

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 672 625**

51 Int. Cl.:

A61K 9/16	(2006.01)
A61K 9/50	(2006.01)
A61K 31/57	(2006.01)
A61K 31/436	(2006.01)
A61K 31/337	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.02.2007 PCT/EP2007/051299**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.08.2007 WO07090897**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.02.2007 E 07704512 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018 EP 1986610**

54 Título: **Carga de fármacos hidrófobos en sistemas de suministro poliméricos hidrófilos**

30 Prioridad:

10.02.2006 EP 06250742

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

15.06.2018

73 Titular/es:

**BIOCOMPATIBLES UK LIMITED (100.0%)
CHAPMAN HOUSE, FARNHAM BUSINESS PARK,
WEYDON LANE
FARNHAM, SURREY GU9 8QL, GB**

72 Inventor/es:

**LEWIS, ANDREW LENNARD;
TANG, YIQING y
GONZALEZ FAJARDO, MARIA VICTORIA**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 672 625 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

Carga de fármacos hidrófobos en sistemas de suministro poliméricos hidrófilos

5 La presente invención se refiere a procedimientos para preparar microesferas hidrófilas cargadas con fármaco hidrófobo que tienen un suministro local sin liberación inicial rápida y de liberación mantenida de fármaco en el sitio de embolización.

La terapia de embolización implica la introducción de un agente en los vasos para provocar el bloqueo deliberado de un vaso particular. Este tipo de terapia es particularmente útil para bloquear conexiones anormales entre arterias y venas (tales como malformaciones arteriovenosas o MAV) y también para ocluir vasos que alimentan ciertos tumores hipervascularizados, para desnutrir el tejido anormal y provocar isquemia o necrosis tumoral.

15 El proceso de embolización puede inducir necrosis o isquemia tumoral dependiendo de la extensión de la embolización. La respuesta de las células tumorales al entorno hipóxico puede dar como resultado una angiogénesis consiguiente en que crecen nuevos vasos sanguíneos para compensar la pérdida de flujo al tumor por la embolización. Sería deseable por lo tanto combinar la embolización con la administración de agentes que pudieran prevenir la respuesta angiogénica consiguiente o combinar con la liberación de un agente citotóxico o u otro antitumoral para provocar la muerte celular en aquellas células que no mueren por la embolización.

20 A principios de los 60, el Instituto Nacional del Cáncer (NCI) de los Estados Unidos inició un programa de cribado biológico de extractos tomados de una amplia variedad de fuentes naturales. Se encontró que uno de estos extractos exhibía una actividad antitumoral marcada contra un amplio intervalo de tumores de roedores. Aunque este descubrimiento se realizó en 1962, no fue hasta cinco años después que dos investigadores, Wall y Wani, del Research Triangle Institute, Carolina del Norte, aislaron el compuesto activo de la corteza del árbol tejo del Pacífico (*Taxus brevifolia*). En 1971, Wall y Wani publicaron la estructura de este nuevo compuesto principal anticanceroso prometedor, un complejo polioxigenado, Wani, M. C., H. L. Taylor, Monroe Wall, P. Coggon, A. T. McPhail, 1971, "Plant Antitumor Agents. VI. The Isolation and Structure of Taxol, a Novel Antileukemic and Antitumor Agent from *Taxus brevifolia*," Journal of the American Chemical Society, 93: 2325-2327.

30 El paclitaxel es un producto natural con actividad antitumoral. Se usa para tratar cáncer de ovario y sarcoma de Kaposi, y se usa en combinaciones con otros agentes de quimioterapia para tratar cáncer de mama y carcinoma pulmonar no microcítico, y es más efectivo contra carcinomas de ovario y carcinomas de mama avanzados. El paclitaxel se procura por vía intravenosa (irrita la piel y las membranas mucosas al contacto). El paclitaxel, que se comercializa como Taxol® por Bristol-Myers Squibb, se obtiene mediante un proceso semisintético a partir de *Taxus baccata*. El nombre químico es 13-éster de 4,10-diacetato y 2-benzoato de 5β,20-epoxi-1,2α,4,7β,10β,13α-hexahidroxitax-11-en-9-ona con (2R,3S)-N-benzoil-3-fenilisoserina. El paclitaxel es un polvo cristalino de blanco a blanquecino de fórmula empírica $CH_{47}H_{51}NO_{14}$ y un peso molecular de 853,9. El paclitaxel es altamente lipófilo, insoluble en agua y funde a alrededor de 216-217 °C.

40 Las propiedades relativamente no tóxicas del paclitaxel le hicieron un modelo en el tratamiento del cáncer en los 90, proporcionando una alternativa no intrusiva a las técnicas más radicales de radioterapia y cirugía.

A pesar de su bien documentada actividad biológica, se mostró muy poco interés por el paclitaxel hasta que los científicos del Albert Einstein Medical College reseñaron que su modo de acción era totalmente único. Hasta este descubrimiento en 1980, se creía que las propiedades citotóxicas del paclitaxel eran debidas a su capacidad de desestabilizar los microtúbulos, estructuras importantes implicadas en la división celular (mitosis). De hecho, se encontró que el paclitaxel induce el ensamblaje de tubulina en microtúbulos y, más importante, que el fármaco realmente los estabiliza en la medida en que se interrumpe la mitosis. Se creyó que tal modo de acción novedoso hacía al paclitaxel un prototipo de una nueva clase de fármacos anticancerosos. El paclitaxel se une a los microtúbulos e inhibe su despolimerización (desensamblaje molecular) a tubulina. Bloquea la capacidad de la célula de degradar el huso mitótico durante la mitosis (división celular). Con el huso aún en su lugar, la célula no puede dividirse en células hija (esto está en contraposición con fármacos como colchicina y los alcaloides de la vinca, que bloquean la mitosis evitando que se forme el huso en primer lugar).

55 La mayoría del trabajo reseñado sobre la preparación de sistemas de suministro de fármaco poliméricos cargados con paclitaxel está basado en sistemas poliméricos hidrófobos en que el paclitaxel tiene una buena solubilidad.

El documento WO2003/077967 se refiere a un procedimiento de deposición para aplicar una sustancia activa a una endoprótesis que tiene un recubrimiento polimérico fino. El procedimiento de deposición posibilita una administración

lenta y, en gran medida, constante de una sustancia activa, como se cita en el ejemplo de tretinoína. Puesto que no se requieren etapas de procesamiento adicionales después de la aplicación de la sustancia o sustancias activas, no es necesario preocuparse por las condiciones de recubrimiento que causan la degradación de la sustancia activa, por ejemplo, por la aplicación de un segundo recubrimiento polimérico. Incluso sustancias activas relativamente inestables, p.ej. tretinoína, pueden aplicarse sin ninguna dificultad a la endoprótesis. Por tanto, se escindió 4-amino-[2,2]-paraciclofano a 700 °C, 20 Pa hasta monómeros reactivos y se polimerizó en la superficie de una prótesis endovascular a 20 °C. Se puso en contacto la prótesis endovascular recubierta con polímero con una solución de tretinoína en DMSO y se sumergió en agua; esto dio como resultado la precipitación de tretinoína sobre la superficie de la prótesis endovascular y la imbibición del precipitado en la capa polimérica.

10 El grupo de Angiotech ha estudiado la carga de paclitaxel en microesferas de poli(ácido L-láctico) (PLLA) usando el procedimiento de evaporación de disolvente. Se disolvieron PLLA y paclitaxel en diclorometano. Se añadió la fase orgánica a una solución acuosa de poli(vinilalcohol) al 2,5 % con agitación. Posteriormente, después de 2 h se pasó la suspensión acuosa que contiene microesferas a través de tamices para retener las partículas de ciertos intervalos de tamaño. Se secaron adicionalmente las microesferas durante 12-16 h a temperatura ambiente. [Richard T. Liggins, Helen M. Burt 'Paclitaxel loaded poly(L-lactic acid) microspheres: properties of microspheres made with low molecular weight polymers' International Journal of Pharmaceutics 222 (2001) 19-33; Richard T. Liggins, Helen M. Burt 'Paclitaxel loaded poly(L-lactic acid) microspheres II. The effect of processing parameters on microsphere morphology and drug release kinetics' International Journal of Pharmaceutics 281 (2004) 103-106.] Más tarde, extendieron su trabajo a películas de poli(ácido láctico-co-glicólico) para el suministro de paclitaxel. [John K. Jackson, *et al.* 'Characterization of perivascular poly(lactic-co-glycolic acid) films containing paclitaxel' International Journal of Pharmaceutics 283 (2004) 97-109.] Otros trabajos incluyen microesferas de poli(ácido láctico) recubiertas con PEG. [Gladwin S. Das, *et al.* 'Controlled delivery of taxol from poly(ethylene glycol)-coated poly(lactic acid) microspheres' Journal of Biomedical Materials Research 55 (2001) 96-103].

25 Boston Scientific Corporation ha desarrollado un sistema de recubrimiento de prótesis endovascular coronaria para el suministro de paclitaxel mediante la formulación de combinaciones poliméricas con 10 a 25 % de paclitaxel. Los polímeros usados son poli(metacrilato de butilo), poli(estireno-co-isobutileno-co-estireno) o poli(estireno-co-etilenbutileno-co-estireno), que se combinan con poli(estireno-co-anhídrido maleico). Un desarrollo reciente usa una porción estirénica modificada, es decir, hidroxiestireno o su versión acetilada. [Shrirang Ranade, *et al.* resúmenes de artículos, 229th ACS national Meeting, San Diego, CA, US, 13-17 de marzo de 2005, PMSE-022].

Se describen la composición y procedimientos para la liberación controlada in vivo de agentes activos farmacéuticos asociados al hidroxapatito (HAP) en un vehículo farmacéuticamente aceptable en el documento WO2003030943. El vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser una pasta o gel polimérico que puede contener un segundo agente farmacológicamente activo. Se proporcionan procedimientos de elaboración y administración de composiciones de liberación controlada para el suministro de un agente farmacológicamente activo, tal como un ácido nucleico, en combinación con un polímero policatiónico y en un vehículo farmacéuticamente aceptable, a un mamífero a una cantidad farmacéuticamente efectiva.

