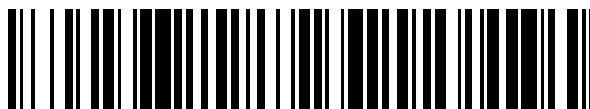


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 741 576**

51 Int. Cl.:

A61K 9/14	(2006.01) A61K 47/60	(2007.01)
A61K 9/16	(2006.01)	
A61K 9/50	(2006.01)	
A61K 9/51	(2006.01)	
A61K 38/09	(2006.01)	
A61K 38/11	(2006.01)	
A61K 38/28	(2006.01)	
A61K 38/31	(2006.01)	
A61K 31/715	(2006.01)	
A61K 47/54	(2007.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.07.2004** **E 11187401 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2019** **EP 2444069**

54 Título: **Composiciones de liberación controlada**

30 Prioridad:

23.07.2003 US 489402 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.02.2020

73 Titular/es:

EVONIK CORPORATION (100.0%)
299 Jefferson Road
Parsippany NJ 07054, US

72 Inventor/es:

COOK, CARY P.

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 741 576 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones de liberación controlada

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a composiciones de liberación controlada que incluyen un agente bioactivo soluble en agua, un ion orgánico y un polímero, en donde el contenido de dicho agente bioactivo es de aproximadamente dos a cuatro veces mayor que en la ausencia del ion orgánico.

Antecedentes de la invención

10 Actualmente existen numerosas formulaciones de liberación controlada en el mercado que contienen diversos agentes bioactivos, tales como análogos de GnRH, hormona del crecimiento humana, risperidona y análogos de somatostatina de los cuales el acetato de octreótido es un ejemplo. Tales formulaciones son preferentes por los médicos y veterinarios y por sus pacientes ya que reducen la necesidad de múltiples inyecciones. Desafortunadamente, existen muchos problemas con las formulaciones de composiciones de liberación controlada tales como el hecho de que muchos agentes bioactivos populares no son buenos candidatos para ser composiciones de liberación controlada debido a su sustancial solubilidad en agua. El uso de agentes bioactivos altamente solubles puede dar como resultado un bajo contenido en fármaco y un "estallido" indeseable del agente bioactivo cuando entra en contacto con una solución acuosa, tal como mediante la administración a un paciente o su introducción en un medio fisiológico que, a menudo, limita el contenido útil de agente bioactivo que se puede conseguir en la práctica.

20 Se han ideado diversos métodos para resolver el problema de solubilidad en agua con algo de éxito. Uno de tales esfuerzos se describe en la patente de los EE.UU. n.º 5.776.885 por Orsolini et al. Orsolini convirtió péptidos solubles en agua en sus sales de adición insolubles en agua con ácido pamoico, tánico o esteárico antes de su encapsulación en composición de liberación sostenida. La encapsulación dentro de una matriz polimérica se realiza, entonces, dispersando el péptido insoluble en agua en una solución polimérica y formando composiciones de liberación controlada mediante o bien extrusión o bien un método de coacervación algo complicado. Un inconveniente de este enfoque es la necesidad de obtener la sal de adición insoluble en agua antes de su encapsulación dentro de una matriz polimérica. Además, se ha hallado en el presente estudio que cuando se empleaban sales de adición preformadas en un proceso de emulsión para formar micropartículas el resultado fue la liberación de cantidades sustanciales de péptido modificado o degradado de la composición cuando se colocaba en un tampón fisiológico acuoso. La modificación fue en la forma de acilación indeseable del agente bioactivo.

30 El documento US 2003/134800 describe determinadas composiciones de liberación controlada y métodos para su producción. Estos comprenden una sustancia fisiológicamente activa, un ácido hidroxinaftoico que es ácido 3-hidroxi-2-naftoico o ácido 1-hidroxi-2-naftoico y un polímero que es un polímero de ácido láctico o sal del mismo.

35 Se necesitan en gran medida composiciones de liberación controlada con una alta carga del fármaco, bajo efecto de estallido cuando se administra y mínima degradación del agente bioactivo para realizar los beneficios de estos tipos de composiciones como terapéutica humana o veterinaria.

Compendio de la invención

40 Ahora se ha descubierto que composiciones de liberación controlada capaces de administrarse en una forma concentrada y en un volumen bajo en dosis que liberan agente activo durante un período de tiempo prolongado se pueden originar a partir de agentes bioactivos solubles en agua sin convertirlas, en primer lugar, en una forma insoluble en agua. Este hallazgo se encuentra en contraste directo con estudios previos en este campo que sugerían que los agentes bioactivos solubles en agua necesitarían manipularse de algún modo, por ejemplo, para convertirlos en insolubles en agua, antes de formar una composición de liberación sostenida. Adicionalmente, el proceso de conversión requerido en composiciones previas, dio como resultado un alto porcentaje de degradación del agente bioactivo, mientras que las composiciones de la presente invención están preparadas con un conocimiento sobre el modo de cómo reducir su degradación. La presencia del agente bioactivo en una forma fisiológicamente relevante crea una carga de núcleo aumentada con respecto a composiciones previamente preparadas, que son susceptibles de una degradación significativa. Una degradación reducida se traduce en una liberación aumentada de agente bioactivo no modificado que permite, de este modo, un volumen de inyección inferior para suministrar la misma dosis de agente bioactivo. Las composiciones de la presente invención ofrecen una gran mejora sobre invenciones previas en que proporcionan un modo de suministrar un agente bioactivo relativamente no degradado durante un período de tiempo prolongado usando un volumen de dosis reducido.

55 En una realización, las composiciones de liberación controlada son micropartículas y nanopartículas. En una realización particular, las micropartículas y nanopartículas son biodegradables. En otra realización particular, el polímero se selecciona del grupo que consiste en, aunque no de forma limitada a, poli(láctido)s, poli(glicolida)s, poli(láctide-co-glicolida)s, poli(ácido láctico)s, poli(ácido glicólico)s, poli(ácido láctico-ácido co-glicólico)s, policaprolactona, policarbonatos, poliesteramidas, polianhídridos, poli(aminoácidos), poliortoésteres, poliacetilos,

policianoacrilatos, poliésteres, poli(dioxanona)s, poli(alquileno alquilato)s, copolímeros de polietilenglicol y polioctoéster, poliuretanos biodegradables mezclas y copolímeros de los mismos.

5 En otra realización, el agente bioactivo se selecciona del grupo que consiste en, aunque no de forma limitada a, proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, péptidos, sustancias farmacéuticas de moléculas pequeñas, inmunógenos, precursores metabólicos capaces de promover el crecimiento y la supervivencia de células y tejidos, agentes antineoplásicos, hormonas, antihistamínicos, agentes cardiovasculares, agentes anti-úlceras, broncodilatadores, vasodilatadores, agentes del sistema nervioso central y antagonistas narcóticos.

El ion orgánico se selecciona de trifluorometil-p-toluenato, sulfonato 2-naftaleno, dicarboxilato de 2,3-naftaleno, 2-naftoato y salicilsalicilato.

10 En otra realización, la degradación incluye la acilación del agente bioactivo o la lisis del polímero. En una realización particular, la reacción de acilación implica el ataque nucleofílico de un grupo amino de un agente bioactivo dirigido a un carbono de carbonilo de un poliéster tal como poli(d,l-lactida-co-glicolida). Se especula que la degradación del agente bioactivo se previene o reduce en las presentes composiciones mediante protonación facilitada de potenciales nucleófilos (por ejemplo, grupos amino) convirtiendo, de este modo, los nucleófilos menos aptos para
15 participar en reacciones de acilación con la estructura principal polimérica de PLGA o fragmentos de la misma.

En otra realización, la estequiometría molar del agente bioactivo con respecto al ion orgánico varía de aproximadamente 0,5 a 2,0. En una realización particular, la estequiometría molar del agente bioactivo con respecto al ion orgánico varía de aproximadamente 1,0 a 1,5.

20 En otra realización el contenido de agente bioactivo puede aumentarse con respecto al contenido de agente bioactivo de composiciones preparadas mediante el método de la presente descripción en ausencia de un ion orgánico.

En una realización particular, el agente bioactivo es soluble en agua.

En otra realización, el contenido de agente bioactivo puede aumentarse con respecto al contenido de agente bioactivo de composiciones previamente preparadas.

25 En otra realización, la carga del núcleo de las presentes composiciones es superior a aproximadamente el 9 % y/o el porcentaje de producto degradado es de aproximadamente el 25 % o menos.

30 Ventajas adicionales de la invención se establecerán en parte en la descripción que sigue o resultarán obvias en parte a partir de la descripción y se pueden aprender mediante la práctica de la invención. Las ventajas de la invención se realizarán y conseguirán por medio de los elementos y combinaciones indicadas particularmente en las reivindicaciones adjuntas. Se debe entender que tanto la descripción general anterior y la siguiente descripción detallada son ejemplares y explicativas solo y no son restrictivas de la invención como se reivindica.

Descripción de las realizaciones ilustrativas

Definiciones

35 Para los fines de la presente invención, las siguientes expresiones tendrán los siguientes significados:
Para los fines de la presente invención, la expresión "biodegradable" se refiere a polímeros que se disuelven o degradan *in vivo* dentro de un período de tiempo que es aceptable en una situación terapéutica particular. Tal producto disuelto o degradado puede incluir especies químicas más pequeñas. La degradación puede resultar, por ejemplo, mediante procesos enzimáticos, químicos y/o físicos. La biodegradación lleva normalmente menos de cinco años y normalmente menos de un año después de su exposición a un pH y temperatura fisiológicos, tal como un pH
40 que varía de 6 a 9 y una temperatura que varía de 22 °C a 38 °C.

Para los fines de la presente invención, la expresión "fase orgánica" se refiere a la solución de disolvente, polímero y agente bioactivo creado en los métodos descritos en el presente documento que, a continuación, se pondrá en contacto con una fase acuosa para crear las composiciones de liberación controlada de la presente invención.

45 Para los fines de la presente invención, la expresión "degradación" se refiere a cualquier modificación indeseada del agente bioactivo, tal como acilación o modificación del polímero tal como lisis.

Para los fines de la presente invención, la expresión "fase acuosa" se refiere a la solución de agua y agente iónico orgánico creado en los métodos descritos en el presente documento que, a continuación, se pondrá en contacto con una fase orgánica para crear las composiciones de liberación controlada de la presente invención.

50 Para los fines de la presente invención, la expresión "combinar" se refiere a cualquier método de colocar dos o más materiales juntos. Tales métodos incluyen, aunque no de forma limitante a, mezclar, combinar, unir, fraguar, homogeneizar, incorporar, entremezclar, fusionar, juntar, revolver, remover, fusionar, integrar, cofundar, juntar y unificar.

