 93,4%.

Ejemplo de referencia 7

Se pesaron 1,90 g de PLGA (90/10, 0,42, 53 000) y se disolvieron en 10 ml de diclorometano para formar una fase oleosa, se pesaron 40 mg de acetato de triptorelina y 60 mg de manitol y se disolvieron en 1,0 ml de agua para formar una fase acuosa; y después la fase acuosa se añadió a la fase oleosa para dar una mezcla que se emulsionó a 13 500 r.p.m. durante 180 s para obtener una emulsión primaria. La emulsión primaria se añadió a un hervidor de reacción que contenía 1000 ml de una solución de PVA al 1,0% a 10°C a través de un inyector en condiciones de homogeneización a 1800 r.p.m. y después se emulsionó de forma homogénea durante 3 min para obtener una

emulsión doble. Con una velocidad de rotación de 600 r.p.m., se agitó durante 5 h para volatilizar y eliminar el disolvente orgánico; y el residuo se filtró por un tamiz, se lavó con agua desionizada y se liofilizó para obtener microesferas pulverizables. Las microesferas tenían una cantidad de carga de fármaco de un 1,84% y una eficacia de atrapamiento de un 92,0%.

5

Ejemplo de referencia 8

Se pesaron 1,698 g de PLGA (75/25, 0,49 70 000) y se disolvieron en 12 ml de diclorometano para formar una fase oleosa, se pesaron 300 mg de acetato de triptorelina y 2 mg de manitol y se disolvieron en 1,2 ml de agua para formar una fase acuosa; y después la fase acuosa se añadió a la fase oleosa para dar una mezcla que se emulsionó a 15 000 r.p.m. durante 180 s para obtener una emulsión primaria. La emulsión primaria se añadió a un hervidor de reacción que contenía 1000 ml de una solución de PVA al 1,0% a 10°C a través de un inyector en condiciones de homogeneización a 1800 r.p.m. y después se emulsionó de forma homogénea durante 3 min para obtener una emulsión doble. Con una velocidad de rotación de 600 r.p.m., se agitó durante 5 h para volatilizar y eliminar el disolvente orgánico; y el residuo se filtró por un tamiz, se lavó con agua desionizada y se liofilizó para obtener microesferas pulverizables. Las microesferas tenían una cantidad de carga de fármaco de un 13,84% y una eficacia de atrapamiento de un 92,3%.

10

15

Ejemplo de referencia 9

Se pesaron 1,88 g de PLGA (50/50, 0,25, 26 000) y se disolvieron en 10 ml de diclorometano para formar una fase oleosa, se pesaron 100 mg de acetato de triptorelina y 20 mg de manitol y se disolvieron en 1,0 ml de agua para formar una fase acuosa; y después la fase oleosa se añadió a la fase acuosa para dar una mezcla que se emulsionó a 15 000 r.p.m. durante 90 s para obtener una emulsión primaria. La emulsión primaria se añadió a 1000 ml de una solución de PVA al 1,0% a 6°C a través de un inyector en condiciones de homogeneización a 2100 r.p.m. y después se emulsionó de forma homogénea durante 2 min para obtener una emulsión doble. La emulsión doble se transfirió a una mezcladora en soporte voladizo que rota a una velocidad de 600 r.p.m. y se agitó durante 5 h para volatilizar y eliminar el disolvente orgánico; y el residuo se filtró por un tamiz, se lavó con agua desionizada y se liofilizó para obtener microesferas pulverizables. Las microesferas tenían una cantidad de carga de fármaco de un 4,53% y una eficacia de atrapamiento de un 90,6%.

20

25

30

Ejemplo de referencia 10

Se pesaron 1,80 g de PLGA (50/50, 0,25, 26 000) y se disolvieron en 10 ml de diclorometano para formar una fase oleosa, se pesaron 100 mg de acetato de triptorelina y 100 mg de manitol y se disolvieron en 1,0 ml de agua para formar una fase acuosa; y después la fase oleosa se añadió a la fase acuosa para dar una mezcla que se emulsionó a 15 000 r.p.m. durante 90 s para obtener una emulsión primaria. La emulsión primaria se añadió a 1000 ml de una solución de PVA al 1,0% a 6°C a través de un inyector en condiciones de homogeneización a 2100 r.p.m. y después se emulsionó de forma homogénea durante 2 min para obtener una emulsión doble. La emulsión doble se transfirió a una mezcladora en soporte voladizo que rota a una velocidad de 600 r.p.m. y se agitó durante 5 h para volatilizar y eliminar el disolvente orgánico; y el residuo se filtró por un tamiz, se lavó con agua desionizada y se liofilizó para obtener microesferas pulverizables. Las microesferas tenían una cantidad de carga de fármaco de un 4,63% y una eficacia de atrapamiento de un 92,6%.

35

40

Ejemplo 11

Se pesaron 1,86 g de PLGA (100/0, 0,37, 50 000) y se disolvieron en 10 ml de diclorometano para formar una fase oleosa, se pesaron 100 mg de acetato de triptorelina y 40 mg de glucosa y se disolvieron en 1,0 ml de agua para formar una fase acuosa; y después la fase acuosa se añadió a la fase oleosa para dar una mezcla que se emulsionó a 13 500 r.p.m. durante 120 s para obtener una emulsión primaria. La emulsión primaria se añadió a 1000 ml de una solución de PVA al 1,0% a 10°C a través de un inyector en condiciones de homogeneización a 2000 r.p.m. y después se emulsionó de forma homogénea durante 3 min para obtener una emulsión doble. La emulsión doble homogeneizada se transfirió a una mezcladora en soporte voladizo que rota a una velocidad de 600 r.p.m. y se agitó durante 5 h para volatilizar y eliminar el disolvente orgánico; y el residuo se filtró por un tamiz, se lavó con agua desionizada y se liofilizó para obtener microesferas pulverizables. Las microesferas tenían una cantidad de carga de fármaco de un 4,74% y una eficacia de atrapamiento de un 94,8%.

45

50

55

Ejemplo 12

Se pesaron 3,64 g de PLGA (75/25, 0,68 100 000) y se disolvieron en 40 ml de diclorometano para formar una fase oleosa, se pesaron 40 mg de acetato de triptorelina y 320 mg de glucosa y se disolvieron en 4,0 ml de agua para formar una fase acuosa; y después la fase oleosa se añadió a la fase acuosa para dar una mezcla que se emulsionó a 13 500 r.p.m. durante 180 s para obtener una emulsión primaria. La emulsión primaria se añadió a 4000 ml de una solución de PVA al 1,0% a 8°C a través de un inyector en condiciones de homogeneización a 1200 r.p.m. y después se emulsionó de forma homogénea durante 3 min para obtener una emulsión doble. La emulsión doble se transfirió a una mezcladora en soporte voladizo que rota a una velocidad de 300 r.p.m. y se agitó durante 5 h para volatilizar y

60

65

eliminar el disolvente orgánico; y el residuo se filtró por un tamiz, se lavó con agua desionizada y se liofilizó para obtener microesferas pulverizables. Las microesferas tenían una cantidad de carga de fármaco de un 0,98% y una eficacia de atrapamiento de un 98,0%.

5 Ejemplo 13

Se pesaron 5,12 g de PLGA (85/15, 0,11, 7100) y se disolvieron en 50 ml de diclorometano para formar una fase oleosa, se pesaron 2,4 g de acetato de triptorelina y 480 mg de glucosa y se disolvieron en 5,0 ml de agua para formar una fase acuosa; y después la fase acuosa se añadió a la fase oleosa para dar una mezcla que se emulsionó a 17 500 r.p.m. durante 90 s para obtener una emulsión primaria. La emulsión primaria se añadió a 4000 ml de una solución de PVA al 1,0% a 8°C a través de un inyector en condiciones de homogeneización a 1300 r.p.m. y después se emulsionó de forma homogénea durante 3 min para obtener una emulsión doble. La emulsión doble homogeneizada se transfirió a una mezcladora en soporte voladizo que rota a una velocidad de 300 r.p.m. y se agitó durante 5 h para volatilizar y eliminar el disolvente orgánico; y el residuo se filtró por un tamiz, se lavó con agua desionizada y se liofilizó para obtener microesferas pulverizables. Las microesferas tenían una cantidad de carga de fármaco de un 26,0% y una eficacia de atrapamiento de un 86,7%.

Ejemplo comparativo 1

Se pesaron 1,90 g de PLGA (50/50, 0,23, 26 000) y 100 mg acetato de triptorelina y se disolvieron respectivamente en 10,0 ml de diclorometano y 1,0 ml de agua con agitación, para obtener soluciones transparentes; la fase de diclorometano disuelta se añadió a la fase acuosa disuelta para dar una mezcla que se emulsionó a 15 000 r.p.m. durante 90 s para obtener una emulsión primaria. La emulsión primaria se añadió a 1000 ml de una solución de PVA al 1,0% a 6°C a través de un inyector en condiciones de homogeneización a 2100 r.p.m. y después se emulsionó de forma homogénea durante 2 min para obtener una emulsión doble. La emulsión doble se transfirió a una mezcladora en soporte voladizo que rota a una velocidad de 600 r.p.m. y se agitó durante 5 h para volatilizar y eliminar el disolvente orgánico; y el residuo se filtró por un tamiz, se lavó con agua desionizada y se liofilizó para obtener microesferas pulverizables. Las microesferas tenían una cantidad de carga de fármaco de un 4,49% y una eficacia de atrapamiento de un 89,8%.

Ejemplo de ensayo 1: Ensayos farmacocinéticos *in vivo* en perro de microesferas de triptorelina que comprenden glucosa/manitol con diferentes contenidos.

1) Materiales de ensayo

Fármacos de ensayo: Microesferas de triptorelina preparadas de acuerdo con los ejemplos 5, 6, ejemplos de referencia 9 y 10, con contenían glucosa un 1% y un 5% de glucosa y 1% y un 5% de manitol, respectivamente, y una carga de fármaco de aproximadamente un 4,5-4,7%.

Grupo de control: Microesferas de triptorelina que no comprenden glucosa/manitol y una carga de fármaco de aproximadamente un 4,5% preparadas de acuerdo con el ejemplo comparativo 1.

Animales experimentales: 20 perros sabueso macho sanos con pesos corporales de 9-12 kg.

