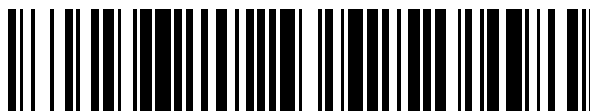


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 689 674**

51 Int. Cl.:

A61K 9/50	(2006.01)
A61K 9/10	(2006.01)
A61K 38/22	(2006.01)
A61K 38/26	(2006.01)
A61K 47/26	(2006.01)
A61K 47/38	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2005 E 14186917 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.07.2018 EP 2821063**

54 Título: **Microcápsulas de liberación sostenida basadas en poli(lactida-co-glicólido) que comprenden un polipéptido y un azúcar**

30 Prioridad:

15.04.2004 US 563245 P
13.04.2005 US 104877

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.11.2018

73 Titular/es:

AMYLIN PHARMACEUTICALS, LLC (50.0%)
9360 Towne Centre Drive
San Diego, CA 92121, US y
ALKERMES PHARMA IRELAND LIMITED (50.0%)

72 Inventor/es:

FINEMAN, MARK;
LOKENS GARD, DAVID;
CONSTANTINO, HENRY;
WRIGHT, STEVEN;
ONG, JOHN;
YEOH, THEAN;
KUMAR, RAJESH;
RICKEY, MICHAEL;
SMITH, CHRISTINE;
HOTZ, JOYCE y
CHRISTENSON, TROY

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 689 674 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

Microcápsulas de liberación sostenida basadas en poli(lactida-co-glicólido) que comprenden un polipéptido y un azúcar

5 Antecedentes de la invención

10 Numerosas proteínas y péptidos, denominados de forma colectiva en el presente documento polipéptidos, muestran actividad biológica *in vivo* y son útiles como medicamentos. Muchas enfermedades o afecciones requieren la administración de un nivel sostenido de medicamento para proporcionar los efectos profilácticos y/o terapéuticos más eficaces. Se consiguen con frecuencia niveles sostenidos mediante la administración de polipéptidos biológicamente activos por inyecciones subcutáneas frecuentes, lo que con frecuencia da como resultado niveles fluctuantes de medicamento y escasa observancia por parte del paciente.

15 Como alternativa, el uso de materiales biodegradables, tales como polímeros, que encapsulan el medicamento puede emplearse como un sistema de suministro sostenido. El uso de polímeros biodegradables, por ejemplo, en forma de micropartículas o microvehículos, puede proporcionar una liberación sostenida del medicamento, utilizando la biodegradabilidad inherente del polímero para controlar la liberación del medicamento proporcionando de este modo un nivel sostenido, más uniforme, de medicamento y mejora de la observancia por parte del paciente.

20 Sin embargo, estos dispositivos de liberación sostenida pueden mostrar con frecuencia altas explosiones de medicamento iniciales y mínima liberación a continuación, lo que da como resultado niveles de fármaco en suero fuera de la ventana terapéutica y/o escasa biodisponibilidad del medicamento. Además, la presencia de polímero, temperaturas fisiológicas y respuesta corporal a la composición de liberación sostenida puede provocar que el medicamento se altere (por ejemplo, se degrade, se agregue) interfiriendo de este modo con el perfil de liberación deseado para el medicamento.

25 Además, los métodos usados para formar composiciones de liberación sostenida pueden dar como resultado pérdida de actividad del medicamento debida a la inestabilidad del medicamento y los efectos degradantes de las etapas de procesamiento. Los efectos degradantes son particularmente problemáticos cuando el medicamento es un polipéptido.

30 Por lo tanto, existe la necesidad de un medio de administración de polipéptidos biológicamente activos de una manera sostenida en donde la cantidad de polipéptido suministrado es a niveles terapéuticos y conserva la actividad y potencia durante el periodo deseado de liberación. Aunque se ha desarrollado mucho trabajo que aborda estos problemas, se requieren soluciones novedosas.

Sumario de la invención

40 La presente invención proporciona un proceso para preparar una composición farmacéuticamente aceptable en forma de micropartículas para la liberación sostenida de exendina-4, que comprende:

45 a) formar una mezcla combinando una fase acuosa que comprende polipéptido de exendina-4 hidrosoluble y sacarosa, con una fase oleosa que comprende un polímero biocompatible y un disolvente para el polímero biocompatible;

b) formar una emulsión de agua en aceite de la mezcla de la etapa a), en donde el tamaño de las gotas de la emulsión interna es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1,2 micrómetros;

50 c) añadir un agente de coacervación a la mezcla para formar micropartículas embrionarias, en donde el agente de coacervación es aceite de silicona añadido en una cantidad suficiente para conseguir una relación de aceite de silicona con respecto a disolvente polimérico de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1,5:1;

55 d) transferir las micropartículas embrionarias a un disolvente inactivador para endurecer las micropartículas embrionarias para formar micropartículas endurecidas;

e) recoger las micropartículas endurecidas; y

60 f) secar las micropartículas endurecidas,

en donde la composición tiene una relación $C_{m\acute{a}x}$ con respecto a C_{pro} de aproximadamente 3 o menos, y el volumen total de los poros de la composición es de aproximadamente 0,1 ml/g o menos; y

en donde la composición está exenta de tampón, sales de precipitación y excipientes adicionales que aumenten o reduzcan la velocidad de liberación del polipéptido biológicamente activo de la composición.

65 Se exponen elementos preferidos de la invención en las reivindicaciones dependientes del presente documento.

La invención se refiere al descubrimiento de que pueden conseguirse perfiles de liberación superiores (tales como los caracterizados por una relación de $C_{\text{máx}}$ con respecto a C_{pro} de aproximadamente 3 o menos) con una formulación que contiene pocos componentes controlando la relación de agente de coacervación con respecto a disolvente polimérico, tal como relación de aceite de silicona con respecto a disolvente polimérico, en el proceso de fabricación, consiguiendo de este modo un volumen de poros bajo. Además se ha descubierto que este perfil de liberación deseado superior puede conseguirse controlando el proceso de coacervación, tal como la duración de la adición de agente de coacervación tal como aceite de silicona, la duración del periodo de reposo después de la adición y la duración de la transferencia a un agente inactivador. También se ha descubierto que pueden conseguirse composiciones de liberación sostenida de bajo volumen de poros superiores, tales como micropartículas, controlando el tamaño de las gotas de la emulsión interna. Además, se ha descubierto que el control del tamaño de partícula y la distribución del tamaño de partícula proporciona además y contribuye a perfiles de liberación deseados superiores (tales como los caracterizados por una relación de $C_{\text{máx}}$ con respecto a C_{pro} de aproximadamente 3 o menos) y un perfil de lote a lote más uniforme.

Se desvelan en el presente documento composiciones para la liberación sostenida de agentes, tales como polipéptidos biológicamente activos, y métodos para formar y usar dichas composiciones, para la liberación sostenida de polipéptidos biológicamente activos. Las composiciones de liberación sostenida desveladas en el presente documento comprenden un polímero biocompatible, un agente, tal como un polipéptido biológicamente activo, y un azúcar. El polipéptido y azúcar preferentemente se dispersan en el polímero. El polipéptido y azúcar pueden dispersarse por separado o, preferentemente, conjuntamente. La composición de liberación sostenida proporciona un perfil de liberación deseable y uniforme. El perfil puede caracterizarse por tener una relación de $C_{\text{máx}}$ con respecto a C_{pro} de aproximadamente 3 o menos. El polipéptido biológicamente activo puede ser un polipéptido antidiabético o glucorregulador, tal como GLP-1, GLP-2, exendina-3, exendina-4 o un análogo, derivado o agonista del mismo, preferentemente, exendina-4. El azúcar es preferentemente sacarosa, manitol o una combinación de los mismos. Una combinación preferida incluye exendina-4 y sacarosa y/o manitol.

Además, o como alternativa, la composición de liberación sostenida comprende un polímero biocompatible, un agente, tal como un polipéptido biológicamente activo, y un azúcar en donde la composición tiene un volumen total de los poros de aproximadamente 0,1 ml/g o menos. En una realización específica, el volumen total de los poros se determina usando porosimetría de intrusión de mercurio.

Además, o como alternativa, la composición de liberación sostenida consiste esencialmente en, o como alternativa consiste en, un polímero biocompatible, exendina-4 a una concentración de aproximadamente 3 % p/p y sacarosa a una concentración de aproximadamente 2 % p/p. El polímero biocompatible es preferentemente un polímero de polilactida coglicólido.

En una realización particular del método de la presente invención, el aceite de silicona se añade en una cantidad suficiente para conseguir una relación de aceite de silicona con respecto a disolvente polimérico de aproximadamente 1,5:1. Además, o como alternativa, el polímero está presente en la fase oleosa a aproximadamente 10 % p/v o menos.

El agente o polipéptido, por ejemplo, exendina-4, puede estar presente en la composición en una cantidad descrita en el presente documento de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 10 % p/p basándose en el peso total de la composición final. Además, el azúcar, por ejemplo sacarosa, puede estar presente en una concentración de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 5 % p/p del peso final de la composición.

La composición desvelada en el presente documento puede administrarse a un ser humano, u otro animal, mediante inyección, implantación (por ejemplo, por vía subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intracraneal e intradérmica), administración a membranas mucosas (por ejemplo, por vía intranasal, intravaginal, intrapulmonar o mediante un supositorio) o suministro *in situ* (por ejemplo, mediante enema o pulverización de aerosol).

Cuando la composición de liberación sostenida tiene incorporada en la misma una hormona, particularmente un péptido antidiabético o glucorregulador, por ejemplo, GLP-1, GLP-2, exendina-3, exendina-4 o agonistas, análogos o derivados de los mismos, la composición se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz para tratar a un paciente que padece diabetes mellitus, tolerancia alterada a la glucosa (IAG), obesidad, trastorno cardiovascular (CV) o cualquier otro trastorno que pueda tratarse mediante uno de los polipéptidos anteriores o derivados, análogos o agonistas de los mismos.

El uso de un azúcar en las composiciones de liberación sostenida desveladas en el presente documento mejora la biodisponibilidad del polipéptido biológicamente activo incorporado, por ejemplo, péptidos antidiabéticos o glucorreguladores, y minimiza la pérdida de actividad debida a inestabilidad y/o interacciones químicas entre el polipéptido y otros componentes contenidos o usados en la formulación de la composición de liberación sostenida, manteniendo al mismo tiempo un perfil de liberación excelente.

La composición puede contener el agente activo exendina-4 a aproximadamente 5 %, sacarosa a aproximadamente 2 % y biopolímero. La composición puede contener el agente activo exendina-4 a aproximadamente 3%, sacarosa a

aproximadamente 2 % y biopolímero. La composición puede contener un polímero de PLGA. La composición puede contener un polímero de PLG 4A, que comprende una relación de aproximadamente 50 por ciento molar de DL lactida con respecto a 50 por ciento molar de glicólido, con un grupo de extremo de ácido carboxílico libre sin recubrimiento (designación "4A"). La composición puede formarse como una micropartícula que tiene un tamaño de partícula, distribución de tamaño de partícula y volumen total de los poros como se describe en el presente documento. El volumen total de los poros puede ser menor de aproximadamente 0,1 ml/g, el tamaño de partícula medio DV_{50} puede ser de aproximadamente 50 micrómetros con una distribución de un límite inferior DV_{10} de aproximadamente 30 micrómetros y un límite superior DV_{90} de aproximadamente 90 micrómetros. Las micropartículas pueden formarse, obtenerse mediante o ser obtenibles por los procesos descritos en el presente documento. El proceso es un proceso de agua/aceite/aceite ("Ag/Ac/Ac") en donde el tamaño de la emulsión interna es como se describe en el presente documento. El proceso incluye un coacervado de aceite de silicona, que puede estar a una relación de aproximadamente 1,5 a 1 con el disolvente polimérico. Adicionalmente el proceso puede incluir controlar la etapa de coacervación como se describe en el presente documento, e incluso adicionalmente cuando se produce una transferencia de coacervado a la emulsión interna aproximadamente a los 3 minutos o menos, una etapa de mantenimiento de aproximadamente 1 minuto o menos y una etapa de transferencia rápida durante un periodo de menos de aproximadamente 3 minutos a un disolvente de inactivación/endurecimiento. En una realización adicional el disolvente es un disolvente doble, preferentemente una mezcla de heptano/etanol.

Las ventajas de las formulaciones de liberación sostenida como se describe en el presente documento incluyen mayor observancia y aceptación por parte del paciente eliminando la necesidad de administración repetitiva, aumento del beneficio terapéutico eliminando fluctuaciones de la concentración de agente activo en niveles sanguíneos proporcionando un perfil de liberación deseable y una reducción potencial de la cantidad total de polipéptido biológicamente activo necesario para proporcionar un beneficio terapéutico reduciendo estas fluctuaciones.

Una composición inyectable adecuada para pase a través de una aguja de calibre 18-23, más preferentemente una aguja de calibre 25, comprende una composición de liberación sostenida que comprende un polímero DL PLG 4A 50:50, exendina-4 de aproximadamente 3 a 5 % (p/p) que tiene una sustitución de amino de metionina por leucina en la posición 14 y sacarosa aproximadamente 2 % (p/p), en donde la relación de $C_{m\acute{a}x}$ con respecto a C_{pro} es de aproximadamente 3 o menos y el volumen total de los poros de la composición es de aproximadamente 0,1 ml/g o menos, suspendida en un vehículo de inyección que comprende carboximetilcelulosa sódica a 3,0 % (p/v), cloruro sódico a 0,9 % (p/v) y polisorbato 20, NF (Tween 20) a 0,1% (v/v) en agua.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es un gráfico que muestra la relación entre el diámetro de poro promedio y la liberación *in vitro* para composiciones de liberación sostenida descritas en el presente documento (S.A. = sulfato de amonio).

