



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 307 650**

51 Int. Cl.:

C08B 30/12 (2006.01)

C08B 30/20 (2006.01)

A61K 47/36 (2006.01)

A61K 9/16 (2006.01)

A61K 9/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01975098 .3**

96 Fecha de presentación : **05.10.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1325034**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.07.2003**

54

Título: **Almidón farmacéuticamente aceptable y su procedimiento de fabricación.**

30

Prioridad: **06.10.2000 SE 0003616**
08.01.2001 US 260491 P

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2008

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2008

73

Titular/es: **Pacira Pharmaceuticals Inc.**
10450 Science Centre Drive
San Diego, California 92121, US

72

Inventor/es: **Gustafsson, Nils, Ove;**
Berden, Per;
Jönsson, Monica;
Laakso, Timo y
Reslow, Mats

74

Agente: **Sugrañes Moliné, Pedro**

ES 2 307 650 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

Almidón farmacéuticamente aceptable y su procedimiento de fabricación.

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a almidón de una calidad tal que es farmacéuticamente aceptable para administración parenteral a un mamífero, especialmente a un ser humano. En particular, dicho almidón se puede usar para la producción de micropartículas que contienen una sustancia biológicamente activa para la liberación controlada de la misma.

Antecedentes de la invención

Muchos fármacos han de administrarse por vía parenteral, en particular mediante inyección, dado que están sometidos a degradación o se absorben de forma insuficiente cuando se dan, por ejemplo, por vía oral, nasal o rectal. Una preparación de fármaco diseñada para uso parenteral tiene que cumplir una serie de requisitos con el fin de que sea aprobada por las autoridades reguladoras para su uso en seres humanos. Por lo tanto, debe ser biocompatible y biodegradable y todas las sustancias usadas y sus productos de degradación deben ser no tóxicos. Además, las preparaciones de fármacos particulados diseñados para inyecciones tienen que ser lo suficientemente pequeños para pasar a través de la aguja de inyección, lo cual significa preferiblemente que deben ser menores de 200 μm . El fármaco no debe degradarse en la preparación en gran medida durante la producción o almacenamiento de la misma o después de la administración y debe ser liberado en una forma biológicamente activa con cinética reproducible.

Una clase de polímeros que cumple los requisitos de biocompatibilidad y biodegradación en productos finales inofensivos son los poliésteres lineales basados en ácido láctico, ácido glicólico y mezclas de los mismos. Estos polímeros se denominarán en lo sucesivo también en el presente documento PLGA. PLGA se degrada mediante hidrólisis de éster en ácido láctico y ácido glicólico y se ha demostrado que posee excelente biocompatibilidad. La naturaleza inocua de PLGA puede ejemplificarse además por la aprobación por parte de las autoridades reguladoras, incluyendo la administración para alimentos y fármacos de EE.UU. de varias preparaciones parenterales de liberación retardada basadas en estos polímeros.

Los productos de liberación retardada administrables por vía parenteral actualmente en el mercado y basados en PLGA incluyen DecapeptylTM (Ibsen Biotech), Prostap SRTM (Lederle), Decapeptyl[®] Depot (Ferring) y Zoladex[®] (Zeneca). Los fármacos en estas preparaciones son todos péptidos. En otras palabras, consisten en aminoácidos condensados en un polímero que tiene un grado de polimerización relativamente bajo y no tienen ninguna estructura tridimensional bien definida. Esto por su parte normalmente permite el uso de condiciones relativamente duras durante la producción de estos productos. Por ejemplo, se pueden utilizar extrusión y posterior reducción de tamaño, técnicas que probablemente no estarían permitidas en relación a proteínas, dado que estas, en términos generales, no soportan tales condiciones estrictas.

Como consecuencia, también existe una necesidad de preparaciones de liberación controlada para proteínas. Las proteínas son similares a los péptidos en el sentido de que también están constituidas por aminoácidos, pero las moléculas son mayores y la mayoría de las proteínas son dependientes de una estructura tridimensional bien definida en lo que respecta a muchas de sus propiedades, incluyendo la actividad biológica e inmunogenicidad. Su estructura tridimensional se puede destruir de forma relativamente fácil, por ejemplo por altas temperaturas, desnaturalización inducida por superficie y, en muchos casos, exposición a disolventes orgánicos. Un inconveniente muy importante relacionado con el uso de PLGA, que es un material excelente en sí mismo, para la liberación retardada de proteínas es por lo tanto la necesidad de usar disolventes orgánicos para disolver dicho PLGA, con el riesgo que conlleva que la estabilidad de la proteína quede comprometida y que se corra el riesgo de cambios conformacionales en la proteína que conduzcan a una reacción inmunológica en el paciente, lo que puede producir tanto una pérdida de efecto terapéutico mediante la formación de anticuerpos inhibidores como efectos secundarios tóxicos. Dado que es extremadamente difícil determinar con certeza si una proteína compleja ha conservado su estructura tridimensional a todos los efectos, es muy importante evitar exponer la proteína a condiciones que puedan inducir cambios conformacionales.

A pesar de intensos esfuerzos dirigidos a modificar la tecnología de PLGA con el fin de evitar este problema inherente de la inestabilidad de las proteínas durante el proceso de producción, el progreso en este campo ha sido muy lento, siendo probablemente la principal razón que las estructuras tridimensionales de la mayoría de las proteínas son demasiado sensibles para resistir las condiciones de fabricación usadas y el ambiente químico ácido formado con la degradación de matrices de PLGA. La bibliografía científica contiene un gran número de descripciones de problemas de estabilidad en la fabricación de microesferas de PLGA debido a la exposición a disolventes orgánicos. Como un ejemplo del ambiente ácido que se forma tras la degradación de matrices de PLGA, se ha demostrado recientemente que el valor de pH en una microesfera de PLGA que tiene un diámetro de aproximadamente 40 μm cae hasta 1,5, que es completamente suficiente para desnaturalizar o dañar de otra forma muchas proteínas terapéuticamente útiles (Fu y col., Visual Evidence of Acidic Environment Within Degrading Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) Microspheres, Pharmaceutical Research, Vol. 17, N° 1, 2000, 100-106). Si las microesferas tienen un diámetro mayor, puede esperarse que el valor de pH caiga más, debido al hecho de que los productos ácidos de degradación tienen más dificultad para alejarse por difusión y la reacción autocatalítica se intensifica.

ES 2 307 650 T3

Se han descrito una serie de intentos para resolver problemas causados por la exposición de la sustancia biológicamente activa a un entorno químico ácido durante la biodegradación de la matriz de microesfera y disolventes orgánicos en el proceso de fabricación. Con el fin de evitar un entorno ácido durante la degradación, se han hecho intentos para sustituir PLGA como la matriz para las microesferas por un polímero que produzca productos de degradación químicamente neutros y con el fin de evitar exponer la sustancia biológicamente activa a disolventes orgánicos, también se ha intentado fabricar las microesferas de antemano y, sólo después de que se hayan procesado y secado, cargarlas con la sustancia biológicamente activa, o se han hecho intentos para excluir o limitar el disolvente orgánico durante la fabricación de las microesferas.

A modo de ejemplo, se ha modificado covalentemente almidón altamente ramificado de relativamente bajo peso molecular (maltodextrina, peso molecular medio aproximadamente 5.000 Da) con grupos acrílico para la conversión de este almidón en una forma que se puede solidificar en microesferas y el poliacrilalmidón obtenido se ha convertido en forma particulada mediante polimerización de radicales en una emulsión con tolueno/cloroformo (4:1) como la fase externa (Characterization of Polyacryl Starch Microparticles as Carriers for Proteins and Drugs, Artursson y col., J. Pharm. Sci., 73, 1507-1513, 1984). Se pudo atrapar proteínas en estas microesferas, pero las condiciones de fabricación exponen la sustancia biológicamente activa tanto a disolventes orgánicos como a altas fuerzas de cizalladura en la fabricación de la emulsión. Las microesferas obtenidas se disuelven enzimáticamente y se puede esperar que el pH se mantenga neutro. Las microesferas obtenidas no son adecuadas para administración parenteral, especialmente administraciones repetidas, por una serie de razones. La más importante de todas ellas es la incompleta y muy lenta biodegradabilidad tanto de la matriz de almidón (Biodegradable Microspheres IV. Factors Affecting the Distribution and Degradation of Polyacryl Starch Microparticles, Laakso y col., J. Pharma. Sci. 75, 962-967, 1986) como de la cadena de polímero sintética que reticula las moléculas de almidón (Stjärnkvist P., Laakso T. y Sjöholm I. (1989) Biodegradable microspheres. XII: Properties of the crosslinking chains in polyacryl starch microparticles, J. Pharm. Sci. 78, 52-56). Además, estas microesferas son demasiado pequeñas, $<2 \mu\text{m}$ de diámetro, para ser adecuadas para su inyección en los tejidos para liberación sostenida, dado que los macrófagos tisulares pueden fagocitarlas fácilmente. Los intentos para aumentar la velocidad de degradación y el grado de degradación introduciendo un grupo éster potencialmente degradable con el fin de unir los grupos acrílico al almidón altamente ramificado no consiguieron producir el resultado pretendido e incluso estas microesferas de poliacrilalmidón fueron degradadas demasiado lenta incompletamente a lo largo de periodos de tiempo razonables (BIODEGRADABLE MICROSPHERES: Some Properties of Polyacryl Starch Microparticles Prepared from Acrylic Acid Esterified Starch, Laakso y Sjöholm, 1987 (76), pp. 935-939, J. Pharm. Sci.).