40 La rapamicina, también conocida como sirolimús, se aisló por primera vez en 1969 a partir de un hongo (*Streptomyces hygroscopicus*) en la isla de Rapa Nui (Isla de Pascua). Inicialmente, se encontró que tenía potentes actividades antifúngicas y antiproliferativas; pero fue en 1977 cuando Martel *et al* reseñaron su actividad inmunosupresora prometedor [Martel, R.R.; Canadian Journal of Physiological Pharmacology, 55, 48-51 (1977)]. A partir de este momento, se ha estudiado profundamente su mecanismo de acción, y es conocido cómo este antibiótico ejerce sus actividades inmunosupresoras y antiproliferativas. La rapamicina es un polvo de blanco a blanquecino y es insoluble en agua, pero fácilmente soluble en alcohol bencílico, cloroformo, acetona y acetonitrilo.

La rapamicina y los análogos de rapamicina están actualmente en desarrollo clínico contra una serie de indicaciones cancerosas. El mecanismo de acción es como inhibidor de la diana de mamífero de rapamicina (mTOR). La estructura de macrólido cíclica inhibe la proliferación celular al interferir con la ruta de TOR altamente conservada, que controla la síntesis de proteínas esenciales implicadas en la progresión del ciclo celular.

La mTOR es una proteína cinasa con similitudes con los dominios catalíticos de las fosfoinositida 3-cinasas (PI3-k). Una vez activada, la TOR transduce señales que inician la síntesis de proteínas ribosómicas, la traducción de ARNm específicos y la generación de cinasas dependientes de ciclina, promoviendo la progresión del ciclo celular. Esto da como resultado la activación y proliferación de linfocitos T y B y la producción de anticuerpos, así como la proliferación de células no inmunitarias tales como hepatocitos, fibroblastos, células endoteliales y células de músculo liso. [Neuhaus P, Klupp J, Langrehr JM.; Liver Transpl. 2001 Jun;7(6):473-84. mTOR inhibitors: an overview.].

La rapamicina ejerce su efecto antiproliferativo principalmente bloqueando todos estos eventos, como consecuencia de la inhibición de mTOR. Es capaz de inhibir esta proteína cinasa formando un complejo trimérico estable, después de unión con la proteína receptora intracelular soluble FKBP12. Esta inhibición bloquea la síntesis de cinasas dependientes de ciclina, que son ARNm clave que codifican las proteínas requeridas para la progresión del ciclo celular de la fase G1 a S.

La mTOR es también un regulador positivo de la transcripción génica dependiente del factor 1 inducible por hipoxia en células expuestas a hipoxia o agentes miméticos de hipoxia [Hudson CC, Liu M, Chiang GG, Otterness DM, Loomis DC, Kaper F, Giaccia AJ, Abraham RT.; Mol Cell Biol. Octubre de 2002; 22(20): 7004-14. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression and function by the mammalian target of rapamycin]. Si las rapamicinas prueban ser inhibidores efectivos de la adaptación hipóxica en tumores en desarrollo, estos fármacos podrían tener efectos drásticos sobre el crecimiento e invasividad tumorales y el potencial metastásico en pacientes de cáncer. En la embolización, se induce un entorno hipóxico y, por lo tanto, la rapamicina y sus análogos pueden actuar mecanísticamente inhibiendo mTOR y consiguientemente inhibiendo la producción del factor inducido por hipoxia (HIF-1), que se cree ampliamente implicado en las respuestas angiogénicas.

El tratamiento de animales portadores de tumores con rapamicina da como resultado una expresión disminuida de ARNm de VEGF y niveles en circulación disminuidos de proteína VEGF. Por tanto, se inhibe la proliferación de células de músculo liso y endoteliales por la inhibición de TOR. Este efecto antiangiogénico puede contribuir a la eficacia de los inhibidores de mTOR en la terapia del cáncer [Rao RD, Buckner JC, Sarkaria JN.; Curr Cancer Drug Targets. Diciembre de 2004; 4(8): 621-35. Mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors as anti-cancer agents].

La rapamicina y los análogos de rapamicina han demostrado actividad contra un amplio intervalo de cánceres humanos que crecen en cultivo de tejido y en modelos de xenoinjerto tumoral humano. El papel básico de mTOR en la modulación de la proliferación celular tanto en células tumorales como normales y la importancia de la señalización de mTOR para la respuesta hipóxica sugiere que las terapias basadas en rapamicina pueden ejercer efectos antitumorales principalmente a través de la inhibición de la proliferación de células tumorales o la supresión de la angiogénesis. Aunque la rapamicina puede inducir la apoptosis en modelos tumorales seleccionados, el tratamiento con rapamicina típicamente retarda el crecimiento pero no induce la regresión tumoral, sugiriendo que la pérdida de células tumorales mediante apoptosis u otros mecanismos no es un contribuyente principal al efecto del fármaco en la mayoría de casos.

Ha habido muchas reseñas de sistemas de suministro de fármacos que usan polímeros hidrófobos, tales como poli(ácido L-láctico), poli(ácido láctico-co-glicólico), poli(caprolactona), poli(metacrilato de butilo) y poli(estireno-co-isobutileno-co-estireno). Sin embargo, hay pocas reseñas de microesferas de hidrogel cargadas con paclitaxel. Esto es debido a la mala compatibilidad entre los fármacos hidrófobos y las microesferas de hidrogel [R. Shi, H.M. Burt, 'Amphiphilic dextran-graft-poly(epsilon-caprolactone) films for the controlled release of paclitaxel' International Journal of Pharmaceutics 271 (2004) 167, http://www.ptca.org/articles/taxus_profileframe.html D.S. Das, G.H.R. Rao, R.F. Wilson, T. Chandy, 'Controlled delivery of taxol from poly(ethylene glycol)-coated poly(lactic acid) microspheres' Journal of Biomedical Materials Research, 55 (2001) 96 R.T. Liggins, H.M. Burt, 'Paclitaxel loaded poly(L-lactic acid) microspheres: properties of microspheres made with low molecular weight polymers' International Journal of Pharmaceutics, 222 (2001) 19. J.K. Jackson, J. Smith, K. Letchford, K.A. Babiuk, L. Machan, P. Signore, W. L. Hunter, K. Wang, H.M. Burt, 'Characterisation of perivascular poly(lactic-co-glycolic acid) films containing paclitaxel' International Journal of Pharmaceutics, 283 (2004) 97. S.K. Dordunoo, J.K. Jackson, L.A. Arsenault, A.M.C. Oktaba, W. L. Hunter, H.M. Burt, 'Taxol encapsulation in poly(epsilon-caprolactone) microspheres' Cancer chemother. Pharmacol. 36 (1995) 279].

El documento US2003/202936 divulga un proceso en que se preparan microesferas mediante la inmersión de micropartículas en una solución que contiene metanol y aminoacridina. Se retira el exceso de metanol por evaporación, pero esto da como resultado la precipitación de la aminoacridina tanto dentro como fuera de las microesferas.

Vandelli *et al.* en The Journal of Controlled Release, 96(2004), 67-84 divulgan microesferas en que precipita diclofenaco en el núcleo. El fármaco se distribuye uniformemente en cada micropartícula. La presencia de fármaco sobre o cerca de la superficie conduce a una liberación inicial rápida del fármaco, lo que a menudo es indeseable.

Según la presente invención, se proporciona un nuevo proceso para formar partículas poliméricas cargadas con fármaco que comprende las etapas de:

60

- a) poner en contacto partículas que comprenden una matriz de polímero no hidrosoluble que tiene un nivel aniónico en el intervalo de 0,1 a 10 meq g⁻¹, que forma un hidrogel en contacto con agua cuyas partículas, cuando están puras, son hinchables en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a temperatura ambiente a un contenido de agua en equilibrio en el intervalo de 40 a 99 % en peso basado en polímero más PBS, con una solución de un fármaco que tiene una solubilidad acuosa de menos de 0,1 g/l a temperatura ambiente, en un primer disolvente orgánico que es miscible con agua; con lo que se impregna la solución de fármaco en disolvente en las partículas y se selecciona el primer disolvente por ser capaz de hinchar partículas puras; en que la relación de solubilidades de fármaco a temperatura ambiente en el primer disolvente orgánico y agua está en el intervalo de 10:1 a 10⁶:1, preferiblemente (al menos) 10²:1;
- 5 b) separar la solución de fármaco que no ha impregnado las partículas de la etapa a) de las partículas impregnadas;
- c) poner en contacto las partículas impregnadas con líquido acuoso, con lo que el fármaco precipita en el núcleo de las partículas; y
- d) aclarar las partículas con fármaco precipitado en el núcleo con un segundo disolvente volátil en que las partículas son menos hinchables, respecto a su capacidad de hinchamiento en agua, y que es un disolvente del fármaco,
- 15 donde la solubilidad del fármaco en el segundo disolvente es de al menos 0,1 g/l, con lo que se retira el fármaco sobre y cerca de la superficie de las partículas con el segundo disolvente y; si se requiere, se secan las partículas. Las partículas poliméricas cargadas con fármaco pueden secarse a vacío o por liofilización o flujo de aire para retirar el segundo disolvente.
- 20 Se entiende por "partículas puras" partículas que no están impregnadas con disolvente, tal como partículas que se han secado, por ejemplo, por liofilización o secado con disolvente.

Cuando la solución de fármaco en un primer disolvente impregna las partículas, se mezcla la solución con cualquier líquido que esté ya impregnado en las partículas. Las partículas pueden hincharse o encogerse. Es importante que

25 el fármaco permanezca en solución cuando las partículas se impregnan con la solución de fármaco.

Generalmente, las partículas tienen un contenido de agua de menos del 10 % basado en el peso de matriz polimérica. Esto ayuda a asegurar que el fármaco permanece en solución cuando las partículas se impregnan.