Para los fines de la presente invención, los intervalos pueden expresarse en el presente documento como desde "sobre" o "aproximadamente" un valor particular y/o hasta "sobre" o "aproximadamente" otro valor particular. Cuando se expresa tal intervalo, otra realización incluye desde el un valor particular y/o hasta el otro valor particular. De modo similar, cuando los valores se expresan como aproximaciones, mediante el uso del antecedente "aproximadamente" se entenderá el valor particular forma otra realización. Se entenderá además que los puntos extremos de cada uno de los intervalos son significativos tanto en relación con el otro punto extremo e independientemente del otro punto extremo.

Para los fines de la presente invención, la expresión "agente bioactivo" se refiere a cualquier agente con actividad biológica o bien *in vivo* o *in vitro*, donde la actividad biológica puede detectarse como un cambio observable en la salud global o al menos un marcador de la salud (es decir, un síntoma) de un individuo, como un cambio en un marcador biológico subrogado relevante o como un cambio en la estructura química o conformación de una molécula fisiológicamente relevante.

Para los fines de la presente invención, la expresión "ion orgánico" se refiere a material aniónico. Los iones orgánicos pueden estar presentes en sus formas de sal o ácido. Iones orgánicos ejemplares incluyen naftoato.

Para los fines de la presente invención, una "composición de liberación controlada" se referirá a cualquier formulación con un perfil de liberación distinto a agente bioactivo nativo. Normalmente, los perfiles de liberación incluirán concentraciones fisiológicamente detectables de un agente bioactivo durante un período de al menos una semana, al menos un mes, al menos 45 días o durante más de 45 días.

Además, para los fines de la presente invención, el término "un" o "uno/una" entidad se refiere a uno o más de esa entidad; por ejemplo, "una proteína" o "un péptido" se refiere a uno o más de esos compuestos o al menos un compuesto. Como tal, los términos "un" o "uno/una", "uno o más" y "al menos uno" pueden usarse indistintamente en el presente documento. También cabe destacar que los términos "que comprende", "que incluye" y "que tiene" pueden usarse indistintamente. Además, un compuesto "seleccionado del grupo que consiste en" se refiere a uno o más de los compuestos en la lista que sigue, incluidas mezclas (es decir, combinaciones) de dos o más de los compuestos. De acuerdo con la presente invención, un agente bioactivo aislado o biológicamente puro es un compuesto que se ha retirado de su medio natural. Como tal, "aislado" y "biológicamente puro" no refleja necesariamente el grado hasta el cual el compuesto se ha purificado. Un compuesto aislado de la presente invención se puede obtener de su fuente natural, puede producirse utilizando técnicas biológicas moleculares o puede producirse mediante síntesis química.

Ahora se hará referencia en detalle a determinadas realizaciones de la invención, los ejemplos de las cuales se ilustran en la sección de Ejemplos adjuntos.

Composiciones de liberación controlada de la presente invención incluyen los siguientes componentes descritos.

Agentes bioactivos

En una realización de la presente invención, el agente bioactivo se selecciona del grupo que consiste en una proteína, un ácido nucleico, un carbohidrato, un péptido o una sustancia farmacéutica de molécula pequeña. Entre las proteínas de so en la presente invención se incluyen, aunque no de forma limitada a, anticuerpos, proteínas terapéuticas, hormona de crecimiento humana, interferón alfa, interferón beta, interferón gama, insulina, calcitonina, interleuquina-1, interleuquina-2 y similares. Entre los ácidos nucleicos de uso en la presente invención se incluyen, ADN, ARN, ADN químicamente modificado y ARN químicamente modificado, aptámeros, antisentido, interferente de ARN e interferente de ARN pequeño. Carbohidratos incluyen heparina, heparina de bajo peso molecular y similares. Péptidos incluyen agonistas de LHRH y análogos sintéticos de los mismos, somatostatina y análogos sintéticos de la misma, hormonas, octreótido, péptido tipo glucagón, oxitocina y similares. Entre las sustancias farmacéuticas de molécula pequeña se incluyen, aunque no de forma limitativa, antiinfecciosos, citotóxicos, antihipertensivos, agentes antifúngicos, antipsicóticos, agentes antidiabéticos, inmunoestimulantes, inmunosupresores, antibióticos, antivíricos, anticonvulsiantes, antihistamínicos, agentes cardiovasculares, anticoagulantes, hormonas, antipalúdicos, analgésicos, anestésicos, esteroides, antiinflamatorios no esteroideos, antieméticos.

En otra realización, el agente bioactivo es un inmunógeno. Tal inmunógeno puede seleccionarse del grupo que consiste en, aunque no limitado a, inmunógenos para estimular anticuerpos frente a hepatitis, gripe, sarampión, rubeola, tétanos, polio y rabia.

En otra realización, el agente bioactivo es una sustancia o precursor metabólico capaz de promover el crecimiento y supervivencia de células y tejidos o aumentar el funcionamiento de las células. Tal sustancia o precursor metabólico puede seleccionarse del grupo que consiste en, aunque no de forma limitada a, una sustancia promotora del crecimiento nervioso tal como gangliósido y un factor del crecimiento nervioso; un agente promotor del crecimiento de tejido duro o suave tal como fibronectina, hormona del crecimiento humana, un factor estimulante de colonias, proteína morfogénica del hueso, factor de crecimiento procedente de plaquetas, factores de crecimiento procedentes de insulina, factor de crecimiento alfa transformante, factor de crecimiento beta transformante, interleuquina-1, factor de crecimiento endotelial vascular, factor de crecimiento de queratinocitos y material óseo desecado.

En otra realización, el agente bioactivo es un agente antineoplásico. En una realización particular, el agente antineoplásico se selecciona del grupo que consiste en, aunque no limitado a, metotrexato, 5-fluorouracilo, adriamicina, vinblastina, cisplatina, anticuerpos específicos a tumor conjugados a toxinas y factor de necrosis tumoral.

- 5 En otras realizaciones, el agente bioactivo se selecciona del grupo que consiste en, aunque no limitado a, antihistamínicos tales como difenhidramina; agentes cardiovasculares tales como papverina, fibrinolíticos tales como estreptoquinasa; agentes anti-úlceras tales como yoduro de isopropamida; bronquodilatadores tales como sulfato de metaproteral, aminofilina; vasodilatadores tales como teofilina, niacina, minoxidil; agentes del sistema nervioso central tales como tranquilizantes, agentes bloqueadores β -adrenérgicos, dopamina; agentes antipsicóticos tales como risperidona, antagonistas narcóticos tales como naltrexona, naloxona, buprenorfina.

En una determinada realización, el agente bioactivo es capaz de proporcionar un efecto biológico, fisiológico o terapéutico local o sistémica en el sistema biológico en el que se aplica. Por ejemplo, el agente puede actuar para controlar la infección o inflamación, potenciar el crecimiento celular y regeneración tisular, controlar el crecimiento tumoral y potenciar el crecimiento óseo, entre otras funciones.

- 15 En otra realización, las composiciones de liberación controlada pueden contener combinaciones de dos o más agentes bioactivos. En una realización particular, las composiciones de liberación controlada pueden contener cinco o menos agentes bioactivos. En otra realización particular, las composiciones de liberación controlada contienen un agente bioactivo.

- 20 En otra realización, un "equivalente farmacéutico" o un agente bioactivo es cualquier compuesto con actividad similar o superior *in vitro* con respecto al agente bioactivo mismo. En un ejemplo particular, un equivalente farmacéutico tiene una estructura química similar al agente bioactivo, contiene solo la porción biológicamente activa del agente bioactivo o es un análogo sintético del agente bioactivo.

En otra realización, los agentes bioactivos de la presente invención pueden incluir diversas formas de sal y derivados que incluyen enlaces covalentes a polímeros hidrófilos tales como poli(etilenglicol) y poli(propilenglicol).

- 25 En una realización particular, el agente bioactivo tiene el potencial de mostrar al menos una carga positiva o negativa o ambas cargas positiva y negativa.

En una realización particular, el agente bioactivo es soluble en agua.

En otra realización particular, el agente bioactivo se solubiliza en un disolvente orgánico, que incluye opcionalmente un disolvente. El agente bioactivo puede ser soluble en agua o en disolventes orgánicos o ambos.

- 30 Se apreciará por un experto en la técnica que las cantidades reales de agentes bioactivos a utilizar en un caso particular variarán según el compuesto específico que está siendo utilizado, las composiciones particulares formuladas, el modo de aplicación y el sitio particular y el paciente que está siendo tratado. Las dosificaciones para un huésped dado pueden determinarse usando consideraciones habituales, por ejemplo, mediante comparación habitual de las actividades diferenciales de los compuestos del sujeto y un agente bioactivo conocido, por ejemplo, mediante un protocolo farmacológico convencional adecuado. Los médicos y formuladores, expertos en la determinación de dosis de compuestos farmacéuticos, no tendrán problemas determinando la dosis de acuerdo con las recomendaciones estándar.

Ion orgánico

- 40 Los iones orgánicos usados en la presente invención son materiales aniónicos. Los materiales aniónicos se seleccionan de los siguientes ácidos orgánicos y sus sales: trifluorometil-p-toluato, sulfonato 2-naftaleno, dicarboxílico de 2,3-naftaleno, 2-naftoico o salicilsalicílico. Las formas de sal de los materiales aniónicos pueden incluir, sodio, amonio, magnesio y calcio.

- 45 Los agentes iónicos orgánicos de uso en la presente invención pueden ser solubles en agua y en la fase orgánica hasta el grado requerido para potenciar la carga del fármaco y eficacia de encapsulación. En una realización particular, la concentración del agente iónico orgánico en la fase acuosa varía desde aproximadamente 0,5 a 100 mM. En otra realización particular, la concentración del ion orgánico varía desde aproximadamente 5 a 50 mM.

Micropartículas biodegradables

En determinadas realizaciones, la composición de liberación controlada es una micropartícula.

- 50 En determinadas realizaciones, un agente bioactivo está asociado con un polímero biodegradable en una forma de micropartícula. En una realización particular, una micropartícula tiene un diámetro inferior a 1,0 mm y normalmente entre 1,0 y 200,0 micrómetros. Las micropartículas incluyen tanto microesferas como microcápsulas y pueden ser aproximadamente esféricas o tener otras geometrías. Las microesferas son normalmente aproximadamente homogéneas en la composición y las microcápsulas comprenden un núcleo de una composición distinta de una

envoltura envolvente. Para los fines de la presente descripción, las expresiones microesfera, micropartícula y microcápsula se usan indistintamente.