Instrumentos de ensayo: Un espectrómetro de masas QTRAP5500 equipado con una fuente de ionización por pulverización de iones (Applied Biosystem, Inc.); un sistema de cromatografía de líquidos de alto rendimiento Agilent 1290 que comprende una bomba de infusión doble, un tomamuestras automático y un horno de columna; una centrífuga de sobremesa Anke TGL-16G Feige, (ShangHai Anting Scientific Instrument Factory); y un concentrador de soplado a presión Turbo Vap LV, (Biotage, Inc).

2) Métodos y resultados

Los 20 perros sabueso machos sanos se dividieron de forma aleatoria en 5 grupos, incluyendo un grupo de control (ejemplo comparativo 1), un primer grupo experimental (ejemplo 5), un segundo grupo experimental (ejemplo 6), un tercer grupo experimental (ejemplo de referencia 9) y un cuarto grupo experimental (ejemplo de referencia 10), respectivamente, todos los cuales se sometieron a administración del fármaco por inyección intramuscular a una dosis de 0,3 mg/kg, se recogieron muestras de sangre antes de la administración y 1 h, 6 h, 1 d, 2 d, 3 d, 4 d, 6 d, 9 d, 11 d, 14 d, 16 d, 19 d, 23 d, 26 d y 30 d después de la administración, respectivamente, las concentraciones de triptorelina en el plasma sanguíneo de los perros sabueso se determinaron por un método de CL-EM/EM y los resultados de ensayo se mostraron en la tabla 1 y la figura 1.

Método de CL-EM/EM:

Condiciones de fase líquida: La columna es Venusil MP-C18, y la fase móvil es un 0,05% de solución de ácido acético-metonal con un caudal de 0,6 ml/min. La columna permaneció a 40°C y el volumen de inyección es de

10 µl.

Condiciones de espectrómetro de masas: La fuente de ionización es una fuente de ionización de electropulverización (ESI); el voltaje de la fuente se mantiene a 5500 V y se hace funcionar en modo positivo; el modo de exploración es control de múltiples reacciones (MRM), usando las transiciones de m/z 656.5-249 .1 y m/z 656.5-110.1 para análisis cuantitativo: el potencial de desagrupación (DP) es 50 V y la energía de colisión (CE) es 42 eV y 90 eV respectivamente.

Los resultados muestran que las microesferas de triptorelina liberaban fármacos inmediatamente después de la administración y la C_{máx} de las microesferas de triptorelina que contenían glucosa/manitol (es decir, glucosa o manitol) era significativamente mayor que la de las que no contienen glucosa/manitol. Por tato, se demostró que la presencia de glucosa/manitol en las microesferas de triptorelina aumentaba la liberación inicial *in vivo* de triptorelina en comparación con las microesferas de triptorelina de una carga de fármaco similar, pero sin glucosa o manitol.

Tabla 1 concentraciones en sangre (ng/ml) a diferentes tiempos después de administrar las microesferas por inyección intramuscular a cada grupo de perros

Tiempo (D)	Ejemplo comparativo 1	Ejemplo 5	Ejemplo 6	Ejemplo de referencia 9	Ejemplo de referencia 10
0	0	0	0	0	0
0,0417	17,667 ± 2,098	29,667 ± 2,223	35,5 ± 3,064	26,9 ± 1,852	36,734 ± 3,751
0,25	3,017 ± 0,045	7,69 ± 3,335	5,917 ± 2,599	5,917 ± 2,61	5,683 ± 1,192
1	0,272 ± 0,182	3,363 ± 0,767	2,44 ± 0,623	3,773 ± 0,803	0,672 ± 0,709
2	0,575 ± 0,793	2,437 ± 0,767	0,891 ± 0,193	1,391 ± 0,169	0,908 ± 0,371
3	0,13 ± 0,025	0,731 ± 0,512	0,541 ± 0,251	0,535 ± 0,261	0,738 ± 0,567
4	0,391 ± 0,484	0,333 ± 0,074	0,507 ± 0,476	0,513 ± 0,483	0,724 ± 0,762
6	0,208 ± 0,058	0,413 ± 0,131	0,395 ± 0,133	0,405 ± 0,033	0,242 ± 0,024
9	0,16 ± 0,078	0,539 ± 0,149	0,613 ± 0,304	0,636 ± 0,404	0,393 ± 0,328
11	0,271 ± 0,07	0,471 ± 0,243	0,654 ± 0,451	0,794 ± 0,456	0,371 ± 0,269
14	0,307 ± 0,078	0,394 ± 0,260	0,376 ± 0,185	0,466 ± 0,085	0,319 ± 0,182
16	0,347 ± 0,037	0,393 ± 0,253	0,423 ± 0,163	0,596 ± 0,298	0,481 ± 0,188
19	0,37 ± 0,068	0,325 ± 0,216	0,224 ± 0,15	0,244 ± 0,134	0,369 ± 0,219
23	0,22 ± 0,104	0,21 ± 0,017	0,319 ± 0,155	0,324 ± 0,165	0,202 ± 0,102
26	0,258 ± 0,043	0,331 ± 0,313	0,09 ± 0,113	0,102 ± 0,111	0,19 ± 0,168
30	0,091 ± 0,047	0,203 ± 0,098	0,122 ± 0,16	0,104 ± 0,175	0,057 ± 0,067

Ejemplo de ensayo 2: Ensayo de liberación *in vitro* de microesferas de triptorelina que comprenden glucosa/manitol con diferentes contenidos

1) Materiales de ensayo

Fármacos de ensayo: Microesferas de triptorelina preparadas de acuerdo con los ejemplos 5, 6, ejemplos de referencia 9 y 10, que contenían un 1% y un 5% de glucosa y un 1% y un 5% de manitol, respectivamente, y una carga de fármaco de aproximadamente un 4,5-4,7%.

Grupo de control: Microesferas de triptorelina que no contienen regulador de la liberación y con una cantidad de carga de fármaco de aproximadamente un 4,5% preparadas de acuerdo con el ejemplo comparativo 1.

Instrumentos de ensayo: Un sistema de cromatografía de líquidos de alto rendimiento Agilent 1290 que comprende una bomba de infusión doble, un tomamuestras automático y un horno de columna; una centrifuga de sobremesa Anke TGL-16G Feige, (ShangHai Anting Scientific Instrument Factory).

2) Métodos y resultados

Métodos: Las microesferas pesadas se colocaron en tubos de centrifuga, se añadió un medio de liberación (metanol:agua = 5:95) a las mismas y se sometieron a tratamiento vorticial durante 1 min. Después se pusieron en un oscilador con baño de agua de 37°C ± 0,5°C para la oscilación, y los tubos de centrifuga se recogieron después de un periodo de 3 h, 1 d, 2 d, 3 d, 4 d, 5 d y así sucesivamente, respectivamente, y se sometieron a centrifugación con una velocidad de rotación de 3600 r.p.m. a 5-8°C durante 15 min. Los contenidos de triptorelina en el centrifugado se determinaron para calcular las cantidades de liberación acumulada (%), los resultados de ensayo se muestran en la tabla 2 y la figura 2.

Los datos de investigación *in vivo* e *in vitro* del ejemplo de ensayo 1 y el ejemplo de ensayo 2 se sometieron a ajuste de curva de Boltzmann por el software Origin, los resultados se muestran en la tabla 3.

Los resultados muestran que (a) las formulaciones con glucosa/manitol, cuando se comparan con las de sin

glucosa/manitol, aumentaban significativamente la cantidad de liberación inicial *in vitro* (0-3 horas) de triptorelina; (b) la cantidad de liberación inicial *in vitro* (0-3 horas) de triptorelina aumentaba con el aumento del contenido de glucosa/manitol; (c) los datos de liberación *in vitro* e *in vivo* obtenidos por un método de ensayo *in vitro* tenían una buena correlación, estando todos los valores R por encima de 0,9 (tabla 3).

5

Tabla 2 cantidades de liberación acumulada *in vitro* (%) de microesferas de triptorelina

Tiempo (D)	Ejemplo comparativo 1	Ejemplo 5	Ejemplo 6	Ejemplo de referencia 9	Ejemplo de referencia 10
0,125	0,9	6,7	28,5	7,1	26,3
1	1,8	11,1	32,6	11,4	29,7
2	2,9	14,4	35,5	15,5	32,1
3	3,8	19,8	38,0	19,6	33,7
5	5,0	19,6	40,9	22,4	34,9
7	8,8	21,3	43,5	24,3	35,2
9	13,1	35,2	46,3	30,5	37,3
11	19,4	42,5	51,7	36,7	43,2
13	39,3	46,3	70,5	47,0	63,0
15	59,3	65,9	82,4	71,6	77,7
17	73,0	75,7	88,2	76,4	85,7
19	85,9	75,6	94,3	82,1	86,5
21	89,5	82,6	96,1	89,1	93,5
23	91,2	82,3	96,5	90,5	92,1
25	93,5	89,5	96,9	93,1	94,1
28	94,6	92,3	97,1	94,8	95,9

Tabla 3 correlación de los datos de liberación *in vivo* e *in vitro* - ecuación de ajuste de Boltzmann

	Ecuación de regresión	R
Ejemplo comparativo 1	$y = 0,5699x + 37,797$	0,950
Ejemplo 5	$y = 0,6915x + 36,276$	0,940
Ejemplo 6	$y = 0,6876x + 31,901$	0,912
Ejemplo de referencia 9	$y = 0,6292x + 40,801$	0,918
Ejemplo de referencia 10	$y = 0,6213x + 37,517$	0,936

10 Ejemplo de ensayo 3: Ensayos farmacodinámicos *in vivo* en rata de microesferas de triptorelina que comprenden glucosa/manitol con diferentes contenidos

1) Materiales de ensayo

15 Fármacos de ensayo: Microesferas de triptorelina preparadas de acuerdo con los ejemplos 5, 6, ejemplos de referencia 9 y 10, que contenían un 1% y un 5% de glucosa y un 1% y un 5% de manitol, respectivamente, y una carga de fármaco de aproximadamente 4,5-4,7%.

20 Grupo de control: Microesferas de triptorelina que no contienen regulador de la liberación y con una cantidad de carga de fármaco de aproximadamente un 4,5% preparadas de acuerdo con el ejemplo comparativo 1.

Grupo de control negativo (disolvente): Carboximetilcelulosa de sodio al 1%, 2 ml por vial.

25 Kit de detección de hormonas séricas en rata: Kit de ELISA de testosterona (T) de rata, de R&D systems, Inc.

Animales experimentales: 56 ratas macho con pesos corporales de 200-250 g.

30 Instrumentos de ensayo: Una centrífuga refrigerada de alta velocidad (Beckman Coulter, Inc., Allegra X-22R); un lector de ELISA (Molecular Devices, Inc., M5); una balanza analítica (Mettler-Toledo Instruments, Co., Ltd., AL104); un oscilador circular (IKA company, IKA MS 3 Digital, Alemania).