- 30 Generalmente, las partículas se suministran al menos parcialmente hinchadas con líquido impregnante acuoso, p.ej. que tiene al menos un 40 % en peso de agua impregnada en las partículas, basado en el peso del polímero más agua. Puesto que la etapa a) requiere que el fármaco permanezca en solución cuando las partículas se impregnan, las partículas hinchadas con agua deben someterse a etapas preliminares para retirar el agua. Aunque puede usarse la evaporación para retirar el agua, es más conveniente mezclar las partículas, incluso en presencia de agua
- 35 impregnante en exceso, con un disolvente miscible con agua para hinchar las partículas y reemplazar el agua absorbida por disolvente. El agua extraída se retira de las partículas hinchadas en forma de una mezcla líquida con el disolvente. Se realiza entonces la adición de alícuotas adicionales del disolvente con retirada de las mezclas de disolvente/agua, hasta que el nivel de agua es típicamente menor del 10 % basado en el peso de la matriz polimérica. Se hace referencia a este procedimiento como prelavado de aquí en adelante. El disolvente de prelavado
- 40 es convenientemente el mismo que el primer disolvente. El nivel de agua que permanece en las partículas después del prelavado, por ejemplo, cuando se saturan con disolvente de prelavado, se calcula a partir del peso del disolvente añadido a cada etapa, el peso de agua hinchada en la matriz, el peso de disolvente y agua mezclados retirado en cada etapa y el número de etapas, suponiendo un mezclado y dilución completas de los líquidos absorbidos así como de los líquidos no absorbidos.
- 45 En la invención, el primer y segundo disolventes orgánicos volátiles se seleccionan teniendo en cuenta su capacidad de disolver el fármaco y cambiar la capacidad de carga de fármaco de las partículas poliméricas. El primer disolvente se selecciona por ser capaz de hinchar partículas puras. El disolvente volátil es principalmente con el fin de limpiar la superficie de la partícula polimérica y preferiblemente para extraer el agua restante de la etapa c). El primer y
- 50 segundo disolventes (volátiles) pueden ser el mismo o pueden ser diferentes entre sí.

Preferiblemente, el segundo disolvente (volátil) tiene un punto de ebullición de menos de 90 °C.

- Preferiblemente, el primer y/o segundo disolventes (volátiles) son aquellos que hinchan las perlas y pueden ser
- 55 miscibles con agua o inmiscibles con agua. Sin embargo, en una forma menos deseable de la invención, pueden usarse disolventes que encogen las perlas. Los disolventes útiles incluyen disolventes apróticos tales como dimetilsulfóxido (DMSO), una lactona, por ejemplo, una pirrolidona tal como 1-metil-2-pirrolidinona (NMP), dialquilformamida, por ejemplo, dimetilformamida (DMF) o un éter cíclico, por ejemplo, 1,4-dioxano ("dioxano"), pero es preferiblemente DMSO. El disolvente puede ser un disolvente prótico, tal como un alcohol.

60

Se ha encontrado que la presente invención es de utilidad para la formulación de fármacos que tienen propiedades antitumorales y baja solubilidad acuosa, con mayor solubilidad en un disolvente orgánico miscible con agua. La invención es de utilidad particular, por ejemplo, para paclitaxel y derivados que tienen una solubilidad acuosa a temperatura ambiente menor de 10 g/l, rapamicina y derivados que tienen una solubilidad acuosa a temperatura ambiente menor de 10 g/l, dexametasona y derivados que tienen una solubilidad acuosa a temperatura ambiente de menos de 10 g/l, metotrexato y algunos tecanos con solubilidad acuosa de menos de 10 g/l. Todos estos compuestos tienen una relación de solubilidad en disolvente miscible con agua a agua a temperatura ambiente de al menos 10:1, preferiblemente al menos 100:1, hasta como máximo $10^6:1$ o incluso más, por ejemplo, más de $10^3:1$.

10 Para estos compuestos, la siguiente tabla da la comparación de las solubilidades acuosa y en disolvente a temperatura ambiente. La relación es de solubilidad en disolvente:solubilidad en agua (insoluble significa menos de 10 mg/l).

Fármaco	Sol. en agua mg/l	Sol. en DMSO	Relación de Sol.
Paclitaxel	0,3-30	50	$> 1,7 \times 10^3$
Metotrexato	insol	200	$>5 \times 10^4$
Rapamicina	0,69	25	$>4 \times 10^4$
Dexametasona	insol	600	$>10^5$
Camptotecina	insol	10	$>10^3$

15 Después del prelavado, se impregnan las partículas poliméricas con solución de fármaco y tiene lugar el contacto con la solución durante suficiente tiempo para cargar las partículas en equilibrio. Preferiblemente, se hinchan las partículas en equilibrio. Como alternativa, pueden hincharse parcialmente las partículas, por ejemplo, a una concentración de disolvente de al menos un 50 % del equilibrio, más preferiblemente al menos un 75 % de la concentración de equilibrio a temperatura ambiente. El grado de hinchamiento puede monitorizarse usando un microscopio. Se alcanza el hinchamiento en equilibrio cuando no hay más aumento del tamaño medio (o volumen) de la partícula.

En la etapa de precipitación (etapa c), se pone en contacto el líquido acuoso con las partículas cargadas con disolvente durante suficiente tiempo para permitir la difusión de agua en el núcleo de las partículas y que tenga lugar la precipitación de fármaco por todas las partículas. Puesto que el fármaco es no hidrosoluble, el uso de líquido acuoso en exceso en este paso debería conducir a poca pérdida de fármaco. En lugar de ello, el fármaco se inmoviliza por precipitación en la matriz polimérica con lo que se inmoviliza.

El contacto con el líquido acuoso se lleva a cabo generalmente a una temperatura <25 °C durante un periodo de al menos alrededor de 1 minuto, preferiblemente con agitación para optimizar el contacto agua/partícula.

En la etapa de aclarado, se pone en contacto el disolvente con las partículas hinchadas durante un tiempo suficiente para crear una capa exenta de fármaco sobre la superficie de la partícula. La selección de un disolvente adecuado para esta etapa puede implicar un proceso de cribado en que se ponen en contacto partículas poliméricas hinchadas con agua, pero que no contienen fármaco, con el disolvente durante periodos variables de tiempo, observándose las partículas antes y después del contacto con disolvente. La observación puede ser por microscopio óptico, opcionalmente con medida del diámetro y forma de la partícula. Puesto que el disolvente podría deshinchar parcialmente el polímero, el tamaño de partícula después del contacto será generalmente menor. Puede observarse también que las superficies de las partículas son menos lisas, con angulosidades o arrugas.

El disolvente para la etapa de aclarado debería seleccionarse también de tal modo que el fármaco sea al menos ligeramente soluble en el disolvente. La solubilidad debería ser de al menos 1 g/l. La etapa de aclarado da como resultado la precipitación de fármaco en una capa superficial de las partículas que se están disolviendo y la retirada con disolvente de aclarado, dejando una capa superficial de polímero relativamente exenta de fármaco. Esta capa superficial depende del diámetro de partícula y es generalmente de alrededor de 1 a 100 μm de grosor, por ejemplo, aproximadamente 30 μm de grosor. El grosor de la capa superficial puede observarse disponiendo las partículas bajo microscopio óptico. El polímero es sustancialmente transparente, mientras que el fármaco precipitado en el núcleo de las partículas vuelve esta porción translúcida u opaca. Las partículas por lo tanto tienen un núcleo translúcido u opaco con un halo transparente de capa superficial que rodea el núcleo. Sin embargo, el polímero puede analizarse y mostrar que comprende un material químicamente homogéneo que se extiende desde el núcleo a la superficie externa de las partículas, difiriendo la capa superficial del material del núcleo por la ausencia de

fármaco.

Según la presente invención, se proporcionan también partículas poliméricas cargadas con fármaco que tienen una composición polimérica homogénea desde el centro a la periferia, teniendo fármaco precipitado en la región de núcleo de las mismas, teniendo dicho fármaco una solubilidad acuosa de menos de 0,1 g/l a temperatura ambiente y teniendo una capa superficial en el intervalo de 1 a 100 μm de grosor, donde la relación de concentración de fármaco en el núcleo:concentración de fármaco en la capa superficial es de al menos 2:1, preferiblemente al menos 10:1, más preferiblemente al menos 100:1.

10 Preferiblemente, el fármaco tiene una solubilidad en un disolvente seleccionado de entre dimetilsulfóxido (DMSO), 1-metil-2-pirrolidinona (NMP), dimetilformamida (DMF) y dioxano de una concentración de al menos 10^1 , preferiblemente al menos 10^2 , veces la solubilidad en agua a temperatura ambiente.

El polímero que se usa para formar las partículas debería ser un polímero relativamente hidrófilo que debe ser no hidrosoluble. Se entiende por no hidrosoluble que el polímero no se disolverá en agua, o puede hincharse por agua, pero refrenado de la disolución total por reticulaciones físicas o químicas. El polímero forma por tanto hidrogel en contacto con agua. Un hidrogel puede comprender, por ejemplo, al menos un 40 %, preferiblemente al menos un 60 %, más preferiblemente al menos un 75 %, preferiblemente al menos un 80 %, más preferiblemente más de un 90 %, y lo más preferiblemente al menos un 95 % de agua cuando las partículas se hinchan en equilibrio en PBS a temperatura ambiente. El contenido de agua en equilibrio después de hinchamiento en equilibrio puede ensayarse por procedimientos gravimétricos.

Las perlas antes de cargar con fármaco tienen un diámetro sustancialmente todas en el intervalo de 25 a 1500 μm , preferiblemente en el intervalo de 50 a 1200 μm , por ejemplo, en el intervalo de 100 a 1200 μm medido en PBS a temperatura ambiente por microscopía óptica.

En la invención, el término perla pretende cubrir partículas de todas las formas, por ejemplo, formas de varilla, cubos, formas irregulares y no uniformes. Sin embargo, la invención es del máximo beneficio cuando las partículas son esféricas, esferoides o en forma de aglomerado o en forma de disco. En las partículas no esféricas, tales como aglomerados, esferoides o discos, la dimensión máxima es preferiblemente no mayor de tres veces el diámetro mínimo, y preferiblemente menos de dos veces el diámetro mínimo, por ejemplo, alrededor de 1,5 o menos. Las limitaciones de tamaño mencionadas anteriormente se determinan ensayando una muestra de perlas hinchables en condiciones en que las perlas se hinchan en equilibrio en solución salina tamponada con fosfato a temperatura ambiente y los tamaños se miden usando un microscopio óptico.