En determinadas realizaciones, las micropartículas se pueden producir con una variedad de polímeros biodegradables. Polímeros biocompatibles y biodegradables adecuados incluyen poli(lactido)s, poli(glicolida)s, poli(lactide-co-glicolida)s, poli(ácido láctico)s, poli(ácido glicólico)s, poli(ácido láctico-ácido co-glicólico)s, policaprolactona, policarbonatos, poliésteramidas, polianhídridos, poli(aminoácidos), poliortoésteres, poliacetilos, policianoacrilatos, polieterésteres, poli(dioxanona)s, poli(alquileo alquilato)s, copolímeros de polietilenglicol y poli(lactida)s o poli(lactida-co-glicolida)s, poliuretanos biodegradables mezclas y copolímeros de los mismos.

En una realización particular, la micropartícula está producida con poli(d,l-lactida-co-glicolida) (PLGA). La PLGA se degrada cuando se expone a pH fisiológico y se hidroliza para formar ácido láctico y ácido glicólico, que son subproductos normales del metabolismo celular. La velocidad de desintegración de polímeros de PLGA variará dependiendo del peso molecular del polímero, la relación de lactida con respecto a monómeros de glicólida en la cadena polimérica y la estereoregularidad de las subunidades monoméricas. Las mezclas de estereoisómeros L y D que alteran la cristalinidad polimérica aumentarán las tasas de desintegración polimérica. Además, las microesferas pueden contener mezclas de dos o más polímeros biodegradables, de distinto peso molecular y/o relación de monómeros.

En otras realizaciones alternativas, polímeros biodegradables derivados, que incluyen polímeros hidrófilos unidos a PLGA, se pueden usar para formar microesferas. En realizaciones particulares, el polímero hidrófilo se selecciona del grupo que consiste en, aunque no limitado a, poli(etilenglicol), poli(propilenglicol) y copolímeros de poli(etilenglicol) y poli(propilenglicol).

Nanopartículas biodegradables

En determinadas realizaciones, la composición de liberación controlada es una nanopartícula.

En determinadas realizaciones, el agente bioactivo, con o sin un polímero hidrófilo unido, se asocia con partículas submicrométricas biodegradables para la liberación controlada del agente bioactivo. Una nanopartícula tiene un diámetro que varía de 20,0 nanómetros a aproximadamente 2,0 micrómetros y es normalmente entre 100,0 nanómetros y 1,0 micrómetro.

Las nanopartículas pueden crearse del mismo modo que las micropartículas excepto en que se usa un mezclado u homogeneización de alta velocidad para reducir el tamaño de las emulsiones de agente polimérico/bioactivo a menos de 2,0 micrómetros y, normalmente, por debajo de 1,0 micrómetro. Se conocen en la técnica métodos alternativos para la producción de nanopartículas y se pueden emplear para la presente invención.

Producción de composiciones de liberación controlada

Las composiciones de liberación controlada de la presente invención se pueden realizar mediante cualquier proceso de emulsión conocido en la técnica.

En una realización, una fase orgánica, que contiene uno o más disolventes, un agente bioactivo y un polímero se ponen en contacto con una fase acuosa, que contiene un ion orgánico. En una realización particular, la fase orgánica adicionalmente incluye un co-disolvente. En otra realización particular, la fase acuosa adicionalmente incluye un agente emulsionante.

En una realización particular, la fase orgánica se pone en contacto con la fase acuosa para formar una emulsión en donde la emulsión comprende gotas de la fase orgánica dispersadas en la fase acuosa. Posteriormente, se retira el disolvente de las gotas de emulsión para formar micropartículas endurecidas. A continuación, las micropartículas endurecidas pueden recuperarse de la fase acuosa y secarse.

En una realización, la fase orgánica puede contener disolventes que incluyen, aunque no de forma limitada a, cloruro de metileno, acetato etílico, alcohol bencílico, acetona, ácido acético, carbonato de propileno y otros disolventes en los que el polímero biodegradable es soluble. En una realización particular, el disolvente de la fase orgánica puede seleccionarse del grupo que consiste en acetato de etilo y cloruro de metileno.

En una realización, la fase acuosa puede contener disolventes que incluyen, aunque no de forma limitada a, metanol, alcohol bencílico, alcohol isopropílico, agua, dimetilfulfóxido, N,N-dimetilformamida, cloruro de metileno y otros disolventes en los que el agente bioactivo es soluble.

En otra realización, los co-disolventes se pueden añadir a la fase orgánica. Se usan, opcionalmente, para promover la solubilidad del agente bioactivo en la fase orgánica. En una realización particular, se seleccionan del grupo que consiste en, aunque no de forma limitada a, alcohol metílico, alcohol etílico, alcohol isopropílico, pirrolidinona de N-metilo, sulfóxido de dimetilo, N,N-dimetilformamida, PEG₂₀₀, PEG₄₀₀ y alcohol bencílico. En otra realización particular, el co-disolvente puede estar presente entre aproximadamente 0 y 90 % p/p del disolvente de la fase orgánica. En otra realización particular, el co-disolvente está presente entre aproximadamente 0 y 50% p/p del

disolvente de la fase orgánica. El agente bioactivo puede disolverse, en primer lugar, en un volumen adecuado del co-disolvente que se añade, a continuación, al disolvente de la fase orgánica, preferentemente, que tiene el polímero disuelto dentro de la misma, para formar una solución de todos los componentes de la fase orgánica. Un experto en la técnica puede ajustar los volúmenes y el orden de adición para lograr la solución deseada de agente bioactivo y polímero biodegradable. En una determinada realización, el agente bioactivo estará presente en la fase orgánica a una concentración de aproximadamente 1-20 % p/p. En una realización particular, el polímero biodegradable estará presente en la fase orgánica a una concentración de aproximadamente 2-40 % p/p. En otra realización particular, el polímero biodegradable estará presente en la fase orgánica a una concentración de aproximadamente 5-20 % p/p.

Los iones orgánicos se disuelven en la fase acuosa. En una determinada realización, se disuelven a una concentración de entre aproximadamente 0,1 y 1.000 mM. En una realización particular, se disuelven a una concentración de entre aproximadamente 1 a 100 mM. La concentración puede ajustarse para cada agente iónico orgánico particular y agente bioactivo para conseguir la carga del fármaco deseada y eficacia de encapsulación.

Se puede añadir uno o más agentes emulsionantes a la fase acuosa para estabilizar la emulsión. Los agentes emulsionantes pueden seleccionarse del grupo que consiste en, aunque no de forma limitada a, poli(vinil alcohol), albúmina, lecitina, vitamina E, TPGS y polisorbatos. Los agentes emulsionantes están presentes a una concentración en la fase acuosa de entre 0 y 10 % p/p). En una realización particular, están presentes a una concentración de entre 0,5 a 5 % p/p.

Formulaciones farmacéuticas

Además de los compuestos formulados para su administración parenteral, tal como inyección intravenosa o intramuscular, también se pueden utilizar otros métodos alternativos de administración de la presente invención, que incluyen, aunque no de forma limitada a administración intradérmica, administración pulmonar, administración bucal, administración transdérmica y de transmucosa. La administración de transmucosa puede incluir, aunque no de forma limitada a, vía oftálmica, vaginal, rectal e intranasal. Todos tales métodos de administración son bien conocidos en la técnica.

En una realización particular, la composición de liberación controlada de la presente invención puede administrarse por vía intranasal, tal como con soluciones o pulverizadores nasales, aerosoles o inhaladores. Las soluciones nasales son normalmente soluciones acuosas diseñadas para administrarse a los conductos nasales en gotas o pulverizaciones. Las soluciones nasales están preparadas de modo que son similares en muchos sentidos con respecto a las secreciones nasales. De este modo, las soluciones nasales acuosas normalmente son isotónicas y altamente tamponadas para mantener un pH de 5,5 a 6,5.

Los conservantes antimicrobianos, similares a los usados en preparaciones oftálmicas y estabilizadores de fármacos adecuados, si se necesitan, pueden incluirse en cualquiera de las formulaciones. Los conservantes y otros aditivos pueden seleccionarse del grupo que consiste en, aunque no de forma limitada a, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes.

Se conocen diversas preparaciones nasales comerciales e incluyen, por ejemplo, antibióticos y antihistamínicos y se pueden para la profilaxis del asma.

En otra realización, las composiciones de liberación controlada de la presente invención se aplican por vía tópica. Tales composiciones de liberación controlada incluyen, aunque no de forma limitada, lociones, pomadas, cremas, geles, gotas, supositorios, pulverizadores, líquidos y polvos. Vehículos farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo o aceitosas, espesantes y similares pueden ser necesarios o deseables.

Excipientes, vehículos y diluyentes

Las composiciones de liberación controlada de la presente invención pueden formularse en cualquier excipiente que el sistema o entidad biológica pueda tolerar. Ejemplos de tales excipientes incluyen agua, solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa, solución de Hank y otras soluciones acuosas de sal fisiológicamente equilibradas. También se pueden utilizar vehículos no acuosos, tales como aceites fijos, polietilenglicol y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Otras formulaciones útiles incluyen suspensiones que contienen agentes potenciadores de la viscosidad, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol o dextrano.

Los excipientes también pueden contener cantidades menores de aditivos, tales como sustancias que potencian la isotonicidad y estabilidad química. Ejemplos de tampones incluyen tampón fosfato, tampón de bicarbonato y tampón Tris, mientras que ejemplos de conservantes incluyen timerosol, cresoles, formalina y alcohol bencílico.

Los expertos en la técnica conocen vehículos farmacéuticos para composiciones de liberación controlada de la presente invención. Los más típicamente utilizados son probablemente vehículos estándar para su administración a humanos que incluyen soluciones tales como agua estéril, solución salina y soluciones tamponadas a un pH fisiológico.

Las composiciones de liberación controlada de la presente invención pueden suspenderse en cualquier solución acuosa u otro diluyente para su inyección en un paciente humano o animal que necesite tratamiento. Soluciones de diluyente acuosas pueden incluir adicionalmente un potenciador de la viscosidad seleccionado del grupo que consiste en carboximetilcelulosa sódica, sacarosa, manitol, dextrosa, trehalosa y otros agentes potenciadores de la viscosidad biocompatibles. La viscosidad puede ajustarse a un valor de entre 2 mPa (2 centipoise, cp) y 100 mPa (100 cp) preferentemente entre 4 y 40 mPa (entre 4 y 40 cp).

En una realización particular, se puede incluir el tensioactivo en el diluyente para potenciar la capacidad de suspensión de la composición de liberación controlada. Los tensioactivos se pueden seleccionar del grupo que consiste en, aunque no de forma limitada a, polisorbatos y otros tensioactivos biocompatibles. Los tensioactivos se usan a una concentración de entre el 0 y el 5 % (p/p) preferentemente entre el 0,1 y el 1 % p/p.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar realizaciones particulares de la invención. Los expertos en la materia deben apreciar que las técnicas descritas en los ejemplos siguientes representan técnicas descubiertas por inventores para funcionar bien en la práctica de la invención y, por lo tanto, pueden considerarse que constituyen modos particulares para su práctica. Sin embargo, los expertos en la técnica deben apreciar, a la luz de la presente descripción, que se pueden realizar muchos cambios en las realizaciones específicas que se describen y que, aun así, obtener un resultado parecido o similar sin alejarse del alcance de la invención, siempre y cuando los cambios se encuentren dentro del alcance de las reivindicaciones.