2) Métodos y resultados

35 Las 56 ratas macho sanas se dividieron de forma aleatoria en 7 grupos, incluyendo un grupo castrado, un grupo de control negativo, un grupo de control (ejemplo comparativo 1), un primer grupo experimental (ejemplo 5), un segundo grupo experimental (ejemplo 6), un tercer grupo experimental (ejemplo de referencia 9) y un cuatro grupo experimental (ejemplo de referencia 10), respectivamente, y todos los cuales se sometieron a administración por inyección intramuscular a una dosis de 300 µg/kg, castrándose las ratas del grupo castrado en el día de la administración, y se recogieron muestras de sangre de las cavidades oculares izquierda y derecha de forma alterna antes de la administración y 1 d, 4 d, 7 d, 10 d, 14 d, 18 d, 21 d, 25 d, 28 d, 32 d y 35 d después de

40

la administración, respectivamente, con el momento de muestreo de sangre en horario de 8:00 a 10:00 de la mañana. Las muestras de sangre estuvieron en reposo a temperatura ambiente durante 1 h y después se centrifugaron a 1000 g/min durante 20 min para dar los sobrenadantes, y las concentraciones de testosterona en suero se detectaron por un kit de ELISA, los resultados se mostraron en la tabla 4 y la figura 3.

Los resultados muestran que a) el nivel de testosterona de los grupos a los que se administraron las microesferas de triptorelina sin glucosa o manitol disminuían hasta un nivel de castración, es decir, empezaban a actuar en el 10.º al 14.º día; mientras que las microesferas de triptorelina que contenían glucosa/manitol empezaban a actuar en el 4.º día. Por lo tanto, las microesferas de triptorelina que comprenden glucosa/manitol eran capaces de actuar más rápido; b) todas las concentraciones de testosterona de los grupos a los que se administraron las microesferas que comprenden glucosa se mantuvieron constantes al nivel de castración desde el 4.º día hasta el 28.º día; mientras que las concentraciones de testosterona de los grupos a los que administraron las microesferas que comprenden manitol se mantuvieron sustancialmente al nivel de castración desde el 4.º días hasta el 21.º día, pero fluctuaron alrededor del 14.º día. Por lo tanto, en comparación con el manitol, la glucosa era capaz de mantener los efectos farmacéuticos durante un periodo más largo, con efectos farmacéuticos más constantes durante el periodo de liberación.

Tabla 4 concentraciones de testosterona en suero (ng/ml) en diferentes momentos después de administrar las microesferas por inyección intramuscular a ratas

Tiempo (D)	Grupo de control negativo	Grupo castrado	Grupo de control	Ejemplo 5	Ejemplo 6	Ejemplo de referencia 9	Ejemplo de referencia 10
0	9,76 ± 2,61	9,78 ± 3,05	8,62 ± 3,57	11,23 ± 3,56	13,42 ± 4,56	8,87 ± 3,84	12,32 ± 6,68
1	9,2 ± 3,81	0,38 ± 0,14	17,65 ± 5,86	20,46 ± 4,73	22,77 ± 4,06	20,67 ± 6,46	23,26 ± 1,45
4	11,36 ± 3,29	0,92 ± 0,15	8,96 ± 1,24	2,44 ± 0,8	2,04 ± 0,66	2,97 ± 0,57	1,82 ± 0,49
7	8,77 ± 3,81	1,34 ± 0,5	6,06 ± 1,16	2,46 ± 1,2	2,33 ± 1,50	3,01 ± 0,69	2,02 ± 0,67
10	9,52 ± 2,34	1,39 ± 0,39	4,83 ± 1,34	2,04 ± 1,22	2,74 ± 1,52	3,47 ± 0,82	2,38 ± 1,12
14	10,38 ± 3,28	1,55 ± 0,62	1,84 ± 0,7	2,52 ± 0,54	2,72 ± 1,66	4,73 ± 2,27	4,19 ± 1,22
18	8,51 ± 2,67	1,49 ± 0,42	1,98 ± 0,38	2,01 ± 1,03	2,31 ± 1,23	3,25 ± 1,61	3,06 ± 1,80
21	11,95 ± 3,48	1,18 ± 0,08	2,5 ± 0,58	2,91 ± 0,84	3,08 ± 1,61	2,61 ± 1,29	2,39 ± 1,14
25	9,2 ± 2,13	1,72 ± 0,34	1,72 ± 0,46	2,7 ± 0,75	2,69 ± 1,44	4,86 ± 1,43	5,03 ± 1,52
28	12,14 ± 2,25	1,65 ± 0,3	1,87 ± 0,34	2,84 ± 0,91	3,17 ± 1,94	5,37 ± 1,20	5,43 ± 1,18
32	11,05 ± 3,4	2,07 ± 0,38	2,78 ± 0,35	3,69 ± 1,15	4,63 ± 1,12	6,08 ± 1,23	7,06 ± 1,81
35	11,25 ± 3,64	1,39 ± 0,17	5,37 ± 0,25	5,73 ± 1,55	6,58 ± 0,53	8,54 ± 0,86	8,98 ± 1,38

Ejemplo 14

Se pesaron 1,798 g de PLGA (50/50, 0,25, 26 000) y se disolvieron en 8 ml de diclorometano para formar una fase oleosa, se pesaron 200 mg de acetato de triptorelina y 2 mg de glucosa y se disolvieron en 0,8 ml de agua para formar una fase acuosa; y después la fase acuosa se añadió a la fase oleosa para dar una mezcla que se emulsionó a 15 000 r.p.m. durante 90 s para obtener una emulsión primaria. La emulsión primaria se añadió a 1000 ml de una solución de PVA al 1,0% a 8°C a través de un inyector en condiciones de homogeneización a 2000 r.p.m. y después se emulsionó de forma homogénea durante 3 min para obtener una emulsión doble. La emulsión doble homogeneizada se transfirió a una mezcladora en soporte voladizo que rota a una velocidad de 500 r.p.m. y se agitó durante 5 h para volatilizar y eliminar el disolvente orgánico; el residuo se filtró por un tamiz, se lavó con agua desionizada y se liofilizó para obtener microesferas pulverizables. Las microesferas tenían una cantidad de carga de fármaco de un 9,13% y una eficacia de atrapamiento de un 91,3%.

Ejemplo 15

Se pesaron 1,78 g de PLGA (50/50, 0,25, 26 000) y se disolvieron en 8 ml de diclorometano para formar una fase oleosa, se pesaron 200 mg de acetato de triptorelina y 20 mg de glucosa y se disolvieron en 0,8 ml de agua para formar una fase acuosa; y después la fase acuosa se añadió a la fase oleosa para dar una mezcla que se emulsionó a 13 500 r.p.m. durante 90 s para obtener una emulsión primaria. La emulsión primaria se añadió a 1000 ml de una solución de PVA al 1,0% a 8°C a través de un inyector en condiciones de homogeneización a 2000 r.p.m. y después se emulsionó de forma homogénea durante 3 min para obtener una emulsión doble. La emulsión doble homogeneizada se transfirió a una mezcladora en soporte voladizo que rota a una velocidad de 500 r.p.m. y se agitó durante 5 h para volatilizar y eliminar el disolvente orgánico; el residuo se filtró por un tamiz, se lavó con agua desionizada y se liofilizó para obtener microesferas pulverizables. Las microesferas tenían una cantidad de carga de fármaco de un 9,01% y una eficacia de atrapamiento de un 90,1%.

Ejemplo 16

Se pesaron 1,60 g de PLGA (50/50, 0,25, 26 000) y se disolvieron en 10 ml de diclorometano para formar una fase oleosa, se pesaron 200 mg de acetato de triptorelina y 200 mg de glucosa y se disolvieron en 1,0 ml de agua para formar una fase acuosa; y después la fase acuosa se añadió a la fase oleosa para dar una mezcla que se emulsionó a 17 500 r.p.m. durante 90 s para obtener una emulsión primaria. La emulsión primaria se añadió a 1000 ml de una

solución de PVA al 1,0% a 8°C a través de un inyector en condiciones de homogeneización a 1800 r.p.m. y después se emulsionó de forma homogénea durante 3 min para obtener una emulsión doble. La emulsión doble homogeneizada se transfirió a una mezcladora en soporte voladizo que rota a una velocidad de 300 r.p.m. y se agitó durante 5 h para volatilizar y eliminar el disolvente orgánico; el residuo se filtró por un tamiz, se lavó con agua desionizada y se liofilizó para obtener microesferas pulverizables. Las microesferas tenían una cantidad de carga de fármaco de un 9,24% y una eficacia de atrapamiento de un 92,4%.

Ejemplo de referencia 17

Se pesaron 1,798 g de PLGA (50/50, 0,25, 26 000) y se disolvieron en 8 ml de diclorometano para formar una fase oleosa, se pesaron 200 mg de acetato de triptorelina y 2 mg de manitol y se disolvieron en 0,8 ml de agua para formar una fase acuosa; y después la fase acuosa se añadió a la fase oleosa para dar una mezcla que se emulsionó a 15 000 r.p.m. durante 90 s para obtener una emulsión primaria. La emulsión primaria se añadió a 1000 ml de una solución de PVA al 1,0% a 8°C a través de un inyector en condiciones de homogeneización a 2000 r.p.m. y después se emulsionó de forma homogénea durante 3 min para obtener una emulsión doble. La emulsión doble homogeneizada se transfirió a una mezcladora en soporte voladizo que rota a una velocidad de 500 r.p.m. y se agitó durante 5 h para volatilizar y eliminar el disolvente orgánico; el residuo se filtró por un tamiz, se lavó con agua desionizada y se liofilizó para obtener microesferas pulverizables. Las microesferas tenían una cantidad de carga de fármaco de un 9,12% y una eficacia de atrapamiento de un 91,2%.