Se ha descrito la fabricación de microesferas de almidón con el uso de almidón no modificado químicamente usando un aceite como la fase exterior (documento US 4.713.249; Schröder, U., Crystallized carbohydrate spheres for show release and targeting, Methods enzymol, 1985 (112), 116-128; Schröder, Crystallized carbohydrate spheres as a show release matrix for biologically active substances, Bio-materials 5:100-104, 1984). Las microesferas se solidifican en estos casos mediante precipitación en acetona, lo cual conduce tanto a la exposición de la sustancia biológicamente activa a un disolvente orgánico como a la no utilización durante el proceso de fabricación, de la tendencia natural del almidón a solidificar mediante reticulación física. Esto conduce por su parte a que las microesferas tengan inestabilidad inherente, dado que el almidón, después de su resuspensión en agua y tras la exposición a fluidos corporales, tenderá a formar tales reticulaciones. Con el fin de obtener una emulsión de agua en aceite de este tipo, se requieren altas fuerzas de cizalladura y las microesferas que se forman son demasiado pequeñas para ser adecuadas para la liberación sostenida parenteral.

El documento EP213303 A2 describe la producción de microesferas de, entre otros, almidón no modificado químicamente en sistemas acuosos de dos fases, utilizando la capacidad natural del almidón para solidificarse mediante la formación de reticulaciones físicas, y la inmovilización de una sustancia en estas microesferas con el propósito de evitar la exposición de la sustancia biológicamente activa a disolventes orgánicos. La metodología descrita, en combinación con la calidad del almidón que es definida, no da origen a partículas completamente biodegradables. Las partículas obtenidas tampoco son adecuadas para su inyección, particularmente para inyecciones repetidas a lo largo de un periodo mayor, dado que la calidad del almidón descrita contiene cantidades demasiado elevadas de proteína vegetal extraña.

Ese almidón es, en teoría, un material de matriz muy adecuado, quizá incluso ideal para micropartículas que se conoce desde hace mucho tiempo dado que el almidón no necesita disolverse en disolventes orgánicos y tiene una tendencia natural a solidificar y, dado que hay enzimas en el interior del cuerpo que pueden degradar el almidón en sustancias endógenas y neutrales, en última instancia glucosa, y dado que el almidón, presumiblemente debido a la similitud con glucógeno endógeno, se ha demostrado que no es inmunogénico. A pesar de los intensos esfuerzos, no se ha descrito previamente ningún almidón que tenga propiedades que permiten la fabricación de micropartículas adecuadas para el uso parenteral y condiciones que permitan la fabricación de micropartículas completamente biodegradables en condiciones suaves que permiten atrapar sustancias sensibles biológicamente activas, tales como proteínas.

Los gránulos de almidón a partir de glucosa natural contienen impurezas, tales como proteínas de almidón, que los hace inadecuados para la administración parenteral. En el caso de deposición no intencionada de almidón insuficientemente purificado, tal como puede ocurrir en operaciones en las que se pulverizan muchos tipos de guantes de operación con gránulos de almidón estabilizado, pueden surgir efectos secundarios muy graves. Los gránulos de almidón tampoco son adecuados intrínsecamente para administraciones parenterales repetidas, debido a que no son completamente biodegradables dentro de intervalos de tiempo aceptables.

Se han usado microesferas de almidón hechas de almidón hidrolizado en ácido y purificado para la administración parenteral a seres humanos. Las microesferas se hicieron mediante reticulación química con epíclorohidrina en condiciones fuertemente alcalinas. La modificación química que adquirió el almidón conduce a biodegradabilidad reducida, de forma que las microesferas pueden disolverse completamente mediante enzimas endógenas, tales como α -amilasa, pero no convertirse completamente en glucosa como producto final. Ni el procedimiento de fabricación ni las microesferas obtenidas son adecuadas para la inmovilización de proteínas sensibles, ni tal almidón hidrolizado en ácido, que se basa esencialmente en amilasa hidrolizada, es adecuado para producir microesferas de almidón completamente biodegradables ni microesferas de almidón que contengan una alta carga de una sustancia biológicamente activa, tal como una proteína.

Se administra hidroxietilalmidón (HEA) por vía parenteral a seres humanos en dosis altas como un sustituto de plasma. Se produce HEA mediante gránulos de almidón a partir de almidón constituido casi exclusivamente por amilopectina altamente ramificada, el llamado "maíz ceroso", hidrolizándose en ácido con el fin de reducir el peso molecular e hidroxietilándose a continuación en condiciones alcalinas e hidrolizándose en ácido una vez más para alcanzar un peso molecular medio de aproximadamente 200.000 Da. Después de esto, se llevan a cabo filtración, extracción con acetona y secado por pulverización. El propósito de la hidroxietilación es prolongar la duración del efecto, dado que la amilopectina no modificada es degradada muy rápidamente por la α -amilasa y su tiempo de permanencia en la circulación es de aproximadamente 10 minutos. El HEA no es adecuado para la producción de microesferas completamente biodegradables que contienen una sustancia biológicamente activa, dado que la modificación química conduce a una reducción considerable en la velocidad e integridad de la biodegradación y da como resultado la eliminación de la tendencia natural del almidón a solidificar mediante la formación de reticulaciones no covalentes. Además, las soluciones altamente concentradas de HEA se hacen demasiado viscosas para poder usarse para la producción de micropartículas. El uso de HEA en estas altas dosis muestra que se puede fabricar almidón que se puede usar parenteralmente, incluso aunque el HEA no se puede usar para la fabricación de microesferas sin reticulación química o precipitación con disolventes orgánicos.

El documento WO 99/00425 describe el uso de enzimas proteolíticas termorresistentes con óptimo de pH amplio para purificar gránulos de almidón de proteínas asociadas a la superficie. Los gránulos obtenidos no son adecuados para administración parenteral, dado que aún contienen las proteínas de almidón que están presentes en el interior de los gránulos y existe un riesgo de que queden residuos de las enzimas proteolíticas añadidas en los gránulos. Los gránulos tampoco son adecuados para la fabricación de microesferas de almidón administrable por vía parenteral en sistemas acuosos de dos fases, dado que no tienen la distribución de peso molecular correcta para poder usarse a una concentración suficientemente alta, incluso después de haberse disuelto, y, cuando se pueden obtener microesferas, probablemente no son completamente biodegradables.

El uso de cizalladura para modificar la distribución de peso molecular del almidón con el propósito de producir mejor almidón para la producción de comprimidos se describe en los documentos US 5.455.342 y WO 93/21008. El almidón que se obtiene no es adecuado para administración parenteral debido al alto contenido en proteínas de almidón, que pueden estar presentes en forma desnaturalizada después de la cizalladura, y el almidón obtenido tampoco es adecuado para producir microesferas de almidón biodegradable para administración parenteral o para uso en sistemas acuosos de dos fases para la producción de tales microesferas de almidón. También se ha usado cizalladura para fabricar hidroxietilalmidón, como se describe en el documento WO 96/10042. No obstante, por razones similares, tal hidroxietilalmidón tampoco es adecuado para administración parenteral o para la producción de microesferas como se menciona.

Sería por lo tanto particularmente deseable un procedimiento para la producción de preparaciones de almidón administrables por vía parenteral que tuviesen las siguientes características:

- un procedimiento por medio del cual se pueda producir un almidón esencialmente completamente biodegradable y biocompatible que sea adecuado para administrarse por vía parenteral y tras cuya degradación se formen sustancias endógenas químicamente neutrales;
- un almidón parenteralmente aceptable que sea adecuado para la producción de micropartículas de almidón sustancialmente completamente biodegradables;

Objetos como estos y otros objetos se alcanzan por medio de la invención definida a continuación.