La FIG. 2 es un gráfico que muestra el efecto de la porosidad en la liberación *in vitro* de exendina-4 de micropartículas y la influencia que las condiciones de procesamiento, concretamente la relación de aceite de silicona con respecto a cloruro de metileno, tiene en la porosidad de las micropartículas formadas.

Las FIGS. 3A-3B son exploraciones de MEB criogénicas para formulaciones de micropartículas seleccionadas descritas en el presente documento.

Las FIGS. 4A-4D son exploraciones de MEB criogénicas para formulaciones de micropartículas seleccionadas descritas en el presente documento.

La FIG. 5 es una representación del % de etanol y cloruro de metileno residual frente a T_g para formulaciones de micropartículas descritas en el presente documento.

La FIG. 6 es una curva farmacocinética representativa (concentración, pg/ml frente a tiempo, días con inserción que muestra concentraciones durante el primer día) para la Formulación 2-1 (exendina-4 3 % y sacarosa 2 %), Formulación 1 (exendina-4 3 % solamente) y Formulación 4 (exendina-4 3 % y sulfato de amonio 0,5 %).

La FIG. 7 es un gráfico de perfil de liberación *in vivo* para las tres Formulaciones de micropartículas 2, 2-1 y 2-2.

La FIG. 8 es un gráfico de los datos farmacocinéticos para Formulaciones de micropartículas 5-1, 5-2 y 5-3.

La FIG. 9 es un gráfico que ilustra la relación entre parámetros de procesos y el tamaño de la emulsión interna conseguida por el proceso.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere un proceso para preparar una composición farmacéuticamente aceptable en forma de micropartículas para la liberación sostenida de exendina-4.

Se exponen en los ejemplos de trabajo procedimientos detallados para algunos métodos de formación de micropartículas. El proceso de la invención se denomina en general en el presente documento un proceso de agua-aceite-aceite (Ag/Ac/Ac).

El polímero puede estar presente en la fase oleosa en una concentración que varía de aproximadamente 3 % p/p a aproximadamente 25 % p/p, preferentemente, de aproximadamente 4 % p/p a aproximadamente 15 % p/p, tal como

de aproximadamente 5 % p/p a aproximadamente 10 % p/p. Se obtuvieron excelentes resultados en el presente documento usando una concentración del 6 % p/p de PLG en la fase oleosa.

5 El polímero se combina en general con un disolvente polimérico. Cuando el polímero es un PLG, tal como los preferidos en el presente documento, el polímero se añade a un disolvente para PLG. Dichos disolventes son bien conocidos en la materia. Un disolvente preferido es cloruro de metileno.

10 Se añaden exendina-4 y sacarosa en la fase acuosa, preferentemente en la misma fase acuosa. La concentración de exendina-4 es preferentemente de 10 a 100 mg/g, preferentemente entre 50 y 100 mg/g. La concentración de sacarosa es preferentemente de 10 a 50 mg/g y de 30 a 50 mg/g.

15 Después las dos fases se mezclan para formar una emulsión. El tamaño de las gotas de la emulsión interna es de aproximadamente 0,1 a 1,2 micrómetros e incluso más puede ser de aproximadamente 0,1 a 1,0 micrómetros y aún más puede ser de aproximadamente 0,2 a 0,4 micrómetros. El límite inferior se determina en gran parte por el deseo de minimizar la degradación polimérica, tal como mediante corte, o degradación de agente tal como mediante calor generado durante la formación de emulsión. Por consiguiente, en una realización los métodos para formar una emulsión, por ejemplo por homogeneización, por alto corte o por ultrasonidos, se aplican de forma intermitente y/o durante periodos relativamente cortos de modo que por ejemplo el calor que se forma en la emulsión se minimice y/o se permita que se disipe. Por ejemplo puede realizarse homogeneización mediante pases discretos de emulsión a 20 granel. Pueden usarse baños de ultrasonidos y homogeneizadores para formar dicha emulsión.

25 Un agente de coacervación como se usa en el presente documento se refiere a cualquier aceite en el que la solución polimérica (polímero y disolvente) no se solubiliza fácilmente en y por lo tanto forma una fase definida con la solución polimérica. El agente de coacervación es aceite de silicona y se añade en una cantidad suficiente para conseguir una relación de aceite de silicona con respecto a disolvente polimérico de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1,5:1. En una realización preferida, la relación de aceite de silicona con respecto a polímero es de aproximadamente 1,5:1.

30 En una realización una etapa de coacervación incluye un periodo de aproximadamente 1 a 5 minutos de adición (o transferencia) de agente de coacervación a emulsión, o viceversa, de emulsión a agente de coacervación, además esa etapa de adición o transferencia puede ser de aproximadamente 2 a 4 minutos, y aún más es de aproximadamente 3 minutos. En otra realización la etapa de adición o transferencia es menor de o igual a aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3 o aproximadamente 3,5 minutos. En otra realización más el volumen de agente de coacervación con respecto a volumen de disolvente polimérico es como se describe en el presente documento, por ejemplo de aproximadamente 1,5 a 1 (por ejemplo aceite de silicona con respecto a 35 cloruro de metileno). En una realización adicional más una emulsión interna puede tener un tamaño de las gotas de menos de aproximadamente 1 micrómetro y aún más puede ser un tamaño como se describe en el presente documento. La exendina-4 puede estar a concentraciones de carga como se describe en el presente documento. En una realización adicional más el polímero es PLGA como se describe en el presente documento, preferentemente 40 una forma de lactida con respecto glicólido aproximadamente 50:50. En una realización una o ambas de la solución polimérica o la solución acuosa que comprenden la emulsión antes de coacervación pueden contener excipientes según pueda desearse.

45 La etapa de coacervación puede incluir además un periodo de mantenimiento, donde la mezcla de agente de coacervación y emulsión se mantiene durante un periodo de tiempo corto, por ejemplo, de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 5 minutos antes de la etapa de endurecimiento. Además el periodo de mantenimiento puede ser de aproximadamente 30 a 90 segundos, y aún más puede ser de aproximadamente 1 minuto. Además en otras realizaciones el periodo de mantenimiento, que puede ser opcional, puede ser de menos de 1 minuto y además puede ser de menos de 30 segundos. En una realización adicional, la mezcla de coacervación puede tratarse para 50 prevenir o minimizar la separación de los componentes de agua/aceite/aceite. Dicho tratamiento puede ser por cualquier medio, incluyendo, por ejemplo, remover, homogeneizar, agitar, someter a ultrasonidos, mezclar, sacudir y presurizar. Las condiciones se eligen para minimizar la degradación de los componentes de la composición, incluyendo destrucción de la composición de polímero embrionario/agente, bien sea una micropartícula u otra forma.

55 La etapa de coacervación incluye además la transferencia de la mezcla de coacervación con una solución de inactivación o endurecimiento. El medio de inactivación puede comprender un polímero no disolvente. Los polímeros no disolventes son en general bien conocidos en la materia. Un medio de inactivación particularmente preferido comprende una mezcla de disolvente de un disolvente de endurecimiento y un disolvente de lavado, por ejemplo sistema de disolvente de heptano/etanol, por ejemplo, como se describe en la Patente de los Estados Unidos N.º 60 6.824.822. Esta etapa de transferencia puede realizarse inmediatamente, tan rápido como sea posible, y en realizaciones adicionales puede ser de menos de 0,5, 1, 2, 3 o 4 minutos.

65 El fármaco sólido también puede encapsularse usando una versión modificada del proceso descrito anteriormente. Este proceso modificado puede denominarse sólido/aceite/aceite (S/Ac/Ac).

Por ejemplo, se suspendió exendina-4 sólida en cloruro de metileno que contenía PLG 6 % y se sometió a ultrasonidos durante aproximadamente cuatro minutos en hielo. Se realizó un procesamiento posterior de una manera análoga al método de (Ag/Ac/Ac).

5 En una realización la composición contiene el agente activo exendina-4 a aproximadamente 5 %, sacarosa a aproximadamente 2 % y biopolímero. En otra realización la composición puede contener el agente activo exendina-4 a aproximadamente 3 %, sacarosa a aproximadamente 2 % y biopolímero. En una de dichas realizaciones adicionales la composición contiene un polímero PLGA. En una realización adicional más la composición contiene un polímero PLG 4A, que comprende una relación de aproximadamente 50 por ciento molar de DL lactida con respecto a 50 por ciento molar de glicólido, con un grupo de extremo de ácido carboxílico libre sin recubrimiento (designación "4A"). En una realización adicional más la composición se forma como una micropartícula que tiene un tamaño de partícula, distribución de tamaño de partícula y volumen total de los poros como se describe en el presente documento. En una realización adicional más el volumen total de los poros es menor de aproximadamente 0,1 ml/g, el tamaño de partícula medio puede ser de aproximadamente 50 micrómetros con una distribución de un límite inferior de aproximadamente 30 micrómetros y un límite superior de aproximadamente 90 micrómetros. En aún otra realización, las micropartículas se forman, se obtienen mediante o son obtenibles por los procesos descritos en el presente documento. En una de dichas realizaciones el proceso es un proceso de agua/aceite/aceite ("Ag/Ac/Ac") en donde el tamaño de la emulsión interna es como se describe en el presente documento. Además, el proceso incluye un coacervado de aceite de silicona, que puede estar a una relación de aproximadamente 1,5 a 1 con el disolvente polimérico. Adicionalmente el proceso puede incluir controlar la etapa de coacervación como se describe en el presente documento, e incluso adicionalmente cuando se produce una transferencia de coacervado a la emulsión interna aproximadamente a los 3 minutos o menos, una etapa de mantenimiento de aproximadamente 1 minuto o menos y una etapa de transferencia rápida durante un periodo de menos de aproximadamente 3 minutos a un disolvente de inactivación/endurecimiento. En una realización adicional el disolvente es un disolvente doble, preferentemente una mezcla de heptano/etanol.

Se desvelan en el presente documento composiciones para la liberación sostenida de polipéptidos biológicamente activos y métodos para formar y usar dichas composiciones, para la liberación sostenida de polipéptidos biológicamente activos. Las composiciones de liberación sostenida desveladas en el presente documento comprenden un polímero biocompatible, y agente, tal como un polipéptido biológicamente activo, y un azúcar. El agente y azúcar se dispersan en el polímero biocompatible por separado o, preferentemente, conjuntamente. La composición de liberación sostenida puede caracterizarse por un perfil de liberación que tiene una relación de concentración en suero máxima ($C_{m\acute{a}x}$) con respecto a concentración en suero promedio (C_{pro}) de aproximadamente 3 o menos. Como se usa en el presente documento, los términos un o una se pueden referir a uno o más.

El agente

El agente desvelado en el presente documento es un polipéptido biológicamente activo tal como un polipéptido antidiabético o glucorregulador, incluyendo GLP-1, GLP-2, exendina-3, exendina-4 o un análogo, derivado o agonista del mismo. De forma más específica, el polipéptido es exendina-4. Sin embargo, otros agentes pueden aprovechar los descubrimientos realizados en el presente documento.

Los polipéptidos biológicamente activos como se usa en el presente documento se refiere de forma colectiva a proteínas y péptidos biológicamente activos y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, que están en su forma molecular, biológicamente activa, cuando se liberan *in vivo*, y que poseen por lo tanto las propiedades terapéuticas, profilácticas y/o de diagnóstico deseadas *in vivo*. Normalmente, el polipéptido tiene un peso molecular entre 500 y 200.000 Dalton.

Los polipéptidos biológicamente activos adecuados incluyen, pero sin limitación, glucagón, péptidos de tipo glucagón tales como, GLP-1, GLP-2 u otros análogos, derivados o agonistas de GLP de péptidos de tipo glucagón, exendinas tales como, exendina-3 y exendina-4, derivados, agonistas y análogos de los mismos, péptido intestinal vasoactivo (VIP), inmunoglobulinas, anticuerpos, citocinas (por ejemplo, linfocinas, monocinas, quimiocinas), interleucinas, factores activadores de macrófagos, interferones, eritropoyetina, nucleasas, factor de necrosis tumoral, factores estimulantes de colonias (por ejemplo, G-CSF), insulina, enzimas (por ejemplo, superóxido dismutasa, activador de plasminógeno, etc.), supresores tumorales, proteínas sanguíneas, hormonas y análogos y agonistas de hormonas (por ejemplo, hormona foliculoestimulante, hormona de crecimiento, hormona adrenocorticotrópica y hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH)), vacunas (por ejemplo, antígenos tumorales, bacterianos y víricos), antígenos, factores de coagulación sanguínea, factores de crecimiento (NGF y EGF), gastrina, GRH, péptidos antibacterianos tales como defensina, encefalinas, bradiquininas, calcitonina y muteínas, análogos, variantes de truncamiento, supresión y sustitución y sales farmacéuticamente aceptables de todos los anteriores.

La exendina-4 es un polipéptido de 39 aminoácidos. La secuencia de aminoácidos de exendina-4 puede encontrarse en la patente de los Estados Unidos N.º 5.424.286 expedida a Eng el 13 de junio de 1995. AC2993 y exenatida son sinónimos del término exendina-4. Se ha mostrado que exendina-4 en seres humanos y animales estimula la secreción de insulina en presencia de concentraciones de glucosa en sangre elevadas, pero no durante periodos de concentraciones de glucosa en sangre bajas (hipoglucemia). También se ha mostrado que suprime la secreción de

glucagón, ralentiza el vaciado gástrico y afecta al consumo de alimentos y al peso corporal, así como otras acciones. Por tanto, exendina-4 y análogos y agonistas de la misma pueden ser útiles en el tratamiento de diabetes mellitus, IGT, obesidad, etc.

5 La cantidad de polipéptido biológicamente activo, que está contenido en la matriz polimérica de una composición de liberación sostenida, es una cantidad terapéutica, diagnóstica o profilácticamente eficaz que puede ser determinada por un experto habitual en la materia, teniendo en cuenta factores tales como el peso corporal, la afección que se va a tratar, el tipo de polímero usado y la tasa de liberación del polímero.