Ejemplo de referencia 18

Se pesaron 1,78 g de PLGA (50/50, 0,25, 26 000) y se disolvieron en 8 ml de diclorometano para formar una fase oleosa, se pesaron 200 mg de acetato de triptorelina y 20 mg de manitol y se disolvieron en 0,8 ml de agua para formar una fase acuosa; y después la fase acuosa se añadió a la fase oleosa para dar una mezcla que se emulsionó a 13 500 r.p.m. durante 90 s para obtener una emulsión primaria. La emulsión primaria se añadió a 1000 ml de una solución de PVA al 1,0% a 8°C a través de un inyector en condiciones de homogeneización a 2000 r.p.m. y después se emulsionó de forma homogénea durante 3 min para obtener una emulsión doble. La emulsión doble homogeneizada se transfirió a una mezcladora en soporte voladizo que rota a una velocidad de 500 r.p.m. y se agitó durante 5 h para volatilizar y eliminar el disolvente orgánico; el residuo se filtró por un tamiz, se lavó con agua desionizada y se liofilizó para obtener microesferas pulverizables. Las microesferas tenían una cantidad de carga de fármaco de un 8,95% y una eficacia de atrapamiento de un 89,5%.

Ejemplo de referencia 19

Se pesaron 1,60 g de PLGA (50/50, 0,25, 26 000) y se disolvieron en 10 ml de diclorometano para formar una fase oleosa, se pesaron 200 mg de acetato de triptorelina y 200 mg de manitol y se disolvieron en 1,0 ml de agua para formar una fase acuosa; y después la fase acuosa se añadió a la fase oleosa para dar una mezcla que se emulsionó a 17 500 r.p.m. durante 90 s para obtener una emulsión primaria. La emulsión primaria se añadió a 1000 ml de una solución de PVA al 1,0% a 8°C a través de un inyector en condiciones de homogeneización a 1800 r.p.m. y después se emulsionó de forma homogénea durante 3 min para obtener una emulsión doble. La emulsión doble homogeneizada se transfirió a una mezcladora en soporte voladizo que rota a una velocidad de 400 r.p.m. y se agitó durante 5 h para volatilizar y eliminar el disolvente orgánico; el residuo se filtró por un tamiz, se lavó con agua desionizada y se liofilizó para obtener microesferas pulverizables. Las microesferas tenían una cantidad de carga de fármaco de un 8,98% y una eficacia de atrapamiento de un 89,8%.

Ejemplo 20

Se pesaron 1,79 g de PLGA (50/50, 0,25, 26 000) y se disolvieron en 10 ml de diclorometano para formar una fase oleosa, se pesaron 200 mg de acetato de triptorelina y 10 mg de glucosa y se disolvieron en 5,0 ml de agua para formar una fase acuosa; y después la fase acuosa se añadió a la fase oleosa para dar una mezcla que se emulsionó a 15 000 r.p.m. durante 90 s para obtener una emulsión primaria. La emulsión primaria se añadió a 1000 ml de una solución de PVA al 1,0% a 8°C a través de un inyector en condiciones de homogeneización a 2200 r.p.m. y después se emulsionó de forma homogénea durante 3 min para obtener una emulsión doble. La emulsión doble homogeneizada se transfirió a una mezcladora en soporte voladizo que rota a una velocidad de 400 r.p.m. y se agitó durante 5 h para volatilizar y eliminar el disolvente orgánico; el residuo se filtró por un tamiz, se lavó con agua desionizada y se liofilizó para obtener microesferas pulverizables. Las microesferas tenían una cantidad de carga de fármaco de un 9,22% y una eficacia de atrapamiento de un 92,2%.

Ejemplo de referencia 21

Se pesaron 1,79 g de PLGA (50/50, 0,25, 26 000) y se disolvieron en 10 ml de diclorometano para formar una fase oleosa, se pesaron 200 mg de acetato de triptorelina y 10 mg de manitol y se disolvieron en 1,0 ml de agua para formar una fase acuosa; y después la fase acuosa se añadió a la fase oleosa para dar una mezcla que se emulsionó a 15 000 r.p.m. durante 90 s para obtener una emulsión primaria. La emulsión primaria se añadió a 1000 ml de una solución de PVA al 1,0% a 8°C a través de un inyector en condiciones de homogeneización a 2200 r.p.m. y después

se emulsionó de forma homogénea durante 3 min para obtener una emulsión doble. La emulsión doble homogeneizada se transfirió a una mezcladora en soporte voladizo que rota a una velocidad de 400 r.p.m. y se agitó durante 5 h para volatilizar y eliminar el disolvente orgánico; el residuo se filtró por un tamiz, se lavó con agua desionizada y se liofilizó para obtener microesferas pulverizables. Las microesferas tenían una cantidad de carga de fármaco de un 9,15% y una eficacia de atrapamiento de un 91,5%.

Ejemplo comparativo 2

Se pesaron 1,80 g de PLGA (50/50, 0,25, 26 000) y se disolvieron en 10 ml de diclorometano para formar una fase oleosa, se pesaron 200 mg de acetato de triptorelina y se disolvieron en 1,0 ml de agua para formar una fase acuosa; y después la fase acuosa se añadió a la fase oleosa para dar una mezcla que se emulsionó a 15 000 r.p.m. durante 90 s para obtener una emulsión primaria. La emulsión primaria se añadió a 1000 ml de una solución de PVA al 1,0% a 8°C a través de un inyector en condiciones de homogeneización a 2000 r.p.m. y después se emulsionó de forma homogénea durante 3 min para obtener una emulsión doble. La emulsión doble homogeneizada se transfirió a una mezcladora en soporte voladizo que rota a una velocidad de 500 r.p.m. y se agitó durante 5 h para volatilizar y eliminar el disolvente orgánico; el residuo se filtró por un tamiz, se lavó con agua desionizada y se liofilizó para obtener microesferas pulverizables. Las microesferas tenían una cantidad de carga de fármaco de un 9,13% y una eficacia de atrapamiento de un 91,3%.

Ejemplo de ensayo 4: Ensayo de liberación *in vitro* de microesferas de triptorelina que comprenden glucosa/manitol con diferentes contenidos

Método de ensayo: El mismo que en el ejemplo de ensayo 2.

Materiales de ensayo:

Fármacos de ensayo: Microesferas de triptorelina preparadas de acuerdo con el ejemplo 14-16 y el ejemplo de referencia 17-19.

Grupo de control: Microesferas de triptorelina sin glucosa/manitol preparadas de acuerdo con el ejemplo comparativo 2.

Los resultados de ensayo se mostraron en la tabla 5 y la figura 4.

Tabla 5 cantidades de liberación acumulada *in vitro* (%) de microesferas de triptorelina

Tiempo (D)	Ejemplo comparativo 2	Ejemplo 14	Ejemplo 15	Ejemplo 16	Ejemplo de referencia 17	Ejemplo de referencia 18	Ejemplo de referencia 19
0,125	0,7	3,7	7,9	35,6	3,5	9,2	37,2
1	1,5	5,6	13,2	42,9	5,2	14,5	45,4
2	2,4	6,8	17,2	47,2	6,7	18,6	50,8
3	3,6	7,9	20,3	50,1	8,3	23,8	52,9
5	4,9	9,2	22,8	52,6	9,6	25,1	55,7
7	8,2	11,3	24,7	53,4	11,5	26,7	56,2
9	12,1	16,9	31,6	57,8	16,6	28,9	58,8
11	18,4	23,4	39,4	66,7	24,7	35,6	68,3
13	37,3	35,7	52,7	73,8	36,8	46,8	76,6
15	56,8	56,4	64,6	79,6	55,2	63,2	83,2
17	71,4	68,3	76,1	82,3	69,6	73,5	85,9
19	81,9	78,5	82,6	86,5	79,8	79,3	86,7
21	86,3	83,6	88,5	89,2	84,3	82,4	88,5
23	89,4	86,8	91,5	91,3	87,5	85,6	90,2
25	90	88,5	92,1	92,5	88,2	87,3	91,3
28	91,3	91,7	92,6	93,2	90,6	89,5	92,1

Los resultados muestran que (a) las formulaciones con glucosa/manitol, cuando se comparan con las de sin glucosa/manitol, aumentaban significativamente la cantidad de liberación inicial *in vitro* (0-3 horas) de triptorelina; (b) la cantidad de liberación inicial *in vitro* (0-3 horas) de las microesferas aumentaba con el aumento del contenido de glucosa/manitol.

Ejemplo de ensayo 5: Ensayos farmacodinámicos *in vivo* en rata de microesferas de triptorelina que comprenden glucosa/manitol con diferentes contenidos.

Método de ensayo: El mismo que en el ejemplo de ensayo 3.

Fármacos de ensayo: Microesferas de triptorelina preparadas de acuerdo con los ejemplos 15-16, 20 y los ejemplos de referencia 18-19, 21.

Grupo de control: Microesferas de triptorelina sin glucosa/manitol preparadas de acuerdo con el ejemplo comparativo 2.

5 Los resultados de ensayo se mostraron en la tabla 6 y en la figura 5.

Tabla 6 concentraciones de testosterona en suero (ng/ml) en diferentes momentos después de administrar las microesferas por inyección intramuscular a ratas

Tiempo (D)	Grupo de control negativo	Grupo castrado	Grupo de control	Ejemplo 20	Ejemplo 15	Ejemplo 16	Ejemplo de referencia 21	Ejemplo de referencia 18	Ejemplo de referencia 19
0	13,61 ± 2,54	12,56 ± 3,16	13,76 ± 3,42	13,22 ± 2,61	12,32 ± 3,13	11,66 ± 3,56	14,02 ± 4,04	10,86 ± 3,17	9,78 ± 5,86
1	14,25 ± 3,73	0,72 ± 0,17	16,33 ± 4,86	24,07 ± 3,15	23,06 ± 4,56	29,71 ± 3,76	18,34 ± 5,16	25,31 ± 3,26	30,35 ± 2,67
4	11,48 ± 3,19	1,22 ± 0,12	9,71 ± 1,31	2,36 ± 0,82	2,31 ± 0,68	2,24 ± 0,46	2,88 ± 1,42	3,05 ± 0,89	2,03 ± 1,05
7	9,92 ± 3,73	1,31 ± 0,53	7,13 ± 1,06	2,23 ± 0,33	1,76 ± 1,02	1,59 ± 1,25	2,36 ± 0,78	2,16 ± 0,53	1,81 ± 0,68
10	8,76 ± 2,31	1,86 ± 0,36	4,62 ± 1,31	1,86 ± 0,27	2,14 ± 1,12	1,97 ± 1,53	1,92 ± 1,82	1,67 ± 0,41	2,06 ± 1,32
14	9,48 ± 3,06	1,53 ± 0,59	2,31 ± 0,72	2,14 ± 0,56	1,62 ± 0,73	2,35 ± 0,96	3,73 ± 1,21	3,16 ± 0,88	3,03 ± 1,10
18	10,52 ± 2,55	2,07 ± 0,43	1,98 ± 0,58	1,79 ± 0,49	2,31 ± 1,13	2,01 ± 0,43	3,65 ± 0,66	2,82 ± 1,03	2,36 ± 1,32
21	11,75 ± 3,42	1,48 ± 0,18	1,85 ± 0,33	2,21 ± 0,17	1,88 ± 0,54	2,32 ± 0,81	2,31 ± 1,21	2,35 ± 0,74	2,17 ± 0,88
25	13,42 ± 2,23	1,66 ± 0,26	1,67 ± 0,66	1,82 ± 0,42	2,37 ± 1,25	2,87 ± 1,14	3,52 ± 0,83	3,37 ± 0,61	3,23 ± 1,32
28	11,07 ± 2,36	1,73 ± 0,31	1,89 ± 0,27	1,73 ± 0,38	1,79 ± 0,61	2,42 ± 1,67	3,65 ± 1,02	3,45 ± 0,55	4,56 ± 1,21
32	12,45 ± 3,14	2,12 ± 0,29	2,46 ± 0,45	3,08 ± 0,25	3,46 ± 1,05	4,54 ± 1,32	4,58 ± 1,43	5,16 ± 1,32	6,17 ± 2,69
35	12,58 ± 3,81	1,72 ± 0,16	4,54 ± 0,36	4,25 ± 0,72	5,53 ± 1,26	5,63 ± 0,83	6,60 ± 0,98	6,82 ± 1,48	7,66 ± 1,49