Las composiciones se proporcionan preferiblemente con una especificación de tamaño de partícula que define la dispersión de diámetros. Preferiblemente, las perlas se gradúan en intervalos de tamaño calibrados para una embolización precisa de los vasos. Las partículas tienen preferiblemente tamaños cuando se equilibran en PBS a temperatura ambiente en el intervalo de 100 a 1500 μm , más preferiblemente en el intervalo de 100 a 1200 μm . Los intervalos calibrados pueden comprender perlas que tienen diámetros con una anchura de banda nominal de aproximadamente 100 a 300 μm . Los intervalos de tamaño nominal pueden ser, por ejemplo, de 100 a 300 μm , de 300 a 500 μm , de 500 a 700 μm , de 700 a 900 μm y de 900 a 1200 μm .

Preferiblemente, el polímero comprende grupos hidroxilo alcohólicos o derivados acilados de los mismos. En una realización, se usan polímeros que derivan de fuentes naturales, tales como albúmina, alginato, gelatina, almidón, quitosano o colágeno, todos los cuales se han usado como agentes embólicos. En una realización preferida, el polímero está sustancialmente exento de polímero de origen natural o derivados. Se forma preferiblemente polimerizando monómeros etilénicamente insaturados, incluyendo monómeros que tienen grupos hidroxialquilo o aciloxialquilo, en presencia de monómeros reticulantes difuncionales o de funcionalidad mayor. Los monómeros etilénicamente insaturados pueden incluir un monómero iónico (incluyendo dipolar).

Pueden usarse copolímeros de metacrilato de hidroxietilo, ácido acrílico y monómero reticulante tal como dimetacrilato de etilenglicol o metilénbisacrilamida, como se usan para lentes de contacto basadas en etafilcón A. Pueden usarse también copolímeros de N-acrilóil-2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol y N,N-bisacrilamida.

Otros polímeros son polímeros estirénicos reticulantes, p.ej. con sustituyentes iónicos, del tipo usado como medios de separación o como medios de intercambio iónico.

Otro tipo de polímero que puede usarse para formar la matriz no hidrosoluble hinchable en agua es polivinilalcohol reticulado usando agentes reticulantes de tipo aldehído tales como glutaraldehído. Para tales productos, el

polivinilalcohol (PVA) puede volverse iónico proporcionando grupos iónicos pendientes haciendo reaccionar un compuesto que contiene un grupo iónico funcional con los grupos hidroxilo. Son ejemplos de grupos funcionales adecuados para la reacción con los grupos hidroxilo los agentes acilantes, tales como ácidos carboxílicos o derivados de los mismos, u otros grupos ácidos que pueden formar ésteres.

5

La invención es de valor particular cuando la matriz polimérica se forma a partir de un macrómero de polivinilalcohol que tiene más de un grupo pendiente etilénicamente insaturado por molécula, mediante polimerización radicalica de los grupos etilénicos. Preferiblemente, el macrómero de PVA se copolimeriza con monómeros etilénicamente insaturados, incluyendo, por ejemplo, un monómero no iónico y/o iónico, incluyendo un monómero aniónico.

10

El macrómero de PVA puede formarse, por ejemplo, proporcionando a un polímero de PVA de un peso molecular adecuado, tal como en el intervalo de 1000 a 500.000 Da, preferiblemente de 10.000 a 100.000 Da, grupos vinílicos o acrílicos pendientes. Los grupos acrílicos pendientes pueden proporcionarse, por ejemplo, haciendo reaccionar ácido acrílico o metacrílico con PVA para formar ligamientos éster a través de algunos de los grupos hidroxilo. Se describen otros procedimientos para enlazar grupos vinílicos capaces de polimerización con polivinilalcohol, por ejemplo, en el documento US 4.978.713 y, preferiblemente, los documentos US 5.508.317 y 5.583.163. Por tanto, el macrómero preferido comprende un esqueleto de polivinilalcohol al que está ligado, a través de un ligamiento acetal cíclico, un resto de (alc)acrilaminoalquilo. El ejemplo 1 describe la síntesis de un ejemplo de tal macrómero conocido con el nombre aprobado de nelfilcón B. Preferiblemente, los macrómeros de PVA tienen aproximadamente 2 a 20 grupos etilénicos pendientes por molécula, por ejemplo, de 5 a 10.

15

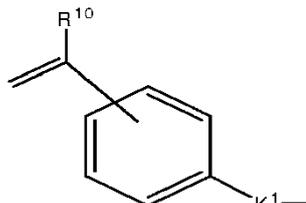
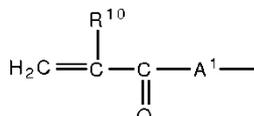
20

Cuando los macrómeros de PVA se copolimerizan con monómeros etilénicamente insaturados, incluyendo un monómero iónico, el monómero iónico tiene preferiblemente la fórmula general I

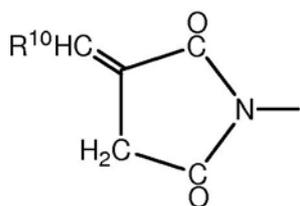
25



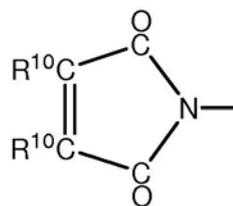
en que Y¹ se selecciona de entre



30 $CH_2=C(R^{10})-CH_2-O-$, $CH_2=C(R^{10})-CH_2-OC(O)-$, $CH_2=C(R^{10})OC(O)-$, $CH_2=C(R^{10})-O-$, $CH_2=C(R^{10})CH_2OC(O)N(R^{11})-$,
 $R^{12}OOCOR^{10}=CR^{10}C(O)-O-$, $R^{10}CH=CHC(O)O-$, $R^{10}CH=C(COOR^{12})CH_2-C(O)-O-$,



y



donde:

35

R¹⁰ es hidrógeno o un grupo alquilo C₁-C₄;

R¹¹ es hidrógeno o un grupo alquilo C₁-C₄;

R¹² es hidrógeno o un grupo alquilo o BQ¹, donde B y Q¹ son como se definen a continuación;

A¹ es -O- o -NR¹¹-;

40

K¹ es un grupo -(CH₂)_rOC(O)-, -(CH₂)_rC(O)O-, -(CH₂)_rOC(O)O-, -(CH₂)_rNR¹³-, -(CH₂)_rNR¹³C(O)-, -(CH₂)_rC(O)NR¹³-, -(CH₂)_rNR¹³C(O)O-, -(CH₂)_rOC(O)NR¹³-, -(CH₂)_rNR¹³C(O)NR¹³- (en que los grupos R¹³ son iguales o diferentes), -(CH₂)_rO-, -(CH₂)_rSO₃⁻, u, opcionalmente en combinación con B, un enlace de valencia y r es de 1 a 12 y R¹³ es hidrógeno o un grupo alquilo C₁-C₄;

45

B es una cadena alcanodiilo, oxaalquileno, alcanodiiloxaalcanodiilo o alcanodiiloligo(oxaalcanodiilo) lineal o ramificada que contiene opcionalmente uno o más átomos de flúor hasta e incluyendo cadenas perfluoradas o, si Q¹

o Y^1 contiene un átomo de carbono terminal unido a B, un enlace de valencia; y Q^1 es un grupo iónico.

Se incluye preferiblemente tal compuesto que incluye un grupo aniónico Q^1 .

5

El grupo aniónico Q^1 puede ser, por ejemplo, un grupo carboxilato, carbonato, sulfonato, sulfato, nitrato, fosfonato o fosfato. El monómero puede polimerizarse como ácido libre o en forma de sal. Preferiblemente, el pK_a del ácido conjugado es menor de 5.

- 10 Es un grupo catiónico Q^1 adecuado preferiblemente un grupo $N^+R^{14}_3$, $P^+R^{15}_3$ o $S^+R^{15}_2$ en que los grupos R^{14} son iguales o diferentes y son cada uno hidrógeno, alquilo C_{1-4} o arilo (preferiblemente fenilo) o dos de los grupos R^{14} junto con el heteroátomo al que están enlazados forman un anillo heterocíclico saturado o insaturado que contiene de 5 a 7 átomos y los grupos R^{15} son cada uno OR^{14} o R^{14} . Preferiblemente, el grupo catiónico es permanentemente catiónico, es decir cada R^{14} es distinto de hidrógeno. Preferiblemente, es un grupo catiónico $Q N^+R^{14}_3$, en que cada
- 15 R^{14} es alquilo C_{1-4} , preferiblemente metilo.

Un grupo dipolar Q^1 puede tener una carga global, por ejemplo, por tener un centro divalente de carga aniónica y un centro monovalente de carga catiónica o viceversa, o por tener dos centros de carga catiónica y un centro de carga aniónica o viceversa. Sin embargo, preferiblemente el ion dipolar no tiene carga global y lo más preferiblemente

20 tiene un centro de carga catiónica monovalente y un centro de carga aniónica monovalente.

Se divulgan ejemplos de grupos dipolares que pueden usarse como Q en la presente invención en el documento WO-A-0029481.

- 25 Cuando el monómero etilénicamente insaturado incluye un monómero dipolar, por ejemplo, este puede aumentar la hidrofilia, lubricación, biocompatibilidad y/o hemocompatibilidad de las partículas. Se describen monómeros dipolares adecuados en las publicaciones previas WO-A-9207885, WO-A-9416748, WO-A-9416749 y WO-A-9520407. Preferiblemente, es un monómero dipolar la sal interna de etilfosfato de 2-metacrililoixi-2'-trimetilamonio (MPC).
- 30 En el monómero de fórmula general I, preferiblemente Y^1 es un grupo $CH^2=CR^{10}COA^-$ en que R^{10} es H o metilo, preferiblemente metilo, y en que A^1 es preferiblemente NH. B es preferiblemente un grupo alcanodiilo de 1 a 12, preferiblemente 2 a 6 átomos de carbono. Tales monómeros son monómeros acrílicos.

