



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 292 655**

51 Int. Cl.:
A61K 9/16 (2006.01)
A61K 9/51 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02005393 .0**
86 Fecha de presentación : **15.03.2002**
87 Número de publicación de la solicitud: **1344520**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **17.09.2003**

54 Título: **Micropartículas y procedimiento para su preparación.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2008

73 Titular/es: **Alrise Biosystems GmbH**
Robert-Rossle-Strasse 10
13125 Berlin, DE

72 Inventor/es: **Albayrak, Celal**

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 292 655 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

Micropartículas y procedimiento para su preparación.

5 La invención se refiere a un procedimiento para la preparación de nanopartículas o micropartículas que comprenden péptidos, proteínas u otras sustancias bioactivas solubles en agua o no solubles en agua y a partículas proporcionadas de acuerdo con este procedimiento.

10 Después de los rápidos desarrollos en biotecnología e ingeniería genética de los últimos años, se ha hecho disponible un gran número de proteínas y péptidos de uso terapéutico potencial. Sin embargo, la administración a pacientes de agentes farmacéuticos proteicos y peptídicos no es fácil de llevar a cabo, en gran medida debido a su inherente inestabilidad física y química. Después de la administración oral a un paciente, estos agentes farmacéuticos experimentan degradación debido a la hidrólisis en el entorno ácido del estómago, de modo que su actividad en el tracto gastrointestinal se ve significativamente reducida. Se puede observar también una inactivación relativamente rápida después de la presentación parenteral, en particular intravenosa, que se debe a la corta semivida de muchas sustancias activas. Como consecuencia, pueden requerirse dosificaciones altas repetidas de estos compuestos a pesar de sus altas actividades farmacológicas, que representa una carga significativa para el paciente. Los problemas de cumplimiento se reducen más aun si se puede reducir el número de dosificaciones.

20 Como formulaciones adecuadas que superan las desventajas anteriormente mencionadas, se conocen sistemas de liberación sostenida en la forma de microesferas que controlan la liberación de la sustancia activa mediante la incorporación de la misma en una cubierta o una matriz de un polímero biodegradable. Dichas formulaciones se proporcionan de forma más habitual mediante la formación de microesferas mediante la técnica “agua-en-aceite-en-agua” (W/O/W) (por ejemplo, tal y como se describe en el documento EP-A-442 671). Sin embargo, se ha hecho cada vez más evidente que las soluciones proteicas emulsionadas en la fase oleosa experimentan degradación debido a la desnaturalización de las estructuras proteicas en la interfase agua/aceite durante la preparación de las cápsulas. Además, la influencia de fuerzas de cizalla durante la emulsificación puede contribuir también a la pérdida de material activo.

30 En vista de estos problemas, se han desarrollado estrategias de encapsulación que intentan minimizar la exposición de proteínas hidratadas a factores de tensión física, en base al descubrimiento de que las proteínas en una forma cristalina o amorfa son menos susceptibles a la desnaturalización. Se han publicado procedimientos que usan la estabilidad aumentada de las proteínas en su estado sólido, por ejemplo por T. Morita y col., Eur. J. Pharm. Sci. 88 (1999) 45-53 o I. J. Castellanos y col., J. Pharm. Pharmacol., 53 (2001) 167-178. De acuerdo con estas técnicas “sólido-en-aceite-en-agua” (S/O/W), se suspenden las proteínas en una solución orgánica del polímero biodegradable, seguido de la emulsificación de la suspensión en una solución acuosa y la formación de microesferas sólidas mediante la retirada del disolvente orgánico. Sin embargo, la técnica S/O/W tal y como se aplica en esos documentos requiere el pretratamiento de las soluciones de la sustancia activa mediante micronización, secado por pulverización o liofilización con el fin de obtener un polvo adecuado para ser suspendido en la solución polimérica. Además, la flexibilidad de estos procedimientos con respecto a una optimización de las propiedades de liberación de la formulación final se ve alterada, puesto que el intervalo para las variaciones selectivas del tamaño de partícula dentro de estos polvos está frecuentemente restringido por el tipo de aparato usado para su provisión.

45 Como consecuencia, existe todavía una necesidad de procedimientos para la encapsulación de sustancias activas sensibles que, al mismo tiempo que eviten tanto como sea posible etapas del procedimiento complicadas y que requieran mucho tiempo, permitan la encapsulación de las sustancias activas con una alta eficacia y a escala industrial. Además, el procedimiento debería asegurar el control de las cinéticas de liberación de las sustancias activas, y, al mismo tiempo, debería permitir la adaptación de estas cinéticas a diferentes tipos de sustancias activas y a diferentes aplicaciones terapéuticas. Por último es también un objetivo superar los problemas de cumplimiento que se encuentran especialmente en los pacientes de edad avanzada.