10 Los resultados muestran que a) el nivel de testosterona de aquellos grupos a los que se han administrado las microesferas de triptorelina sin glucosa o manitol disminuía hasta un nivel de castración, es decir, empezaban a actuar en el 10.º al 14.º día; mientras que las microesferas de triptorelina que contenían glucosa/manitol, empezaban a actuar en el 4.º día. Por lo tanto, las microesferas de triptorelina que comprenden glucosa/manitol pueden actuar más rápido; b) todas las concentraciones de testosterona de aquellos grupos a los que se han administrado las microesferas que comprenden glucosa se mantuvieron constantes a nivel de castración desde el 4.º día hasta el 28.º día; mientras que las concentraciones de testosterona de aquellos grupos a los que se han administrado las microesferas que comprenden manitol se mantuvieron sustancialmente al nivel de castración desde el 4.º día hasta el 21.º día, pero fluctuaron alrededor del 14.º día. Por lo tanto, en comparación con el manitol, la glucosa puede mantener un periodo más largo y efectos farmacéuticos más constantes.

20 **Ejemplo 22**

25 Se pesaron 5,592 g de PLGA (75/25, 0,51, 70 000) y se disolvieron en 40 ml de diclorometano para formar una fase oleosa, se pesaron 2,4 g de acetato de triptorelina y 8 mg de glucosa y se disolvieron en 4,0 ml de agua para formar una fase acuosa; y después la fase acuosa se añadió a la fase oleosa para dar una mezcla que se emulsionó a 13 500 r.p.m. durante 90 s para obtener una emulsión primaria. La emulsión primaria se añadió a 4000 ml de una solución de PVA al 1,0% a 8°C a través de un inyector en condiciones de homogeneización a 1300 r.p.m. y después se emulsionó de forma homogénea durante 3 min para obtener una emulsión doble. La emulsión doble homogeneizada se transfirió a una mezcladora en soporte voladizo que rota a una velocidad de 350 r.p.m. y se agitó durante 5 h para volatilizar y eliminar el disolvente orgánico; el residuo se filtró por un tamiz, se lavó con agua desionizada y se liofilizó para obtener microesferas pulverizables. Las microesferas tenían una cantidad de carga de fármaco de un 26,37% y una eficacia de atrapamiento de un 87,9%.

35 **Ejemplo 23**

Se pesaron 5,56 g de PLGA (75/25, 0,51, 70 000) y se disolvieron en 50 ml de diclorometano para formar una fase oleosa, se pesaron 2,4 g de acetato de triptorelina y 40 mg de glucosa y se disolvieron en 5,0 ml de agua para formar una fase acuosa; y después la fase acuosa se añadió a la fase oleosa para dar una mezcla que se emulsionó a 13 500 r.p.m. durante 90 s para obtener una emulsión primaria. La emulsión primaria se añadió a 4000 ml de una

solución de PVA al 1,0% a 8°C a través de un inyector en condiciones de homogeneización a 1300 r.p.m. y después se emulsionó de forma homogénea durante 3 min para obtener una emulsión doble. La emulsión doble homogeneizada se transfirió a una mezcladora en soporte voladizo que rota a una velocidad de 350 r.p.m. y se agitó durante 5 h para volatilizar y eliminar el disolvente orgánico; el residuo se filtró por un tamiz, se lavó con agua desionizada y se liofilizó para obtener microesferas pulverizables. Las microesferas tenían una cantidad de carga de fármaco de un 26,46% y una eficacia de atrapamiento de un 88,2%.

Ejemplo 24

Se pesaron 4,8 g de PLGA (75/25, 0,51, 70 000) y se disolvieron en 50 ml de diclorometano para formar una fase oleosa, se pesaron 2,4 g de acetato de triptorelina y 800 mg de glucosa y se disolvieron en 5,0 ml de agua para formar una fase acuosa; y después la fase acuosa se añadió a la fase oleosa para dar una mezcla que se emulsionó a 13 500 r.p.m. durante 90 s para obtener una emulsión primaria. La emulsión primaria se añadió a 4000 ml de una solución de PVA al 1,0% a 8°C a través de un inyector en condiciones de homogeneización a 1300 r.p.m. y después se emulsionó de forma homogénea durante 3 min para obtener una emulsión doble. La emulsión doble homogeneizada se transfirió a una mezcladora en soporte voladizo que rota a una velocidad de 350 r.p.m. y se agitó durante 5 h para volatilizar y eliminar el disolvente orgánico; el residuo se filtró por un tamiz, se lavó con agua desionizada y se liofilizó para obtener microesferas pulverizables. Las microesferas tenían una cantidad de carga de fármaco de un 27,42% y una eficacia de atrapamiento de un 94,4%.

Ejemplo de referencia 25

Se pesaron 5,592 g de PLGA (75/25, 0,51, 70 000) y se disolvieron en 40 ml de diclorometano para formar una fase oleosa, se pesaron 2,4 g de acetato de triptorelina y 8 mg de manitol y se disolvieron en 4,0 ml de agua para formar una fase acuosa; y después la fase acuosa se añadió a la fase oleosa para dar una mezcla que se emulsionó a 13 500 r.p.m. durante 90 s para obtener una emulsión primaria. La emulsión primaria se añadió a 4000 ml de una solución de PVA al 1,0% a 8°C a través de un inyector en condiciones de homogeneización a 1300 r.p.m. y después se emulsionó de forma homogénea durante 3 min para obtener una emulsión doble. La emulsión doble homogeneizada se transfirió a una mezcladora en soporte voladizo que rota a una velocidad de 350 r.p.m. y se agitó durante 5 h para volatilizar y eliminar el disolvente orgánico; el residuo se filtró por un tamiz, se lavó con agua desionizada y se liofilizó para obtener microesferas pulverizables. Las microesferas tenían una cantidad de carga de fármaco de un 26,82% y una eficacia de atrapamiento de un 89,4%.

Ejemplo de referencia 26

Se pesaron 5,56 g de PLGA (75/25, 0,51, 70 000) y se disolvieron en 50 ml de diclorometano para formar una fase oleosa, se pesaron 2,4 g de acetato de triptorelina y 40 mg de manitol y se disolvieron en 5,0 ml de agua para formar una fase acuosa; y después la fase acuosa se añadió a la fase oleosa para dar una mezcla que se emulsionó a 12 000 r.p.m. durante 90 s para obtener una emulsión primaria. La emulsión primaria se añadió a 4000 ml de una solución de PVA al 1,0% a 8°C a través de un inyector en condiciones de homogeneización a 1500 r.p.m. y después se emulsionó de forma homogénea durante 3 min para obtener una emulsión doble. La emulsión doble homogeneizada se transfirió a una mezcladora en soporte voladizo que rota a una velocidad de 300 r.p.m. y se agitó durante 5 h para volatilizar y eliminar el disolvente orgánico; el residuo se filtró por un tamiz, se lavó con agua desionizada y se liofilizó para obtener microesferas pulverizables. Las microesferas tenían una cantidad de carga de fármaco de un 27,15% y una eficacia de atrapamiento de un 90,5%.

Ejemplo de referencia 27

Se pesaron 4,8 g de PLGA (75/25, 0,51, 70 000) y se disolvieron en 50 ml de diclorometano para formar una fase oleosa, se pesaron 2,4 g de acetato de triptorelina y 800 mg de manitol y se disolvieron en 5,0 ml de agua para formar una fase acuosa; y después la fase acuosa se añadió a la fase oleosa para dar una mezcla que se emulsionó a 12 000 r.p.m. durante 90 s para obtener una emulsión primaria. La emulsión primaria se añadió a 4000 ml de una solución de PVA al 1,0% a 8°C a través de un inyector en condiciones de homogeneización a 1500 r.p.m. y después se emulsionó de forma homogénea durante 3 min para obtener una emulsión doble. La emulsión doble homogeneizada se transfirió a una mezcladora en soporte voladizo que rota a una velocidad de 300 r.p.m. y se agitó durante 5 h para volatilizar y eliminar el disolvente orgánico; el residuo se filtró por un tamiz, se lavó con agua desionizada y se liofilizó para obtener microesferas pulverizables. Las microesferas tenían una cantidad de carga de fármaco de un 27,84% y una eficacia de atrapamiento de un 92,8%.

Ejemplo comparativo 3

Se pesaron 5,6 g de PLGA (75/25, 0,51, 70 000) y se disolvieron en 50 ml de diclorometano para formar una fase oleosa, se pesaron 2,4 mg de acetato de triptorelina y se disolvieron en 5,0 ml de agua para formar una fase acuosa; y después la fase acuosa se añadió a la fase oleosa para dar una mezcla que se emulsionó a 13 500 r.p.m. durante 90 s para obtener una emulsión primaria. La emulsión primaria se añadió a 4000 ml de una solución de PVA al 1,0% a 8°C a través de un inyector en condiciones de homogeneización a 1300 r.p.m. y después se emulsionó de forma

5 homogénea durante 3 min para obtener una emulsión doble. La emulsión doble homogeneizada se transfirió a una mezcladora en soporte voladizo que rota a una velocidad de 350 r.p.m. y se agitó durante 5 h para volatilizar y eliminar el disolvente orgánico; y el residuo se filtró por un tamiz, se lavó con agua desionizada y se liofilizó para obtener microesferas pulverizables. Las microesferas tenían una cantidad de carga de fármaco de un 27,5% y una eficacia de atrapamiento de un 91,7%.