10 Las composiciones de liberación sostenida contienen en general de aproximadamente 0,01 % (p/p) a aproximadamente 50 % (p/p) del agente, por ejemplo, polipéptido biológicamente activo (tal como exendina-4 (peso total de la composición). Por ejemplo, la cantidad de polipéptido biológicamente activo (tal como exendina-4) puede ser de aproximadamente 0,1 % (p/p) a aproximadamente 30 % (p/p) del peso total de la composición. La cantidad de polipéptido variará dependiendo del efecto deseado, la potencia del agente, los niveles de liberación planeados y el periodo de tiempo durante el que se liberará el polipéptido. Preferentemente, el intervalo de carga está entre 15 aproximadamente 0,1 % (p/p) y aproximadamente 10 % (p/p), por ejemplo, de 0,5 % (p/p) a aproximadamente 5 % (p/p). Se obtuvieron perfiles de liberación superiores cuando el agente, por ejemplo, exendina-4, se cargó a aproximadamente 3 % p/p y adicionalmente cuando se cargó a aproximadamente 4 % o aproximadamente 5 %.

20 El azúcar

Un azúcar, como se define en el presente documento, es un monosacárido, disacárido u oligosacárido (de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 monosacáridos) o un derivado de los mismos. Por ejemplo, los alcoholes de azúcares de monosacáridos son derivados adecuados incluidos en la presente definición de azúcar. Por tanto, el alcohol de azúcar manitol, por ejemplo, que procede del monosacárido manosa se incluye en la definición de azúcar como se usa en el presente documento.

Los monosacáridos adecuados incluyen, pero sin limitación, glucosa, fructosa y manosa. Un disacárido, como se define adicionalmente en el presente documento, es un compuesto que tras la hidrólisis produce dos moléculas de un monosacárido. Los disacáridos adecuados incluyen, pero sin limitación, sacarosa, lactosa y trehalosa. Los oligosacáridos adecuados incluyen, pero sin limitación, rafinosa y acarbosa.

La cantidad de azúcar presente en la composición de liberación sostenida puede variar de aproximadamente 0,01 % (p/p) a aproximadamente 50 % (p/p), tal como de aproximadamente 0,01 % (p/p) a aproximadamente 10 % (p/p), tal como de aproximadamente 0,1 % (p/p) a aproximadamente 5 % (p/p) del peso total de la composición de liberación sostenida. Se obtuvieron perfiles de liberación excelentes incorporando aproximadamente 2 % (p/p) de sacarosa.

Como alternativa, la cantidad de azúcar presente en la composición de liberación sostenida puede indicarse en una relación en peso con el agente o polipéptido biológicamente activo. Por ejemplo, el polipéptido y azúcar pueden estar presentes en una relación de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 1:10 peso:peso. La relación de polipéptido (por ejemplo, exendina-4) con respecto a azúcar (por ejemplo, sacarosa) puede ser de aproximadamente 3:2 (p/p), 4:2 (p/p) y 5:2 (p/p).

También se pueden usar combinaciones de dos o más azúcares. La cantidad de azúcar, cuando se emplea una combinación, es la misma que los intervalos enumerados anteriormente.

Cuando el polipéptido es exendina-4, el azúcar es preferentemente sacarosa, manitol o una combinación de los mismos.

50 El polímero

Los polímeros adecuados para formar la composición de liberación sostenida de la presente invención son polímeros biocompatibles que pueden ser polímeros biodegradables o no biodegradables o mezclas o copolímeros de los mismos. Un polímero es biocompatible si el polímero y cualquier producto de degradación del polímero no son tóxicos para el receptor y tampoco poseen ningún efecto deletéreo o adverso en el cuerpo del receptor, tal como una reacción inmunológica sustancial en el sitio de inyección.

Biodegradable, como se define en el presente documento, significa que la composición se degradará o erosionará *in vivo* para formar unidades más pequeñas o especies químicas. La degradación puede resultar, por ejemplo, de procesos enzimáticos, químicos y físicos. Los polímeros biodegradables, biocompatibles, adecuados, incluyen, por ejemplo, poli(lactidas), poli(glicólidos), poli(lactida-co-glicólidos), poli(ácidos lácticos), poli(ácidos glicólicos), policarbonatos, poliesteramidas, polianidridas, poli(aminoácidos), poliortoésteres, poli(dioxanonas), poli(alquilatos de aquileno), copolímeros o polietilenglicol y poliortoéster, poliuretano biodegradable, mezclas de los mismos y copolímeros de los mismos.

Los polímeros no biodegradables, biocompatibles, adecuados, incluyen polímeros no biodegradables seleccionados del grupo que consiste en poliacrilatos, polímeros de acetatos de etilen-vinilo y otros acetatos de celulosa acilo sustituidos, poliuretanos no degradables, poliestirenos, cloruro de polivinilo, fluoruro de polivinilo, poli(vinil imidazol), poliolefinas de clorosulfonato, óxido de polietileno, mezclas de los mismos y copolímeros de los mismos.

Los pesos moleculares aceptables para polímeros usados en la presente invención pueden ser determinados por un experto habitual en la materia teniendo en consideración factores tales como la tasa de degradación polimérica deseada, propiedades físicas tales como la fuerza mecánica, la química de grupos finales y la tasa de disolución de polímero en disolvente. Normalmente, un intervalo aceptable de peso molecular es de aproximadamente 2000 Dalton a aproximadamente 2.000.000 de Dalton. En una realización preferida, el polímero es polímero o copolímero biodegradable. En una realización más preferida, el polímero es un poli(lactida-co-glicólido) (en lo sucesivo en el presente documento "PLG") con una relación de lactida:glicólido de aproximadamente 1:1 y un peso molecular de aproximadamente 10.000 Dalton a aproximadamente 90.000 Dalton. En una realización aún más preferida, el peso molecular del PLG usado en la presente invención tiene un peso molecular de aproximadamente 30.000 Dalton a aproximadamente 70.000 Dalton tal como de aproximadamente 50.000 a aproximadamente 60.000 Dalton.

Los PLG pueden poseer grupos finales ácidos o grupos finales bloqueados, tales como los que pueden obtenerse esterificando el ácido. Se obtuvieron excelentes resultados con un PLG con un grupo final ácido.

Los polímeros también pueden seleccionarse basándose en la viscosidad inherente del polímero. Las viscosidades inherentes adecuadas incluyen de aproximadamente 0,06 a 1,0 dl/g, tal como de aproximadamente 0,2 a 0,6 dl/g, más preferentemente entre aproximadamente 0,3 y 0,5 dl/g. Se eligen polímeros preferidos que se degradarán en de 3 a 4 semanas. Pueden obtenerse polímeros adecuados de Alkermes, Inc. con el nombre comercial Medisorb®, tales como los comercializados como 5050 DL 3A o 5050 DL 4A. También pueden usarse PLG Boehringer Ingelheim Resomer®, tales como Resomer® RG503 y 503H.

La composición de liberación sostenida puede adoptar muchas formas tales como una película, un microgránulo, un cilindro, un disco o una micropartícula. Una micropartícula, como se define en el presente documento, comprende un componente polimérico que tiene un diámetro de menos de aproximadamente un milímetro y que tiene polipéptido biológicamente activo dispersado o disuelto en el mismo. Una micropartícula puede tener una forma esférica, no esférica o irregular. Normalmente, la micropartícula será de un tamaño adecuado para inyección. Un intervalo de tamaños típico para micropartículas es de 1000 micrómetros o menos. Los intervalos de micropartículas pueden ser de aproximadamente uno a aproximadamente 180 micrómetros de diámetro. Se obtienen perfiles de liberación superiores cuando las micropartículas varían de aproximadamente 1 a 100 micrómetros, de aproximadamente 30 a 90 micrómetros, de aproximadamente 50 a 70 micrómetros e incluso además el tamaño de partícula medio puede ser de aproximadamente 50 a 60 micrómetros. El tamaño de partícula medio puede ser no menor de o es igual a aproximadamente 50, 60 o 70 micrómetros, y preferentemente menos de aproximadamente 80, 90 o 100 micrómetros. A mayores tamaños de partículas, las partículas están preferentemente sustancialmente no agregadas para permitir el paso a través de una aguja de calibre 23, aún más preferentemente una aguja de calibre 25. Se obtienen perfiles de liberación uniformes y superiores controlando la distribución del tamaño de partículas. Un tamaño de partícula medio desvelado en el presente documento es de aproximadamente 50 micrómetros y el intervalo inferior y superior de partículas es de aproximadamente 30 y 90 micrómetros, respectivamente. La distribución de micropartículas puede describirse usando un diámetro medio del volumen. El diámetro medio de la distribución del volumen representa el centro de gravedad de la distribución y es un tipo de "tamaño de partícula promedio". Una composición puede tener un diámetro medio de la distribución del volumen de aproximadamente 50 a 70 micrómetros, de aproximadamente 50 a 60 micrómetros o de aproximadamente 50, 60 o 70 micrómetros, con una distribución de volumen (DV) de menos de o aproximadamente 5 %, 10 % o 15 % a 30 micrómetros y una DV de más de o aproximadamente 80 %, 85 %, 90 % o 95 % a 90 micrómetros. Una composición desvelada en el presente documento puede tener un diámetro medio de la distribución del volumen de aproximadamente 60 micrómetros, con una distribución de volumen (DV) de menos de o aproximadamente 10 % a 30 micrómetros y una DV de más de o aproximadamente 90 % a 90 micrómetros.

Excipientes adicionales

Aunque es posible que puedan añadirse excipientes adicionales a las formulaciones desveladas en el presente documento como es bien sabido en la materia, un descubrimiento sorprendente de la presente invención es que puede conseguirse un perfil de liberación excelente con las formulaciones sencillas descritas en el presente documento. Por lo tanto, la composición está exenta de tampón, sales de precipitación y excipientes adicionales que aumenten o reduzcan la velocidad de liberación de exendina-4 de la composición. Los ingredientes que pueden aumentar sustancialmente la tasa de liberación incluyen agentes formadores de poros y excipientes que facilitan la degradación polimérica. Por ejemplo, la tasa de hidrólisis polimérica aumenta en pH distinto del neutro. Por lo tanto, un excipiente ácido o básico tal como un ácido inorgánico o una base inorgánica puede alterar la tasa de erosión polimérica. Los ingredientes que pueden reducir sustancialmente la tasa de liberación incluyen excipientes que reducen la hidrosolubilidad del agente.

Se desvelan en el presente documento formulaciones de liberación sostenida que consisten esencialmente en el polímero biocompatible, el agente y el azúcar. Por "consiste esencialmente en" se entiende la ausencia de ingredientes que aumentan sustancialmente la tasa de liberación del agente activo de la formulación. Los ejemplos de excipientes adicionales que no se esperaría que aumentarían o reducirían sustancialmente la tasa de liberación del agente incluyen agentes activos adicionales e ingredientes inertes.

La formulación puede consistir en el polímero biocompatible, el agente y el azúcar. Por "consiste en" se entiende la ausencia de componentes o ingredientes distintos de los enumerados y niveles residuales de materiales de partida, disolventes, etc. del proceso.

Ha sido un descubrimiento sorprendente que agentes tamponantes tales como acetato, citrato, fosfato u otros tampones biológicamente compatibles no fueran necesarios en la fase acuosa para conseguir una formulación de liberación sostenida con agente, por ejemplo, exendina-4, con biodisponibilidad de buena a excelente. También fue un descubrimiento sorprendente que fueron innecesarias sales de precipitación para controlar el estallido del agente, por ejemplo, exendina-4. Como alternativa o además, la composición de liberación sostenida producida por el método de la invención tiene baja porosidad. La composición tiene un volumen total de los poros de aproximadamente 0,1 ml/g o menos. Además del volumen total de los poros puede ser de 0,0 a 0,1 ml/g y de 0,01 a menos de 0,1 ml/g. Se ha descubierto que este volumen total de los poros muy pequeño conduce a un estallido (liberación) inicial pequeño de agente, y además que promueve un perfil de liberación sostenida más lento y/o más largo que formulaciones convencionales, y permite el desplazamiento de una $C_{máx}$ a un momento posterior en un perfil. En una realización específica, el volumen total de los poros se determina usando porosimetría de intrusión de mercurio, por ejemplo, como se describe con mayor detalle a continuación.

Cuando las composiciones de liberación sostenida tienen una porosidad baja como se describe en el presente documento, que actúa tanto para reducir la liberación inicial como para proporcionar liberación sostenida más larga con una relación de $C_{máx}$ con respecto a C_{pro} deseable, pueden estar presentes excipientes adicionales si tienen poco o ningún efecto sustancial en la tasa de liberación. Dichos excipientes pueden incluir los que proporcionan o potencian estabilidad del agente, durante la fabricación, el almacenamiento o la liberación. Los estabilizadores adecuados incluyen, por ejemplo, hidratos de carbono, aminoácidos, ácidos grasos y tensioactivos y son conocidos por los expertos en la materia. Además, los estabilizadores incluyen "antioxidantes" tales como metionina, vitamina C, vitamina E y ácido maleico. El antioxidante puede estar presente como parte de una formulación acuosa estabilizada o añadirse a la fase polimérica. La composición está exenta de tampón. Los tampones son soluciones que contienen un ácido libre y una sal relacionada del ácido, o una base libre y una sal de la base. Los tampones pueden mantener un pH deseado para estabilizar la formulación durante cualquier etapa de fabricación, almacenamiento o liberación. Por ejemplo, el tampón puede ser una sal de fosfato monobásica o sal de fosfato dibásico o combinaciones de las mismas o un tampón volátil tal como bicarbonato de amonio. Otros tampones incluyen pero sin limitación acetato, citrato, succinato y aminoácidos tales como glicina, arginina e histidina.