Puede incluirse en el monómero etilénicamente insaturado un monómero diluyente, por ejemplo, un monómero no

35 iónico. Tal monómero puede ser útil para controlar el pK_a de los grupos ácidos, para controlar la hidrofilia o hidrofobia del producto, para proporcionar regiones hidrófobas en el polímero o simplemente para actuar como diluyente inerte. Son ejemplos de monómero diluyente no iónico, por ejemplo, (alc)acrilatos de alquilo y (alc)acrilamidas, especialmente tales compuestos que tienen grupo alquilo de 1 a 12 átomos de carbono, (alc)acrilatos de alquilo y (alc)acrilamidas de alquilo sustituidos con hidroxilo y dihidroxilo, vinilactamas, estireno y otros

40 monómeros aromáticos.

En la matriz polimérica, el nivel aniónico está preferiblemente en el intervalo de 0,1 a 10 meq g^{-1} , preferiblemente al menos 1,0 meq g^{-1} . Los aniones preferidos derivan de ácidos fuertes, tales como sulfatos, sulfonatos, fosfatos y fosfonatos.

45

Cuando se copolimeriza el macrómero de PVA con otros monómeros etilénicamente insaturados, la relación en peso de macrómero de PVA al otro monómero está preferiblemente en el intervalo de 50:1 a 1:5, más preferiblemente en el intervalo de 20:1 a 1:2. En el monómero etilénicamente insaturado, el monómero aniónico está preferiblemente presente en una cantidad en el intervalo de 10 a 100 % en moles, preferiblemente al menos 25 % en moles.

50

El polímero reticulado puede formarse como tal en forma particulada, por ejemplo, polimerizando gotitas de monómero en fase dispersada en un vehículo inmiscible continuo. Son conocidos ejemplos de polimerizaciones de agua en aceite adecuadas para producir partículas que tienen el tamaño deseado cuando se hinchan. Por ejemplo, el documento US 4.224.427 describe procesos para formar perlas esféricas uniformes (microesferas) de hasta 5 mm de diámetro dispersando monómeros hidrosolubles en una fase disolvente continua en presencia de agentes de suspensión. Pueden estar presentes estabilizantes y tensioactivos para proporcionar control sobre el tamaño de las partículas en fase dispersada. Después de la polimerización, se recuperan las microesferas reticuladas por medios conocidos y se lavan y opcionalmente se esterilizan. Preferiblemente, las partículas, p.ej. microesferas, se hinchan en un líquido acuoso y se clasifican según su tamaño.

60

En la invención, las etapas en que se ponen en contacto las partículas con líquido se realizan generalmente en presencia de líquido en exceso, por ejemplo, en un recipiente con agitación. Son procedimientos alternativos para poner en contacto las partículas con el líquido: inmersión sin agitación, inmersión con sonicación, flujo continuo y lecho fluidizado. Generalmente se separan entre sí el líquido y las partículas cargadas, por ejemplo, mediante uno o una combinación de los siguientes procedimientos: pipeteado, decantación, filtración, evaporación, intercambio de líquido, aspiración o liofilización. Si se requiere, las partículas pueden secarse al final del proceso, por ejemplo, mediante liofilización o secado con disolvente y pueden esterilizarse entonces por autoclave o irradiación gamma.

La siguiente es una breve descripción de las figuras:

- 10 la figura 1 es un diagrama de flujo que muestra las etapas de proceso para el ejemplo 1 y otros;
 la figura 2 muestra la eficacia de carga de paclitaxel frente a la carga de diana para el ejemplo 1;
 la figura 3 muestra fotos de microscopía de perlas secas y perlas rehidratadas como se describe en el ejemplo 1; la
 figura 3A muestra perlas secas con 7,2 mg de carga de paclitaxel, 3B muestra perlas rehidratadas de 3A, 3C
 15 muestra perlas secas con 23,9 mg/ml de carga de paclitaxel y 3D muestra perlas rehidratadas de 3C;
 la figura 4 muestra el perfil de elución para paclitaxel a partir del producto formado en el ejemplo 1;
 la figura 5 muestra un diagrama de flujo para el proceso de preparación usado en el ejemplo 2;
 la figura 6 muestra la eficacia de carga de rapamicina en perlas de PVA usando el procedimiento descrito en el
 ejemplo 2;
 20 las figuras 7 A a D son fotografías que muestran perlas cargadas con rapamicina usando el procedimiento del
 ejemplo 2. La figura 7A muestra perlas no cargadas de 300 a 500 μm , la figura 7B muestra muestras de 300 a 500
 μm de perlas cargadas con 5,1 mg/ml de rapamicina, la figura 7C muestra perlas de 300 a 500 μm cargadas con 8,5
 mg/ml de rapamicina y la figura 7D muestra perlas cargadas con 23,8 mg/ml de rapamicina, todo como se describe
 en el ejemplo 2;
 25 La figura 8 muestra la distribución de tamaño de perlas de rapamicina como se producen en el ejemplo 2;
 La figura 9 muestra el perfil de elución de las perlas con los tres niveles de carga del ejemplo 2;
 La figura 10 muestra ciertas micrografías de perlas cargadas con dexametasona como se describe en el ejemplo 3.

La invención se ilustra en los siguientes ejemplos:

30

Ejemplo 1

La preparación de microesferas cargadas con paclitaxel es como se describe en el documento WO2004/000548,
 ejemplo 1, producto "rico en AMPS". Brevemente, se suspende una mezcla acuosa de macrómero de polivinilalcohol
 35 que tiene grupos etilénicamente insaturados ligados por acetal y propanosulfonato de 2-acrilamido-2-metilo en una
 relación en peso de aproximadamente 1:1 en una fase continua de acetato de butilo que contiene estabilizante
 celulosa acetato butirato con agitador y se polimeriza radicalmente usando iniciación redox, formando perlas que
 se lavan, se secan y se tamizan en fracciones de tamaño que incluyen las fracciones de 300-500 μm , 500-700 μm y
 700-900 μm usadas en los ejemplos posteriores. El contenido de agua en equilibrio de las microesferas es de 94 a
 40 95 % en peso.

Se muestra esquemáticamente el procedimiento de carga en la figura 1. En primer lugar, se retiró la solución de
 envasado acuosa de 1 ml de perlas del vial y se mezclaron completamente las perlas con 1 ml de DMSO con
 agitación suave. Después de 5 minutos, se retiró la mezcla de DMSO/agua y se añadió de nuevo 1 ml de DMSO
 45 reciente. Se llevó a cabo el procedimiento tres veces, y se obtuvo finalmente una suspensión de perlas retirando
 DMSO que contenía también algo de agua retirada. El contenido de agua en este paso es menor del 10 % basado
 en el peso hinchado, suponiendo que el DMSO se equilibra en las perlas hinchadas, y basado en los volúmenes
 totales de agua inicialmente presentes como hinchados en las perlas y el DMSO añadido, teniendo en cuenta el
 volumen de disolventes mezclados retirados después de cada etapa de lavado.

50

Se disolvieron 16,4 mg de polvo de paclitaxel (Taxol®) en 1 ml de DMSO en un vial. Posteriormente, se mezcló la
 suspensión de microesferas desprovistas de agua prelavadas con la solución y se agitó suavemente durante 10
 minutos, para posibilitar que el fármaco se difunda completamente en las perlas. Después de esto, se retiró la
 solución de DMSO, se añadieron 5 ml de solución salina a las perlas y se agitó la mezcla. Se observaron
 55 precipitados de paclitaxel en solución, y las perlas azules se volvieron de color blanco debido a la precipitación del
 paclitaxel en las perlas rehidratadas a medida que cambiaba el disolvente. Después de retirar la solución y los
 precipitados de paclitaxel, se añadieron 5 ml de solución salina reciente y se repitió el procedimiento 5 veces para
 retirar los cristales de paclitaxel en solución y el DMSO residual.

60 La superficie de las perlas cargadas con paclitaxel tenía enlazados con la misma muchos cristales de fármaco

pequeños, y el dominio de paclitaxel dentro de las perlas no era físicamente estable (teniendo a recristalizar fuera de las perlas). Además, se ha reseñado que el paclitaxel no es químicamente estable en solución acuosa. Por lo tanto, las perlas cargadas con paclitaxel necesitan secarse.

- 5 Se lavó la suspensión de perlas cargadas con paclitaxel con 3 ml de acetona durante aproximadamente 1 min, y se retiró rápidamente la acetona por aspiración. Se secaron entonces las perlas bajo una corriente suave de aire comprimido en un aislador durante aproximadamente 10 minutos. Se secaron adicionalmente las perlas dejándolas en una campana de humos durante una noche.
- 10 Se analizó la carga de paclitaxel mediante el procedimiento de HPLC. Se extrajeron 4,1 mg de perlas cargadas con paclitaxel con 1 ml de DMSO bajo ultrasonificación durante 2 h y se extrajeron posteriormente con 1 ml de DMSO 5 veces. Se analizó el DMSO recogido por el sistema HPLC Waters 486 usando una columna Phenomenex Luna C18 (temperatura de columna: 40 °C); fase móvil: mezcla de metanol 63, tampón de acetato de amonio (pH 3) 33, isopropanol 4; detector de UV a 230 nm. La eficacia de carga de paclitaxel frente a la carga de diana (es decir, la
- 15 cantidad total inicial de fármaco en solución) se muestra en la figura 2.

Se valoró la capacidad de rehidratación de las perlas cargadas por microscopía óptica comparando el tamaño de las perlas cargadas antes y después de la rehidratación. El aumento de volumen de las perlas rehidratadas es aportado por la captación de agua durante el hinchamiento de perlas. En este caso, se despreció la cantidad de elución de fármaco. Las perlas secas con 7,2 mg/ml de carga de paclitaxel tenían un diámetro medio de $353 \pm 25 \mu\text{m}$. Después de rehidratación durante 12 h, las perlas hinchadas tenían un diámetro medio de $810 \pm 46 \mu\text{m}$. Para las perlas de alta carga con 23,9 mg/ml de paclitaxel, el diámetro medio de las perlas secas es de $399 \pm 20 \mu\text{m}$. El diámetro medio después de 12 h de rehidratación es de $832 \pm 45 \mu\text{m}$.

20 La figura 3 muestra fotos tomadas usando un microscopio Olympus con una cámara ColorView. Las figuras 3A y 3C son fotografías de perlas cargadas con paclitaxel secas, que muestran una morfología superficial irregular. Después de la rehidratación, las perlas se hinchan de nuevo a la forma esférica (figuras 3B y 3D).