Descripción de la invención

Según un primer aspecto de la presente invención, esta proporciona un procedimiento para la producción de un almidón farmacéuticamente aceptable como se reivindica en la reivindicación 1 a continuación.

Una aplicación especialmente relevante de un almidón de este tipo es para la producción de micropartículas de almidón administrables por vía parenteral, sustancialmente completamente biodegradables, en las que se puede incorporar una sustancia biológicamente activa con alto rendimiento y en condiciones suaves, en un sistema acuoso de dos fases, por ejemplo, tales que se conserva su actividad biológica. Se entiende principalmente que la expresión administración parenteral requiere que tales micropartículas deben tener una distribución de tamaño, pureza y biodegradabilidad adecuadas y ser biocompatibles. Se pretende que alto rendimiento signifique que el almidón debe ser

ES 2 307 650 T3

capaz de formar soluciones tan altamente concentradas que la sustancia biológicamente activa que se va a incorporar en las micropartículas de almidón formadas no pueda difundir hacia fuera en fases circundantes, o en la interfaz entre las fases en una cantidad significativa, y que la solución de almidón usada solidifica en micropartículas con la suficiente rapidez pero de una forma controlada. Ha resultado sorprendentemente que el procedimiento según la presente invención permite la producción de tal almidón.

El almidón de fuentes naturales contiene algunas impurezas que no son aceptables para administración parenteral a seres humanos, en particular varios materiales particulados, proteínas y endotoxinas. El procedimiento según la presente invención hace posible purificar el almidón de estos constituyentes que son inaceptables para uso parenteral. La dificultad con un procedimiento de este tipo es que dichos constituyentes son numerosos y su contenido puede variar dependiendo de variaciones estacionales naturales y que tienen características que difieren ampliamente, tales como solubilidad, forma física, localización, etc. Es incluso más complejo desarrollar un proceso de este tipo para la producción de un almidón que también sea adecuado para la producción de micropartículas en sistemas acuosos de dos fases y que sea aceptable para las autoridades de registro. Mediante una combinación de la elección de un almidón básico y ciertas etapas de purificación específicas, se ha probado sorprendentemente que es posible, según la presente invención, producir un almidón de este tipo.

El procedimiento según la invención consiste brevemente en tomar un almidón con un alto contenido en amilopectina, lavarlo con el fin de eliminar proteínas localizadas en la superficie, lípidos y endotoxinas, reducir el peso molecular del almidón mediante cizalladura y preferiblemente, también eliminar proteínas residuales, no localizadas al principio sobre la superficie.

De forma más precisa, el procedimiento según la presente invención comprende;

a) partir de almidón en forma sólida, especialmente partículas, por ejemplo gránulos, y con un contenido en amilopectina mayor del 85% en peso,

b) someter dicho almidón sólido a lavado(s) en condiciones tales que proteínas, lípidos y endotoxinas localizadas en la superficie sobre el almidón se disuelvan mientras que el almidón permanezca sin disolver, y separar el almidón del material disuelto,

c) provocar la disolución del almidón lavado obtenido de la etapa b) en un medio acuoso, y

d) someter a la solución de almidón a reducción de peso molecular mediante cizalladura, de forma que se obtenga una distribución de peso molecular en la que al menos el 80% del material esté en el intervalo de 10-10.000 kDa.

El almidón usado como material de partida en el procedimiento según la presente invención debe ser por lo tanto basado en gran medida en amilopectina, es decir, la proporción de amilasa debe ser pequeña. Un contenido en amilopectina especialmente preferido en este contexto es de al menos 95 por ciento en peso, más preferiblemente al menos 98 por ciento en peso, expresándose los contenidos en porcentaje en todos los casos como peso seco de almidón. Un almidón de este tipo se puede obtener comercialmente de una serie de proveedores o se puede producir por medio de procedimientos bien conocido en este campo técnico. Un almidón especialmente preferido es un almidón llamado maíz ceroso, en particular uno natural o hidrolizado en ácido. Tal almidón se procesa comercialmente a gran escala para una serie de aplicaciones, usando procedimientos bien conocidos. Un ejemplo de un almidón de maíz ceroso que se puede usar es Cerestar 04201, y un ejemplo de un almidón hidrolizado en ácido es Cerestar C* Gel 06090. Estos tipos de almidón no son adecuados para administración parenteral en sí, o para la producción de micropartículas de almidón para administración parenteral debido, entre otras cosas, a insuficiente pureza e insuficiente biodegradabilidad, pero por lo tanto se tratan según la presente invención para su procesamiento en almidón farmacéuticamente aceptable.

Se usan preferiblemente partículas de almidón o gránulos de almidón que tienen un diámetro medio en el intervalo de 5-25 μm , basándose en distribución de peso como el almidón de partida en el procedimiento según la presente invención.

Antes de someter al material de partida de almidón al lavado o lavados en la etapa b), se elimina del mismo material diferente a almidón. Esto se puede hacer de forma adecuada mediante tamizado y/o sedimentación. Se puede eliminar material mayor que las partículas de almidón en este contexto mediante tamizado en húmedo, por ejemplo, mientras que el material que es menor que las partículas de almidón se elimina mediante sedimentación, por ejemplo. Esto puede implicar de forma apropiada la eliminación de material diferente a almidón mayor que 40 μm y preferiblemente también material que es menor que 5 μm .

Si se estudia de hecho almidón en bruto bajo un microscopio óptico, se pueden observar normalmente pequeñas cantidades de material fibroso, y también se puede esperar que el material de almidón en bruto contenga residuos vegetales, arena y otras partículas de naturaleza no definida. Se pueden eliminar partículas tales como microorganismos y residuos de los mismos, que forman un sedimento más lentamente que los gránulos de almidón, por ejemplo, mediante sedimentación repetida. De esta forma es ventajoso obtener una población homogénea de partículas de almidón como material básico para las etapas de purificación adicionales, mientras se elimina al mismo tiempo el riesgo de introducir accidentalmente varios materiales particulados con un tamaño mayor que el tamaño de partícula del almidón en cuestión. El tratamiento inicial también da como resultado una mejor capacidad de filtración en etapas posteriores.

ES 2 307 650 T3

Dado que el almidón de partida es un material relativamente económico, se pueden tolerar pérdidas en esta etapa inicial con el fin de obtener de esta forma un alto grado de pureza y un procedimiento de purificación fiable. Dado que las etapas iniciales en la eliminación de material diferente de almidón también llevan tiempo y el material que se va a purificar es un buen sustrato para el crecimiento bacteriano, también es importante que los procedimientos en cuestión se lleven a cabo en condiciones que no permitan el crecimiento de microorganismo y que al mismo tiempo deben ser aceptables para la producción de un material inyectable. En este campo técnico existe un gran número de soluciones bien conocidas a este problema concreto, tal como el uso de sustancias bacteriostáticas, temperaturas que no permitan el crecimiento de microorganismo u otras condiciones que inhiban el crecimiento de microorganismos. Una medida muy simple es ajustar el valor de pH, por ejemplo a un nivel de aproximadamente 11.

El lavado en la etapa (b) se realiza en general en condiciones alcalinas, preferiblemente a un valor de pH en el intervalo de aproximadamente 11-14 y en una o más etapas, escogiéndose las condiciones de forma que no se disuelvan los gránulos de almidón. Como álcali se escoge preferiblemente un hidróxido de metal alcalino, particularmente hidróxido de sodio. Preferiblemente se usa al menos una etapa para disolver proteínas solubles en agua, lípidos y endotoxinas, y al menos una etapa con disolventes para disolver material más escasamente soluble, especialmente proteínas, es decir, aquellas que no son solubles en agua sola. Un material de este tipo es la proteína zeína. En su estado natural, todas las diferentes variantes de la zeína son insolubles en agua y soluciones salinas diluidas, lo cual es una característica que define a las prolaminas en general, y dado que el almidón de partida contiene muy a menudo zeínas en cantidades significativas (aproximadamente la mitad del contenido en proteína en el maíz), en un caso así es esencial que se eliminen.

Por lo tanto, es una cuestión fundamental usar un disolvente acuoso con la capacidad para disolver la zeína, por medio de lo cual se pueden eliminar proteínas más escasamente solubles. El disolvente debe también naturalmente ser aceptable para la producción de almidón administrable por vía parenteral. La etapa de lavado b) o modificaciones de la misma, puede eliminar muchas clases diferentes de materiales diferentes de almidón.