50 El objetivo anterior se ha hecho realidad en la actualidad mediante un nuevo procedimiento para la provisión de nanopartículas o micropartículas cargadas de fármaco al que se puede hacer referencia como un procedimiento de precipitación *in situ*.

55 De acuerdo con este procedimiento, las sustancias activas son embebidas o encapsuladas en una matriz polimérica mediante las etapas de

- a) llevar a cabo la precipitación de una sustancia activa en una solución que comprende un polímero disuelto en un disolvente orgánico para obtener una suspensión de la sustancia activa,
- b) mezclar la suspensión obtenida con una solución acuosa de tensioactivo y solidificar el polímero para obtener una suspensión de nanopartículas o micropartículas que contienen una sustancia activa.

65 Tal y como se usa en la presente memoria, los términos “nanopartículas” o “micropartículas” incluyen nanoesferas y microesferas así como nanoesponjas y microesponjas.

Este procedimiento puede, por ejemplo, usarse de manera ventajosa con proteínas y péptidos como sustancias activas. Si se emulsifican en la forma de una solución, estos compuestos bioactivos son propensos a la desnaturalización

ES 2 292 655 T3

en la interfase W/O (agua/aceite) (H, Sah, J. Pharm. Sci. 88 (1999) 1320-1325) y son particularmente sensibles a fuerzas de cizalla. Dichas desventajas no se encuentran en las suspensiones usadas en el procedimiento de la presente invención.

5 Los polímeros o copolímeros adecuados para la formación de la matriz polimérica deberían ser degradables en las condiciones fisiológicas a las que son expuestos tras la administración al paciente de las partículas que contienen las sustancias activas, una propiedad que a menudo se denomina biodegradabilidad. Se debería entender que los polímeros o copolímeros mencionados deberían ser biocompatibles, es decir, no deberían dar lugar a efectos secundarios significativos en el organismo del paciente.

10 Un procedimiento conveniente para llevar a cabo la etapa a) anterior parte de una solución de la sustancia activa en agua o en un disolvente orgánico que se mezcla con la solución del polímero en un disolvente orgánico. En una realización particularmente preferida, la sustancia activa se disuelve en una cantidad más pequeña de un primer disolvente L1. La solución polimérica se prepara con la ayuda de una cantidad más grande de un segundo disolvente orgánico L2
15 que disuelve el polímero, pero es un no disolvente (anti-disolvente) para la sustancia activa. A continuación, L1 y L2, incluyendo las sustancias disueltas en los mismos, se combinan. Tras la combinación de L1 y L2, se lleva a cabo la precipitación de la sustancia activa, que es insoluble en L2, para dar lugar a una suspensión de la sustancia activa en la solución polimérica. De manera preferible, los disolventes L1 y L2 deberían ser total o parcialmente miscibles entre sí para este fin. Puesto que se usa en esta realización preferida un exceso del disolvente orgánico L2 sobre el disolvente
20 L1, a la fase líquida que comprende el polímero disuelto junto con la sustancia activa suspendida se la denomina en la presente memoria como una fase orgánica, independientemente del hecho de que L1 puede ser también agua.

A partir de la suspensión obtenida en la etapa a), las nanopartículas o micropartículas cargadas de fármaco deseadas se forman de manera preferible mediante la adición de una solución acuosa de tensioactivo a la suspensión de la
25 sustancia activa. Esta adición da como resultado una transición de fase desde la fase orgánica como fase continua hasta la fase acuosa como fase continua. Si el disolvente orgánico para el polímero se elige de forma que sea parcialmente soluble en agua, la difusión inmediata del disolvente orgánico desde la fase discontinua hasta la fase continua da como resultado la solidificación del polímero para formar una matriz en la que está embebida la sustancia activa. Por consiguiente, se forma una suspensión de las nanopartículas o micropartículas cargadas de fármaco.

30 De manera alternativa, las nanopartículas o micropartículas cargadas de fármaco deseadas se pueden formar a partir de la suspensión obtenida en la etapa a) anterior mediante un procedimiento S/O/W convencional, es decir, mediante la adición de la suspensión a una solución acuosa de tensioactivo para formar una emulsión que comprende la solución orgánica del polímero en forma de una fase discontinua en la que está suspendida la sustancia activa. El disolvente orgánico se retira posteriormente de la fase discontinua, por ejemplo mediante la aplicación de presión reducida, teniendo lugar la solidificación del polímero y proporcionando una suspensión de las nanopartículas o micropartículas
35 cargadas de fármaco. En este caso, se pueden usar disolventes orgánicos para la formación de la solución polimérica de la etapa a) anterior que no sean solubles en agua o que sólo sean escasamente solubles en agua.