Se mezclaron 15,8 mg de perlas cargadas con paclitaxel secas con 200 ml de tampón de PBS en un mezclador de rodillos a temperatura ambiente. Se usaron dos muestras de prueba, una cargada con 7,2 mg/ml de paclitaxel y la otra con 23,9 mg/ml de paclitaxel. A intervalos de tiempo predeterminados, se retiraron 100 ml de solución y se añadió PBS reciente. Se determinó la elución por procesamiento por HPLC como para la figura 2. Se muestra el perfil en la figura 4.

35 Ejemplo 2: Preparación de microesferas cargadas con rapamicina

En este ejemplo, las microesferas eran perlas de PVA de 300-500 μm (como se usan en el ejemplo 1). Se muestra el procedimiento de carga en la figura 5. En primer lugar, se retiró la solución de envasado acuosa de 1 ml de perlas y se mezclaron totalmente las perlas con 1 ml de DMSO por agitación suave. Después de 5 minutos, se retiró el

40 DMSO y se añadió de nuevo 1 ml de DMSO reciente. Se repitió el procedimiento tres veces, y se obtuvo finalmente una suspensión de perlas retirando el DMSO.

Se disolvió polvo de rapamicina (16,4 mg) en 1 ml de DMSO en un vial. Posteriormente, se mezclaron las microesferas desprovistas de agua prelavadas con la solución de rapamicina y se agitaron suavemente durante 10

45 minutos para posibilitar que el fármaco se difundiera completamente en las perlas. Después de esto, se retiró la solución de DMSO, se añadieron 5 ml de solución salina a las perlas y se agitó la mezcla. Se observaron precipitados de rapamicina en solución y las perlas azules se volvieron de color blanco debido a la disminución de solubilidad de la rapamicina en las perlas rehidratadas. Después de retirar la solución y los precipitados de rapamicina, se añadieron 5 ml de solución salina reciente y se repitió el procedimiento 5 veces para retirar la

50 rapamicina sólida en solución y el DMSO residual.

Se analizó la carga de rapamicina por UV a 280 nm. Se extrajeron 0,5 ml de perlas cargadas con rapamicina con 2 ml de DMSO 6 veces. Se mostraron la carga real y la eficacia de carga frente a la carga de fármaco diana en la figura 6. El análisis de UV indica que la eficacia de carga de rapamicina es de $40 \pm 3 \%$ a diferentes cargas de diana.

55 La figura 7 muestra fotos tomadas usando un microscopio Olympus con una cámara ColorView. La figura 7A es la fotografía de perlas antes de la carga de rapamicina, que muestra las microesferas transparentes. Después de la carga, las perlas ya no eran transparentes (figuras 7B, 7C, 7D), pero seguían manteniendo su forma esférica. La figura 8 muestra el histograma de la distribución de tamaño de perlas con/sin carga de rapamicina en solución salina. Demuestra que la carga de rapamicina tiene poco efecto sobre la distribución del tamaño de perlas.

60

Se mezclaron 0,5 ml de suspensión de perlas con rapamicina con diferente carga con 200 ml de tampón PBS en un mezclador de rodillos a temperatura ambiente. A intervalos de tiempo predeterminados, se retiraron 100 ml de solución y se añadió PBS reciente. La concentración de rapamicina en PBS se determina por UV a 280 nm. Se

Ejemplo 3: Preparación de microesferas cargadas con dexametasona

10 Siguiendo el procedimiento del ejemplo 2 y la figura 5, se cargó dexametasona en perlas de PVA (300-500 μm) como se usa en el ejemplo 1. En primer lugar, se retiró la solución de envasado acuosa de 1 ml de perlas y se mezclaron totalmente las perlas con 1 ml de DMSO con agitación suave. Después de 5 minutos, se retiró el DMSO y se añadió de nuevo 1 ml de DMSO reciente. Se repitió el procedimiento tres veces y se obtuvo finalmente una suspensión de perlas retirando el DMSO.

15 Se disolvió polvo de dexametasona (139,6 mg) en 1 ml de DMSO en un vial. La solubilidad de la dexametasona en DMSO a temperatura ambiente es de aproximadamente 60 g/l, y es prácticamente insoluble en agua. Posteriormente, se mezclaron las microesferas desprovistas de agua prelavadas con la solución de dexametasona y se agitaron suavemente durante 10 minutos para posibilitar que el fármaco difundiera completamente en las perlas. Después de esto, se retiró la solución de DMSO, se añadieron 5 ml de solución salina a las perlas y se agitó la

20 mezcla. Se observaron precipitados de dexametasona en solución y las perlas azules se volvieron de color blanco debido a la precipitación por disminución de la solubilidad de dexametasona en las perlas rehidratadas a medida que cambiaba el disolvente. Después de retirar la solución y los precipitados de dexametasona suspendidos, se añadieron 5 ml de solución salina reciente y se repitió el procedimiento 5 veces para despejar la dexametasona sólida en solución y el DMSO residual. Se muestran en la figura 10 fotografías de las perlas cargadas con

25 dexametasona bajo microscopio óptico. Hay una fina capa superficial sustancialmente sin fármaco. Se cree que la capa superficial del fármaco se retira en la primera etapa, en que se añade líquido acuoso (solución salina para precipitar el fármaco), puesto que en este paso hay suficiente disolvente presente en la mezcla líquida para mantener el fármaco en solución en la superficie, de modo que se retira con la solución salina y aclarados de solución salina adicionales.

30

Ejemplo 4: Carga de paclitaxel por diferentes disolventes

Se utilizaron otros disolventes miscibles con agua, incluyendo 1-metil-2-pirrolidiona, N,N-dimetilformamida y 1,4-dioxano, en lugar de DMSO para cargar paclitaxel en perlas (como se usa en el ejemplo 1). Los procedimientos eran

35 por lo demás iguales que los descritos en el ejemplo 1. Se usaron perlas (500-700 μm) en este experimento. Antes de la carga de paclitaxel, se lavaron las perlas con el disolvente orgánico seleccionado y se saturaron agotando los valores de contenido de agua por debajo del 15 %. Para cada disolvente, se consigue la dilución adecuada con tres etapas de lavado. Se encontró que la 1-metil-2-pirrolidiona hacía hinchar las perlas; N,N-dimetilformamida y dioxano disminuían el tamaño de las perlas cuando se hinchaban en equilibrio en PBS a temperatura ambiente. Se

40 mezcló 1 ml de disolvente orgánico con polvo de paclitaxel disuelto a la concentración mostrada en la tabla siguiente con las perlas anteriores y se dejó durante 15 a 30 minutos. Después de precipitación con solución salina, lavado y aclarado entonces con acetona, se secaron las perlas bajo una corriente suave de aire comprimido y entonces en campana de humos. Se extrajo el paclitaxel cargado con DMSO y se analizó por HPLC. Se enumeraron los resultados en la tabla siguiente.

45

Concentraciones en solución de paclitaxel y eficiencia de carga en perlas con disolventes orgánicos

Disolvente	Conc. en solución g/l	Eficiencia de carga
1-metil-2-pirrolidiona	28,4	10,1 %
N, N-dimetilformamida	43,9	6,4 %
1,4-dioxano	31,1	0,8 %

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para formar partículas poliméricas cargadas con fármaco que comprende las etapas de:
- 5 a) poner en contacto partículas que comprenden una matriz de polímero no hidrosoluble que tiene un nivel aniónico en el intervalo de 0,1 a 10 meq g⁻¹, que forma un hidrogel en contacto con agua cuyas partículas, cuando están puras, son hinchables en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a temperatura ambiente a un contenido de agua en equilibrio en el intervalo de 40 a 99 % en peso basado en polímero más PBS, con una solución de un fármaco que tiene una solubilidad acuosa de menos de 0,1 g/l a temperatura ambiente, en un primer disolvente orgánico que es miscible con agua; con lo que se impregna la solución de fármaco en disolvente en las partículas y se selecciona el primer disolvente por ser capaz de hinchar partículas puras; en que la relación de solubilidades de fármaco a temperatura ambiente en el primer disolvente orgánico y agua está en el intervalo de 10:1 a 10⁶:1, preferiblemente (al menos) 10²:1;
- 10 b) separar la solución de fármaco que no ha impregnado las partículas de la etapa a) de las partículas impregnadas;
- 15 c) poner en contacto las partículas impregnadas con líquido acuoso, con lo que el fármaco precipita en el núcleo de las partículas; y
- d) aclarar las partículas con fármaco precipitado en el núcleo con un segundo disolvente volátil en que las partículas son menos hinchables, respecto a su capacidad de hinchamiento en agua, y que es un disolvente del fármaco, donde la solubilidad del fármaco en el segundo disolvente es de al menos 0,1 g/l, con lo que se retira el fármaco sobre y cerca de la superficie de las partículas con el segundo disolvente.
- 20
2. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además secar las partículas al final del proceso.
- 25 3. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, que incluye adicionalmente la etapa e), secar las partículas poliméricas cargadas con fármaco al vacío, o liofilización o flujo de aire para retirar el segundo disolvente.
4. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, donde las partículas se hinchan cuando la solución de fármaco impregna las partículas.
- 30 5. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 4, donde las partículas se hinchan en equilibrio cuando la solución de fármaco impregna las partículas.
6. Un proceso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en que el primer y segundo disolventes son el mismo.
- 35 7. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en que el primer y segundo disolventes son diferentes entre sí.
- 40 8. Un proceso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en que el primer y segundo disolventes son miscibles con agua.
9. Un proceso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, donde el segundo disolvente tiene un punto de ebullición de menos de 90 °C.
- 45 10. Un proceso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en que el fármaco se selecciona de análogos de rapamicina, ésteres y sales de la misma que tienen una solubilidad acuosa de menos de 0,1 g/l; de paclitaxel, análogos y ésteres del mismo que tienen una solubilidad acuosa de menos de 0,1 g/l; dexametasona e ibuprofeno.
- 50 11. Un proceso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en que el primer disolvente es un disolvente aprótico, preferiblemente seleccionado de entre dimetilsulfóxido (DMSO), 1-metil-2-pirrolidiona (NMP), dimetilformamida (DMF) y dioxano.
- 55 12. Un proceso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en que la matriz polimérica está formada por polivinilalcohol reticulado.
13. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 12, donde el polivinilalcohol se reticula usando agentes reticulantes de tipo aldehído tales como glutaraldehído.
- 60

14. Un proceso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en que la matriz polimérica está formada por un macrómero de polivinilalcohol que tiene más de un grupo pendiente etilénicamente insaturado por molécula, mediante polimerización radicalica de los grupos etilénicos.
- 5 15. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 14, en que el macrómero copolimeriza con monómeros etilénicamente insaturados, incluyendo, por ejemplo, un monómero no iónico y/o iónico, incluyendo un monómero aniónico.
- 10 16. Un proceso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en que las partículas usadas en la etapa a) tienen un tamaño medio de partícula en el intervalo de 50 a 1500 μm , preferiblemente en el intervalo de 100 a 1200 μm , cuando se hinchan completamente con PBS a temperatura ambiente.