Ejemplo 1 (comparativo)

Preparación convencional de acetato de octreótido encapsulado en micropartículas de poli(lactida-co-glicolida) usando co-disolventes de acuerdo con métodos previamente usados.

Se prepararon formulaciones de micropartículas de acetato de octreótido para investigar el efecto de distintos co-disolventes en la fase orgánica. Las formulaciones A-F, preparadas usando una técnica de extracción de emulsión/disolvente aceite-en-agua, se resumen en la Tabla 1. Se disolvió polímero de PLGA (50:50 de lactida/glicolida, PM 24.000, 180 mg) en acetato de etilo (EtOAc, 900 μ L) y se añadió acetato de octreótido (20 mg) disuelto en un co-disolvente (Tabla 1) a la solución polimérica. La fase orgánica homogénea resultante se añadió a una fase acuosa (2 ml) que contenía poli(alcohol vinílico) (PVA) al 1 % y la mezcla se agitó con formación de vórtice durante 15-30 s. La emulsión se vertió en una solución de extracción de disolvente (10 mM fosfato sódico, pH 8,0, 150 ml) y se agitó durante cuatro horas para extraer EtOAc. Las partículas se aislaron mediante filtración, se lavaron con agua y se secaron aire durante la noche. Las formulaciones se caracterizaron por tamaño de partícula, microscopía de barrido electrónico (SEM), morfología, carga del núcleo de octreótido y perfiles de liberación *in vitro*.

La Formulación D se repitió usando un dispositivo emulsionante, tal como se desvela en la solicitud PCT serie n.º PCT/US04/11485 que combinaba una fase orgánica homogénea (2 ml) que consistía en acetato de octreótido (20 mg), MeOH 100 μ L, polímero de PLGA (50:50 lactida/glicolida, PM 24.000, 180 mg) y EtOAc (1,9 ml) con un 1 % de fase acuosa de PVA (4 ml). A continuación, la emulsión se añadió a una solución de extracción de disolvente y se agitó durante cuatro horas para extraer EtOAc. Este proceso produjo la formulación D2 (Tabla 1).

Los co-disolventes investigados tenía una poca influencia sobre el tamaño de partícula y la carga del núcleo. Los tamaños de partícula fueron más grandes con los co-disolventes de poli(etilenglicol) (PEG) de viscosidad superior. En contraste, las cargas del núcleo fueron similares para los co-disolventes de metanol (MeOH) y PEG (formulaciones A-C). Se obtuvieron las cargas del núcleo más altas en el co-disolvente de MeOH con una etapa de emulsión tamponada de pH 8 (formulación D2) y para el co-disolvente de dimetilsulfóxido (DMSO) (formulación F).

Las cinéticas de liberación *in vitro* se midieron o bien en solución salina tamponada de fosfato (PBS, pH 7,2, 37 °C) o 100 mM de acetato sódico (NaOAc, pH 4,0, 37 °C). Se muestra un ejemplo en la Tabla 2 (Formulación D2). Los sistemas de co-disolvente de PEG mostraron el estallido de péptido inicial más alto (8-10 %), mientras que las formulaciones restantes tuvieron un estallido inicial en el intervalo de 2-3 %. Todas las formulaciones liberaron péptido durante al menos 6 semanas. Hubo una disminución en las velocidades de liberación relativa para formulaciones preparadas con disolventes apróticos polares (formulaciones E-F) dando como resultado una liberación total inferior de péptido con respecto a otras formulaciones.

El acetato de octreótido como el péptido libre se midió para que fuera del 95 % intacto mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) seguido de incubación en el medio de liberación (PBS, pH 7,2, 37 °C) después de 49 días. En contraste, la incubación de formulaciones de micropartículas de PLGA de acetato de octreótido produjo un 55 % de especies peptídicas modificadas después de 70 días en el medio de liberación (PBS, pH 7,2, 37 °C, Tabla 2). El análisis de HPLC mostró que las nuevas entidades peptídicas fueron más hidrófobas que el acetato de octreótido nativo. El análisis de HPLC/MS reveló masas consistentes con la acilación del péptido parental mediante polímero de PLGA. Se halló que las masas eran consistentes con la acilación aleatoria, por ejemplo, péptidos más uno o dos de monómeros de ácido glicólico o láctico en cualquier combinación. Puede ser que los productos de acilación surjan del ataque en los fragmentos de PLGA o la estructura principal del polímero por restos nucleófilos en el octreótido. A un pH inferior, estos restos se protonarían probablemente reduciendo su nucleofilicidad y, por

consiguiente, la cantidad de producto acilado. Se observó que la formación de subproductos acilados para micropartículas de PLGA de acetato de octreótido incubadas en 100 mM de tampón de acetato sódico (NaOAc, pH 4,0) se redujo al 1,25 % en 49 días, en contraste marcado con respecto a los resultados del tampón de PBS (55 %).

Tabla 1. Encapsulación de acetato de octreótido en micropartículas de PLGA.

	<i>Co-disolvente en fase orgánica</i>	<i>Composición de fase acuosa</i>	<i>Tamaño de partícula medio</i>	<i>Carga del núcleo (ef. encaps.)</i>	<i>Estallido (%)</i>	<i>Liberación peptídica total (Acilado)</i>
A	PEG ₂₀₀ (100 µL)	1% PVA	49 µm	2,83% (28%)	7,96	72,6% (44%)
B	PEG ₄₀₀ (100 µL)	1% PVA	76 µm	3,20% (32%)	10,4	63,0% (48%)
C	MeOH (50 µL)	1% PVA	25 µm	2,75% (28%)	2,91	65,7% (50%)
D	MeOH (100 µL)	1% PVA + 10 mM PO ₄ (pH8)	34 µm	5,57% (56%)	2,58	65,1% (50%)
D2	MeOH (100 µL)	1% PVA + 10 mM PO ₄ (pH8)	60 µm	5,66% (57%)	1,90	85,8% (55%)
E	DMF (100 µL)	1% PVA	38 µm	3,41% (34%)	1,97	50,3% (33%)
F	DMSO (100 µL)	1% PVA	38 µm	4,88% (49%)	2,74	43,4% (36%)

5

Tabla 2. Liberación *in vitro* de formulaciones D2 y AG. El tampón de NaOAc contiene 100 mM NaOAc (pH 4,0), 0,02 % de Tween-20 y 0,05 % de NaN₃. El PBS es solución salina tamponada de fosfato (pH 7,2) que contiene 0,02 % de Tween-20 y 0,05 % de NaN₃. Las muestras se incubaron en una incubadora de baño de agua con agitación (150 Hz) a 37 °C. Los valores de liberación de péptido y péptido acilado se enumeran como porcentaje cumulativo liberado.

Formulación D2		
100 mM NaOAc (pH 4)		
Día	% de péptido liberado	% de péptido acilado liberado
0	0,0	0,0
1	5,55	0,15
3	13,75	0,78
6	53,47	4,11
10	71,74	5,16
14	72,19	5,26
20	72,21	5,28
24	72,22	5,30
29	72,22	5,30
34	72,22	5,30
42	72,22	5,30
48	72,22	5,30

10

Formulación D2		
PBS (pH 7)		
Día	% de péptido liberado	% de péptido acilatado liberado
0	0,0	0,0
1	1,81	0,08
3	3,09	0,22
6	4,87	0,59
10	7,54	1,98
14	10,42	4,29
20	17,81	10,51
24	20,69	14,06
29	23,86	18,86
34	26,21	23,12
42	32,91	28,73
48	35,13	32,14
57	36,50	35,10
64	37,83	37,41
71	38,42	45,82
78	38,58	46,37
85	38,64	46,70

Formulación AG		
PBS (pH 7)		
Día	% de péptido liberado	% de péptido acilatado liberado
0	0,0	0,0
1	8,04	0,33
2	9,09	0,47
6	12,27	0,65
15	17,75	1,23
24	20,03	1,78
29	23,78	2,66
35	36,16	5,62
42	43,80	8,15
49	51,17	11,13
57	61,47	15,57
64	67,63	18,16

Ejemplo 2 (comparativo)

5 Producción de sales de ácido orgánico insolubles en agua (complejos) de octreótido y encapsulación en micropartículas de PLGA de acuerdo con métodos previamente usados.

Se investigaron los agentes iónicos orgánicos en los que el ion orgánico se acomplejó inicialmente con acetato de octreótido para formar una sal insoluble en agua seguido por encapsulación en micropartículas de PLGA.

Dodecilsulfato sódico (SDS). Se preparó un complejo de octreótido-SDS disolviendo acetato de octreótido (100 mg) en H₂O (500 µL). SDS (1,5 equiv, 43,2 mg) disuelto en H₂O (500 µL) se agregó a gotas a la solución de acetato de octreótido con agitación con formación de vórtice a temperatura ambiente. Se formó inmediatamente un precipitado. La muestra se centrifugó a 10.000 rpm durante 1 minuto y el sobrenadante se retiró mediante pipeta. El precipitado se lavó con agua fría y se liofilizó, proporcionando un complejo de octreótido-SDS (95,3 mg). El análisis de RP-HPLC mostró una ampliación pronunciada del máximo de octreótido que indicaba la formación del complejo de octreótido/SDS. Las Formulaciones G-I se prepararon usando una técnica de extracción de emulsión/disolvente de aceite-en-agua. Se disolvió el polímero de PLGA (PM 24.000, 180 mg) en EtOAc (900 µL). El complejo de octreótido/SDS se disolvió en MeOH (100 µL) y se añadió a la solución polimérica. Esto dio como resultado una fase orgánica heterogénea. En el caso de la formulación I (Tabla 3) se añadió un alícuota adicional de MeOH (100 µL) para producir una fase orgánica homogénea. La fase orgánica resultante se añadió a una fase acuosa (2 ml) que contenía PVA al 1 % y la mezcla se agitó con formación de vórtice durante 15- 30 s. La emulsión se vertió en una solución de extracción de disolvente (10 mM fosfato sódico, pH 8,0, 150 ml) y se agitó durante cuatro horas para extraer EtOAc. Las partículas se aislaron mediante filtración, se lavaron con agua y se secaron aire durante la noche. Las formulaciones se caracterizaron por tamaño de partícula, SEM, morfología, carga del núcleo de octreótido y perfiles de liberación *in vitro*.

La carga del núcleo medida para las formulaciones G-I preparadas del complejo de octreótido-SDS fue relativamente baja, entre 0,6-2,6 % (Tabla 3). También el tamaño de partícula medio se redujo aproximadamente en un 40 % con respecto a las formulaciones (A-F) preparadas con acetato de octreótido.