40 Las nanopartículas o micropartículas en polímero cargadas de fármaco que se pueden obtener a partir del procedimiento de acuerdo con la invención se caracterizan por una distribución de tamaño altamente homogénea de la sustancia activa particulada embebida en la matriz polimérica. Más de un 50, de forma preferible más de un 60, un 70, un 80 o incluso de un 90% de las partículas cargadas de fármaco presentan la estructura morfológica de las nanoesferas o microesferas o de las nanoesponjas o microesponjas.

45 Además, el tamaño promedio de partícula de las partículas de las sustancias activas contenidas en las nanopartículas o micropartículas puede variar a lo largo de un amplio intervalo tal como desde 10 nm hasta 500 μm , dependiendo de las condiciones aplicadas durante la precipitación. De esta forma, si se requiere, las partículas de las sustancias activas dentro de la matriz polimérica pueden exhibir un diámetro promedio de partícula en el intervalo de nm, tal como por
50 debajo de 1000, 500, 100, 50, o incluso por debajo de 10 nm. Dichos pequeños tamaños de partícula son de interés, por ejemplo, para partículas para la administración intravenosa, que no deberían superar un diámetro global de unos pocos micrómetros.

55 A continuación, la invención se explicará en más detalle mediante referencia a realizaciones preferidas adicionales de la misma.

Las sustancias activas o fármacos que se pueden usar para el fin de la presente invención son preferiblemente aquellas que con probabilidad sufren degradación si se procesan en una solución acuosa. Tal y como se mencionó anteriormente, el procedimiento de la invención es particularmente adecuado para la encapsulación de proteínas y péptidos
60 sensibles tales como hormonas, factores de crecimiento, enzimas, anticuerpos, interleucinas, lisozimas, interferones, fibronectinas, fármacos peptídicos, fármacos proteicos, agentes desensibilizantes, antígenos, vacunas, agentes anti-infecciosos, antibióticos, agentes antimicrobianos, agentes antialérgicos, agentes anti-inflamatorios esteroideos, agentes descongestionantes, agentes mióticos, agentes anti-colinérgicos, agentes simpaticomiméticos, agentes sedantes, agentes hipnóticos, estimulantes psíquicos, tranquilizantes, esteroides androgénicos, estrógenos, agentes progestacionales,
65 agentes humorales, prostaglandinas, analgésicos, antiespasmódicos, agentes contra la malaria, antihistamínicos, agentes cardioactivos, agentes anti-inflamatorios no esteroideos, agentes contra el parkinson, agentes contra la hipersensibilidad, agentes bloqueantes β -adrenérgicos, agentes nutricionales, alcaloides de benzofenantridina, calcitonina, eritropoyetina (EPO), ciclosporina, factor estimulante de colonia granulocito (GCSF), factor estimulante de colonia granulo-

ES 2 292 655 T3

cito - macrófago (GMCSF), hormonas de crecimiento que incluyen la hormona de crecimiento humana (HGH), y hormona de liberación de la hormona de crecimiento (GHRH), hormona de liberación de la hormona luteinizante (LHRH) y análogos de LHRH, insulina, somatostatina, análogos de somatostatina incluyendo octreotida, vasopresina y sus análogos, hormona estimulante del folículo (FSH), y factor de crecimiento de tipo insulina en condiciones suaves.

5

Las sustancias activas adecuadas para el fin de la presente invención pueden encapsularse en nanopartículas o micropartículas en solitario o en combinaciones de dos o más de las mismas.

10 Los polímeros o copolímeros que se pueden usar como una matriz en las nanopartículas o micropartículas de la presente invención incluyen poliamidas, polianhídridos, poliéster, poliortoéster, poliacetatos, polilactonas o poliortocarbonato.