Administración

Las composiciones desveladas en el presente documento se pueden administrar según métodos conocidos en general en la técnica. La composición desvelada en el presente documento puede administrarse a un paciente (por ejemplo, un ser humano que necesite el agente) u otro animal, mediante inyección, implantación (por ejemplo, por vía subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intracraneal e intradérmica), administración a membranas mucosas (por ejemplo, por vía intranasal, intravaginal, intrapulmonar o mediante un supositorio), por vía oral, mediante inyección sin agujas (véase por ejemplo patentes de los Estados Unidos 5312335 y 5630796) o suministro *in situ* (por ejemplo, mediante enema o pulverización de aerosol).

La composición de liberación sostenida puede administrarse usando cualquier programa de dosificación que consiga los niveles terapéuticos deseados durante el periodo de tiempo deseado. Por ejemplo, la composición de liberación sostenida puede administrarse y el paciente puede supervisarse hasta que los niveles del fármaco que se suministra vuelven al valor basal. Después de una vuelta al valor basal, la composición de liberación sostenida puede administrarse de nuevo. Como alternativa, la administración posterior de la composición de liberación sostenida puede realizarse antes de conseguir niveles basales en el paciente.

Por ejemplo, cuando la composición de liberación sostenida tiene incorporada en la misma una hormona, particularmente un péptido antidiabético o glucorregulador, por ejemplo, GLP-1, GLP-2, exendina-3, exendina-4 o agonistas, análogos o derivados de los mismos, la composición se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz para tratar a un paciente que padece diabetes mellitus, IGT, obesidad, trastorno cardiovascular (CV) o cualquier otro trastorno que pueda tratarse mediante uno de los polipéptidos anteriores o derivados, análogos o agonistas de los mismos.

Otras afecciones que pueden tratarse administrando la composición de liberación sostenida desvelada en el presente documento incluyen diabetes de tipo I y tipo II que puede tratarse con una composición de liberación sostenida que tiene insulina incorporada en la misma. Además, cuando el polipéptido incorporado es FSH o análogos de la misma la composición de liberación sostenida puede usarse para tratar la infertilidad. En otros casos,

la composición de liberación sostenida puede usarse para tratar la esclerosis múltiple cuando el polipéptido incorporado es interferón beta o una muteína de la misma. Como se puede comprender, la composición de liberación sostenida puede usarse para tratar una enfermedad que responda a la administración de un polipéptido dado.

En una realización adicional, la composición de liberación sostenida desvelada en el presente documento puede coadministrarse con un corticoesteroide. La coadministración de la composición de liberación sostenida desvelada en el presente documento con un corticoesteroide puede aumentar adicionalmente la biodisponibilidad del polipéptido biológicamente activo de la composición de liberación sostenida. Se describe la coadministración de un corticoesteroide en combinación con composiciones de liberación sostenida en detalle en la solicitud de patente de los Estados Unidos 60/419.430 titulado, "Method of Modifying the Release Profile of Sustained Release Compositions" por Dasch *et al.*

Corticoesteroides, como se define en el presente documento, se refiere a agentes antiinflamatorios esteroideos también denominados glucocorticoides.

Los corticoesteroides adecuados incluyen, pero sin limitación, 21-Acetoxipregnenolona, Alclometasona, Algestona, Amcinonida, Beclometasona, Betametasona, Budesonida, Cloroprednisona, Clobetasol, Clobetasona, Clorcortolona, Cloprednol, Corticosterona, Cortisona, Cortivazol, Deflazacort, Desonida, Desoximetasona, Dexametasona, Disflorasona, Diflucortolona, Difluprednato, Enoxolona, Fluazacort, Flucloronida, Flumetasona, Flunisolida, Acetónido de fluocinolona, Fluocinonida, Butilo de fluocortina, Flucortolona, Fluorometolona, Acetato de fluperolona, Acetato de fluprednido, Fluprednisolona, Flurandrenolida, Propionato de fluticasona, Formocortal, Halcinonida, Propionato de halobetasol, Halometasona, Acetato de halopredona, Hidrocortamato, Hidrocortisona, Etabonato de loteprednol, Mazipredona, Medrisona, Meprednisona, Metilprednisolona, Furoato de mometasona, Parametasona, Prednicartrato, Prednisolona, Prednisolona 25 - Dietilamino-acetato, Fosfato sódico de prednisolona, Prednisona, Prednival, Prednilideno, Rimexolona, Tixocortol, Triamcinolona (todas las formas), por ejemplo, Acetónido de triamcinolona, Metil éster de ácido 21-oico de acetónido de triamcinolona, Benetónido de triamcinolona, Hexacetónido de triamcinolona, Diacetato de triamcinolona, mezclas farmacéuticamente aceptables de los mismos y sales de los mismos y cualquier otro derivado y análogo de los mismos.

El corticoesteroide puede incorporarse en la composición de liberación sostenida que comprende el polímero biocompatible y el agente polipeptídico biológicamente activo incorporado en la misma.

El corticoesteroide desvelado en el presente documento puede incorporarse por separado en un segundo polímero biocompatible. El segundo polímero biocompatible puede ser el mismo o diferente del primer polímero biocompatible que tiene el agente polipeptídico biológicamente activo incorporado en el mismo.

El corticoesteroide desvelado en el presente documento puede estar presente en un estado encapsulado pero entremezclado con la composición de liberación sostenida. Por ejemplo, el corticoesteroide puede solubilizarse en el vehículo usado para suministrar la composición de liberación sostenida. Como alternativa, el corticoesteroide puede estar presente como un sólido suspendido en un vehículo apropiado. Además, el corticoesteroide puede estar presente como un polvo que está entremezclado con la composición de liberación sostenida.

Se entiende que el corticoesteroide está presente en una cantidad suficiente para aumentar la biodisponibilidad del polipéptido biológicamente activo de la composición de liberación sostenida. La biodisponibilidad aumentada se refiere a un aumento de la biodisponibilidad del polipéptido biológicamente activo de la composición de liberación sostenida cuando se coadministra con un corticoesteroide en comparación con la administración en ausencia de corticoesteroide durante un periodo de tiempo que comienza a los dos días después de la administración y que termina al final del ciclo de liberación de la formulación particular.

Como se usa en el presente documento, paciente se refiere a un ser humano, tal como un ser humano que necesite el agente o la terapia, profilaxis o método de diagnóstico.

Como se define en el presente documento, una liberación sostenida de polipéptido biológicamente activo es una liberación del polipéptido de la composición de liberación sostenida que se produce durante un periodo que es mayor que el periodo durante el que estaría disponible una cantidad biológicamente significativa del polipéptido después de la administración directa de una solución del polipéptido. Se prefiere que una liberación sostenida sea una liberación que se produzca durante un periodo de al menos aproximadamente una semana, tal como al menos aproximadamente dos semanas, al menos aproximadamente tres semanas o al menos aproximadamente cuatro semanas. La liberación sostenida puede ser una liberación continua o discontinua, con tasas de liberación relativamente constantes o variantes. La continuidad de liberación y el nivel de liberación pueden verse afectados por el tipo de composición polimérica usada (por ejemplo, relaciones monoméricas, peso molecular, composición de bloque y diversas combinaciones de polímeros), carga de polipéptidos y/o selección de excipientes para producir el efecto deseado.

Como se usa en el presente documento, una cantidad terapéuticamente eficaz, cantidad profilácticamente eficaz o cantidad diagnósticamente eficaz es la cantidad de la composición de liberación sostenida necesaria para inducir la respuesta biológicamente deseada después de la administración.

5 $C_{m\acute{a}x}$ como se usa en el presente documento es la concentración máxima en suero de fármaco que aparece durante el periodo de liberación que se supervisa.

C_{pro} como se usa en el presente documento, es la concentración promedio en suero de fármaco obtenida dividiendo el área bajo la curva (ABC) del perfil de liberación por la duración de la liberación.

10 La relación de $C_{m\acute{a}x}$ con respecto a C_{pro} es de aproximadamente 3 o menos. Este perfil es particularmente deseable para polipéptidos antidiabéticos o glucorreguladores, tal como los descritos anteriormente. Una relación de aproximadamente 3 o menos puede proporcionar una C_{pro} en una ventana terapéutica evitando al mismo tiempo efectos secundarios farmacológicos adversos que pueden resultar de relaciones más altas. Además se ha descubierto que controlando los aspectos físicos de la composición de liberación sostenida, como se describe en el presente documento, pueden conseguirse y controlarse otras características deseadas de un perfil de liberación deseado superior. El proceso proporciona composiciones que tienen un estallido reducido superior (es decir liberación inicial; por ejemplo, $C_{m\acute{a}x}$ a 0-1 día). En una realización el estallido inicial es menor de aproximadamente 1 % de agente total. En otra realización la liberación inicial es menor de aproximadamente 0,75 % y además menor de aproximadamente 0,5 %. A este respecto la relación de $C_{m\acute{a}x}$ con respecto a C_{pro} es menor de aproximadamente 3 y además puede ser de aproximadamente 1 a 3 y puede ser además de aproximadamente 2 a 3. Además, una $C_{m\acute{a}x}$, si está presente, puede desplazarse a un momento durante el periodo de liberación sostenida distinto del periodo de estallido o liberación inicial, en la "fase sostenida" de liberación. La $C_{m\acute{a}x}$ puede aparecer al menos a los 7, 14, 21, 28, 35 o 42 días después de la administración y puede aparecer en cualquier número de día entre medias. La $C_{m\acute{a}x}$ puede ser aproximadamente a los 21 a 35 días después de la administración, aproximadamente a los 28 a 31 días o aproximadamente a los 28 días después de la administración. La concentración máxima de fármaco (por ejemplo concentración en plasma) puede aparecer al menos a los 7, 14, 21, 28, 35 o 42 días después de la administración y puede aparecer en cualquier número de día entre medias. La concentración máxima de fármaco puede aparecer aproximadamente a los 21 a 35 días después de la administración, particularmente en el caso de agentes glucorreguladores tales como exendina-4, GLP-1, GIP o sus análogos.

Los perfiles de liberación sostenida superiores de las presentes composiciones permiten un método de administración de un agente o agentes activos en dosis que evitan un efecto (secundario) indeseable, tal como náuseas, reduciendo un estallido inicial indeseablemente alto. Además, los perfiles de liberación sostenida superiores permiten un método de administración de un agente o agentes activos en una dosis que es menor que la terapéuticamente eficaz pero tras liberación sostenida múltiple la dosificación consigue una concentración terapéuticamente eficaz en el paciente. Esta concentración se mantiene después fácilmente mediante dosificación sostenida adicional. Una ventaja de este enfoque de tratamiento permitido por la presente invención es que los efectos (secundarios) indeseables, tales como náuseas, se reducen o eliminan mediante la reducción de estallidos indeseablemente altos del fármaco y permitiendo además que un paciente se adapte a concentraciones gradualmente crecientes del agente o los agentes. Por consiguiente, se proporcionan múltiples dosis de liberación sostenida desveladas en el presente documento de modo que cada dosis sucesiva aumente la concentración del agente o los agentes en el paciente, en las que se consigue una concentración terapéuticamente eficaz de agente o agentes en el paciente. Cada dosis de liberación sostenida sucesiva puede administrarse de modo que su fase sostenida solape con la fase sostenida de la dosis previa. Además, la $C_{m\acute{a}x}$ de una dosis o su concentración máxima de agente puede solapar con la $C_{m\acute{a}x}$ o concentración máxima de agente de la dosis previa.

Biodisponibilidad, tal como se usa ese término en el presente documento, se refiere a la cantidad de producto terapéutico que alcanza el sistema de circulación. La biodisponibilidad puede definirse como el área bajo la curva (ABC) calculada para el perfil de liberación de un polipéptido particular durante el periodo de tiempo comenzando después de la administración y terminando en un punto temporal predeterminado. Como se entiende en la técnica, el perfil de liberación se genera representando gráficamente los niveles en suero de un agente biológicamente activo en un sujeto (eje Y) en puntos temporales predeterminados (eje X). La biodisponibilidad se indica con frecuencia con respecto a % de biodisponibilidad, que es la biodisponibilidad conseguida para un polipéptido particular después de la administración de una composición de liberación sostenida dividida por la biodisponibilidad conseguida para un polipéptido particular después de administración intravenosa de la misma dosis de fármaco, multiplicada por 100.

Una modificación del perfil de liberación puede confirmarse mediante supervisión farmacocinética apropiada del suero del paciente con respecto a la presencia del agente polipeptídico biológicamente activo. Por ejemplo, un ensayo basado en anticuerpo específico (por ejemplo, ELISA e IRMA), como es bien sabido en la materia, puede usarse para determinar la concentración de determinados agentes polipeptídicos biológicamente activos en el suero del paciente. Un ejemplo de dicho ensayo se describe en el presente documento para exendina-4.

Puede usarse supervisión farmacodinámica del paciente para supervisar los efectos terapéuticos del agente sobre el paciente para confirmar la conservación de la actividad biológica del agente liberado. Los métodos de supervisión de

efectos farmacodinámicos pueden seleccionarse basándose en el agente polipeptídico biológicamente activo que se administra usando técnicas ampliamente disponibles.