Dicho disolvente con la capacidad para disolver zeína se selecciona preferiblemente de soluciones acuosas de alcoholes y cetonas monovalentes y divalentes, preferiblemente alcanoles o alquilenglicoles que contienen un total de hasta 4 átomos de carbono o dialquilcetonas con un total de hasta 5 átomos de carbono.

Son alcanoles adecuados etanol e isopropanol, especialmente etanol, y son alquilenglicoles adecuados etilenglicol y propilenglicol. Una dialquilcetona adecuada es acetona.

El siguiente es un procedimiento adecuado para las etapas iniciales del procedimiento según la invención. Se suspende almidón en una solución acuosa, preferiblemente agua para inyección, y una concentración que se puede usar típicamente es aproximadamente 10 kg de almidón por 80 kg de agua. La solución acuosa se ajusta a un valor de pH adecuado, es decir, para disolver las sustancias que se van a eliminar mientras que al mismo tiempo se intente evitar la disolución del almidón, siendo un valor adecuado aproximadamente 11, por ejemplo. También se usa solución de hidróxido de sodio, preferiblemente a una concentración relativamente baja con el fin de alcanzar dicho valor de pH. Al mismo tiempo, también es ventajoso si la adición se realiza de lentamente mientras se agita a conciencia. Según una forma de realización especialmente preferida, la suspensión se bombea, por ejemplo con una bomba peristáltica, a una malla vibratoria con un tamaño de poro nominal de 40 μm , por ejemplo, para el filtrado mencionado anteriormente.

Las partículas de almidón se resuspenden para formar una suspensión homogénea, por ejemplo con una pala grande y normalmente se dejan reposar durante 1-24 horas preferiblemente 3-14 horas, de la forma más preferida a temperatura ambiente, y el sobrenadante se decanta cuidadosamente o se desagua. Esto debe repetirse una serie de veces, por ejemplo al menos tres veces. Además, las partículas también pueden dejarse permanecer en la solución alcalina final mientras se agita durante un periodo más prolongado, por ejemplo al menos veinticuatro horas, con el fin de asegurar adicionalmente la eliminación de proteínas solubles en álcali.

Después de ello se lleva a cabo el lavado real de las partículas de almidón en condiciones alcalinas, que también detoxifica endotoxinas. En este procedimiento se pueden usar varias bases, por ejemplo hidróxido de sodio, hidróxido de potasio y tioglicolato, solas o en combinación. Las condiciones se seleccionan en general de forma que las proteínas que se van a eliminar permanezcan solubles, mientras que las partículas de almidón permanezcan insolubles, después de lo cual la solución de lavado se puede separar mediante a través de medios adecuados, por ejemplo, mediante sedimentación o filtración, preferiblemente en condiciones aceleradas. Este procedimiento de lavado se puede repetir entonces hasta que se haya alcanzado el resultado pretendido. Un tiempo de contacto adecuado para las partículas de almidón en la solución alcalina es de al menos 2 horas, más preferiblemente de al menos 4 horas. Los gránulos lavados se separan del líquido de lavado cada vez, por ejemplo por medio de filtración o centrifugación en una centrifuga de cesta. La concentración de álcali se selecciona de tal forma que se obtiene una concentración eficaz sin que se disuelvan las partículas de almidón. El valor de pH es preferiblemente uno en el intervalo de 11,5-13. Una concentración típica es 0,0125 M, cuando se usa hidróxido de sodio, lo cual da un valor de pH de aproximadamente 12. Según la forma de realización más preferida, se usan una centrifuga de cesta y una concentración de hidróxido alcalino de aproximadamente 0,0125 M. El primer lavado se lleva a cabo preferiblemente en la propia centrifuga de cesta, con el fin de, por ejemplo, reducir con ello la concentración de sustancias usadas en etapas anteriores. En etapas posteriores, las partículas se resuspenden en el líquido de lavado, que entonces se introduce en la centrifuga de cesta para la separación. Una proporción típica de líquido de lavado a almidón es aproximadamente 5:1, por ejemplo, 50 litros de líquido de lavado por 10 kg de almidón. Normalmente son suficientes tres lavados.

ES 2 307 650 T3

Si se desea, la eficacia del lavado se puede verificar cualitativamente por medio de una electroforesis en gel, por ejemplo en condiciones desnaturizantes, o cuantificarse, por ejemplo mediante análisis de aminoácidos del almidón.

Si el almidón básico contiene material tal como proteínas, lípidos y endotoxinas, etc., que no se disuelven en una solución acuosa alcalina solamente, dicho material se elimina sometiendo al almidón a lavado con dicho disolvente que tiene la capacidad de disolver zeína. La composición de la solución se selecciona a este respecto de tal forma que el material en cuestión se disuelva sin que el almidón entre en solución. Las condiciones correctas para esto son normalmente unas en las que el valor de pH de entrada en la fase acuosa esté en el intervalo de 12,5-13,5. Una composición especialmente preferida es una mezcla equimolar de etanol y solución alcalina basada en agua, por ejemplo agua para inyección con la adición de hidróxido de sodio 0,1 M. La suspensión formada de almidón y solución de lavado usada se agita de forma adecuada durante un periodo de entre 4 horas y 12 horas, por ejemplo a temperatura ambiente. Se puede llevar a cabo después de ello lavado, por ejemplo, en una centrifuga de cesta equipada con una boquilla de pulverización para el lavado final con agua para inyección.

Siguiendo dichas etapas de lavado, las partículas de almidón purificadas pueden ser sometidas inmediatamente a las siguientes etapas del procedimiento según la invención o almacenarse en forma de un producto intermedio, antes de que se lleven a cabo las etapas finales. Pueden almacenarse, por ejemplo, en forma refrigerada o seca. El secado se puede llevar a cabo a través de medios adecuados, preferiblemente después de lavar con etanol. Como alternativa, el almidón purificado se puede almacenar en forma amorfa no granular, a la que se puede convertir disolviendo con calor, refrigerado o en forma seca.

Según las actuales especificaciones y procedimientos de análisis, los lavados anteriormente mencionados con hidróxido de metal alcalino son completamente satisfactorios para las partículas de almidón. No obstante, si se incrementan los requerimientos en el futuro, por ejemplo mediante el desarrollo de procedimientos de análisis incluso más sensibles, el lavado según la etapa b) se puede complementar lavando con una solución de tioglicolato con el fin de eliminar proteínas escasamente solubles. Se ha demostrado que el tioglicolato es más eficaz en la eliminación de proteínas escasamente solubles, tales como queratinas, a partir de un material de almidón de partida del tipo mencionado anteriormente. El tioglicolato también es aceptable para su uso parenteral y se puede eliminar por lavado de las partículas. Se debe tener precaución, no obstante, cuando se use tioglicolato, dado que irrita los ojos y la piel y tiene un olor desagradable, pero estos factores son completamente manejables.

Antes de someter el almidón disuelto a cizalladura, se elimina preferiblemente cualquier material particulado diferente de almidón filtrando la solución. Esto se puede hacer, por ejemplo, combinando un filtro previo con un tamaño de poro de aproximadamente $20\ \mu\text{m}$ o menos seguido de un filtro con un tamaño de poro de $0,5\ \mu\text{m}$ o $0,45\ \mu\text{m}$ en serie. Para disolver el almidón, se usa preferiblemente agua que sea aceptable para la fabricación de almidón para uso parenteral, de la forma más preferida agua para inyección. La disolución se lleva a cabo por lo general a temperatura elevada, por ejemplo a una temperatura de al menos 80°C , y una concentración típica es 1-25%, por ejemplo aproximadamente 10%. El bombeo a través de los filtros en cuestión se puede hacer de cualquier forma adecuada. El bombeo se lleva a cabo de la forma más preferida con exceso de presión, que se forma en etapas y que no supera 300 kPa, lo cual está limitado por la resistencia mecánica del filtro. Son ejemplos de posibles filtros Ultipor GF 2+20 μm (Pall) y Fluorodyne II (Pall). Una dimensión adecuada son 50,8 cm y se prefieren filtros de cartucho. La filtración se lleva a cabo a temperatura elevada con el fin de evitar la precipitación del almidón, pero la temperatura, naturalmente, no debe exceder la que tolere el material de filtro. En el caso de que se tapone cualquier filtro, el procedimiento debe continuar después de cambiar a un filtro nuevo.