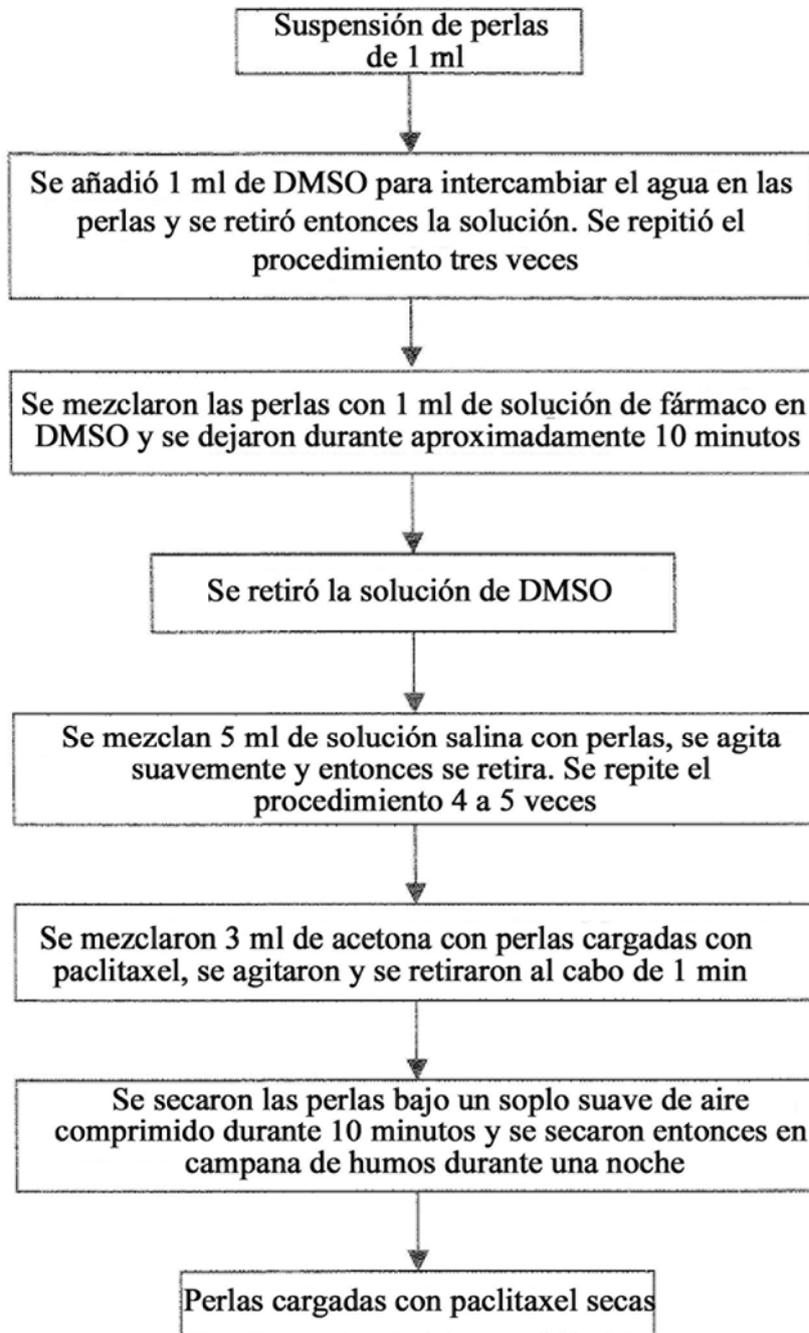


Figura 1

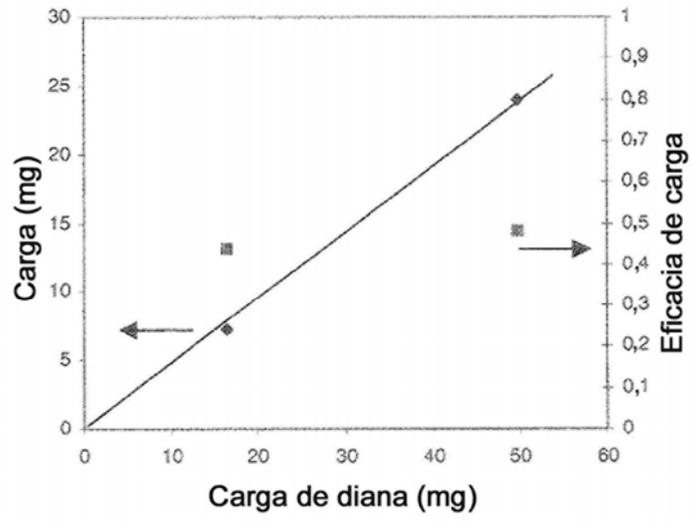


Figura 2

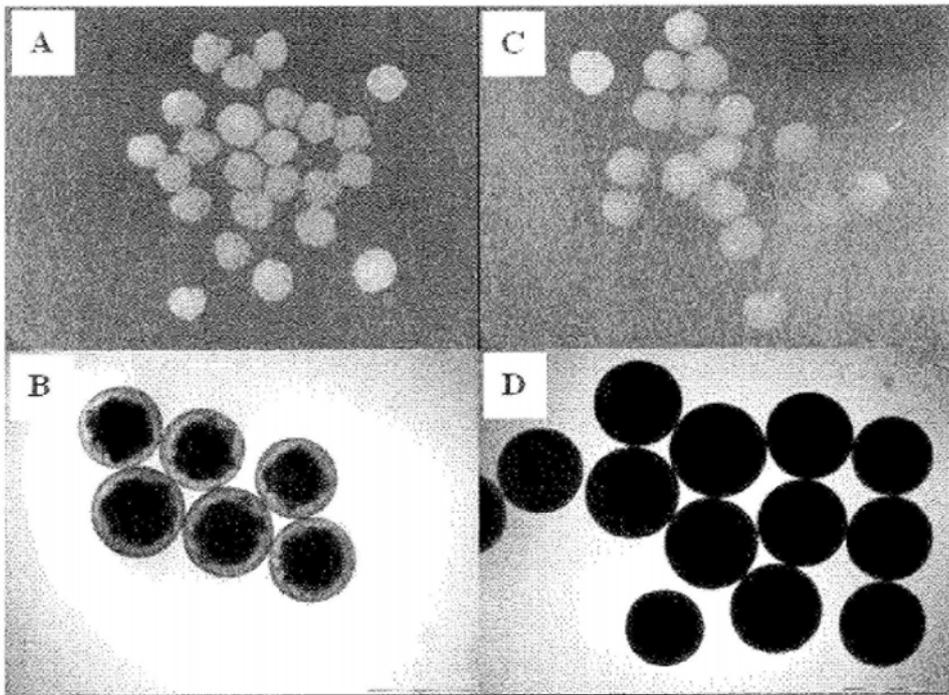


Figura 3

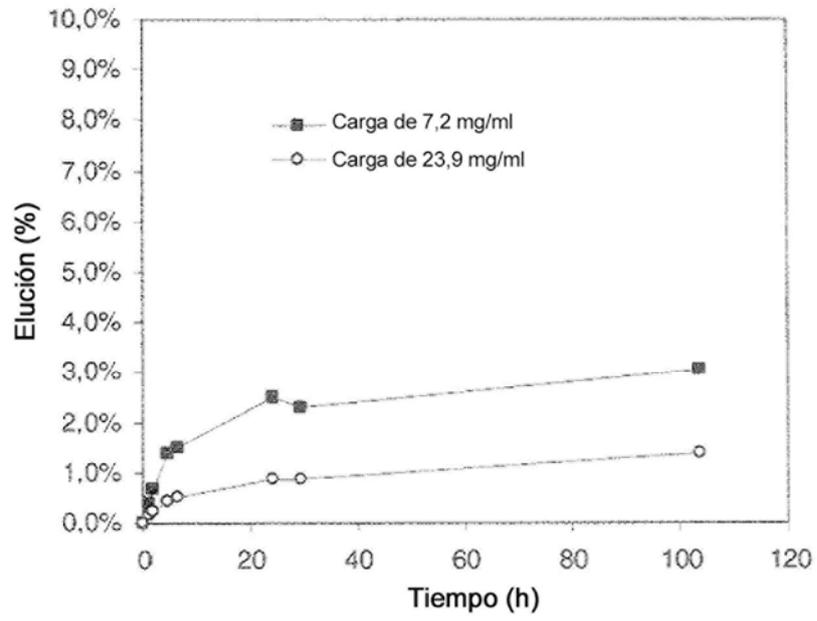


Figura 4

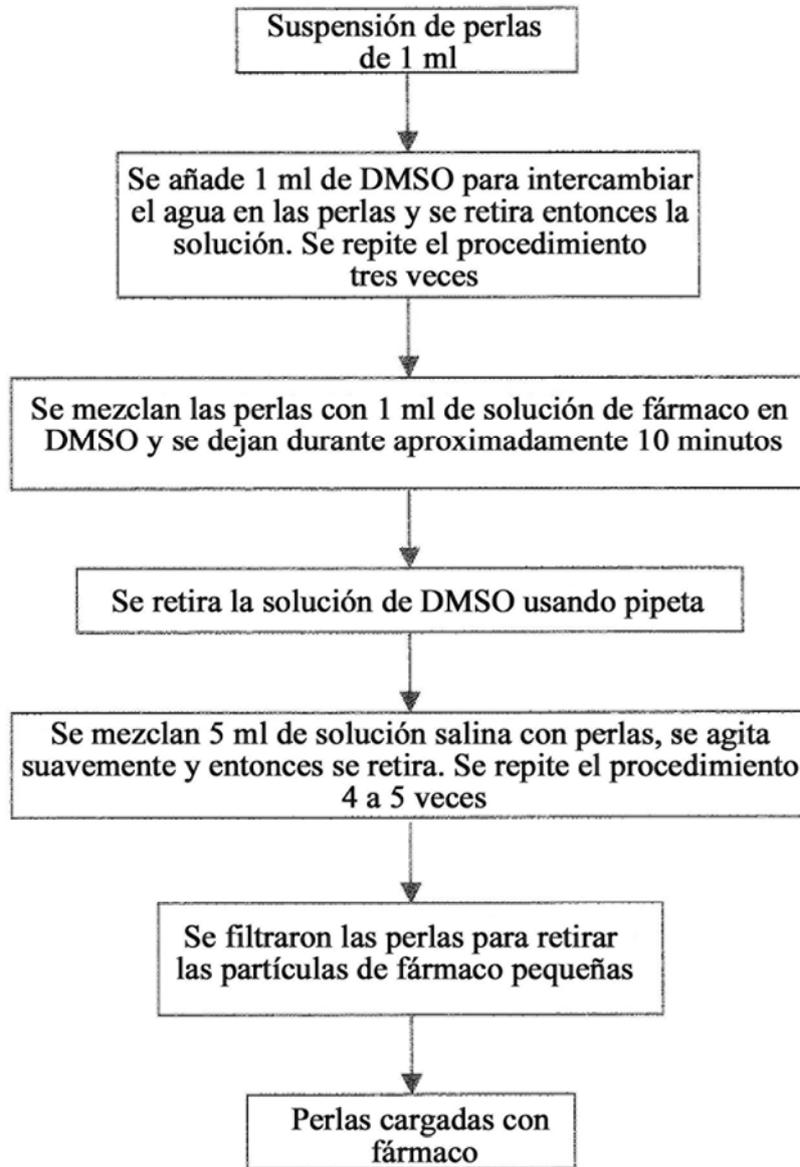


Figura 5