Los perfiles de liberación *in vitro* de las formulaciones G-I en PBS fueron bastante similares. Cada uno tuvo un estallido inicial de aproximadamente el 20 % seguido por las tres semanas del 1,5 % de liberación/semana. Después de las tres semanas, la tasa de liberación aumentó aproximadamente el 7,0 % de liberación/semana, culminando aproximadamente el 80 % en liberación peptídica a las 9 semanas.

El ensayo de liberación de PBS *in vitro* con estas formulaciones dio como resultado la liberación de cantidades similares de péptido acilado (40-55 %) y péptido total en comparación con acetato de octreótido (formulaciones A-F).

Tabla 3. Complejo Octreótido-SDS en la fase orgánica.

Formulación	Co-disolvente en fase orgánica	Tamaño de partícula medio	Carga del núcleo (ef. encaps.)	Estallido (Acilado)
G	MeOH (100 µL)	11,4 µm	0,61 % (6,1 %)	20,3 % (49 %)
H	MeOH (100 µL)	12,4 µm	0,75 % (7,5 %)	21,2 % (40 %)
I	MeOH (200 µL)	12,9 µm	2,64 % (2,6 %)	20,2 % (42 %)

Ácido benzoico

Las formulaciones (J-M) se prepararon usando de uno a diez equivalentes de ácido benzoico co-disuelto en la fase orgánica con PLGA. El polímero de PLGA (PM 24.000, 180 mg) y ácido benzoico (2,4-24 mg) se disolvieron en EtOAc (900 µL). El acetato de octreótido se disolvió en MeOH (100 µL) y se añadió a la solución polimérica proporcionando una fase orgánica homogénea. La fase orgánica resultante se añadió a una fase acuosa (2 ml) que contenía PVA al 1 % y la mezcla se agitó con formación de vórtice durante 15-30 s. La emulsión se vertió en una solución de extracción de disolvente (10 mM fosfato sódico, pH 8,0, 150 ml) y se agitó durante cuatro horas para extraer EtOAc. Las partículas se aislaron mediante filtración, se lavaron con agua y se secaron aire durante la noche. Las cargas del núcleo medidas entre el 0,88-1,67 % sobre el intervalo de 1-10 agregaron equivalentes de ácido benzoico por equivalente de acetato de octreótido (Tabla 4).

Ácido pamoico

Se preparó un complejo de octreótido-pamoato disolviendo ácido pamoico (19,4 mg, 0,05 mmol) en 0,2 N NaOH (500 µL) para proporcionar la sal de pamoato de sodio. El acetato de octreótido (100 mg, 0,10 mmol) se disolvió en agua desionizada (100 µL) y se agregó a gotas con formación de vórtice suave a la solución de sal de pamoato sódico. Esto produjo un precipitado de color amarillo claro floculante. El precipitado se microgranuló mediante centrifugación y el sobrenadante se retiró mediante pipeta. El microgranulado se lavó con agua (1,0 ml), resuspendió

en agua y liofilizó en un polvo de color amarillo claro (113 mg). La relación de octreótido/pamoato de esta preparación fue de 1,71 según se ha medido por RP-HPLC.

Se preparó un segundo complejo de octreótido-pamoato disolviendo ácido pamoico (19,4 mg, 0,05 mmol) en 0,4 N NaOH (250 µL) y dioxano (250 µL) para proporcionar una solución de pamoato sódico en dioxano/agua (1:1). El acetato sódico (50 mg, 0,05 mmol) se disolvió en dioxano/agua (1:1, 200 µL). La solución de acetato de octreótido se añadió a gotas al pamoato sódico con mezclado para proporcionar una solución homogénea de color amarillo claro. El material se liofilizó hasta sequedad para proporcionar un polvo de color amarillo claro (65 mg). La relación de octreótido/pamoato de esta preparación fue de 1,02 según se ha medido por RP-HPLC. Se utilizaron estas dos preparaciones para preparar nuevas formulaciones de micropartículas de PLGA.

Tabla 4. Ácido benzoico y acetato de octreótido en fase orgánica

<i>Formulación</i>	<i>Co-disolvente en fase orgánica</i>	<i>Ácido benzoico: Relación de acetato de octreótido</i>	<i>Tamaño de partícula medio</i>	<i>Carga del núcleo (ef. encaps.)</i>
J	MeOH (100 µL)	1	21,8 µm	1,36% (14%)
K	MeOH (100 µL)	2	19,5 µm	0,88% (8,8%)
L	MeOH (100 µL)	5	18,8 µm	1,61% (16%)
M	MeOH (100 µL)	10	17,9 µm	1,67% (17%)

Las formulaciones de micropartículas (Tabla 5, Q-W) se prepararon mediante un método de extracción de emulsión/disolvente de aceite-en-agua. Se disolvió el polímero de PLGA (PM 24.000, 180 mg) en EtOAc (1.000 µL). El pamoato de octreótido (20 o 40 mg) se disolvió en alcohol bencílico (BnOH, 1.000 µL) y se añadió a la solución polimérica proporcionando una fase orgánica homogénea. La fase orgánica resultante se combinó con una fase acuosa de PVA al 1 % en una relación de 1:2 para proporcionar una emulsión. La emulsión se recogió directamente en una solución de extracción de disolvente de PVA al 0,3 % (150 ml) y se agitó durante cuatro horas para extraer EtOAc. Se recogieron las micropartículas endurecidas mediante filtración, se lavaron con agua, se secaron al aire y se almacenaron a 4 °C.

La caracterización de la formulación (Tabla 5) reveló que la relación de octreótido/pamoato inicial de 1,7 tuvo poco efecto en la eficacia de encapsulación y carga del núcleo con respecto a las formulaciones preparadas con la relación de octreótido/pamoato de 1,02. En contraste, cambia el co-disolvente a alcohol bencílico aumentó la eficacia de encapsulación por aproximadamente un 60 % con respecto a metanol (por ejemplo, Formulación S en comparación con T).

Los perfiles de liberación *in vitro* de estas formulaciones en PBS demostraron un péptido total liberado (79-92 %, Tabla 5 Q-T) es comparable con micropartículas de acetato de octreótido de PLGA realizadas mediante métodos convencionales (Formulaciones D, F, Tabla 1) mientras que la cantidad de péptido acilado liberado (28-40 %, Tabla 5 Q-T) disminuye ligeramente con respecto a formulaciones convencionales (44-55 %, Tabla 1, A-D).

Las formulaciones preparadas que utilizan la relación de octreótido/pamoato de 1:1 no mostraron una dependencia tan fuerte de la eficacia de encapsulación y carga del núcleo en la naturaleza del co-disolvente como las formulaciones de relación 1,7 anteriores. Las diferencias en solubilidad para los complejos con distintas relaciones de octreótido/pamoato en el co-disolvente se proponen como una explicación de esta observación. El material con una relación de octreótido/pamoato superior tuvo una solubilidad aumentada en alcohol bencílico con respecto a metanol, lo que da como resultado una eficacia de encapsulación superior. En contraste, se encontró que no hubo una diferencia significativa en solubilidad en metanol frente a alcohol bencílico para el complejo de octreótido/pamoato 1:1. Esto dio como resultado eficacias de encapsulación similares y cargas de núcleo independientes de los co-disolventes.

Los perfiles de liberación *in vitro* de estas formulaciones 1:1 (U-W) revelan tendencias similares tal como se ha analizado anteriormente, a saber, a las del porcentaje total de péptido liberado (85-110 %, Tabla 5 U-W) es de nuevo comparable a formulaciones convencionales (Ejemplo 1) (ca. 85 %, Tabla 2) mientras que la cantidad de producto acilado liberado (35-44 %, Tabla 5 U-W) disminuye de algún modo con respecto a formulaciones convencionales (44-55 %, Tabla 1, A-D2).

El análisis de la relación molar de octreótido/pamoato final mostró una amplia variación entre las formulaciones sometidas a ensayo (Tabla 5) con un intervalo de 2,1:1 (formulación W) a sobre 200:1 (formulación R). En todos los casos la relación es más del doble de la relación de octreótido/pamoato del complejo de sal de péptido de partida. De este modo, el uso de una sal de pamoato preformada del octreótido peptídico proporcionó relaciones molares de octreótido/pamoato altamente variables en la formulación de liberación sostenida final.

Tabla 5. Micropartículas de octreótido-pamoato preparadas utilizando complejo preformado.

<i>Formulación</i>	<i>Relación inicial de octreótido-pamoato (final)</i>	<i>Co-disolvente en fase orgánica</i>	<i>Tamaño de partícula medio</i>	<i>Carga del núcleo (ef. encaps)</i>	<i>Liberación peptídica total (Acilado)</i>
Q	1,7:1 (4,4:1)	MeOH (100 µL)	40 µm	6,52% (65%)	88,6% (28,1%)
R	1,7:1 (201:1)	MeOH (500 µL)	34 µm	3,34% (33%)	79,2% (38,9%)
S	1,7:1 (13:1)	BnOH (200 µL)	31 µm	8,29% (83%)	87,2% (39,7%)
T	1,7:1 (21:1)	MeOH (200 µL)	37 µm	5,03% (50%)	91,5% (32,2%)
U	1:1 (5,3:1)	MeOH (200 µL)	48 µm	4,93% (49%)	92,3% (37,3%)
V	1:1 (5,4:1)	BnOH (200 µL)	48 µm	4,76% (48%)	110% (44,4%)
W	1:1 (2,1:1)	BnOH (200 µL)	44 µm	5,01% (25%)	84,9% (35,0%)

Ejemplo 3

Encapsulación de acetato de octreótido en microesferas de PLGA usando sales de ácido orgánico en fase de emulsión acuosa de acuerdo con la presente invención.

Las formulaciones X, Y, Z, AA, AB, AC, AD, AE, AF, AG, AH, AI, AJ, AK, AL, AM, AN, AO, AQ, AT, AU, AV, AW y AY no forman parte de la invención.

Sorprendentemente, se descubrió que el uso de una sal de ácido orgánico en la fase acuosa del proceso de emulsificación permitiría el uso de un péptido soluble en agua y eliminaba la necesidad de preparar especies acomplejadas en una etapa independiente antes de preparar la formulación. La presente invención proporcionó beneficios añadidos tales como carga del núcleo aumentada consistente con la relación de ion de octreótido/orgánico y degradación peptídica reducida durante la liberación *in vitro*.

Las formulaciones de micropartículas se prepararon mediante un método de extracción de emulsión/disolvente de aceite-en-agua. Se disolvió el polímero de PLGA (PM 24.000, 140-180 mg) en EtOAc (1.000 µL). El acetato de octreótido (20-60 mg) se disolvió en BnOH (1.000 µL) y se añadió a la solución polimérica proporcionando una fase orgánica homogénea. La fase orgánica resultante se combinó con una fase acuosa de PVA al 1 % que contenía 10-50 mM pamoato disódico para proporcionar una emulsión. La emulsión se recogió directamente en una solución de extracción de disolvente de PVA al 0,3 % (150 ml) y se agitó durante cuatro horas para extraer EtOAc. Se recogieron las micropartículas endurecidas mediante filtración, se lavaron con agua, se secaron al aire y se almacenaron a 4 °C.