La distribución de peso molecular del almidón se reduce después mediante cizalladura, lo cual se lleva a cabo preferiblemente en un homogeneizador de alta presión. La reducción del peso molecular y de la distribución de peso molecular que se consiguen son principalmente una función de la presión usada y del número de pasos a través del homogeneizador. La persona experta en la materia puede determinar fácilmente qué niveles de estos factores se deben usar en cada caso individual por medio de experimentación a una cierta concentración de almidón. Cuando se lleva a cabo la cizalladura, la distribución de peso molecular del almidón se puede determinar mediante el procedimiento descrito a continuación después de cada paso a través del homogeneizador, con el fin de asegurar que se obtiene la distribución de peso molecular deseada. Mediante el procedimiento según la invención, es posible obtener la distribución de peso molecular deseada sin que se forme una gran proporción de material no deseado de bajo peso molecular. Además, se puede obtener una distribución de peso molecular significativamente más estrecha usando otros procedimientos. Dado que el procedimiento de cizalladura puede conducir a la fragmentación y posiblemente disolución parcial de material particulado no deseado, es preferiblemente eliminar tal material particulado no deseado, por ejemplo residuos de bacterias, antes de la cizalladura, como se ha explicado anteriormente.

Un homogeneizador adecuado para su uso en el procedimiento según la invención es Rannie modelo 12.56H (APV, Dinamarca). La decisión sobre qué homogeneizador usar se basa en su capacidad para reducir la distribución de peso molecular del almidón y su idoneidad desde el punto de vista de la limpieza, por ejemplo, dado que operará en un procedimiento para la producción de un material administrable por vía parenteral.

La distribución de peso molecular obtenida mediante cizalladura es preferiblemente tal que al menos 80% del material cae en el intervalo de 100-4000 kDa, más preferiblemente 200-1000 kDa, y de la forma más preferida, 300-600 kDa.

ES 2 307 650 T3

La distribución de peso molecular se puede determinar mediante una serie de procedimientos diferentes en sí conocidos. El más preferido se basa en filtración en gel con detección sobre la base del índice de refracción y detección por medio de refracción de ángulo múltiple de luz láser (MALLS, por sus siglas en inglés). Es un equipamiento adecuado el detector de refracción de ángulo múltiple de luz láser DAWN-F, y un programa adecuado para la recogida de datos y la determinación del peso molecular medio y la polidispersidad es ASTRA 2.11a, y un programa informático adecuado para la evaluación del intervalo de peso molecular es EASI 6.00 (todos de Wyatt Technology Corporation).

La cizalladura se lleva a cabo preferiblemente a una presión superior a 1200 bar, por ejemplo en el intervalo de 1200-1500 bar, pero debe determinarse específicamente para cada tipo de homogeneizador, dado que el diseño particular del aparato también es significativo. Se usa adecuadamente la presión máxima para el aparato mencionado anteriormente, que es de 1500 bar, y en la práctica es la presión máxima para el aparato usado la que establece el límite superior. Es posible obtener la misma distribución de peso molecular tanto si la homogeneización se lleva a cabo en forma de pasos discretos como mediante recirculación. Una concentración de almidón típica mediante homogeneización es aproximadamente 10%, y un medio adecuado es agua para inyección, como se ha explicado anteriormente.

Para producir un almidón con un margen de seguridad aún mayor para administración parenteral, también se eliminan del almidón proteínas solubles en agua. Tal eliminación se lleva a cabo de la forma más preferida después de la etapa de cizalladura d) pero también se puede llevar a cabo antes de la misma.

Según una forma de realización del procedimiento según la invención, la eliminación de proteínas solubles en agua también se lleva a cabo sometiendo a la solución de almidón a cromatografía de intercambio iónico.

Según la forma de realización preferida, se usa cromatografía de intercambio aniónico con el fin de eliminar proteínas solubles en agua cargadas negativamente. A diferencia de las proteínas y otros contaminantes que se eliminaron en la etapa b) y que estaban constituidos principalmente de material que se encuentra sobre la superficie de las partículas de almidón, con cromatografía de intercambio iónico se trata principalmente de eliminar proteínas que estaban inicialmente localizadas en el interior de las partículas de almidón y por lo tanto, en gran medida inaccesibles en la purificación inicial. La cantidad de material de intercambio iónico que se necesita para esta purificación puede titularse, si es necesario, fácilmente de forma experimental. Por lo general, no obstante, se ha demostrado que preferiblemente deberían usarse cantidades mayores de material de intercambio iónico que las que se han empleado convencionalmente. Usando más material de intercambio iónico que el que ha sido habitual hasta la fecha, la elusión de los varios constituyentes a partir del material de intercambio iónico puede dar como resultado mayor concentración de dichos constituyentes en el almidón de lo normal. En este caso, se debería seleccionar por lo tanto un material de intercambio iónico que únicamente conduzca a la elusión de constituyentes que son aceptables para uso parenteral. Un ejemplo de un material adecuado de intercambio iónico es Q-Sepharose (Farmacia Amersham). El procedimiento se puede llevar a cabo tanto usando una columna como por medio de un proceso en lotes. En el último caso, el material de intercambio iónico se suspende en la solución de almidón, que entonces se separa con medios adecuados, por ejemplo por filtración.

Las condiciones adecuadas para la cromatografía de intercambio iónico normalmente están explicadas en las instrucciones emitidas por el fabricante y en la bibliografía científica. Por lo general es posible alcanzar los mismos resultados usando diferencias razonables en parámetros del procedimiento para esta técnica, y estas condiciones por lo tanto sólo se ilustrarán mediante ejemplos típicos no limitantes. Son condiciones adecuadas para el uso de Q-Sepharose, por ejemplo, un tampón de carbonato de sodio 10 mM, pH 9,8, a aproximadamente 45°C. Si es necesario se puede usar un tampón más fuerte, pero en ese caso debería incorporarse una etapa de desalinización después de la cromatografía. La cantidad de material de intercambio iónico debe ser de al menos 0,4 ml, preferiblemente al menos 0,8 ml de volumen de lecho sedimentado de material de intercambio iónico por gramo de almidón, en el orden de magnitud, por ejemplo, de 0,4-1,1, calculado como volumen expandido en el tampón en cuestión, a temperatura ambiente, por kg de peso seco de almidón. El material de intercambio iónico debe lavarse o regenerarse mediante un procedimiento convencional. Un procedimiento adecuado, no obstante, es el tratamiento con hidróxido de sodio 1 M durante, digamos, 1 hora a temperatura ambiente seguido de aclarado con dos volúmenes de lecho de agua para inyección y aclarado con un total de dos volúmenes de lecho de cloruro de sodio 2 M, repartidos a lo largo de dos adiciones, por ejemplo. Este procedimiento puede repetirse después de ello una vez. El aclarado se lleva a cabo con agua para inyección hasta que la conductividad es menor que 2 mS/cm y luego se lleva a cabo el equilibrado dos veces con un volumen de lecho de tampón de carbonato de sodio 100 mM, pH 9,8, y después con tampón de carbonato de sodio 10 mM, pH 9,8, hasta que tanto el pH como la conductividad se hayan estabilizado. El intercambio iónico se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante un procedimiento en lotes que dura al menos 4 y hasta 48 horas a 45°C. Por razones prácticas, a menudo se elige llevar a cabo el intercambio iónico durante una noche. El intercambio iónico se lleva a cabo de forma adecuada con agitación ligera, de forma que se conserva la integridad del material de intercambio iónico. La masa de intercambio iónico se separa entonces de la solución de almidón con medios adecuados, por ejemplo, introduciendo la suspensión en una columna de cromatografía con filtro de salida adecuado. El valor de pH de la solución de almidón se neutraliza después. Cuando se usan sustancias tampón volátiles o inestables, el valor de pH debe reducirse unas pocas unidades de pH por debajo de la neutralidad, de forma que se previene que se produzcan condiciones excesivamente alcalinas durante el siguiente secado por pulverización, por ejemplo, cuando la sustancia tampón puede degradarse o convertirse en una fase gaseosa.

ES 2 307 650 T3

Según otra forma de realización del procedimiento reivindicado, la eliminación de proteínas solubles en agua se lleva a cabo por medio de una operación de electroforesis. Se puede llevar a cabo una operación de este tipo según principios forelectroforéticos conocidos, lo cual significa por lo general que el almidón se somete a tal electroforesis en forma de un gel.