Ejemplo de ensayo 6: Ensayo de liberación *in vitro* de microesferas de triptorelina que comprenden glucosa/manitol con diferentes contenidos

10 Método de ensayo: El mismo que en el ejemplo de ensayo 2.

Materiales de ensayo:

15 Fármacos de ensayo: Microesferas de triptorelina preparadas de acuerdo con el ejemplo 22, 24 y el ejemplo de referencia 25, 27.

Grupo de control: Microesferas de triptorelina sin glucosa/manitol preparadas de acuerdo con el ejemplo comparativo 3.

20 Los resultados de ensayo se mostraron en la tabla 7 y la figura 6.

Tabla 7 cantidades de liberación acumulada *in vitro* (%) de microesferas de triptorelina

Tiempo (D)	Ejemplo comparativo 3	Ejemplo 22	Ejemplo 24	Ejemplo de referencia 25	Ejemplo de referencia 27
0,125	4,8	8,2	37,4	7,9	40,6
1	12,4	17,9	43,2	16,7	47,4
3	16,1	20,3	45,8	19,5	50,6
7	20,9	22,6	47,2	22,8	54,1
14	23,5	26,3	48,3	25,7	56,3
21	26,8	29,2	48,8	27,6	56,9
28	30,5	32,7	49,5	31,2	57,5
35	35,1	36,4	50,1	35,6	58,6
42	37,6	41,5	51,4	39,2	62,2
49	50,8	51,6	54,5	52,3	70,5
56	70,4	67,3	63,7	69,6	76,1
63	76,9	77,2	74,5	78,4	81,2
70	83,2	85,6	78,8	84,1	84,1
77	88,5	90,1	84,6	87,5	86,3
84	90,7	92,3	87,3	91,2	89,4

25 Los resultados muestran que (a) las formulaciones con glucosa/manitol, cuando se comparan con las de sin glucosa/manitol, aumentaban significativamente la cantidad de liberación inicial *in vitro* (0-3 horas) de triptorelina; (b) la cantidad de liberación inicial *in vitro* (0-3 horas) de triptorelina aumentaba con el aumento del contenido de glucosa/manitol.

30 **Ejemplo de ensayo 7: Ensayos farmacodinámicos *in vivo* en rata de microesferas de triptorelina que comprenden glucosa/manitol con diferentes contenidos.**

Método de ensayo: El mismo que en el ejemplo de ensayo 3.

35 Fármacos de ensayo: Microesferas de triptorelina preparadas de acuerdo con el ejemplo 23-24, ejemplo de referencia 26-27.

Grupo de control: Microesferas de triptorelina sin glucosa/manitol preparadas de acuerdo con el ejemplo comparativo 3.

40 Los resultados de ensayo se mostraron en la tabla 8 y en la figura 7.

Tabla 8 concentraciones de testosterona en suero (ng/ml) en diferentes momentos después de administrar las microesferas por inyección intramuscular a ratas

Tiempo (D)	Grupo de control negativo	Grupo castrado	Grupo de control	Ejemplo 23	Ejemplo 24	Ejemplo de referencia 26	Ejemplo de referencia 27
0	11,52 ± 3,25	13,79 ± 3,05	12,73 ± 2,83	10,56 ± 3,41	11,92 ± 1,22	13,24 ± 3,45	11,33 ± 3,68
1	12,37 ± 2,52	0,88 ± 0,21	16,24 ± 3,96	25,31 ± 4,78	30,11 ± 4,31	26,45 ± 2,78	29,08 ± 4,74
4	10,36 ± 3,41	1,02 ± 0,14	10,80 ± 1,42	2,35 ± 0,68	2,33 ± 0,65	2,76 ± 1,06	2,25 ± 0,96
7	11,60 ± 2,86	1,51 ± 0,38	6,13 ± 1,28	2,48 ± 0,85	1,65 ± 0,88	2,23 ± 0,75	1,57 ± 0,42

Tiempo (D)	Grupo de control negativo	Grupo castrado	Grupo de control	Ejemplo 23	Ejemplo 24	Ejemplo de referencia 26	Ejemplo de referencia 27
10	9,76 ± 3,31	1,84 ± 0,52	4,74 ± 1,05	2,14 ± 0,63	1,76 ± 0,63	2,32 ± 1,42	1,36 ± 0,37
14	10,48 ± 3,62	1,72 ± 0,46	2,45 ± 0,68	1,73 ± 0,56	1,53 ± 0,42	2,05 ± 0,95	2,43 ± 0,95
18	12,44 ± 2,41	2,31 ± 0,37	2,76 ± 0,72	2,21 ± 0,97	2,32 ± 0,56	1,87 ± 0,61	1,58 ± 0,26
21	11,63 ± 2,88	1,69 ± 0,20	3,07 ± 0,56	1,88 ± 0,41	1,57 ± 0,37	2,02 ± 0,81	2,22 ± 0,78
25	10,24 ± 3,55	1,56 ± 0,19	2,86 ± 0,43	2,37 ± 1,05	2,34 ± 0,74	2,45 ± 0,46	2,43 ± 1,02
28	11,31 ± 2,27	1,89 ± 0,37	2,89 ± 0,39	2,52 ± 0,41	2,29 ± 0,62	2,33 ± 0,74	3,26 ± 1,27
35	9,88 ± 2,62	1,76 ± 0,42	3,62 ± 1,25	2,04 ± 1,02	2,76 ± 1,13	3,81 ± 1,12	4,35 ± 0,96
42	9,64 ± 3,17	2,36 ± 0,55	2,55 ± 0,66	1,65 ± 0,66	2,85 ± 0,55	3,39 ± 1,47	3,72 ± 1,18
49	10,81 ± 3,44	2,27 ± 0,36	1,88 ± 0,35	1,46 ± 0,58	2,41 ± 0,47	2,34 ± 0,58	1,88 ± 0,47
56	11,92 ± 2,52	1,68 ± 0,09	1,90 ± 0,40	1,76 ± 0,73	2,78 ± 0,36	2,08 ± 0,64	2,46 ± 0,56
63	13,44 ± 2,18	1,45 ± 0,22	1,76 ± 0,52	1,57 ± 0,88	1,75 ± 0,82	1,96 ± 0,72	1,63 ± 0,85
70	12,17 ± 2,22	1,73 ± 0,27	1,89 ± 0,07	1,79 ± 0,52	1,66 ± 0,68	1,83 ± 0,66	2,94 ± 0,42
77	11,55 ± 3,51	2,32 ± 0,55	2,66 ± 0,35	2,36 ± 0,71	1,94 ± 1,12	2,46 ± 0,71	4,38 ± 1,31
84	12,46 ± 2,72	2,15 ± 0,31	3,88 ± 0,62	2,78 ± 0,44	2,32 ± 0,93	2,93 ± 1,20	6,02 ± 2,06
91	10,63 ± 3,37	1,86 ± 0,61	5,54 ± 0,73	4,56 ± 1,35	7,02 ± 1,86	6,77 ± 0,86	8,03 ± 1,54

Los resultados muestran que a) el nivel de testosterona de aquellos grupos a los que se ha administrado las microesferas de triptorelina sin glucosa o manitol disminuía hasta un nivel de castración, es decir, empezaba a actuar en el 10.º al 14.º día; mientras que las microesferas de triptorelina que contenían glucosa/manitol, empezaban a actuar en el 4.º día. Por lo tanto, las microesferas de triptorelina que comprenden glucosa/manitol podían actuar más rápido; b) todas las concentraciones de testosterona de aquellos grupos a los que se ha administrado las microesferas que comprenden glucosa se mantuvieron constantes a nivel de castración desde el 4.º día hasta el 84.º día; mientras que las concentraciones de testosterona de aquellos grupos a los que se ha administrado las microesferas que comprenden manitol se mantuvieron sustancialmente al nivel de castración desde el 4.º día hasta el 70.º día, pero fluctuaron alrededor del 35.º día, por lo tanto, en comparación con el manitol, la glucosa puede mantener un periodo más largo y efectos farmacéuticos más constantes.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica de microesferas de triptorelina de liberación sostenida, comprendiendo las microesferas de triptorelina, triptorelina o una sal de la misma, poli(lactida-co-glicolida) y glucosa.
2. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el contenido en peso de glucosa en las microesferas de triptorelina es de un 0,1-10%, o de un 0,5-10%, o un de 0,5-5%, o un de 0,5-2%, o de un 1%.
- 10 3. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el contenido en peso de triptorelina o la sal de la misma en las microesferas de triptorelina es de un 1-30%.
4. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el contenido en peso de poli(lactida-co-glicolida) en las microesferas de triptorelina es de un 60-98,9%.
- 15 5. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el contenido en peso de triptorelina o la sal de la misma en las microesferas de triptorelina es de un 1-30% y el contenido en peso del poli(lactida-co-glicolida) en las microesferas de triptorelina es de un 60-98,9% y el contenido en peso de glucosa en las microesferas de triptorelina es de un 0,1-10%.
- 20 6. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el contenido en peso de triptorelina o la sal de la misma en las microesferas de triptorelina es de un 2-20% y el contenido en peso del poli(lactida-co-glicolida) en las microesferas de triptorelina es de un 70-97,5% y el contenido en peso de glucosa en las microesferas de triptorelina es de un 0,5-10%.
- 25 7. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el contenido en peso de triptorelina o la sal de la misma en las microesferas de triptorelina es de un 2-20% y el contenido en peso del poli(lactida-co-glicolida) en las microesferas de triptorelina es de un 75-97,5% y el contenido en peso de glucosa en las microesferas de triptorelina es de un 0,5-5%.
- 30 8. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7, en la que el contenido en peso de triptorelina o la sal de la misma en las microesferas de triptorelina es de un 5-15% y el contenido en peso de poli(lactida-co-glicolida) en las microesferas de triptorelina es de un 83-94,5% y el contenido en peso de glucosa en las microesferas de triptorelina es de un 0,5-2%.
- 35 9. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8, en la que el contenido en peso de triptorelina o la sal de la misma en las microesferas de triptorelina es de un 10% y el contenido en peso del poli(lactida-co-glicolida) en las microesferas de triptorelina es de un 89% y el contenido en peso de glucosa en las microesferas de triptorelina es de un 1%.
- 40 10. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la sal de triptorelina es acetatos.
- 45 11. La composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8, en la que las microesferas de triptorelina se preparan por un proceso doble de emulsión- evaporación de disolvente, añadiéndose la glucosa en una fase acuosa interna.
- 50 12. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10, en la que la relación molar de lactida a glicolida en el poli(lactida-co-glicolida) está dentro de un intervalo de 90:10 a 40:60 o de 75:25 a 40:60, o de 50:50.
- 55 13. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10, en la que la viscosidad intrínseca del poli(lactida-co-glicolida) es de 0,10-0,70 dl/g, preferiblemente 0,15-0,50 dl/g y más preferiblemente 0,20-0,35 dl/g, en la que la viscosidad intrínseca se mide de la siguiente manera: se prepara una solución a un 0,5% (p/v) de PLGA en cloroformo y se determina la viscosidad intrínseca de PLGA a 30°C usando un viscosímetro de capilar de vidrio Cannon-Fenske.
- 60 14. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10, en la que el peso molecular promedio en peso del poli(lactida-co-glicolida) es de 5000-100 000 Dalton, preferiblemente 10 000-75 000 Dalton y más preferiblemente 15 000-40 000 Dalton.
- 65 15. La composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 14, en la que las microesferas pueden prepararse en forma de polvo estéril, que comprende la composición de microesferas de triptorelina de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 14 y manitol.
16. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en el tratamiento de cáncer de próstata, precocidad sexual, adenomiosis, infertilidad femenina o histeromioma.