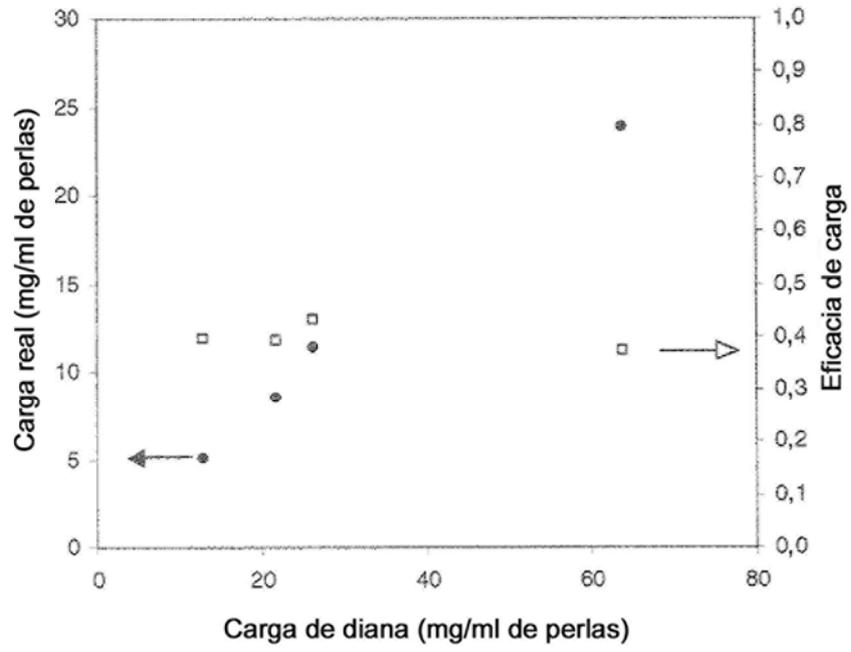


Figura 6

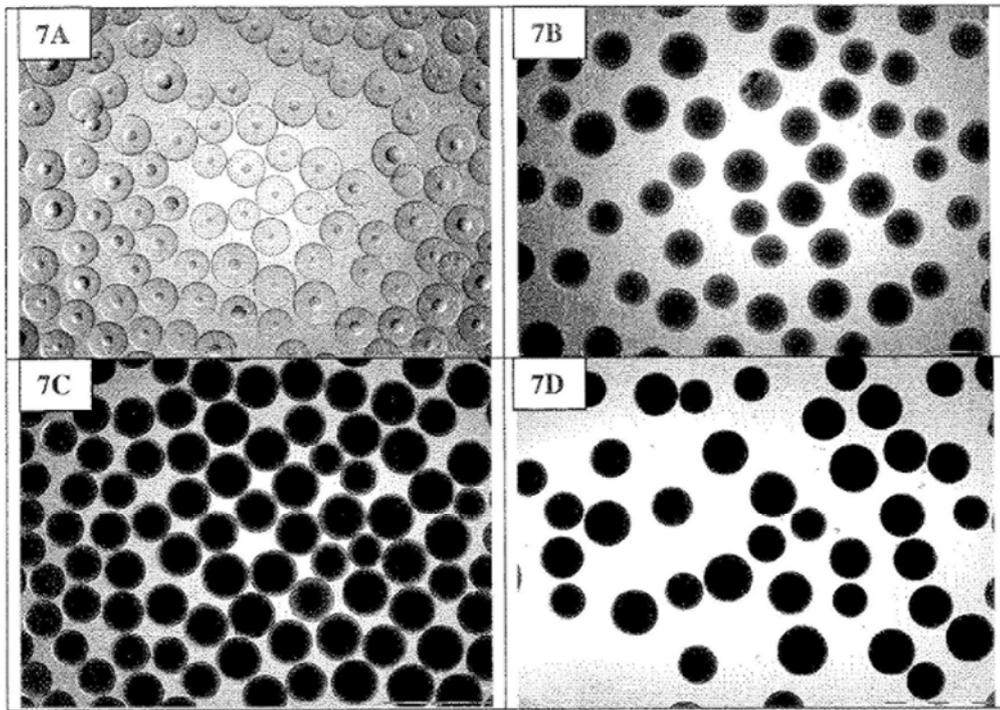


Figura 7

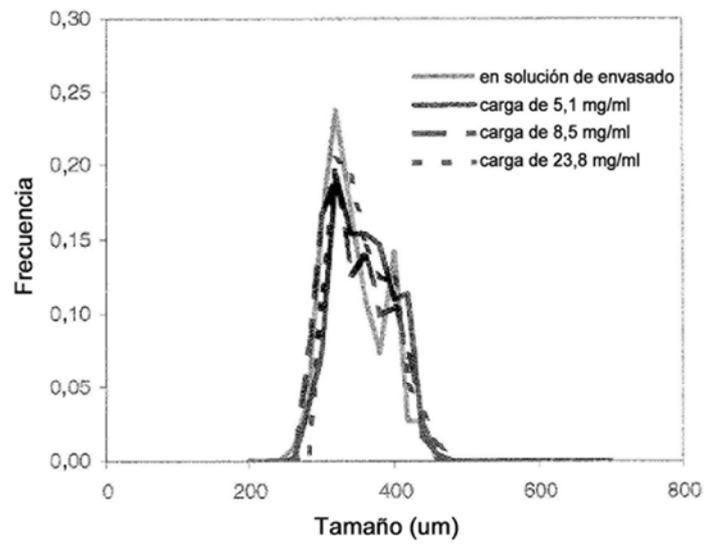


Figura 8

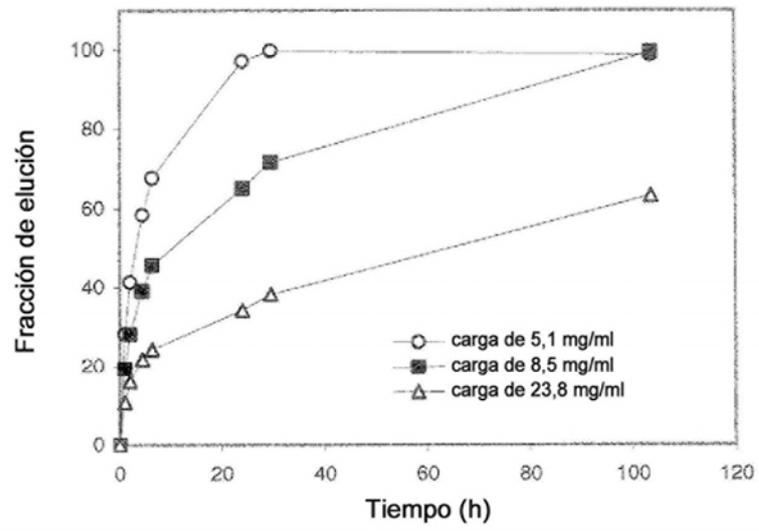


Figura 9

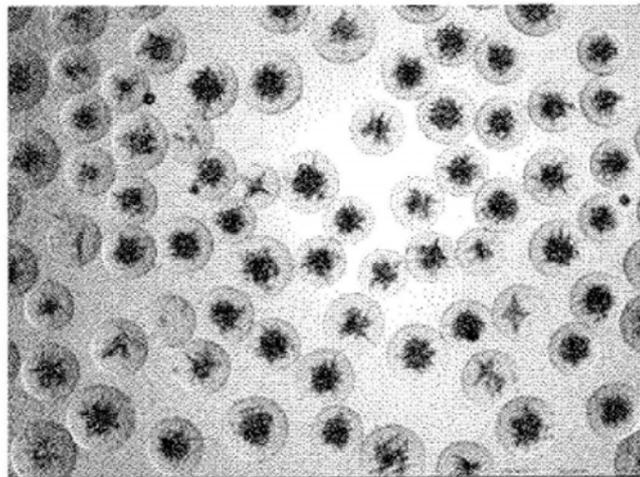


Figura 10