5

Después de la eliminación de proteínas solubles en agua, se lleva a cabo preferentemente la filtración para eliminar cualquier contaminación particulada generada durante la misma. Hay un gran número de filtros adecuados comercialmente disponibles para este propósito. Una configuración adecuada es un filtro previo de 5 μm y un filtro final de 0,5 μm . Son dimensiones adecuadas 50,8 cm para filtros previos y 25,4 cm para filtros finales. Son ejemplos de filtros adecuados Profile Star (Pall) y Star Clear (Pall), que está cargado positivamente.

10

El almidón purificado se somete de forma adecuada a una etapa de secado final antes de almacenarse. Un procedimiento especialmente preferido de secado a este respecto es secado por pulverización, aunque también son adecuados otros procedimientos en sí conocidos, por ejemplo liofilización o secado al vacío. En el secado por pulverización, las condiciones deberían seleccionarse de forma que el material se seque suficientemente sin que se produzcan reacciones secundarias no deseadas debido a temperatura excesivamente alta y/o valor de pH demasiado alcalino. Son temperaturas típicas para su uso en este contexto aproximadamente 200°C como temperatura de entrada y aproximadamente 120°C como temperatura de salida. La temperatura de salida se puede controlar fácilmente mediante la velocidad de bombeo para la solución de almidón.

15

El almidón se puede mantener durante un tiempo prolongado si se almacena en condiciones de oscuridad y sequedad, a una temperatura que no supere la temperatura ambiente normal. Antes de que se use el almidón para la producción de microesferas diseñadas para uso parenteral, se disuelve, por ejemplo, en agua para inyección y se esteriliza. El procedimiento preferido de esterilización es tratamiento en autoclave. También son posibles otros procedimientos de esterilización, tal como filtración estéril.

20

La pureza del almidón se puede determinar mediante procedimientos bien conocidos en sí. Con el fin de obtener una valoración cualitativa, se usa preferiblemente electroforesis en gel en condiciones desnaturalizantes con posterior tinción. Con el fin de obtener más datos cuantitativos, se puede determinar el contenido en nitrógeno, por ejemplo mediante análisis de aminoácidos, análisis elemental o por medio de detectores selectivos para nitrógeno. Se prefiere análisis de aminoácidos, dado que este proporciona datos cuantitativos relacionados con el contenido en proteína del almidón y este es el factor más importante para la utilidad del almidón. El procedimiento puede reducir el contenido de nitrógeno aminoacídico hasta 50 ppm, de forma adecuada por debajo de 20 ppm, preferiblemente a menos de 10 ppm, más preferiblemente a menos de 5 ppm, o incluso por debajo de 2 ppm, lo cual proporciona un buen factor de seguridad, especialmente en administraciones parenterales repetidas, y que está a la par con o es inferior al contenido en nitrógeno aminoacídico en hidroxietilalmidón, que se usa por vía parenteral como expansor plasmático y que en dosificación diaria puede sobrepasar el máximo indicado para partículas de almidón en al menos 100 veces, basado en kg de peso corporal. Después de producir anticuerpos contra los constituyentes proteicos de entrada, lo cual se describe en sí mismo en la bibliografía científica, es posible usar procedimientos inmunológicos sensibles para cuantificar dichos constituyentes.

30

Según un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un almidón farmacéuticamente aceptable según la reivindicación 30 a continuación. Un almidón de este tipo:

35

a) tiene un contenido en amilopectina superior al 85 por ciento en peso, en el que el peso molecular de dicha amilopectina se ha reducido, preferiblemente mediante cizalladura, de forma que al menos el 80 por ciento en peso del material está en el intervalo de 10-10000 kDa.

40

b) tiene una pureza de como máximo 50 μg de nitrógeno aminoacídico por gramo de peso seco de almidón, preferiblemente como máximo 20 μg , más preferiblemente como máximo 10 μg y de la forma más preferible, como máximo 5 μg de nitrógeno aminoacídico por gramo de peso seco de almidón,

c) se puede disolver a una concentración superior al 25 por ciento en peso de agua.

45

Se pretende que la expresión “se puede disolver en agua” signifique disolución mediante un procedimiento convencional para almidón, lo cual por lo general implica calentamiento, por ejemplo a al menos 80°C, y también disolver en solución acuosa tamponada.

50

Preferiblemente, dicho almidón carece de grupos químicos adicionales unidos covalentemente del tipo que aparecen en hidroxietilalmidón.

55

La expresión “carece de grupos químicos adicionales unidos covalentemente del tipo que aparecen en hidroxietilalmidón” se pretende que signifique por lo general que el almidón sólo contiene aquellos grupos que aparecen en almidón natural y no se ha modificado como en el hidroxietilalmidón, por ejemplo.

Además, el almidón según cualquiera de los aspectos anteriormente mencionados preferiblemente muestra la capacidad de melificar de forma natural *in vitro*.

ES 2 307 650 T3

Según otra forma de realización, el almidón anteriormente mencionado muestra la capacidad de formar micropartículas en un sistema de emulsión, especialmente un sistema acuoso de dos fases.

5 Otra forma de realización se refiere a almidón con un contenido en endotoxina de menos de 25 UE/g, y una forma de realización adicional se refiere a almidón que contiene menos de 100 microorganismos por g, más preferiblemente menos de 10 microorganismos por g.

Otras formas de realización preferibles del almidón son las siguientes.

10 Un almidón que se puede disolver en agua a una concentración que supera el 30%, preferiblemente que supera el 40%, y más preferiblemente que supera el 45% en peso.

15 Un almidón que permanece en solución a una temperatura de como máximo 60°C, preferiblemente 20-45°C, especialmente a 30-37°C, durante un periodo lo suficientemente prolongado como para permitir su combinación con una sustancia que es sensible a la temperatura y/o inestable en disolventes orgánicos, especialmente una proteína. Dicha combinación se lleva a cabo preferiblemente en condiciones que son capaces de conservar la actividad biológica de dicha sustancia.

20 Un almidón que cuando se disuelve en agua solidifica a una temperatura de 1-55°C, especialmente 4-37°C.

Un almidón que solidifica cuando se expone a una temperatura inicial de 1-10°C, especialmente de aproximadamente 4°C, y posteriormente a una temperatura de 20-55°C, preferiblemente 25-40°C, especialmente de aproximadamente 37°C.

25 Para otras formas de realización especialmente preferidas de este almidón, se hace referencia a las formas de realización que se han descrito anteriormente en relación con el procedimiento según la invención, por lo que no necesitan repetirse ahora.

30 El área principal de aplicación del nuevo almidón es para la producción de micropartículas esencialmente completamente biodegradables. Naturalmente, puede usarse no obstante también en otros contextos en los que puede ser relevante el almidón farmacéuticamente aceptable, por ejemplo para la producción de hidroxietilalmidón (HEA).

35 Según un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de un almidón según la presente invención como un vehículo para una sustancia biológicamente activa para la fabricación de micropartículas, según la reivindicación 35 a continuación. Dichas micropartículas son adecuadas para su uso como vehículos para una sustancia biológicamente activa, especialmente para administración por vía parenteral, preferiblemente por medio de inyección a un mamífero, incluyendo un ser humano.

40 Tales micropartículas preferiblemente tienen un diámetro medio de partícula en el intervalo de 10-200 μm , preferiblemente de 20-100 μm , especialmente de 20-80 μm . El término micropartículas se usa por lo tanto como designación general para partículas de un tamaño determinado conocido en la técnica. Un tipo de micropartículas es el de las microesferas, que tienen una forma sustancialmente esférica, aunque el término micropartícula puede incluir desviaciones de tal forma esférica ideal. El término conocido microcápsula también está cubierto por la expresión micropartícula de acuerdo con la técnica anterior.

45 En una forma de realización preferida, las micropartículas muestran la capacidad de disolverse mediante acción enzimática *in vitro* y de ser eliminadas de tejido biológico *in vivo*.

50 A partir de lo que se ha mencionado, será evidente que una sustancia biológicamente activa de especial interés es proteína, pero la invención también es aplicable naturalmente en principio a cualquier sustancia activa que se pueda usar para administración por vía parenteral, por ejemplo (poli)péptidos, poli(nucleótidos), plásmidos y ADN. La invención es, no obstante, de especial interés en aquellos casos en los que existen problemas de sensibilidad y estabilidad.

55 Son ejemplos de sustancias biológicamente activas del tipo mencionado anteriormente hormona del crecimiento, eritropoyetina, interferón (tipo α , β , γ), vacuna, hormona de crecimiento epidérmico, factor VIII, análogo de LHRH. Insulina, factores estimulantes de colonias de macrófagos, factores estimulantes de colonias de granulocitos e interleucina.