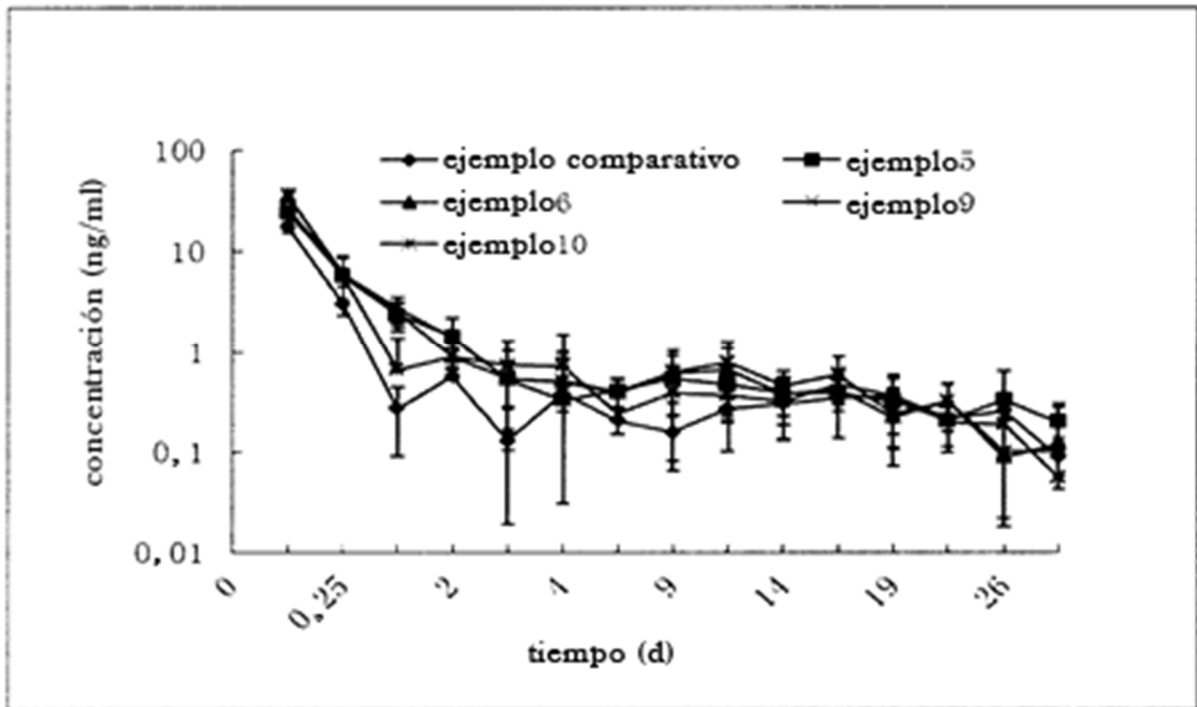


Fig. 1

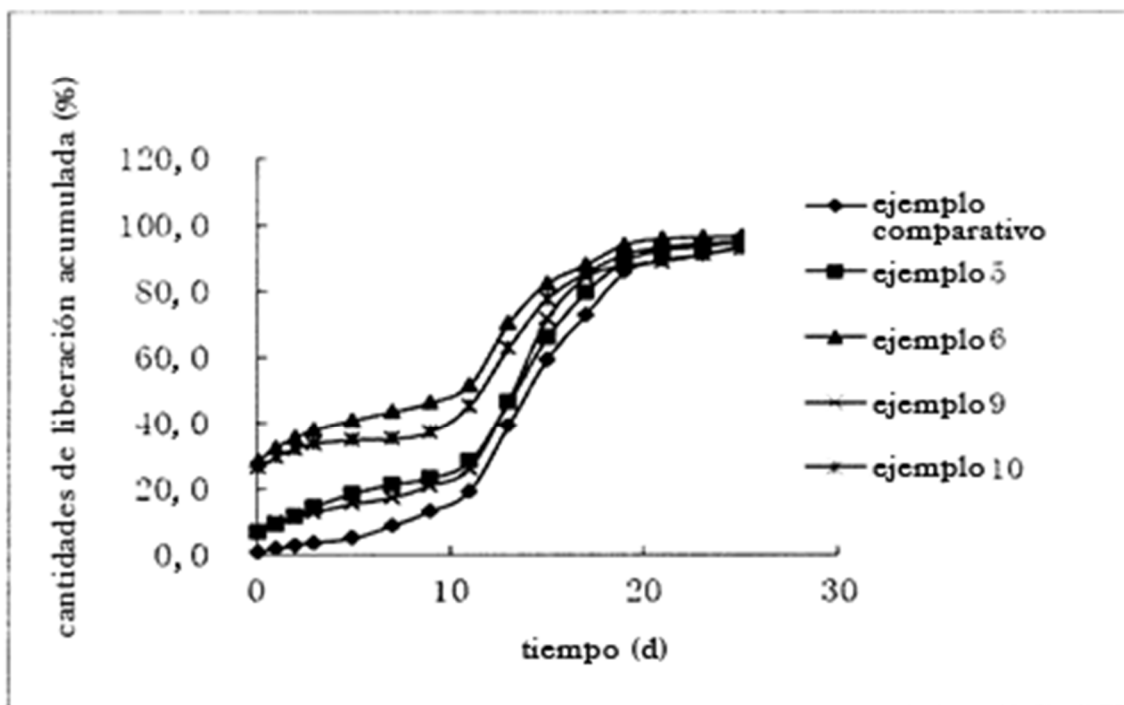


Fig. 2

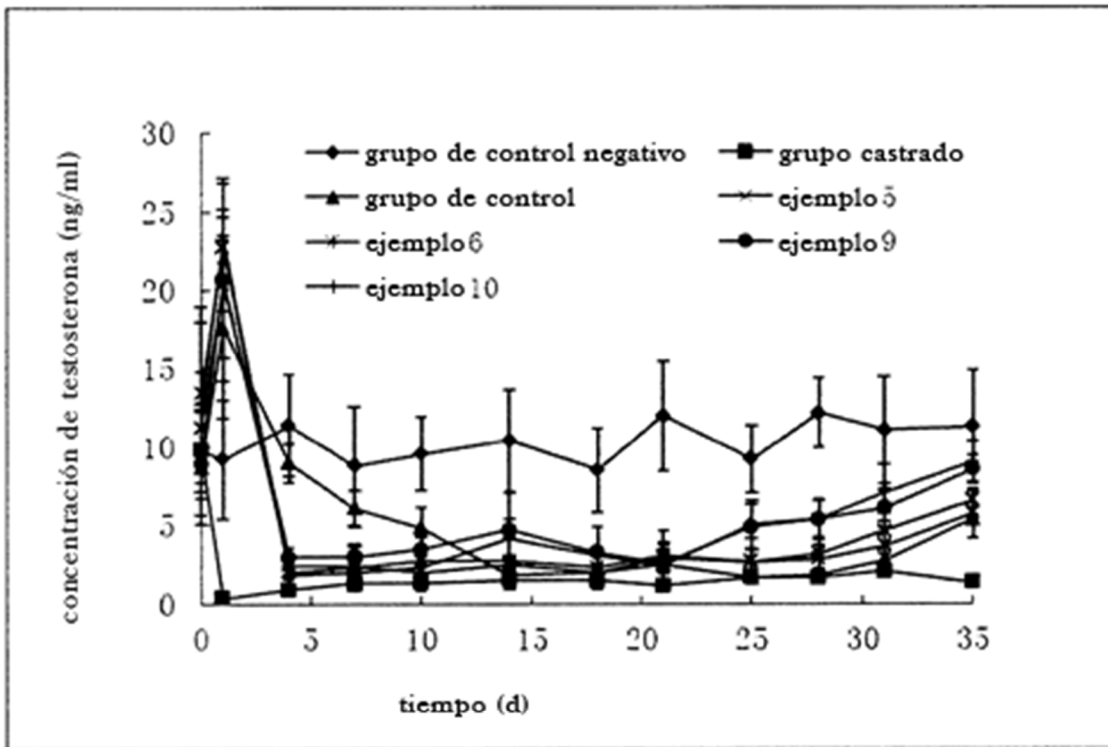


Fig. 3

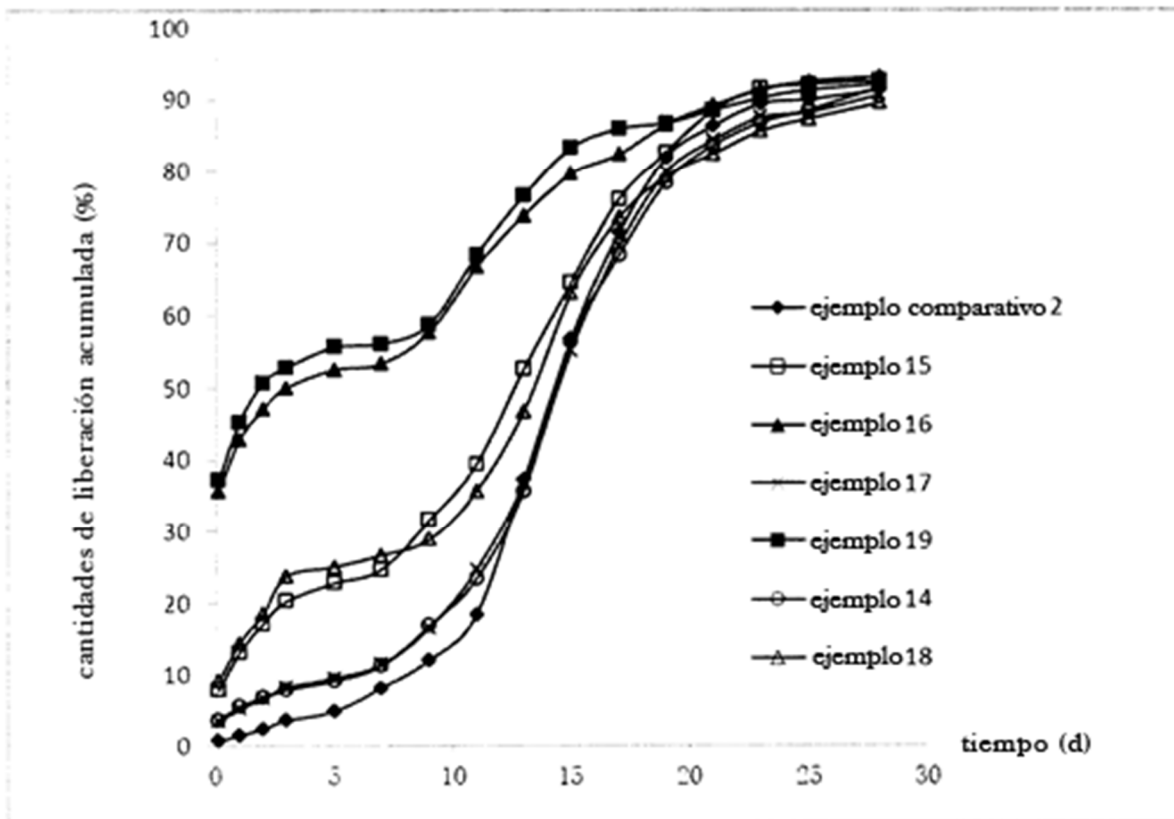