5 Las composiciones desveladas en el presente documento pueden formularse adicionalmente en una forma adecuada para inyección a través una aguja en un hospedador. Una composición inyectable puede comprender composiciones de micropartículas como se describen en el presente documento en un vehículo de inyección acuoso viscoso, por ejemplo, como se describe en la Patente de los Estados Unidos N.º 6.495.164. El vehículo de inyección acuoso puede tener una viscosidad de al menos 20 cp a 20 °C, y además puede tener una viscosidad mayor de 10 50 cp y menor de 60 cp a 20 °C. Las micropartículas pueden suspenderse en el vehículo de inyección a una concentración de más de aproximadamente 30 mg/ml para formar una suspensión, teniendo la fase fluida de la suspensión una viscosidad de al menos 20 cp a 20 °C. La fase fluida de la suspensión puede tener una viscosidad a 20 °C de al menos aproximadamente 30 cp, 40 cp, 50 cp y 60 cp. La composición también puede comprender un agente potenciador de la viscosidad, un agente potenciador de la densidad, un agente potenciador de la tonicidad y/o un agente humectante. La viscosidad del vehículo de inyección proporciona inyectabilidad de la composición mediante una aguja cuyo diámetro varía de calibre 18 a 23, aún más preferentemente mediante una aguja de calibre 15 25. Como saben los expertos en la materia, una aguja de pared regular (PR) de calibre 18 tiene un diámetro interno nominal (DI) de 0,84 mm (0,033 pulgadas) y una aguja de pared regular de calibre 22 tiene un diámetro interno nominal de 0,42 mm (0,016 pulgadas). El vehículo de inyección puede contener un agente potenciador de la viscosidad. El agente potenciador de la viscosidad puede ser carboximetil celulosa sódica, aunque también pueden usarse otros agentes potenciadores de la viscosidad adecuados. El vehículo de inyección también puede comprender un agente potenciador de la densidad que aumente la densidad del vehículo de inyección. El agente potenciador de la densidad puede ser sorbitol, aunque también pueden usarse otros agentes potenciadores de la densidad adecuados. El vehículo de inyección también puede contener un agente de ajuste de la tonicidad para ajustar la tonicidad para evitar problemas de toxicidad y mejorar la biocompatibilidad. Un agente de ajuste de la 25 tonicidad preferido es cloruro sódico, aunque también pueden usarse otros agentes de ajuste de la tonicidad adecuados. El vehículo de inyección también puede comprender un agente humectante para asegurar la humectación completa de las micropartículas por el vehículo de inyección. Los agentes humectantes incluyen polisorbato 20 (Tween 20), polisorbato 40 (Tween 40) y polisorbato 80 (Tween 80).

30 Las micropartículas pueden suspenderse en el vehículo de inyección a una concentración de más de aproximadamente 30 mg/ml. Las micropartículas pueden suspenderse a una concentración de aproximadamente 150 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml o de aproximadamente 100 mg/ml a aproximadamente 400 mg/ml. Sin embargo, debería entenderse que la invención no está limitada a una concentración particular.

35 En una realización adecuada para pase a través de una aguja de calibre 23, el vehículo de inyección comprende carboximetilcelulosa sódica a 3,0 % (p/v), cloruro sódico a 0,9 % (p/v) y polisorbato 20, NF (Tween 20) a 0,1 % (v/v) u opcionalmente a 0,5 %, en agua. La solución está opcionalmente tamponada. Las micropartículas que contienen exenatida como se ha descrito anteriormente pueden suspenderse en vehículo de inyección de carboximetilcelulosa sódica a 3,0 % (p/v), cloruro sódico a 0,9 % (p/v) y polisorbato 20, NF (Tween 20) a 0,1 % (v/v) u opcionalmente a 40 0,5 %, en agua. La concentración de micropartículas de exenatida suspendidas puede ser mayor de aproximadamente 30 mg/ml. Típicamente se suspenden aproximadamente de 100 a 200 mg de micropartículas secas por ml de vehículo.

45 Pueden excluirse micropartículas específicas halladas en la publicación WO2004036186 publicada el 29 de abril de 2004. Más específicamente se excluyen las micropartículas que no contenían una cantidad de sulfato de amonio que afectaba sustancialmente a la liberación. Dichas micropartículas específicas incluyen las designadas IF-1, IF-2, IF-3, IF-4, M1 a M4, M7-M14, M18, M19.

50 La invención se describirá ahora adicionalmente y más específicamente mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplificaciones

PREPARACIÓN DE MICROPARTÍCULAS I

55 Las composiciones de liberación sostenida descritas en el presente documento se prepararon mediante un proceso de separación de fases. El proceso general se describe posteriormente para micropartículas que contienen exendina-4 y sacarosa para un tamaño de lote de 1 kg.

A. Formación de emulsión de agua en aceite interna

60 Se creó una emulsión de agua en aceite con la ayuda de un homogeneizador. Los homogeneizadores adecuados incluyen un homogeneizador Megatron en línea MT-V 3-65 F/FF/FF, Kinematica AG, Suiza. La fase de agua de la emulsión se preparó disolviendo exendina-4 y excipientes tales como sacarosa y agua. La concentración de fármaco en la solución resultante puede ser de aproximadamente 50 mg/g a aproximadamente 100 mg/g. Por ejemplo, cuando el fármaco es exendina-4, la solución de fármaco en solución puede ser de aproximadamente 30 g a 65 aproximadamente 60 g por cada 600 g de agua. En una realización particular, se disolvieron 50 g de exendina-4 y 20

g de sacarosa en 600 g de agua para irrigación (WFI). Las cantidades especificadas enumeradas anteriormente representan una carga nominal sin ajuste para compensar la concentración de contenido peptídico específica para el lote de exendina-4 usado. La fase oleosa de la emulsión se preparó disolviendo polímero PLGA (por ejemplo, 930 g de DL4A PLGA 50:50 purificado (Alkermes, Inc.) en cloruro de metileno (14,6 kg o 6 % p/p).

La fase acuosa se añadió después a la fase oleosa para formar una emulsión gruesa con un mezclador superior durante aproximadamente tres minutos. Después, la emulsión gruesa se homogeneizó a aproximadamente 21300 rpm a temperatura ambiente durante tres periodos discretos. Esto dio como resultado un tamaño de las gotas de la emulsión interna de menos de 1 micrómetro. Se entiende que puede conseguirse formación de emulsión interna usando cualquier medio adecuado. Los medios adecuados de formación de emulsión incluyen, pero sin limitación, homogeneización como se ha descrito anteriormente y ultrasonidos.

B. Formación de coacervados

Después se realizó una etapa de coacervación añadiendo aceite de silicona (21,8 kg de dimeticona, NF, 350 cs) durante un periodo de tiempo de aproximadamente cinco minutos a la emulsión interna. Esto es equivalente a una relación de 1,5:1, de aceite de silicona con respecto a cloruro de metileno. El cloruro de metileno de la solución polimérica se divide en el aceite de silicona y comienza a precipitar el polímero alrededor de la fase acuosa que contiene exendina-4, lo que conduce a microencapsulación. Las microesferas embrionarias formadas de este modo son blandas y requieren endurecimiento. Frecuentemente, se permite que las microesferas embrionarias reposen durante un periodo de tiempo corto, por ejemplo, de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 5 minutos antes de continuar a la etapa de endurecimiento de microesferas.

C. Endurecimiento y aclarado de microesferas

Las microesferas embrionarias se transfirieron después inmediatamente a una mezcla de disolvente de heptano/etanol. El volumen de mezcla de heptano/etanol necesario puede determinarse basándose en el tamaño de lote de microesferas, típicamente una relación 16:1 de cloruro de metileno con respecto a disolvente de heptano/etanol. En el presente ejemplo, se usaron aproximadamente 210 kg de heptano y 23 kg de etanol en un tanque agitado, enfriado a 3°C. Esta mezcla de disolvente endureció las microesferas extrayendo cloruro de metileno adicional de las microesferas. Esta etapa de endurecimiento también puede denominarse inactivación. Después de inactivarse durante 1 hora a 3°C, la mezcla de disolvente se decanta y se añade heptano nuevo (13 kg) a 3°C y se mantiene durante 1 hora para aclarar el aceite de silicona residual, etanol y cloruro de metileno en la superficie de la microesfera o se bombea directamente a la etapa de recogida.

D. Secado y recogida de microesferas

Al final de la etapa de inactivación o decantación/lavado, las microesferas se transfirieron y se recogieron en un filtro/secador Sweco Pharmasep de 30 cm (12 pulgadas) modelo PH12Y6. El filtro/secador usa una rejilla de recogida multicapa de 20 micrómetros y se conecta a un motor que hace vibrar la rejilla durante la recogida y el secado. Se realizó un aclarado final con heptano (6 kg a 3°C) para asegurar la máxima transferencia lineal y para eliminar cualquier exceso de aceite de silicona. Las microesferas se secaron después al vacío con una purga constante de gas nitrógeno a una velocidad controlada según el siguiente programa: 6 horas a 3°C; 6 horas aumentando hasta 41°C; y 84 horas a 41°C.

Después de finalizar el secado, las microesferas se descargaron en un vaso de recogida, se tamizaron a través de un tamiz de 150 µm y se almacenaron a aproximadamente -20°C hasta su llenado.

Para todas las formulaciones de micropartículas que se prepararon en el presente documento la cantidad del polipéptido, por ejemplo, exendina-4 y excipientes presentes en las formulaciones preparadas se expresan como un % (p/p) basándose en el peso final de la composición de liberación sostenida. El % (p/p) es un porcentaje nominal, excepto cuando se indique.

PREPARACIÓN DE MICROPARTÍCULAS II

A. Formación de emulsión de agua en aceite interna

Se creó una emulsión de agua en aceite con la ayuda de un baño de ultrasonidos. Los baños de ultrasonidos adecuados incluyen Vibracell VCX 750 con cabeza de sonda modelo CV33, Sonics and Materials Inc., Newtown, CT. La fase de agua de la emulsión se preparó disolviendo exendina-4 y excipientes tales como sacarosa y agua. La concentración de fármaco en la solución resultante puede ser de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml. Por ejemplo, cuando el fármaco es exendina-4, la solución de fármaco en solución puede ser de aproximadamente 3,28 g a aproximadamente 6,55 g por cada 65,5 g de agua. En una realización particular, se disolvieron 5,46 g de exendina-4 y 2,18 g de sacarosa en 65,5 g de agua para irrigación o WFI. Las cantidades especificadas enumeradas anteriormente representan una sobrecarga del 4% para la carga diana para compensar pérdidas tras la esterilización por filtrado de los componentes. La fase oleosa de la emulsión se preparó disolviendo

polímero PLGA (por ejemplo, 97,7 g de DL4A PLGA 50:50 purificado (Alkermes, Inc.)) en cloruro de metileno (1539 g o 6 % p/v).

La fase de agua se añadió después a la fase oleosa durante un periodo de aproximadamente tres minutos sometiendo a ultrasonidos al mismo tiempo a 100 % de amplitud a temperatura ambiente. La fase acuosa se bombeó a través de un tubo de acero inoxidable de 6,35 mm (0,25 pulgadas) con un extremo de tubo de HPLC de 25,40 mm (1 pulgada) (DI = 0,51 mm (20/1000 pulgadas) a 34,47 kPa (5 psig), añadida por debajo de la sonda de ultrasonidos dentro de la zona de ultrasonidos. El reactor se agitó después de 1400 a 1600 rpm, con ultrasonidos adicionales a 100 % de amplitud durante 2 minutos, seguido de un mantenimiento de 30 segundos y después 1 minuto más de ultrasonidos. Esto dio como resultado un tamaño de las gotas de la emulsión interna de menos de 0,5 micrómetros. Se entiende que puede conseguirse formación de emulsión interna usando cualquier medio adecuado. Los medios adecuados de formación de emulsión incluyen, pero sin limitación, ultrasonidos como se ha descrito anteriormente y homogeneización.

B. Formación de coacervados

Después se realizó una etapa de coacervación añadiendo aceite de silicona (2294 g de dimeticona, NF, 350 cs) durante un periodo de tiempo de aproximadamente tres a cinco minutos a la emulsión interna. Esto es equivalente a una relación de 1,5:1, de aceite de silicona con respecto a cloruro de metileno. El cloruro de metileno de la solución polimérica se divide en el aceite de silicona y comienza a precipitar el polímero alrededor de la fase acuosa que contiene exendina-4, lo que conduce a microencapsulación. Las microesferas embrionarias formadas de este modo son blandas y requieren endurecimiento. Frecuentemente, se permite que las microesferas embrionarias reposen durante un periodo de tiempo corto, por ejemplo, de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 5 minutos antes de continuar a la etapa de endurecimiento de microesferas.

C. Endurecimiento y aclarado de microesferas

Las microesferas embrionarias se transfirieron después inmediatamente a una mezcla de disolvente de heptano/etanol. El volumen de mezcla de heptano/etanol necesario puede determinarse basándose en el tamaño de lote de microesferas. En el presente ejemplo, se usaron aproximadamente 22 kg de heptano y 2448 g de etanol en un tanque agitado, enfriado a 3 °C (de 350 a 450 rpm). Esta mezcla de disolvente endureció las microesferas extrayendo cloruro de metileno adicional de las microesferas. Esta etapa de endurecimiento también puede denominarse inactivación. Después de inactivarse durante 1 hora a 3 °C, la mezcla de disolvente se decantó y se añadió heptano nuevo (13 kg) a 3 °C y se mantuvo durante 1 hora para aclarar el aceite de silicona residual, etanol y cloruro de metileno en la superficie de la microesfera.

D. Secado y recogida de microesferas

Al final de la etapa de aclarado, las microesferas se transfirieron y recogieron en un tamiz de 152,40 mm (6 pulgadas) de diámetro, de 20 micrómetros, multicapa, dentro de la cámara de secado en forma de cono que actuó como un filtro sin salida. Se realizó un aclarado final con heptano (6 kg a 4 °C) para asegurar la máxima transferencia lineal. Las microesferas se secaron después con una purga constante de gas nitrógeno a una velocidad controlada según el siguiente programa: 18 horas a 3 °C; 24 horas a 25 °C; 6 horas a 35 °C; y 42 horas a 38 °C.

Después de finalizar el secado, las microesferas se descargan en un vaso de recogida esterilizado de acero inoxidable/teflón unido al cono de secado. El vaso de recogida se sella, se retira del cono de secado y se almacena a -20 ± 5 °C hasta su llenado. El material que permanece en el cono tras su desmontaje para limpiar se toma para análisis del contenido de fármaco. La producción fue de aproximadamente 100 gramos de microesferas.

Para todas las formulaciones de micropartículas que se prepararon en el presente documento la cantidad del polipéptido, por ejemplo, exendina-4 y excipientes presentes en las formulaciones preparadas se expresan como un % (p/p) basándose en el peso final de la composición de liberación sostenida. El % (p/p) es un porcentaje nominal, excepto cuando se indique.