60 Sustancias biológicamente activas farmacéuticas de tipo no proteico que se pueden usar se pueden seleccionar de los siguientes grupos:

65 Fármacos antitumorales, antibióticos, fármacos antiinflamatorios, antihistamínicos, sedantes, relajantes musculares, antiepilépticos, antidepresivos, preparaciones antialérgicas, broncodilatadores, fármacos cardiotónicos, fármacos antiarrítmicos, vasodilatadores, fármacos antidiabéticos, anticoagulantes, hemostáticos, narcóticos y esteroides.

Respecto a la estructura de las microesferas, microcápsulas o micropartículas en general y a los varios procedimientos que existen para producirlas, se hace referencia la bibliografía existente. No obstante, se ha demostrado que el

ES 2 307 650 T3

almidón según la invención, es especialmente adecuado para la producción de micropartículas del tipo que se describe en la solicitud de patente sueca titulada “micropartículas”, presentada de forma concurrente con la presente solicitud de patente. Para más detalles sobre esto, se hace referencia por lo tanto a dicha solicitud de patente.

- 5 La invención se describirá ahora adicionalmente por medio de los siguientes ejemplos no limitantes. En estos, así como en el resto del texto, a menos que se indique lo contrario, los porcentajes mencionados se refieren a porcentaje en peso.

Ejemplos

- 10 Ejemplo 1

Producción de almidón puro altamente ramificado de bajo peso molecular

- 15 Se suspendió almidón (maíz ceroso, National Starch) en forma granular en agua, producido por ósmosis inversa, a una concentración de 5 kg por 50 litros de agua. Se añadió hidróxido de sodio hasta que el valor de pH fue 11. La suspensión se agitó durante media hora y el líquido se separó de los gránulos centrifugando en una centrífuga de cesta. Esto se repitió dos veces. Los gránulos se lavaron con agua y se mantuvieron en 5 litros de etanol durante el fin de semana. Los gránulos se lavaron después dos veces con 10 litros de etanol al 70% y luego con agua. El material se suspendió después en agua a 60°C y luego se vertió en 40 litros de agua y se disolvió, en parte con ayuda de un mezclador de chorro mientras se agitaba, formando la solución una espuma que permanecía en la superficie. La distribución de peso molecular se redujo después mediante cizalladura (Microfluidizer 110 T, Microfluids Corp.) a 1500 bar, en un total de 15 pasos. La solución de almidón se calentó a 70°C y se filtró a través de un filtro previo (Pall profile II 20 μm , 25,4 cm de diámetro y Pall Starclear 0,5 μm , cargado positivamente, 50,8 cm de diámetro) y se secaron por pulverización (200°C temperatura de entrada, aproximadamente 122-127°C temperatura de salida). En total, se obtuvieron aproximadamente 3 kg de almidón con un peso molecular medio de 1.930 kDa.

- El almidón en bruto contenía aproximadamente 0,052% de nitrógeno, determinado por medio de análisis elemental, y el almidón obtenido contenía aproximadamente 0,022% de nitrógeno. Tanto el almidón en bruto como el almidón limpio contenían <10 microorganismos por gramo. No obstante, se encontraron 30 microorganismos por gramo en una etapa intermedia, lo cual muestra la necesidad de condiciones que prevengan que aumenten los microorganismos en el transcurso del procedimiento. El valor de nitrógeno aminoacídico fue de 56,53 $\mu\text{g/g}$ de almidón (peso seco) y el almidón pasó la prueba de pirógenos según Ph. Eur. 2ª Ed. después de la administración parenteral a conejos. Después de administración parenteral repetida del almidón a cobayas con el fin de permitir la inducción de una respuesta inmune, seguido de administración por vía intravenosa del almidón con el fin de detectar cualquier reacción anafiláctica, se encontró que el almidón no tenía capacidad para inducir una reacción anafiláctica. El almidón obtenido cumple por lo tanto los requisitos para un material en bruto para la producción de una preparación parenteral.

Ejemplo 2

- 40 *Producción de un almidón para uso parenteral*

- Se preparó una suspensión de almidón (almidón de maíz ceroso, Cerestar C* gel 06090) con una concentración de 10 kg en 75 litros de agua para inyección con agitación. Una vez que se había formado una suspensión homogénea, se añadieron 0,25 M de solución de hidróxido de sodio hasta que se obtuvo un valor de pH de 11,0 \pm 0,2, y después esto se completó con más agua para inyección hasta un volumen total de 80 litros. La suspensión se bombeó a través de un tamiz húmedo a un caudal de aproximadamente 520 ml/min. La suspensión de almidón se dejó reposar en recipientes de Müller durante toda la noche, y al día siguiente, la solución superior se decantó por medio de un sifón hasta que quedaron 18 litros de la suspensión. Después de completar con 72 litros de agua para inyección, se encontró que el valor de pH era todavía al menos 10,5, de forma que no fue necesario añadir más solución de hidróxido de sodio. La suspensión se dejó reposar durante 12 horas, después de lo cual se decantó el líquido superior. Esto se repitió una vez más con reposo durante toda la noche. Los gránulos de almidón se lavaron después con solución de hidróxido de sodio 0,0125 M en agua para inyección, primero aclarando la torta de filtro en la centrífuga de cesta con 45 litros de la solución y después mediante suspensión en la solución y eliminación de la solución mediante centrifugación en la centrífuga de cesta. La última etapa se repitió una vez más. Los gránulos de almidón se lixiviaron después durante cuatro horas con una solución equimolar de hidróxido de sodio 0,1 M y etanol, después de lo cual la solución se separó por medio de una centrífuga de cesta. Esta lixiviación se repitió una vez, después de lo cual los gránulos de almidón se lavaron dos veces con 40 litros de agua para inyección. El valor de pH de la suspensión de almidón se ajustó a 6,4 \pm 1 con ácido clorhídrico 1 M y se lavó con 50 litros de agua para inyección en la centrífuga de cesta. El almidón se transfirió a un congelador para su almacenamiento. La cantidad obtenida se determinó como 7,32 kg de almidón seco.

- De los gránulos de almidón obtenidos, se tomaron 3,7 kg y se suspendieron en 1,76 kg de agua para inyección y luego se transfirieron a 27,62 kg de agua para inyección, que se calentó a 100°C. Después de agitar, se comprobó visualmente que el almidón se había disuelto. El almidón se filtró a través de un filtro previo de 50,8 cm con tamaños de poro de 20 y 2 μm y un filtro de 0,45 μm hasta que se consideró que el flujo era demasiado bajo. Llegados a este punto quedaba <5% de la solución de almidón. La distribución de peso molecular del almidón se ajustó mediante cizalladura a una presión fija de 1500 bar según las instrucciones del fabricante. El flujo a esta presión era de 2,25 litros/minuto. El propósito era permitir que la solución pasase a través del homogeneizador las veces suficientes para

ES 2 307 650 T3

que el peso molecular medio se hiciese 350-500 kDa. En total se llevaron a cabo 9 pasos. Después se ajustó el valor de pH de la solución mediante la adición de hidrógeno bicarbonato de sodio hasta una concentración final de 10 mM y ajuste del valor de pH a 0,5 hasta 9,8. Las proteínas residuales se eliminaron después mediante cromatografía de intercambio iónico sobre una Q-Sepharose FF (Pharmacia) usando un volumen de lecho total de 3,7 litros. El material de intercambio iónico se había dejado hinchar previamente y se lavó con un volumen de lecho de hidróxido de sodio 1 M, después con dos volúmenes de lecho de agua para inyección, y después de ello bajo flujo con 3 veces la mitad del volumen de lecho de solución de cloruro de sodio 2 M. Esta secuencia completa se repitió una vez más, después de lo cual se aclaró la masa de intercambio iónico con agua para inyección hasta que la conductividad fue de menos de 2 mS/cm. El equilibrado se llevó a cabo con dos volúmenes de lecho de carbonato de sodio 100 mM, pH 9,8, y después con hidrógeno carbonato de sodio 10 mM hasta que tanto el valor de pH como la conductividad se estabilizaron. El material de intercambio iónico y el almidón se mezclaron y se mantuvieron a 45°C con agitación lenta con un agitador de ancla montado por encima durante aproximadamente 15 horas, y después se separó la masa de intercambio iónico mediante recolección en una columna de cromatografía, manteniéndose el volumen de lecho a aproximadamente 1,5 veces el volumen de lecho sedimentable requerido para mantener la presión por debajo de 3 bar. Después de ajustar el valor de pH a 6,4, se filtró el almidón de intercambio iónico a través de un filtro previo (cartucho de filtro PALL Profile star 5 μ m, 50,8 cm de diámetro) y un filtro final (cartucho de filtro PALL Starclear 0,5 μ m, 25,4 cm de diámetro) después de que éstos se hubieron precalentado bombeando agua caliente para inyección de antemano. Finalmente se secó por pulverización la solución de almidón con una temperatura de entrada de 200°C y una temperatura de salida de 120-125°C.