Esto dio como resultado una relación de octreótido/pamoato final de aproximadamente 1-1,5 en la formulación de micropartículas medidas por RP-HPLC (Tabla 6).

- Los efectos de diversos parámetros experimentales en la carga del núcleo se investigaron incluída la relación de fase orgánica con respecto a acuosa, la naturaleza del co-disolvente y el volumen del co-disolvente. Se halló que el BnOH era un disolvente más adecuado que el MeOH. Fue posible usar BnOH en volúmenes más grandes que MeOH, ya que MeOH inducía la precipitación polimérica en la fase orgánica. El BnOH también llevaba a un pequeño aumento en la carga del núcleo frente a MeOH (Formulación Y, AB, Tabla 6). Sin embargo, el uso de BnOH sin el ion orgánico en la fase acuosa no proporcionó altas cargas de núcleo o eficacias de encapsulación (AI, Tabla 6). También se halló que disminuyendo la relación de fase orgánica con respecto a acuosa aumentó la eficacia de encapsulación ligeramente cuando se usó BnOH como el co-disolvente (Formulaciones AE, AF, Tabla 6). En todos los casos, la relación molar de octreótido con respecto a pamoato se agrupó estrechamente entre aproximadamente 1,0 a 1,5, en contraste con las formulaciones del Ejemplo 2 (Tabla 5) donde el uso de un complejo de octreótido/pamoato preformado llevó a amplias variaciones de la relación de octreótido/pamoato final desde 2,1 a sobre 200.
- Significativamente, se podría formar producto con cargas de núcleo predecibles y elevadas que varían de 5-17,5 % con el método descrito en el presente documento (formulaciones, AD, AG, AH, Tabla 6), en contraste con los métodos de la técnica anterior de Ejemplos 1 y 2 donde la carga del núcleo máxima era de aproximadamente el 8 % (Tabla 5-S) con promedios que variaban de 2-6 % (Tablas 1-5). Además, las composiciones descritas en el presente documento tienen una estequiometría consistente para la relación molar del agente bioactivo con respecto al ion orgánico (Tabla 6). Esto contrasta con las composiciones realizadas utilizando métodos anteriores (Tabla 5). Además, la producción relativa de péptido acilado es inferior para micropartículas realizadas con el ion orgánico en la fase acuosa (Tabla 6) que para micropartículas realizadas con el uso de octreótido-pamoato preformado (Tabla 5) o acetato de octreótido (Tabla 2).

Tabla 6. Micropartículas de complejo octreótido-pamoato mediante un proceso *in situ*.

Formulación (relación final de octreótido/pamoato)	Entrada de acetato de octreótido	Co- disolvente	Relación de fase orgánica/acuosa	Tamaño de partícula medio	Carga del núcleo (ef. encap)	Liberación peptídica total (Acilado)
X (1,09:1)	40 mg	MeOH (200 µL)	1:4	79 µm	8,52% (46,8%)	98,8% (15,7%)
Y (0,86:1)	20 mg	MeOH (200 µL)	1:10	71 µm	5,13% (51%)	120% (30,6%)
Z (1,09:1)	20 mg	BnOH (1.000 µL)	1:2	44 µm	7,61% (76%)	97,1% (4,11%)
AA (1,01:1)	20 mg	BnOH (1.000 µL)	1:2	59 µm	6,79% (6,8%)	101% (12,7%)
AB (1,11:1)	20 mg	BnOH (500 µL)	1:2	45 µm	6,19% (62%)	97,1% (14,8%)
AC (1,14:1)	20 mg	BnOH (1.000 µL)	1:2	47 µm	7,51% (75%)	96,8% (13,4%)
AD (1,11:1)	40 mg	BnOH (1.000 µL)	1:2	53 µm	12,7% (64%)	101% (16,1%)
AE (1,41:1)	60 mg	BnOH (500 µL)	1:2	45 µm	9,51% (32%)	103% (26,1%)
AF (1,16:1)	60 mg	BnOH (500 µL)	1:4	50 µm	12,0% (40%)	108% (21,7%)

Formulación (relación final de octreótido/pamoato)	Entrada de acetato de octreótido	Co- disolvente	Relación de fase orgánica/acuosa	Tamaño de partícula medio	Carga del núcleo (ef. encap)	Liberación peptídica total (Acilatado)
AG (1,39:1)	60 mg	BnOH (1.000 μL)	1:2	39 μm	17,2% (57%)	92,5% (20,7%)
AH (1,36:1)	60 mg	BnOH (1.000 μL)	1:2	37 μm	17,5% (57%)	111% (25,0%)
AI	60 mg	BnOH (1.000 μL)	1:2	40 μm	6,85% (23%)	ND

El efecto de la concentración de ácido orgánico en la fase acuosa se exploró para determinar los parámetros de fabricación óptimos. Se disolvió el polímero de PLGA (PM 24.000, 160 mg) en EtOAc (1.000 μL). El acetato de octreótido (40 mg) se disolvió en BnOH (1.000 μL) y se añadió a la solución polimérica proporcionando una fase orgánica homogénea. La fase orgánica resultante se combinó con una fase acuosa de PVA al 1 % que contenía 20 o 50 mM pamoato sódico para proporcionar una emulsión. La emulsión se recogió directamente en una solución de extracción de disolvente de PVA al 0,3 % (150 ml) y se agitó durante cuatro horas para extraer EtOAc. Se recogieron las micropartículas endurecidas mediante filtración, se lavaron con agua, se secaron al aire y se almacenaron a 4 °C. Las Formulaciones AJ-AL muestran que 20 o 50 mM de pamoato disódico no tuvo efecto en la carga del núcleo con respecto a 10 mM de pamoato disódico (Tabla 7). Sin embargo, la concentración de pamoato disódico en la fase acuosa tuvo un efecto medible en el "día uno" de la liberación de PBS *in vitro*. La formulación preparada utilizando 50 mM pamoato sódico dio como resultado un estallido del 15 % (Formulación AL, Tabla 7) en comparación con menos de un 4 % de estallido en las formulaciones preparadas con 20 mM ion orgánico (Formulaciones AJ, AK, Tabla 7). Esto sugiere que el exceso de ion orgánico en la fase acuosa es perjudicial para el rendimiento de liberación *in vitro* de las formulaciones.

Tabla 7. El efecto de la concentración iónica orgánica en la formación de micropartículas de octreótido-pamoato

Formulación (relación final de octreótido/pamoato)	Conc. de pamoato sódico	Relación de fase orgánica/acuosa	Tamaño de partícula medio	Carga del núcleo (ef. encap)	Liberación de estallido de PBS	Liberación peptídica total (Acilatado)
AJ (1,33:1)	20 mM	1:1	33 μm	13,3% (67%)	3,77 %	108% (25,7%)
AK (1,29:1)	20 mM	1:2	41 μm	13,3% (67%)	3,38%	106% (22,4%)
AL (1,29:1)	50 mM	1:2	54 μm	12,8% (64%)	15,0%	110% (26,8%)

Se investigaron iones orgánicos alternativos con respecto a pamoato para explorar la utilidad general de la presente invención. Las formulaciones de micropartículas se prepararon mediante un método de extracción de emulsión/disolvente de aceite-en-agua. Se disolvió el polímero de PLGA (PM 24.000, 160 mg) en EtOAc (1.000 μL). El acetato de octreótido (40 mg) se disolvió en BnOH (1.000 μL) y se añadió a la solución polimérica proporcionando una fase orgánica homogénea. La fase orgánica resultante se combinó con una fase acuosa de PVA al 1 % que contenía 10-20 mM ácido orgánico como su sal sódica para proporcionar una emulsión. La emulsión se recogió directamente en una solución de extracción de disolvente de PVA al 0,3 % (150 ml) y se agitó durante cuatro horas para extraer EtOAc. Se recogieron las micropartículas endurecidas mediante filtración, se lavaron con agua, se secaron al aire y se almacenaron a 4 °C. Esto dio como resultado formulaciones de micropartículas con cargas de núcleo de octreótido entre 6,8 y 15,3 % según se ha medido por RP-HPLC (Tabla 8). Los efectos de los iones orgánicos sometidos ensayo en la carga del núcleo son reveladores. Las Formulaciones AM-AP muestran que no hay un aumento en la carga del núcleo medida con respecto a la de control que contiene pamoato sódico (Formulaciones AT, AU, AY, Tabla 8). En contraste, las formulaciones AQ-AS, AV-AX y AZ-BB, que emplearon ácidos orgánicos que variaban desde ácido cólico a aromáticos bicíclicos, proporcionó cargas de núcleo de péptidos comparables con el ácido pamoico (Tabla 8). Estos resultados implican que los ácidos orgánicos con propiedades

físico-químicas adecuadas pueden reemplazarse por ácido pamoico para producir formulaciones de micropartículas comparables.

Tabla 8. El efecto de diversos ácidos orgánicos (sales sódicas) en la fase acuosa en la formación de micropartículas octreótido-complejo.

<i>Formulación</i>	<i>Sal sódica de ácido orgánico (conc.)</i>	<i>Tamaño de partícula</i>	<i>Carga del núcleo (ef. encaps.)</i>	<i>Liberación peptídica total (Acilado)</i>
AM	Succínico (10 mM)	34,1 µm	7,74% (39%)	99,9% (53,4%)
AN	Benzoico (10 mM)	32 µm	6,88% (34%)	105% (56,7%)
AO	Salicílico (10 mM)	34 µm	7,78% (39%)	106% (54,0%)
AP	Trifluorometil-p-toluico (10 mM)	33 µm	8,92% (45%)	107% (50,7%)
AQ	Cólico (20 mM)	60 µm	13,2% (66%)	104% (47,2%)
AR	2-Naftaleno sulfónico (20 mM)	38 µm	11,6% (58%)	110% (42,6%)
AS	2,3-Naftaleno dicarboxílico (10 mM)	38 µm	13,1% (66%)	109% (47%)
AT	Pamoico (10 mM)	45 µm	13,8 (69 %)	98,5% (37%)
AU	Pamoico (10 mM)	43 µm	14,2% (71%)	97,5% (31%)
AV	1-Hidroxi-2-naftoico (20 mM)	42 µm	15,3% (76%)	152% (25,7%)
AW	3-Hidroxi-2-naftoico (20 mM)	40 µm	14,6% (72%)	105% (20,8%)
AX	2-Naftoico (20 mM)	39 µm	13,4% (67%)	134% (32,9%)
AY	Pamoico (10 mM)	46 µm	14,4% (72%)	103% (22%)
AZ	2-Naftaleno sulfónico (20 mM)	36 µm	10,8% (54%)	138% (33,0%)
BA	2,3-Naftaleno dicarboxílico (10 mM)	46 µm	12,1% (61%)	97,8% (25%)
BB	Salicilsalicílico (20 mM)	39 µm	12,4% (62%)	114% (23,2%)

5

Ejemplo 4

Encapsulación de péptidos adicionales en microesferas de PLGA usando sales de ácido orgánico en fase de emulsión acuosa (no forma parte de la invención)

10 Se formuló acetato de oxitocina y acetato de leuprolida en micropartículas de PLGA tal como se describe en los ejemplos siguientes. Los resultados de estas investigaciones demuestran una carga del núcleo aumentada y eficacia de encapsulación (Formulaciones BI frente a BJ-BK y BL frente a BM) con respecto a la metodología convencional (Tabla 9).