POLÍMERO:

Se enumeran a continuación ejemplos de polímeros PLG específicos adecuados para su uso. Todos los polímeros empleados en los siguientes ejemplos se exponen en la lista y todos los polímeros enumerados se obtuvieron de Alkermes, Inc. de Cincinnati, OH y pueden describirse de la siguiente manera:

Polímero 2A: Poli(lactida-co-glicólido); relación de lactida:glicólido 50:50; 12,3 kD de peso mol.; VI=0,15 (dl/g).

Polímero 4A: Poli(lactida-co-glicólido); relación de lactida:glicólido 50:50; peso mol. 45-64 kD; VI=0,45-0,47 (dl/g).

PURIFICACIÓN DE PLG: Se conoce en la técnica (véase, por ejemplo, Peptide Acylation by Poly(α -Hydroxy Esters) por Lucke *et al.*, Pharmaceutical Research, Vol. 19, n.º 2, p. 175-181, febrero de 2002) que las proteínas y péptidos que se incorporan en matrices de PLG pueden alterarse de forma indeseable (por ejemplo, degradarse o modificarse químicamente) como resultado de la interacción con productos de degradación del PLG o impurezas que permanecen después de la preparación del polímero. Por tanto, los polímeros de PLG usados en la preparación de la mayoría de formulaciones de micropartículas descritas en el presente documento se verificaron antes de la preparación de las composiciones de liberación sostenida usando métodos de purificación reconocidos en la técnica.

MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN:

Se ha determinado que los siguientes métodos de caracterización son adecuados para identificar micropartículas que proporcionen un perfil de liberación deseado del agente activo.

MEB

Se usó MEB para evaluar el tamaño de partícula, la forma y elementos superficiales de las micropartículas. Se realizó captura de imágenes por MEB en un sistema Personal SEM® (ASPEX™, LLC). Todas las muestras se depositaron mediante espátula en portaobjetos de MEB con cinta de doble cara de carbono. Las muestras se recubrieron por bombardeo con Au durante aproximadamente 90 segundos a una corriente de emisión de 18 mA usando un "mini" aparato de recubrimiento por bombardeo modelo SC 7620 (Energy Beam Sciences). Todas las capturas de imágenes por MEB se realizaron utilizando un haz de electrones de 20 KeV sobre un intervalo de aumento de aproximadamente 250 a 2500X.

MEB CRIOGÉNICA

La sección transversal de micropartículas se estudió usando MEB criogénica. La muestra de micropartículas se mezcló con solución de HISTO PREP® (Fischer) y se mantuvo en un criostato a -20 °C durante una noche. Las micropartículas endurecidas se montaron en un cubreobjetos de vidrio y después se cortaron usando un cuchillo metálico. Las partículas cortadas se montaron en portaobjetos de aluminio, se recubrieron por bombardeo con platino y paladio y se observaron con un microscopio electrónico de barrido (Phillips 525M). La observación visual de los cortes proporciona un método para determinar el grado de porosidad para las micropartículas.

MEDICIÓN DE POROSIDAD-INTRUSIÓN DE MERCURIO

La distribución del volumen de poros en micropartículas se determinó usando un porosímetro de intrusión de mercurio Moden modelo SutoPor IV 9500 (Micromeritics, Norcross, GA). En resumen, se introdujo mercurio en una cantidad conocida de micropartículas en un penetrómetro aplicando presión de una manera por etapas hasta una presión máxima de 413,57 MPa (60.000 Psia). Se midió el volumen de mercurio introducido en los poros a diversas presiones. Este método cuantifica la distribución de poros en las micropartículas. Es decir, el tamaño de los poros que se introducen está relacionado de forma inversa con la presión aplicada. El equilibrio de las fuerzas internas y externas en el sistema de líquido-sólido-vapor puede describirse mediante la ecuación de Washburn. La relación entre presión aplicada y el tamaño de poro en el que se hace entrar mercurio se describe por:

$$D = \frac{4\gamma \cos\theta}{P}$$

P

Donde: D = diámetro de poro
 γ = tensión superficial (constante)
 θ = ángulo de contacto (constante)
 P = Presión

Por lo tanto, el tamaño del poro en que se introducirá mercurio es inversamente proporcional a la presión aplicada. Suponiendo que todos los poros son cilindros estrechos, el diámetro de poro promedio ($D=4V/A$) puede calcularse dividiendo el volumen de poro ($V=\pi D^2 h/4$) por el área de poro ($A=\pi Dh$).

DISOLVENTES RESIDUALES

Se usó un único método para cuantificación de heptano, etanol y cloruro de metileno. El equipamiento consistió en un cromatógrafo de gases HP 5890 Serie 2 con una columna Rtx de 1301,30 cm x 0,53 mm. Se disolvieron aproximadamente 130 mg de micropartículas en 10 ml de *N,N*-dimetilformamida. Como el patrón interno se usó acetato de propilo. La preparación de muestras se ajustó de modo que pudieran cuantificarse concentraciones de cloruro de metileno tan bajas como 0,03 %.

PREPARACIÓN DE MICROPARTÍCULAS

5 Los lotes de micropartículas expuestos en la Tabla 1 se prepararon como se ha descrito anteriormente a la escala de 100 gramos usando el polímero 4A y una relación de aceite de silicona con respecto a cloruro de metileno de 1,5:1 o 1:1 y el aceite de silicona tuvo una viscosidad de 350 cs. La cantidad de exendina-4 y los excipientes usados en la formulación también se exponen en la Tabla 1.

TABLA 1

N.º de lote	Formulación	Estallido <i>in vitro</i> (%)	Comentarios
02-019-147(n.º 1)	Sacarosa al 0 %, AS al 0 %	0,40	Aceite de Si:MeCl ₂ 1,5:1
02-019-167(n.º 2)	Sacarosa al 2 % (F16)	0,40	Aceite de Si:MeCl ₂ 1,5:1
02-019-160(n.º 2-1)	Sacarosa al 2 % (F16)	0,44	Aceite de Si:MeCl ₂ 1,5:1
02-019-164(n.º 2-2)	Sacarosa al 2 % (F16)	0,45	Aceite de Si:MeCl ₂ 1,5:1
02-030-08(n.º 2-3)	Sacarosa al 2 % (F16)	0,80	Aceite de Si:MeCl ₂ 1:1
02-030-01(n.º 2-4)	Sacarosa al 2 % (F16)	1,0	Aceite de Si:MeCl ₂ 1:1
02-030-04(n.º 2-5)	Sacarosa al 2 % (F16)	1,1	Aceite de Si:MeCl ₂ 1:1
02-019-136(n.º 3-1)	Sacarosa al 2 %, AS al 0,5 % (F14)	1,3	Medio de inactivación 50:50
02-019-115(n.º 3-2)	Sacarosa al 2 %, AS al 0,5 % (F14)	2,2	Aceite de Si:MeCl ₂ 1,5:1
02-019-170(n.º 4)	Sacarosa al 0 %, AS al 0,5%	3,8	Aceite de Si:MeCl ₂ 1,5:1
02-019-133A(n.º 3-3)	Sacarosa al 2 %, AS al 0,5 % (F14)	12,7	Medio de inactivación de heptano al 100 %
02-019-185(n.º 5) (carga de fármaco 5 %)	Sacarosa al 2 % (F17)	0,5	Carga de fármaco 5 %, Aceite de Si:MeCl ₂ 1,5:1
02-019-64(n.º 3-4)	Sacarosa al 2 %, AS al 0,5 % (F14)	0,5	Aceite de Si:MeCl ₂ 1,5:1
02-019-10(n.º 3-5)	Sacarosa al 2 %, AS al 0,5 % (F14)	1,30	Aceite de Si:MeCl ₂ 1:1
02-001-196(n.º 3-6)	Sacarosa al 2 %, AS al 0,5 % (F14)	2,70	Aceite de Si:MeCl ₂ 1:1
02-019-24(n.º 3-7)	Sacarosa al 2 %, AS al 0,5 % (F14)	6,70	Aceite de Si:MeCl ₂ 1:1
*TODAS LAS FORMULACIONES TENÍAN CARGA DE FÁRMACO DEL 3 % CON LA EXCEPCIÓN DEL N.º 5			

10 POROSIDAD

El volumen de intrusión total obtenido de la porosimetría de intrusión de mercurio y los diámetros de poros promedio calculados se proporcionan en la TABLA 2. La relación entre el diámetro de poro promedio y la liberación *in vitro* se muestra en la FIG. 1-

15

TABLA 2

N.º de lote	Volumen de poros total (ml/g)	Estallido <i>in vitro</i> (%)	Diámetro de poro promedio (mm)
02-019-147(n.º 1)	0,033	0,40	0,0068
02-019-167(n.º 2)	0,035	0,40	0,0069
02-019-160(n.º 2-1)	0,037	0,44	0,0070
02-019-164(n.º 2-2)	0,035	0,45	0,0070
02-030-08(n.º 2-3)	0,036	0,80	0,0070
02-030-01(n.º 2-4)	0,038	1,0	0,0073
02-030-04(n.º 2-5)	0,039	1,1	0,0074
02-019-136(n.º 3-1)	0,041	1,3	0,0073
02-019-115(n.º 3-2)	0,039	2,2	0,0078
02-019-170(n.º 4)	0,067	3,8	0,0125
02-019-133A(n.º 3-3)	0,513	12,7	0,0277

02-019-64(n.º 3-4)	0,030	0,5	0,0060
02-019-10(n.º 3-5)	0,060	1,30	0,0090
02-001-196(n.º 3-6)	0,060	2,70	0,0100
02-019-24(n.º 3-7)	0,180	6,70	0,0170

La FIG. 1 muestra el efecto del sulfato de amonio en la liberación inicial *in vitro*. Los datos indican que la liberación inicial *in vitro* está correlacionada con el diámetro de poro de la micropartícula. Las formulaciones hechas con sulfato de amonio mostraron diversos niveles de liberación *in vitro* y porosidad variable a diferencia de las formulaciones sin sulfato de amonio que mostraron porosidad y liberación uniformes. Durante la fabricación de micropartículas la presencia de sulfato de amonio en la fase acuosa puede precipitar la sustancia farmacológica durante la preparación de la emulsión interna. Las diferencias en el microambiente de los precipitados pueden contribuir a las diferencias en la porosidad y por lo tanto la variación en la liberación inicial. El efecto no se observó en formulaciones preparadas sin sulfato de amonio. Las formulaciones con sacarosa y exendina-4 muestran un nivel más deseable y uniforme de liberación inicial en comparación con formulaciones que tienen exendina-4, sacarosa y sulfato de amonio.

La FIG. 2 demuestra además el efecto de la porosidad en la liberación *in vitro* y la influencia que las condiciones de procesamiento, concretamente la relación de aceite de silicona con respecto a cloruro de metileno, tiene en la porosidad de las micropartículas formadas. En resumen, las formulaciones de micropartículas preparadas usando una relación de aceite de silicona con respecto a cloruro de metileno de 1:1 (Formulaciones 2-4 y 2-5 de la Tabla 1) tienen una liberación inicial mayor que las mismas formulaciones preparadas usando una relación de aceite de silicona con respecto a cloruro de metileno de 1,5:1 (Formulaciones 2, 2-1 y 2-2 de la Tabla 1). La FIG. 2 sugiere que una relación mayor de aceite de silicona con respecto a cloruro de metileno da como resultado una porosidad menor que da como resultado una liberación inicial menor.

MEB CRIOGÉNICA

Se realizó análisis de MEB criogénica como se ha descrito anteriormente en Formulaciones de los Tipos 2, 3 y 5 de la Tabla 1. Las FIG. 3A-3B son exploraciones de microfotografías para formulaciones seleccionadas de Tipo 2 (Formulación 2-2, FIG. 3A) y de Tipo 5 (exendina-4 al 5 %, sacarosa al 2 %, FIG. 3B). Las FIG. 4A-D son exploraciones de microfotografías para las Formulaciones 3-4, 3-5, 3-6 y 3-7, respectivamente de la Tabla 1. De nuevo la variación de la porosidad mostrada con el uso de sulfato de amonio que puede contribuir a la variabilidad en la liberación inicial, puede verse en las secciones transversales de MEB de las FIG. 4A-D.

NIVELES DE DISOLVENTES RESIDUALES

El nivel de disolventes residuales en una formulación dada puede influir en la Tg de la formulación. Se determinaron los niveles de disolventes residuales para formulaciones de micropartículas de los Tipos 2 y 5 de la Tabla 1. Se usó un único método para cuantificación de heptano, etanol y cloruro de metileno. El equipamiento consistió en un cromatógrafo de gases HP 5890 Serie 2 con una columna Rtx de 1301, 30 m x 0,53 mm. Se disolvieron aproximadamente 130 mg de micropartículas en 10 ml de N,N-dimetilformamida. Como el patrón interno se usó acetato de propilo. La preparación de muestras se ajustó de modo que pudieran cuantificarse concentraciones de cloruro de metileno tan bajas como 0,03 %.

La FIG. 5 es una representación del % de etanol y cloruro de metileno residual para formulaciones de los Tipos 2 y 5 de la Tabla 1 (exendina-4 al 3 o 5 %, sacarosa al 2 %). La FIG. 5 muestra que la Tg se reduce a medida que aumenta la cantidad de disolvente residual.

PREPARACIÓN DE MICROPARTÍCULAS QUE TIENEN EXENDINA-4 AL 3 % Y SACAROSA AL 2 %

A la vista de la variación en la porosidad introducida por la presencia de sulfato de amonio en las formulaciones de micropartículas y la identificación de la porosidad como una característica que influye significativamente en la liberación inicial, no se investigó el sulfato de amonio en descubrimientos adicionales.