Fig. 4

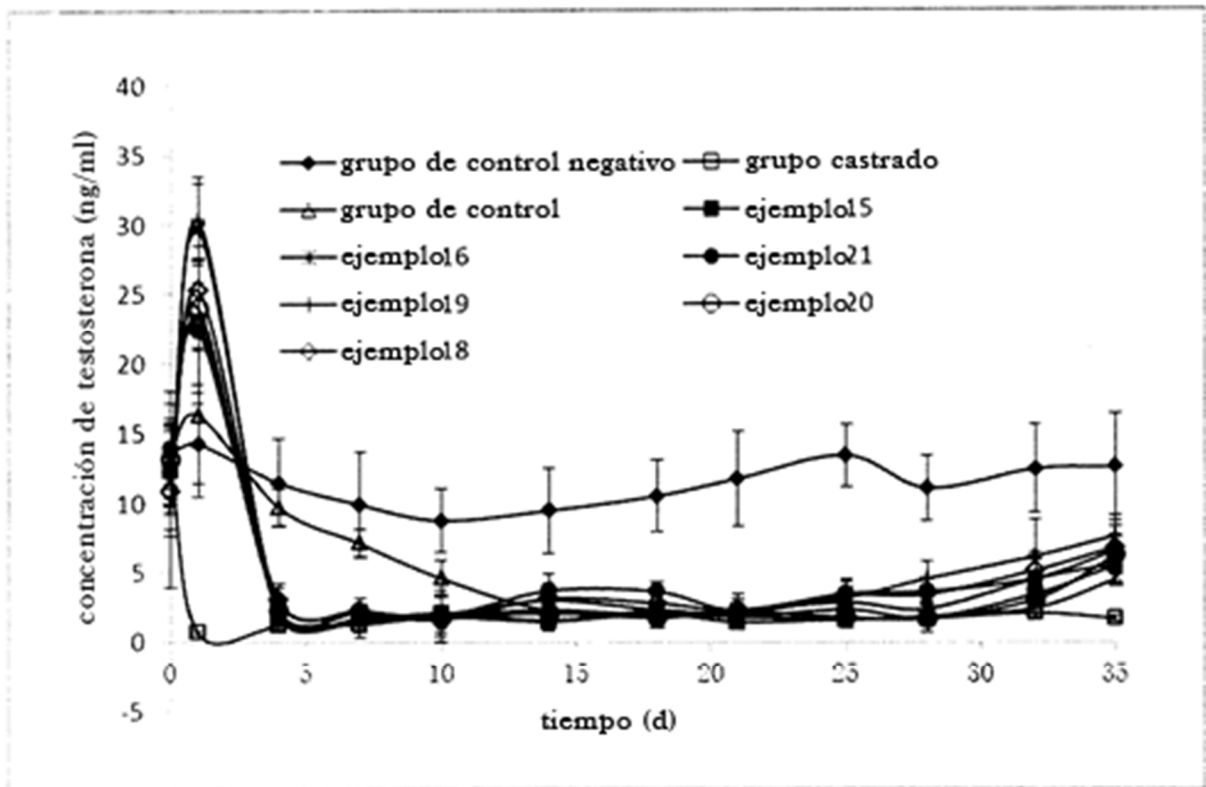


Fig. 5

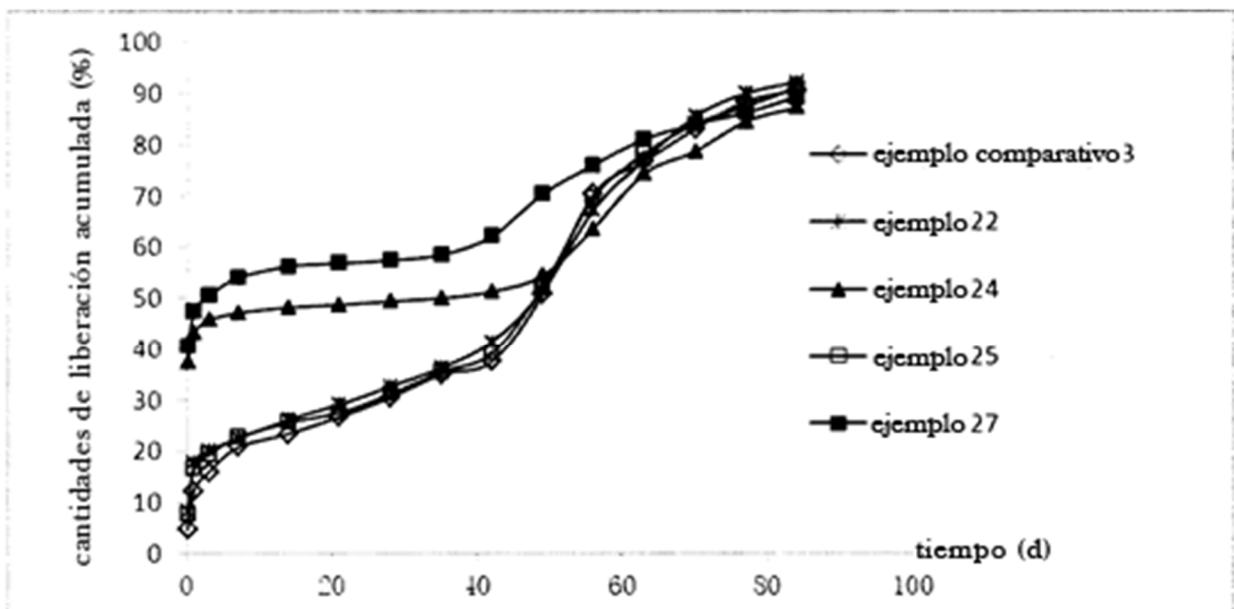


Fig. 6

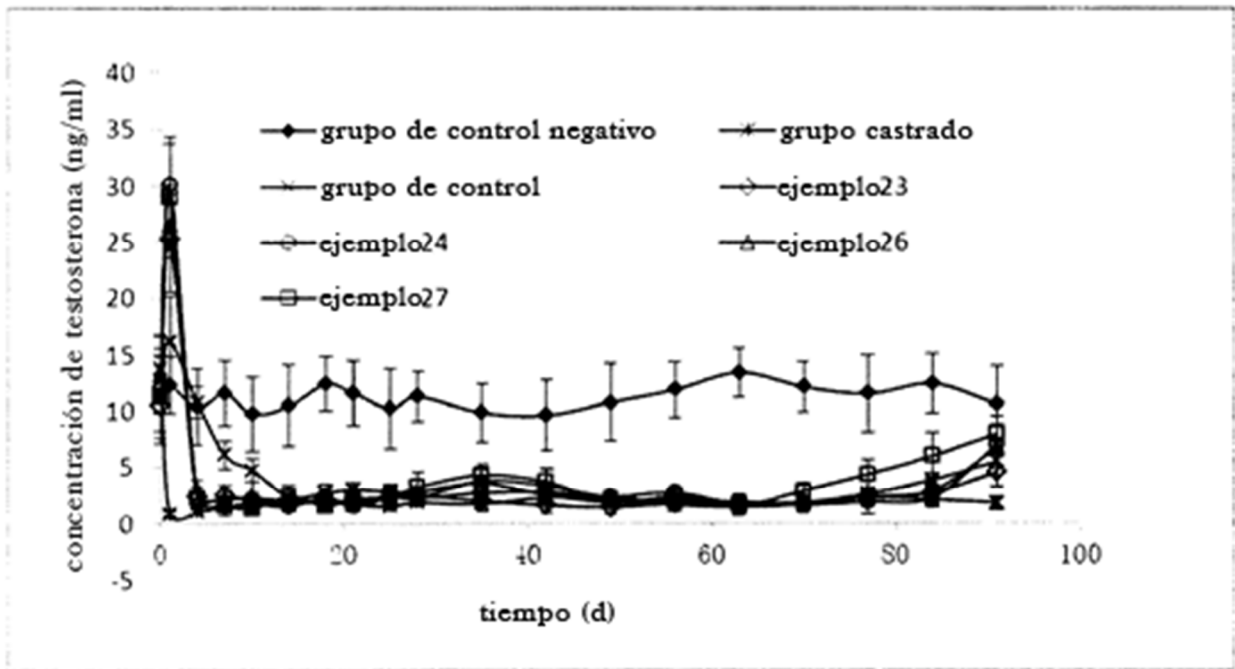


Fig. 7