El contenido en proteínas del almidón se determinó mediante análisis de aminoácidos. El almidón en bruto contenía aproximadamente 137 ppm de nitrógeno aminoácido, después de tamizar en húmedo contenía aproximadamente 124 ppm, después de la sedimentación, 61 ppm de nitrógeno aminoácido, después del tratamiento a pH 10,5, 64 ppm de nitrógeno aminoácido, después del tercer lavado con solución de hidróxido de sodio 0,0125 M, 54 ppm de nitrógeno aminoácido, después de lavar con el lavado de álcali/etanol, 52 ppm de nitrógeno aminoácido y después de lavar con agua para inyección, 50 ppm de nitrógeno aminoácido. Con el muestreo triple después de cromatografía de intercambio iónico, se obtuvieron los siguientes valores de nitrógeno aminoácido: 1,8, 3,0 y 0,4 μ g/g de peso seco de almidón.

Se determinó el peso molecular medio mediante filtración en gel combinada con índice de refracción y detección por MALLS y se encontró que era 584 kDa después de 3 pasos, 508 kDa después de 6 pasos y 434 kDa después de 9 pasos. El contenido de endotoxina se determinó como <25 UE/g usando un procedimiento nefelométrico de análisis de amebocitos de *Limulus* validado para almidón (Associates of Cape Cod Int Inc).

ES 2 307 650 T3

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la producción de un almidón farmacéuticamente aceptable que comprende
 - 5 a) partir de almidón en forma sólida y con un contenido en amilopectina superior al 85% en peso, expresado como peso seco de almidón,
 - b) someter dicho almidón sólido a lavado(s) en condiciones tales que se disuelvan proteínas, lípidos y endotoxinas localizadas en la superficie del almidón mientras que el almidón permanece sin disolver, y separar el almidón del material disuelto,
 - 10 c) provocar que el almidón lavado obtenido de la etapa b) se disuelva en un medio acuoso y
 - d) someter a la disolución de almidón a una reducción de peso molecular mediante cizalladura de tal forma que se obtiene una distribución de peso molecular en la que al menos el 80 por ciento en peso del material se encuentra en el intervalo de 10-10.000 kDa.
2. Un procedimiento según la reivindicación 1, que comprende eliminar proteínas solubles en agua residuales del almidón.
3. Un procedimiento según la reivindicación 2, que comprende eliminar dichas proteínas solubles en agua después de llevar a cabo la etapa d) para reducir el peso molecular del almidón.
4. Un procedimiento según la reivindicación 2, que comprende eliminar dichas proteínas solubles en agua antes de llevar a cabo la etapa d) para reducir el peso molecular del almidón.
5. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa a) se lleva a cabo usando almidón con un contenido en amilopectina superior al 95 por ciento en peso expresado como peso seco de almidón.
6. Un procedimiento según la reivindicación 5, en el que dicho almidón es almidón de maíz ceroso.
7. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa a) se lleva a cabo usando partículas de almidón con un diámetro medio en el intervalo de 5-25 μm , basado en la distribución de peso.
8. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el lavado en la etapa b) se lleva a cabo en condiciones alcalinas, preferiblemente usando hidróxido de sodio como álcali y en una o más etapas.
9. Un procedimiento según la reivindicación 8, en el que el lavado o lavados en la etapa b) se lleva/n a cabo a un valor de pH en el intervalo de 11-14.
10. Un procedimiento según la reivindicación 8 ó 9, en el que el lavado comprende una etapa con una solución acuosa alcalina para disolver proteínas solubles en agua, lípidos y endotoxinas y una etapa con un disolvente acuoso con la capacidad para disolver zeína para disolver proteínas más escasamente solubles.
11. Un procedimiento según la reivindicación 10, en el que el disolvente con la capacidad para disolver zeína se selecciona de soluciones acuosas de alcoholes y cetonas monovalentes o divalentes.
12. Un procedimiento según la reivindicación 11, en el que el disolvente se selecciona de soluciones acuosas de etanol, isopropanol, etilenglicol, propilenglicol y acetona.
13. Un procedimiento según la reivindicación 12, en el que el disolvente es una solución acuosa de etanol.
14. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la disolución en la etapa c) se lleva a cabo de tal forma que se obtiene una solución de almidón con una concentración en el intervalo de 1 a 25%.
15. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la disolución en la etapa c) se lleva a cabo en agua aceptable para la producción de almidón para uso parenteral.
16. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la cizalladura en la etapa d) se lleva a cabo de tal forma que se obtiene una distribución de peso molecular en la que al menos el 80% del material está en el intervalo de 100-4.000 kDa.
17. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la cizalladura en la etapa d) se lleva a cabo en un homogeneizador de alta presión.

ES 2 307 650 T3

18. Un procedimiento según la reivindicación 17, en el que la cizalladura se lleva a cabo a una presión superior a 1200 bar.

5 19. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 2-18, en el que dicha eliminación de proteínas solubles en agua residuales del almidón se lleva a cabo sometiendo a la solución de almidón a cromatografía de intercambio iónico.

10 20. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 2-18, en el que dicha eliminación de proteínas solubles en agua residuales del almidón se lleva a cabo mediante electroforesis.

21. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que antes de los lavados en la etapa b) se elimina material diferente a almidón del almidón de partida, preferiblemente mediante tamizado y/o sedimentación.

15 22. Un procedimiento según la reivindicación 21, en el que se elimina material que es mayor que las partículas de almidón mediante tamizado en húmedo y material que es menor que las partículas de almidón mediante sedimentación.

23. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 21 y 22, en el que se elimina material diferente a almidón que es mayor de 40 μm .

20 24. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que antes de la cizalladura en la etapa d) se elimina cualquier material particulado diferente de almidón residual filtrando la solución.

25 25. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la solución obtenida de la cizalladura en la etapa d) se somete a filtración para eliminar cualquier contaminación particulada generada durante dicha cizalladura, llevándose a cabo preferiblemente la filtración con un filtro de 5 μm .

30 26. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 2-25, en el que, después de la eliminación de proteínas solubles en agua residuales del almidón, se lleva a cabo filtración a través de un filtro previo de 5 μm y un filtro de 0,5 μm para eliminar cualquier contaminación particulada.

35 27. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 19-26, en el que se usa al menos 0,4 ml de volumen de lecho sedimentado de material de intercambio iónico por gramo de almidón en la cromatografía de intercambio iónico.

28. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el almidón purificado se somete a una etapa final de secado.

40 29. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el lavado en la etapa b) comprende lavado con una solución de tiogluconato para eliminar proteínas escasamente solubles.

30. Un almidón farmacéuticamente aceptable que

45 a) tiene un contenido en amilopectina superior al 85 por ciento en peso, en el que el peso molecular de dicha amilopectina se ha reducido de tal forma que al menos el 80 por ciento en peso del material se encuentra en el intervalo de 10-10.000 kDa, y

b) tiene una pureza de como máximo 50 μg de nitrógeno aminoacídico por gramo de peso seco de almidón.

50 31. Un almidón farmacéuticamente aceptable según la reivindicación 30, que carece de grupos químicos adicionales unidos covalentemente del tipo que aparecen en el almidón hidroxietilalmidón.

32. Un almidón según la reivindicación 30 y 31, en el que el peso molecular de dicha amilopectina se ha reducido mediante cizalladura.

55 33. Un almidón según una cualquiera de las reivindicaciones 30 a 32, que se puede obtener por medio de un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29.

60 34. Un almidón según una cualquiera de las reivindicaciones 30-33, en el que dicho peso molecular de la amilopectina está en el intervalo de 100-4.000 kDa.

35. Uso de un almidón según cualquiera de las reivindicaciones 30-34 como un vehículo para una sustancia biológicamente activa para la fabricación de micropartículas.

65 36. Uso según la reivindicación 35, en el que dichas micropartículas tienen un diámetro medio de partícula en el intervalo de 10-200 μm .