INFLUENCIA DEL TAMAÑO DE LAS GOTAS DE LA EMULSIÓN INTERNA

El siguiente estudio se realizó para determinar la influencia de parámetros del proceso en la formación de la emulsión interna así como la estabilidad de la emulsión resultante y liberación *in vitro* a las 24 horas resultante de microesferas producidas usando los diferentes parámetros del proceso. Se formaron emulsiones internas de la fase acuosa y la fase de disolvente mediante ultrasonidos como se ha descrito anteriormente para la escala de 100 g u homogeneización usando un homogeneizador MT5000 con un generador 36/4 (Kinematica AG, Suiza) a una velocidad baja (10.800 rpm) o velocidad alta (21.300 rpm). Después de la formación de emulsión interna por las diferentes técnicas, las emulsiones se mantuvieron en el reactor con agitación suave con un agitador superior durante 5, 15 o 60 minutos antes de retirarse una alícuota. Después de los tiempos de mantenimiento designados, la

emulsión interna se procesó adicionalmente como se ha descrito anteriormente en micropartículas y después se determinó la liberación *in vitro* a las 24 horas para cada lote como se describe posteriormente.

La caracterización del tamaño de las gotas de la emulsión interna puede determinarse usando el analizador de tamaño de partículas Horiba

Se extrajo una alícuota de la emulsión interna del reactor usando una pipeta de vidrio. Usando una pipeta de transferencia, se añadieron -30 gotas de la emulsión interna a ~10 ml de solución de polímero PLG 4A 50:50 Medisorb® 6 % en un vial de centelleo de tapón a rosca de 20 cm³ seguido de mezclado. La solución de polímero PLG 4A 50:50 Medisorb® 6 % también actuó como la solución de blanco de referencia. Después se transfirieron aproximadamente 9 ml de esta muestra de emulsión diluida a un portamuestras Horiba de 10 ml. Se colocó una tapadera en el portamuestras para evitar la evaporación rápida del disolvente polimérico. La muestra preparada estaba dentro del intervalo de % de lectura de transmisión aceptable de 0,65 % - 0,90 % según la barra azul (lámpara). Se seleccionó un ajuste de índice refractario relativo de 0,94-0,00i en la preparación del programa. Después se midió la muestra mediante un analizador de tamaño de partículas Horiba tal como el modelo LA 910 para el tamaño de las gotas. Los datos correlacionados con los parámetros del proceso y el tamaño de la emulsión interna obtenido durante los tiempos de mantenimiento de 5, 15 y 60 minutos así como los resultados de liberación *in vitro* a las 24 horas resultantes (entre paréntesis) se muestran en la Figura 9.

CARACTERIZACIÓN DE MICROESFERAS

Las microesferas de exendina-4 se caracterizaron de forma rutinaria con respecto a contenido farmacológico, tamaño de partícula, disolventes residuales, liberación *in vitro* inicial y características PK en ratas. El fármaco se extrajo para obtener una evaluación preliminar de la postencapsulación de pureza de exendina-4 en lotes seleccionados.

LIBERACIÓN INICIAL *IN VITRO*

La liberación inicial de exendina-4 se determinó midiendo la concentración de exendina-4 después de 1 hora en tampón de liberación (HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4). Se colocaron 1506,5 mg de microesferas en 5,0 ml de HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, tampón de pH 7,4 a temperatura ambiente, se agitaron vorticialmente durante aproximadamente 30 segundos para suspender la solución y después se colocaron en una cámara de aire a 37 °C durante 1 hora. Después de 1 hora, las muestras se retiraron de la cámara y se invirtieron varias veces para mezclar, seguido de centrifugación a 3500 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se retiró y se analizó inmediatamente mediante HPLC usando las siguientes condiciones: Columna: TSK-GEL®, 7,8 mm x 30 cm, 5 m (TSOH BIOSEP PARTE n.º08540); Temperatura del horno de columna: Ambiente; Temperatura del automuestreador: 6 °C; Caudal: 0,8 ml/minuto; Detección: 280 nm; Volumen de inyección: 10 l; Fase móvil: Acetonitrilo 35 %/Agua 65 % con TFA 0,1 %/litro (v/v); Tiempo de ejecución: Aproximadamente 20 minutos. Se usó sustancia farmacológica a granel exendina-4, 0,2 mg/ml preparada en tampón de acetato 30 mM, pH 4,5, como patrón.

ESTUDIOS ANIMALES

Todos los estudios farmacocinéticos (PK) descritos en el presente documento se realizaron en ratas Sprague-Dawley que pesaban aproximadamente 500±50 g.

Para caracterización PK de las formulaciones de micropartículas, cada animal recibió una inyección subcutánea de micropartículas suspendidas en diluyente (carboximetilcelulosa 3 %, NaCl 0,9 %, Tween 20 0,1 %) en la región interescapular. En general, la dosis fue de aproximadamente 1,0 mg de exendina-4 por rata en un volumen de inyección de 0,75 ml. Se recogieron muestras de sangre mediante la vena lateral de la cola a 0,5, 2, 4, 6, 10, 24 horas, y 2, 4, 7, 10, 14, 17, 21, 24 y 28 días después de la dosis. Las muestras sanguíneas se colocaron inmediatamente en tubos MICROTAINER® que contenían EDTA y se centrifugaron a aproximadamente 14.000 X g durante aproximadamente dos minutos. El plasma se transfirió después a tubos MICROTAINER® sin aditivo y se almacenó a -70 °C hasta el momento del ensayo. Se usó IRMA para determinar las concentraciones de exendina en plasma.

LIBERACIÓN *IN VIVO*-IRMA

El método para cuantificar exendina-4 en plasma es un inmunoensayo de tipo sándwich, con el analito capturado por un anticuerpo monoclonal de fase sólida EXE4:2-8,4 y detectado por el anticuerpo monoclonal radioyodado GLP-1:3-3. Los recuentos unidos se cuantifican a partir de una curva de calibración convencional. Este ensayo es específico para exendina-4 de longitud completa o intacta y no detecta exendina-4 (3-39). Un intervalo de curva patrón típico es de 30 pg/ml a 2000 pg/ml dependiendo de la edad del anticuerpo indicador.

LIBERACIÓN *IN VITRO* E *IN VIVO*

Las formulaciones 2, 2-1 y 2-2 (exendina-4 al 3 % y sacarosa al 2 %) se ensayaron con respecto a liberación inicial *in vitro* como se ha descrito anteriormente. La liberación *in vitro* fue de 0,4 %, 0,4% y 0,5%, respectivamente. Los tres lotes también tuvieron una liberación inicial *in vivo* relativamente baja de 1154 a 1555 pg/ml para $C_{m\acute{a}x}$ de 0-1 días. La FIG. 6 es una curva farmacocinética representativa para las formulaciones que tienen exendina-4 al 3 % y sacarosa al 2 % (2-1) y también para exendina-4 al 3 % solamente (1) y exendina-4 al 3 % y sulfato de amonio al 0,5 % (4). Se usó una relación de aceite de silicona con respecto a cloruro de metileno de 1,5:1 y la viscosidad del aceite de silicona fue de 350 cs.

A partir de la FIG. 6 se puede ver que las formulaciones que no contienen sulfato de amonio muestran una liberación inicial más baja. Aunque la formulación que tiene exendina-4 solamente mostró una liberación inicial adecuada se redujo la pureza postencapsulación del fármaco en comparación con la formulación que tiene la exendina-4 en combinación con la sacarosa. La adición de azúcar en las formulaciones reduce la degradación del agente.

El perfil de liberación *in vivo* para las tres formulaciones 2, 2-1 y 2-2 comparadas anteriormente, se muestra en la FIG. 7. Los tres lotes mostraron una liberación inicial relativamente baja seguida de un "valle" (niveles bajos en suero entre aproximadamente el día 4 y el día 17), seguido de una liberación sostenida durante de aproximadamente el día 21 al día 28. La liberación inicial baja y la forma del perfil de liberación fueron coherentes para las tres formulaciones.

FORMULACIÓN USANDO UNA RELACIÓN 1:1 DE ACEITE DE SILICONA CON RESPECTO A CLORURO DE METILENO

Las formulaciones 2-3, 2-4 y 2-5 de la Tabla 1 (exendina-4 al 3 %, sacarosa al 2 %) se prepararon usando una relación 1:1 de aceite de silicona con respecto a cloruro de metileno. La liberación inicial fue mayor para estas formulaciones que para las formulaciones 2, 2-1 y 2-2 de la Tabla 1 (exendina-4 al 3 %, sacarosa al 2 % con una relación de silicona con respecto a cloruro de metileno 1,5:1). Específicamente las formulaciones de relación 1,5:1 proporcionaron una liberación inicial promedio de aproximadamente 0,4 %, mientras que las formulaciones de relación 1:1 proporcionaron una liberación inicial promedio de aproximadamente 1,0 %. Se observó la misma tendencia *in vivo* con $C_{m\acute{a}x}$ de 0-1 días en ratas de 2288 ± 520 pg/ml para una relación 1:1, mientras que la $C_{m\acute{a}x}$ de 0-1 días en ratas fue de 1300 ± 221 pg/ml para la relación 1,5:1.

CARGA DE FÁRMACO AUMENTADA

El aumento de carga de exendina-4 a 4 % manteniendo al mismo tiempo la sacarosa al 2 % dio como resultado una liberación inicial *in vitro* e *in vivo* en el mismo intervalo que para la carga del 3 %.

Se prepararon tres formulaciones de Tipo 5 de la Tabla 1 (carga de fármaco 5 %, sacarosa al 2 %, relación de aceite de silicona con respecto a cloruro de metileno 1,5:1). Los tres lotes, 5-1, 5-2 y 5-3 mostraron todos una liberación inicial *in vitro* baja de 0,2 a 0,5 %. De manera similar, la $C_{m\acute{a}x}$ *in vivo* de las formulaciones fue uniformemente baja variando de 467 pg/ml a 1267 pg/ml. La FIG. 8 muestra un gráfico de los datos farmacocinéticos para los tres lotes ensayados. En comparación con el comportamiento de la formulación de exendina-4 al 3 % que tiene sacarosa al 2 %, las formulaciones al 5 % mostraron niveles del fármaco en suero mayores durante aproximadamente el día 1 y el día 2. El resto del perfil para las formulaciones al 5 % fue similar a las formulaciones al 3 % que tiene un valle seguido de la liberación de fármaco principalmente durante el día 21 al día 28.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para preparar una composición farmacéuticamente aceptable en forma de micropartículas para la liberación sostenida de exendina-4, que comprende:

- 5
- a) formar una mezcla combinando una fase acuosa que comprende polipéptido de exendina-4 hidrosoluble y sacarosa, con una fase oleosa que comprende un polímero biocompatible y un disolvente para el polímero biocompatible;
 - 10 b) formar una emulsión de agua en aceite de la mezcla de la etapa a), en donde el tamaño de las gotas de la emulsión interna es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1,2 micrómetros;
 - c) añadir un agente de coacervación a la mezcla para formar micropartículas embrionarias, en donde el agente de coacervación es aceite de silicona añadido en una cantidad suficiente para conseguir una relación de aceite de silicona con respecto a disolvente polimérico de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1,5:1;
 - 15 d) transferir las micropartículas embrionarias a un disolvente inactivador para endurecer las micropartículas embrionarias para formar micropartículas endurecidas;
 - e) recoger las micropartículas endurecidas; y
 - f) secar las micropartículas endurecidas,

20 en donde la composición tiene una relación $C_{\text{máx}}$ con respecto a C_{pro} de aproximadamente 3 o menos, y el volumen total de los poros de la composición es de aproximadamente 0,1 ml/g o menos; y en donde la composición está exenta de tampón, sales de precipitación y excipientes adicionales que aumenten o reduzcan la velocidad de liberación del polipéptido biológicamente activo de la composición.

25 2. El proceso de la reivindicación 1, en donde en la etapa b), el tamaño de las gotas de la emulsión interna es de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,4 micrómetros.

30 3. El proceso de la reivindicación 1, en donde la exendina-4 está presente en la composición en una cantidad de aproximadamente 3 % p/p, aproximadamente 5 % p/p o aproximadamente 10 % p/p del peso total de la composición.

35 4. El proceso de la reivindicación 1, en donde el polímero biocompatible se selecciona entre el grupo que consiste en poli(lactidas), poli(glicólidos), poli(lactida-co-glicólidos), poli(ácidos lácticos), poli(ácidos glicólicos), policarbonatos, poliesteramidas, polianhídridos, poli(aminoácidos), poliortoésteres, poli(dioxanonas), poli(alquilatos de aquileno), copolímeros de polietilenglicol y poliortoéster, poliuretanos biodegradables, mezclas de los mismos y copolímeros de los mismos.

5. El proceso de la reivindicación 1, en donde el polímero biocompatible es polímero DL PLG 4A 50:50 que tiene una viscosidad inherente de entre aproximadamente 0,3 y aproximadamente 0,5 dl/g.

40 6. El proceso de la reivindicación 1, en donde en la etapa c), el aceite de silicona se añade a la emulsión de agua en aceite en de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 5 minutos, y la mezcla de coacervación se mantiene durante menos de o aproximadamente 1 minuto.

45 7. El proceso de la reivindicación 1, en donde en la etapa d), la relación del disolvente inactivador con respecto al disolvente para el polímero biocompatible es 16:1 (v/v), el disolvente inactivador es una mezcla de heptano/etanol, el disolvente para el polímero biocompatible es cloruro de metileno y el tiempo de transferencia es de menos de o aproximadamente 3 minutos.