Método de encapsulación de Formulación BI (Leuprolida)-Convencional

Se disolvió el polímero de PLGA (PM 24.000, 160 mg) en CH_2Cl_2 (1.000 μL). El acetato de leuprolida (40 mg) se disolvió en BnOH (1.000 μL) y se añadió a la solución polimérica proporcionando una fase orgánica homogénea. La fase orgánica resultante se combinó con una fase acuosa de PVA al 1 % para proporcionar una emulsión. La emulsión se recogió directamente en una solución de extracción de disolvente de PVA al 0,3 % (150 ml) y se agitó durante cuatro horas para extraer EtOAc. Se lavaron con agua, se secaron al aire y se almacenaron a 4 °C. Esto proporcionó la formulación BI (140 mg, 70,0 % de rendimiento) con un tamaño de partícula medio de 50,1 μm . La carga del núcleo (1,99 %), la eficacia de encapsulación (9,95 %) y el estallido *in vitro* (1,63 %) se determinaron mediante ensayo de RP-HPLC.

Método de encapsulación asistida de Formulación BJ (Leuprolida) - Ion orgánico

Se disolvió el polímero de PLGA (PM 24.000, 160 mg) en CH_2Cl_2 (1.000 μL). El acetato de leuprolida (40 mg) se disolvió en BnOH (1.000 μL) y se añadió a la solución polimérica proporcionando una fase orgánica homogénea. La fase orgánica resultante se combinó con una fase acuosa de PVA al 1 % que contenía 10 mM pamoato disódico para proporcionar una emulsión. La emulsión se recogió directamente en una solución de extracción de disolvente de PVA al 0,3 % (100 ml) y se agitó durante 10 minutos. Se añadió una solución de extracción secundaria que consistía en 2 % de isopropanol (200 ml) y se agitó durante unas cuatro horas adicionales. Se lavaron con agua, se secaron al aire y se almacenaron a 4 °C. Esto proporcionó la formulación BJ (157 mg, 78,5% de rendimiento) con un tamaño de partícula medio de 54,0 μm . La carga del núcleo (9,4%), la eficacia de encapsulación (47,0%) y el estallido *in vitro* (5,31 %) se determinaron mediante ensayo de RP-HPLC.

Método asistido de Formulación BK (Leuprolida) - Ion orgánico

Se preparó una formulación de micropartículas mediante un método de extracción de emulsión/disolvente de aceite-en-agua. Se disolvió el polímero de PLGA (PM 24.000, 160 mg) en CH_2Cl_2 (1.000 μL). El acetato de leuprolida (40 mg) se disolvió en BnOH (1.000 μL) y se añadió a la solución polimérica proporcionando una fase orgánica homogénea. La fase orgánica resultante se combinó con una fase acuosa de PVA al 1 % que contenía 50 mM pamoato disódico para proporcionar una emulsión. La emulsión se recogió directamente en una solución de extracción de disolvente de PVA al 0,3 % (100 ml) y se agitó durante 10 minutos. Se añadió una solución de extracción secundaria que consistía en 2 % de isopropanol (200 ml) y se agitó durante unas cuatro horas adicionales. Se lavaron con agua, se secaron al aire y se almacenaron a 4 °C. Esto proporcionó la formulación BK (120 mg, 60,0% de rendimiento) con un tamaño de partícula medio de 43,1 μm . La carga del núcleo (10,6%), la eficacia de encapsulación (53,0%) y el estallido *in vitro* (21,1%) se determinaron mediante ensayo de RP-HPLC.

Método de encapsulación de Formulación BL (Oxitocina)-Convencional

Se disolvió el polímero de PLGA (PM 13.000, 180 mg) en EtOAc (900 μL). El acetato de oxitocina (20 mg) se disolvió en MeOH (100 μL) y se añadió a la solución polimérica proporcionando una suspensión lechosa como la fase orgánica. La fase orgánica resultante se combinó con una fase acuosa de PVA al 1 % que contenía 5 % de EtOAc para proporcionar una emulsión. La emulsión se recogió directamente en una solución de extracción de disolvente de 10 mM fosfato sódico (pH 8, 0 °C, 150 ml) y se agitó durante cuatro horas mientras que se calentada a temperatura ambiente para extraer el EtOAc. Se lavaron con agua, se secaron al aire y se almacenaron a 4 °C. Esto proporcionó la formulación BL (143 mg, 71,5% de rendimiento) con un tamaño de partícula medio de 44,0 μm . La carga del núcleo (1,67%), la eficacia de encapsulación (16,7%) y el estallido *in vitro* (46,3%) se determinaron mediante ensayo de RP-HPLC.

Método de encapsulación asistida de Formulación BM (Oxitocina) - Ion orgánico

Se disolvió el polímero de PLGA (PM 24.000, 180 mg) en EtOAc (1.800 μL). El acetato de oxitocina (40 mg) se disolvió en MeOH (200 μL) y se añadió a la solución polimérica proporcionando una suspensión lechosa como la fase orgánica. La fase orgánica resultante se combinó con una fase acuosa de PVA al 1 % que contenía 10 mM pamoato disódico para proporcionar una emulsión. La emulsión se recogió directamente en una solución de extracción de disolvente de PVA al 0,3 % (150 ml) y se agitó durante cuatro horas para extraer EtOAc. Se lavaron con agua, se secaron al aire y se almacenaron a 4 °C. Esto proporcionó la formulación BM (158 mg, 79,0% de rendimiento) con un tamaño de partícula medio de 144 μm . La carga del núcleo (8,9%), la eficacia de encapsulación (44,5%) y el estallido *in vitro* (21,1%) se determinaron mediante ensayo de RP-HPLC.

Tabla 9. Micropartículas de complejo de péptido-pamoato mediante un proceso *in situ*.

Formulación	Péptido	Conc. de pamoato	Carga del núcleo	Ef. encaps
BI	leuprolida	0 mM	2,0%	10,0%
BJ	leuprolida	10 mM	9,4%	47,0%
BK	leuprolida	50 mM	10,6%	53,0%
BL	oxitocina	0 mM	1,7%	16,7%

Formulación	Péptido	Conc. de pamoato	Carga del núcleo	Ef. encaps
BM	oxitocina	10 mM	8,9%	49,1%

Ejemplo 5

Encapsulación de insulina en micropartículas de PLGA usando sales de ácido orgánico en fase de emulsión acuosa (no forma parte de la invención)

5 Dodecilsulfato sódico

Las formulaciones de micropartículas de dodecilsulfato sódico se prepararon usando un método de extracción de emulsión/disolvente de aceite-en-agua. La fase orgánica consistía en polímero de PLGA (PM 11.800, 150 mg) e insulina PEGilada (50 mg) disuelta en CH₂Cl₂ (2 ml). La fase acuosa consistía en PVA al 1 % y 14 mM de SDS. Las fases orgánicas y acuosas homogéneas se combinaron en una relación de 1:5 para producir un orgánico en emulsión de fase acuosa. La emulsión se recogió directamente en una solución de extracción de disolvente de PVA al 0,3 % (100 ml) y se agitó durante 10 minutos antes de añadir 100 ml de IPA al 2 %. La solución de extracción de disolvente se agitó, a continuación, durante unas 3 horas adicionales para extraer CH₂Cl₂. Se recogieron las micropartículas endurecidas mediante filtración, se lavaron con agua, se secaron al aire y se almacenaron a -20 °C. La micropartícula resultante tenía una carga de núcleo del 21 % (eficacia de encapsulación del 84 %). Estas micropartículas se caracterizaron por un gran estallido *in vitro* del 50 % a las 24 h en PBS a 37 °C.

Pamoato disódico

Las formulaciones de micropartículas de pamoato disódico se prepararon usando un método de extracción de emulsión/disolvente de aceite-en-agua. La fase orgánica consistía en polímero de PLGA (PM 11.800, 75 mg) e insulina PEGilada (25 mg) disuelta en CH₂Cl₂ (1 ml). La fase acuosa consistía en PVA al 1 % y 10 mM pamoato disódico. Las fases orgánicas y acuosas homogéneas se combinaron en una relación de 1:5 para producir un orgánico en emulsión de fase acuosa. La emulsión se recogió directamente en una solución de extracción de disolvente de PVA al 0,3 % (50 ml) y se agitó durante 10 minutos antes de añadir agua (100 ml). La solución de extracción de disolvente se agitó, a continuación, durante unas 3 horas adicionales para extraer CH₂Cl₂. Se recogieron las micropartículas endurecidas mediante filtración, se lavaron con agua, se secaron al aire y se almacenaron a -20 °C. La micropartícula resultante tenía una carga de núcleo del 18% (eficacia de encapsulación del 78%) y una relación de insulina PEGilada/pamoato de 1:2. En contraste con las micropartículas realizadas con SDS, estas micropartículas tenían un bajo estallido *in vitro* del 5 % en PBS a 37 °C.

Ejemplo 6

30 Evaluación de la farmacocinética de octreótido en micropartículas de PLGA después de su administración a ratas Sprague Dawley (no forma parte de la invención)

35 Se midieron los niveles de suero en sangre para octreótido liberado de formulaciones de micropartículas de PLGA inyectadas por vía subcutánea en ratas. Los animales (n=6/grupo) se trataron una vez mediante inyección por vía subcutánea de un nivel de dosis único (~8-10 mg/kg) de seis formulaciones distintas de micropartículas de PLGA de octreótido. En las horas 1 y 6, y en los días 1, 4, 7, 11, 14, 20, 28, 42 y 54 se obtuvieron muestras de suero de cada animal para evaluar la farmacocinética del octreótido. Se midieron las concentraciones de suero mediante el kit de radioinmunoensayo libre de extracción disponible en el mercado (n.º S-2211) (Peninsula Labs). El límite de cuantificación (LOQ) del ensayo fue de 0,1 ng/ml. Las concentraciones de suero de octreótido medias para cada punto de tiempo se dan a conocer en la Tabla 10. La preparación de las formulaciones de PLGA de octreótido sometidas a ensayo se describen a continuación.

Tabla 10. Niveles de suero de octreótido medio (ng/ml) después de un único tratamiento por vía subcutánea en ratas

Formulación	Dosis (mg/kg)	Día de muestra					
		0	0,04	0,25	1	4	7
BC	10,2	0,00	39,75	3,83	0,62	1,44	3,07
BD	8,9	0,00	39,95	4,00	0,95	1,66	3,41
BE	9,7	0,00	36,35	4,09	2,04	2,13	2,59
BF	8,6	0,00	39,75	3,89	1,33	2,54	3,06
BG	9,2	0,00	29,70	3,82	2,06	1,85	2,28
BH	9,4	0,00	39,80	4,13	2,90	3,70	3,64
		11	14	20	28	42	54
BC	3,71	3,42	3,51	1,95	0,39	0,00	
BD	3,64	3,44	2,03	1,04	0,45	0,00	
BE	2,89	2,94	2,19	1,81	3,09	0,90	
BF	3,16	2,89	1,43	0,64	1,52	0,00	
BG	1,96	2,00	1,70	0,97	2,24	1,39	
BH	3,54	3,44	2,34	1,70	1,63	0,05	

Preparación y caracterización de formulaciones de octreótido usadas en el estudio de animales.

Formulación BC

- Se disolvió el polímero de PLGA (PM 24.000, 720 mg) en EtOAc (4.000 µL). El acetato de octreótido (80 mg) se disolvió en BnOH (4.000 µL) y se añadió a la solución polimérica proporcionando una fase orgánica homogénea. La fase orgánica resultante se combinó con una fase acuosa de PVA al 1 % que contenía 10 mM pamoato disódico para proporcionar una emulsión. La emulsión se recogió directamente en una solución de extracción de disolvente de PVA al 0,3 % (600 ml) y se agitó durante cuatro horas para extraer EtOAc. Se lavaron con agua, se secaron al aire y se almacenaron a 4 °C. Esto proporcionó la formulación BC (754 mg, 94% de rendimiento) con un tamaño de partícula medio de 55,0 µm. La carga del núcleo (8,5%), la eficacia de encapsulación (85,0%) y el estallido *in vitro* (7,4%) se determinaron mediante ensayo de RP-HPLC.

Formulación BD

- Se disolvió el polímero de PLGA (PM 24.000, 680 mg) en EtOAc (4.000 µL). El acetato de octreótido (120 mg) se disolvió en BnOH (4.000 µL) y se añadió a la solución polimérica proporcionando una fase orgánica homogénea. La fase orgánica resultante se combinó con una fase acuosa de PVA al 1 % que contenía 10 mM pamoato disódico para proporcionar una emulsión. La emulsión se recogió directamente en una solución de extracción de disolvente de PVA al 0,3 % (600 ml) y se agitó durante cuatro horas para extraer EtOAc. Se lavaron con agua, se secaron al aire y se almacenaron a 4 °C. Esto proporcionó la formulación BD (694 mg, 94% de rendimiento) con un tamaño de partícula medio de 58,7 µm. La carga del núcleo (11,8%), la eficacia de encapsulación (78,7%) y el estallido *in vitro* (4,1%) se determinaron mediante ensayo de RP-HPLC.

Formulación BE

Se disolvió el polímero de PLGA (PM 24.000, 680 mg) en EtOAc (4.000 µL). El acetato de octreótido (120 mg) se disolvió en BnOH (4.000 µL) y se añadió a la solución polimérica proporcionando una fase orgánica homogénea. La fase orgánica resultante se combinó con una fase acuosa de PVA al 1 % que contenía 10 mM pamoato disódico para proporcionar una emulsión. La emulsión se recogió directamente en una solución de extracción de disolvente de PVA al 0,3 % (600 ml) y se agitó durante cuatro horas para extraer EtOAc. Se lavaron con agua, se secaron al aire y se almacenaron a 4 °C. Esto proporcionó la formulación BE (727 mg, 91% de rendimiento) con un tamaño de partícula medio de 52,2 µm. La carga del núcleo (11,6%), la eficacia de encapsulación (77,3%) y el estallido *in vitro* (2,75%) se determinaron mediante ensayo de RP-HPLC.

10 Formulación BF

Se disolvió el polímero de PLGA (PM 24.000, 640 mg) en EtOAc (4.000 µL). El acetato de octreótido (160 mg) se disolvió en BnOH (4.000 µL) y se añadió a la solución polimérica proporcionando una fase orgánica homogénea. La fase orgánica resultante se combinó con una fase acuosa de PVA al 1 % que contenía 10 mM pamoato disódico para proporcionar una emulsión. La emulsión se recogió directamente en una solución de extracción de disolvente de PVA al 0,3 % (600 ml) y se agitó durante cuatro horas para extraer EtOAc. Se lavaron con agua, se secaron al aire y se almacenaron a 4 °C. Esto proporcionó la formulación BF (766 mg, 95,8% de rendimiento) con un tamaño de partícula medio de 47,7 µm. La carga del núcleo (14,7%), la eficacia de encapsulación (73,5%) y el estallido *in vitro* (5,5%) se determinaron mediante ensayo de RP-HPLC.

Formulación BG

Se disolvió el polímero de PLGA (PM 28.000, 640 mg) en EtOAc (4.000 µL). El acetato de octreótido (160 mg) se disolvió en BnOH (4.000 µL) y se añadió a la solución polimérica proporcionando una fase orgánica homogénea. La fase orgánica resultante se combinó con una fase acuosa de PVA al 1 % que contenía 10 mM pamoato disódico para proporcionar una emulsión. La emulsión se recogió directamente en una solución de extracción de disolvente de PVA al 0,3 % (600 ml) y se agitó durante cuatro horas para extraer EtOAc. Se lavaron con agua, se secaron al aire y se almacenaron a 4 °C. Esto proporcionó la formulación BG (715 mg, 89,3% de rendimiento) con un tamaño de partícula medio de 48,7 µm. La carga del núcleo (11,9%), la eficacia de encapsulación (59,5%) y el estallido *in vitro* (2,3%) se determinaron mediante ensayo de RP-HPLC.

Formulación BH

Se disolvió el polímero de PLGA (PM 14.000, 560 mg) en EtOAc (4.000 µL). El acetato de octreótido (240 mg) se disolvió en BnOH (4.000 µL) y se añadió a la solución polimérica proporcionando una fase orgánica homogénea. La fase orgánica resultante se combinó con una fase acuosa de PVA al 1 % que contenía 10 mM pamoato disódico para proporcionar una emulsión. La emulsión se recogió directamente en una solución de extracción de disolvente de PVA al 0,3 % (600 ml) y se agitó durante cuatro horas para extraer EtOAc. Se lavaron con agua, se secaron al aire y se almacenaron a 4 °C. Esto proporcionó la formulación BH (680 mg, 85,0% de rendimiento) con un tamaño de partícula medio de 40,6 µm. La carga del núcleo (17,4%), la eficacia de encapsulación (58,0%) y el estallido *in vitro* (6,8%) se determinaron mediante ensayo de RP-HPLC.

Todas las composiciones y métodos descritos y reivindicados en el presente documento pueden realizarse y ejecutarse sin experimentación indebida a la luz de la presente descripción. Mientras que las composiciones y métodos de la presente invención se han descrito en términos de realizaciones particulares, resultará aparente para los expertos en la materia que se pueden aplicar variaciones a las composiciones, así como métodos y en las etapas o en la secuencia de etapas de los métodos descritos en el presente documento sin alejarse del concepto y alcance de la invención, siempre y cuando las variaciones se encuentren dentro del alcance de las reivindicaciones. Más específicamente, resultará aparente que determinados agentes que están tanto química como físicamente relacionados pueden reemplazarse por agentes descritos en el presente documento mientras que se obtendrían los mismos o similares resultados, siempre y cuando los cambios se encuentren dentro del alcance de las reivindicaciones. Todos tales sustitutos similares y modificaciones aparentes para los expertos en la técnica están previstos para que se encuentren dentro del alcance y concepto de la invención según se define por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un agente bioactivo y un polímero en una fase orgánica que contiene uno o más disolventes; y un ion orgánico en una fase acuosa, en donde el ion orgánico comprende trifluorometil-p-toluenato, sulfonato 2-naftaleno, dicarboxilato de 2,3-naftaleno, 2-naftoato o salicilsalicilato.
- 5 2. La composición de la reivindicación 1, en donde la fase orgánica comprende adicionalmente un co-disolvente.
3. La composición de la reivindicación 1, en donde la composición es capaz de producir una composición de liberación controlada.
4. La composición de la reivindicación 3, en donde dicha composición de liberación controlada se proporciona en la forma de micropartículas o nanopartículas.
- 10 5. La composición de la reivindicación 4, en donde dichas micropartículas y nanopartículas son biodegradables.
6. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho polímero es biodegradable y comprende poli(láctido)s, poli(glicolida)s, poli (láctido-co-glicolida)s, poli(ácido láctico)s, poli(ácido glicólico)s, poli(ácido láctico-ácido co-glicólico)s, policaprolactona, policarbonatos, poliésteramidas, polianhídridos, poli(aminoácidos), poliortoésteres, poliacetilos, policianoacrilatos, poliésteres, poli(dioxanona)s, poli(alquilenalquilato)s, copolímeros de polietilenglicol o poliortoéster, poliuretanos biodegradables mezclas o copolímeros de los mismos.
- 15 7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicho agente bioactivo se selecciona del grupo que consiste en proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, péptidos y sustancias farmacéuticas de molécula pequeña.
- 20 8. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la estequiometría del agente bioactivo con respecto al ion orgánico oscila entre 1,0 a 1,5.
9. La composición de cualquiera una de las reivindicaciones anteriores, en donde el ion orgánico interactúa con el agente bioactivo para formar un complejo.
- 25 10. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el ion orgánico comprende trifluorometil-p-toluenato, dicarboxilato de 2,3-naftaleno, 2-naftoato o salicilsalicilato
11. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la fase orgánica comprende cloruro de metileno, acetato etílico, alcohol bencílico, acetona, ácido acético o carbonato de propileno.
12. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el co-disolvente comprende alcohol metílico, alcohol etílico, alcohol isopropílico, pirrolidinona de N-metilo, sulfóxido de dimetilo, formamida de N,N-dimetilo, PEG 200, PEG 400 o alcohol bencílico.
- 30 13. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la fase acuosa comprende un disolvente que es metanol, alcohol bencílico, alcohol isopropílico, agua, dimetilsulfóxido, N,N-dimetilformamida o cloruro de metileno.
14. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición es una emulsión que comprende gotas de la fase orgánica dispersadas en la fase acuosa.
- 35