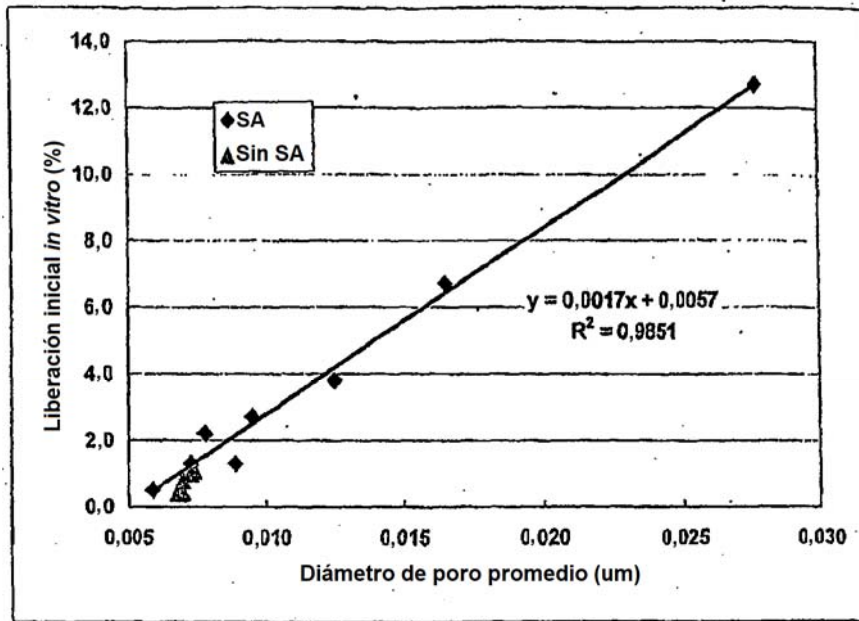


FIG. 1

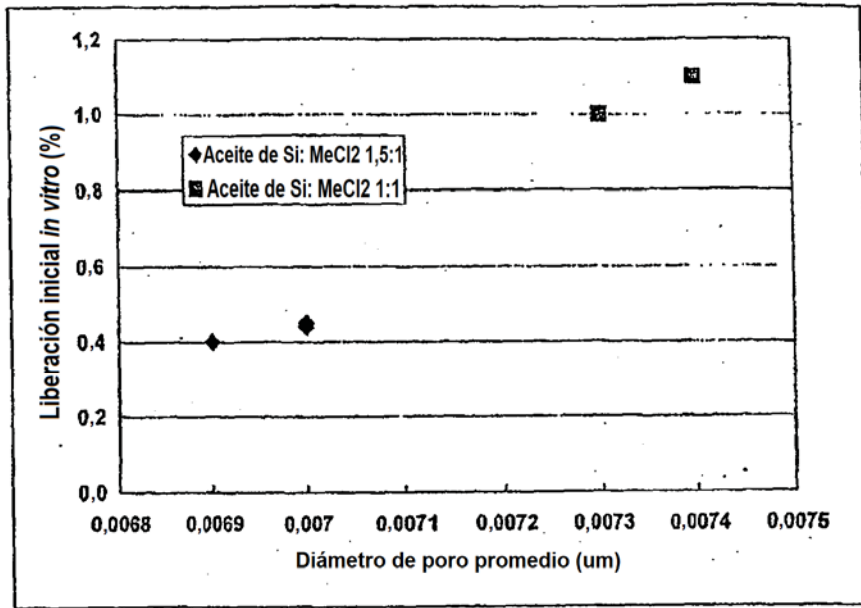


FIG. 2



FIG. 3A

FIG. 3B



FIG. 4A

FIG. 4B

FIG. 4C

FIG. 4D

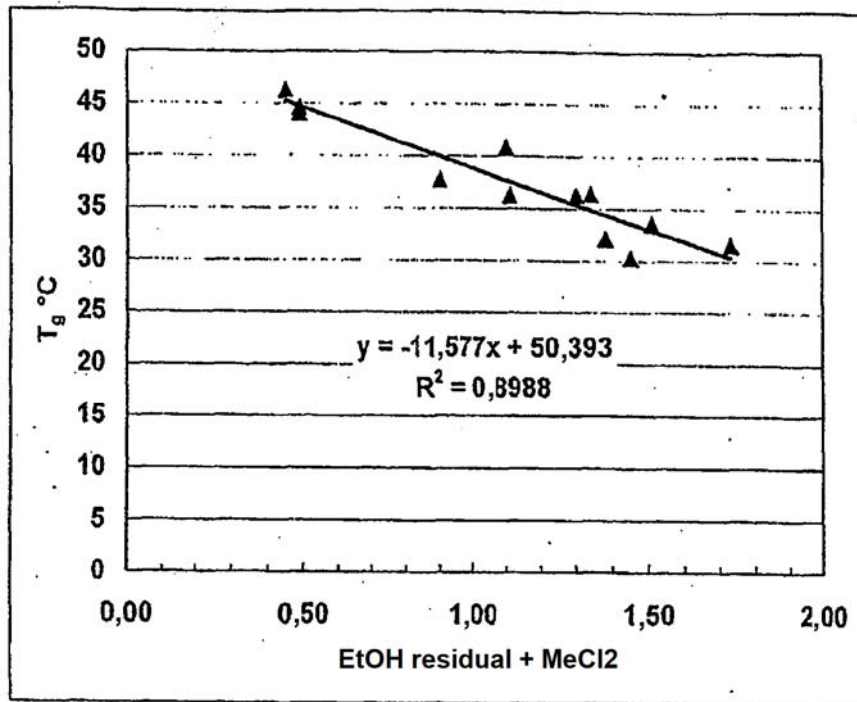


FIG. 5

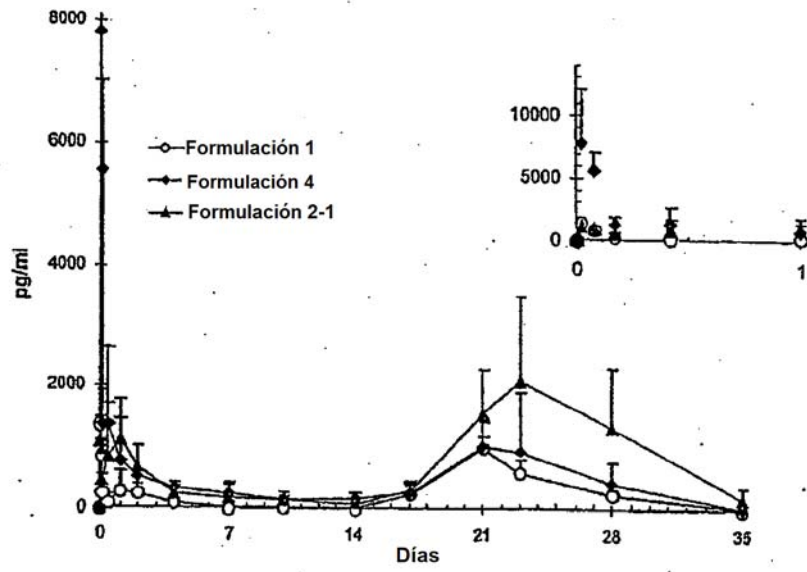


FIG. 6

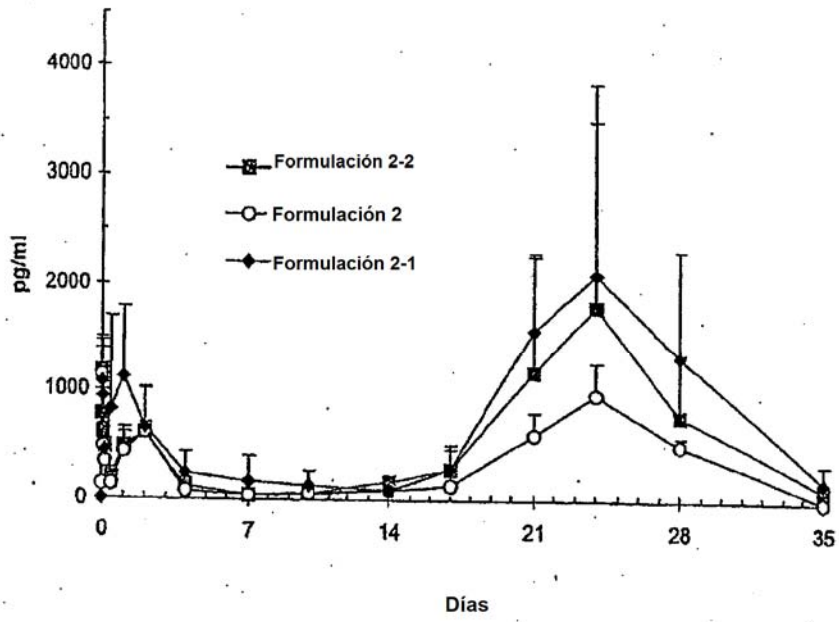


FIG. 7.

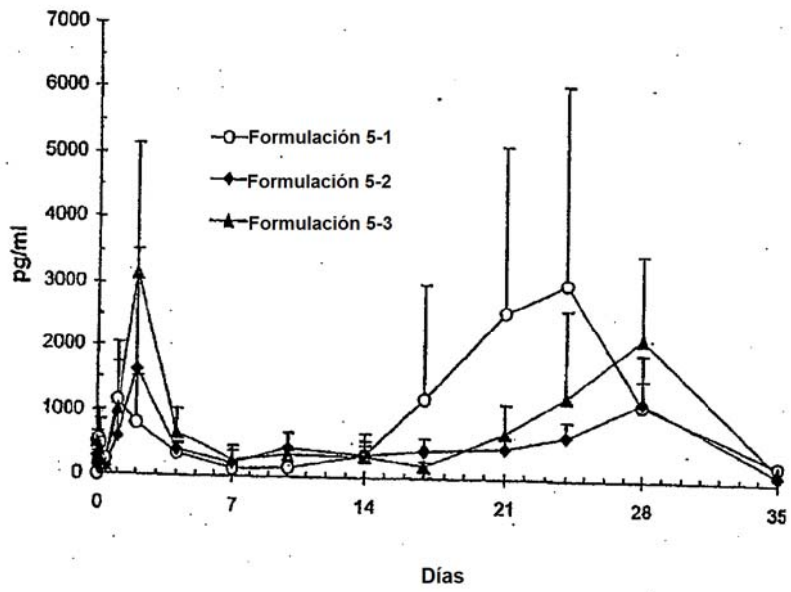


FIG. 8

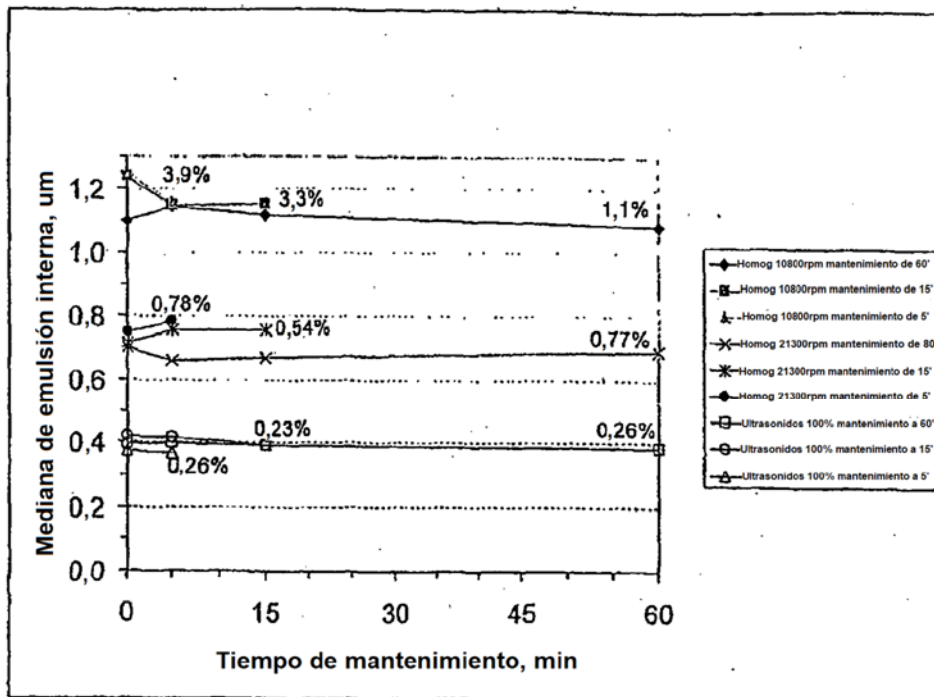


FIG. 9

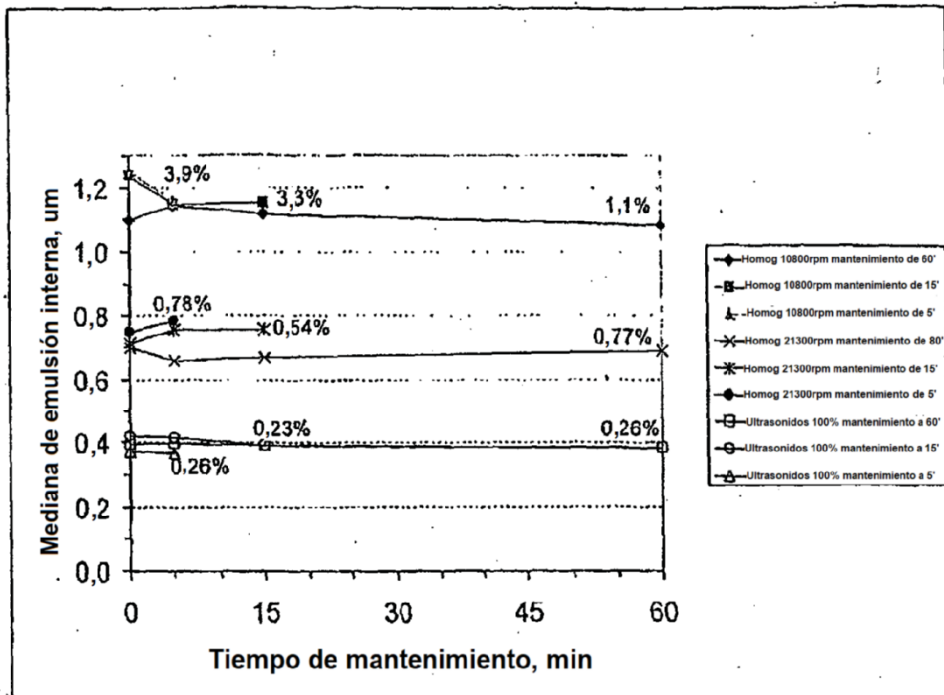


FIG. 9