15 Los preferidos entre tales polímeros biodegradables son los poliésteres de ácidos hidroxicarboxílicos en general, copolímeros de bloque de poliésteres de ácidos hidroxicarboxílicos con polialquilenglicol (C2-C4), poliglicólidos (PGA) y copolímeros de glicólidos tales como copolímeros de glicólido/lactida (PLLA/PGA) o copolímeros de glicólido/trimetilencarbonato (PGA/TMC); L-polilactidas (PLA) y estereocopolímeros de polilactidas tales como poli-L-lactida (PLLA), copolímeros de poli-DL-lactida y copolímeros de L-lactida/DL-lactida; copolímeros de PLA tales como copolímeros de lactida/tetrametilglicólido; copolímeros de lactida/ δ -valerolactona y copolímeros de lactida/ ϵ -caprolactona; poli- β -hidroxibutirato (PHBA), copolímeros de PHBA/ β -hidroxivalerato (PHBA/HVA), poli- β -hidroxipropionato (PHPA), poli-p-dioxanona (PDS), poli- δ -valerolactona, poli- ϵ -caprolactona, poliaminoácidos, polisacáridos hidrofobizados, ácido hialurónico hidrofobizado, dextranos hidrofobizados o amilopectina, quitosano, ácido hialurónico hidrofobizados auto-organizables o proteínas hidrofobizadas. También, se pueden usar copolímeros de bloque de poliésteres y polietilenglicol (PEG) lineal o en forma de estrella, tales como copolímeros de bloque AB de PLGA y PEG, copolímeros de tribloque ABA de PEG-PLGA-PEG, copolímeros de bloque S(3)-PEG-PLGA-S(3) y copolímeros de bloque S(4)-PEG-PLGA.

25

Los polímeros particularmente preferidos son poli (DL-lactida-co-glicólidos). Estos polímeros están, por ejemplo, disponibles en el mercado con el nombre comercial Resomer[®] en Böhringer Ingelheim (Alemania). Los representantes típicos de los mismos son Resomer[®] L-104, L-206, L-207, L-208, L-209, L-210, L214, R-104, R-202, R-203, R-206, R-207, R-208, G-110, G-205, LR-909, RG-502, RG-502H, RG-503, RG-503H, RG-504, RG-504H, RG-505, RG-505H, RG-506, RG-508, RG-752, RG-755, RG-756 y RG-858.

30

Dependiendo del tipo de polímero así como del tipo de sustancia activa usados, la proporción en peso entre ambos usada en las partículas de acuerdo con la invención puede variar. Sin embargo, se elige frecuentemente de forma que se obtengan partículas con un contenido (o carga útil) de la sustancia activa que varía entre un 0,1 y un 40% en peso, de forma preferible entre un 1 y un 20% en peso o entre un 1 y un 10% en peso, en base al peso total de la sustancia activa y el polímero.

35

Tal y como se mostró anteriormente, una manera conveniente de llevar a cabo la precipitación de la sustancia activa en la solución polimérica es mediante la combinación de una cantidad más pequeña de un primer disolvente L1 que disuelve la sustancia activa con una cantidad más grande de un segundo disolvente orgánico L2 que disuelve el polímero. Si L2 es apropiadamente elegido como un no disolvente (anti-disolvente) para la sustancia activa, la difusión de L1 en la fase polimérica conducirá entonces a la precipitación *in situ* de la sustancia activa particulada. Para permitir que esta etapa del procedimiento se lleve a cabo de forma eficaz, L1 y L2 deberían ser miscibles entre sí. La miscibilidad total (es decir, de un 100%) de L1 y L2 asegura un alto rendimiento de la precipitación. Sin embargo, como L2 se usa normalmente en exceso, se puede conseguir el mismo buen resultado si L1 y L2 son sólo parcialmente miscibles siempre que la cantidad de L1 sea suficiente para disolver todo el L2.

45

En general, las cantidades relativas de los disolventes L1 y L2 están determinadas por la solubilidad de la sustancia activa y del polímero, respectivamente, así como por la proporción en peso deseada de la sustancia activa y el polímero en las partículas cargadas de fármaco finales. Normalmente, la proporción entre L1 y L2 varía entre 1:2 y 1:1000, de manera preferible entre 1:2 y 1:100, 1:50 o 1:20 (vol/vol).

50

Es ventajoso usar soluciones concentradas de la sustancia activa en L1. Mientras que la sustancia activa no debe ser soluble en L2, el polímero, de manera preferible, debería ser soluble tanto en L1 como en L2.

55

Para controlar mejor la precipitación de las partículas cristalinas, es preferible combinar las soluciones añadiendo L1 a L2 (aunque no debería excluirse el procedimiento contrario). Por ejemplo, L1 puede añadirse gota a gota o mediante un vertido lento del mismo en L2. Durante la adición, L2 preferiblemente se agita, por ejemplo, mediante un agitador mecánico, tal como un agitador magnético o un dispositivo de dispersión.

60

De acuerdo con una realización preferida del procedimiento de la presente invención explicada con anterioridad, se forman nanopartículas y micropartículas cargadas de fármaco añadiendo una solución acuosa de tensioactivo a la suspensión de la etapa a) para inducir una transición de fase desde la fase orgánica como una fase continua hasta la fase acuosa como una fase continua con solidificación simultánea del polímero. En esta realización particular, un volumen definido de una solución acuosa o una solución de tampón que contiene un tensioactivo o una mezcla de tensioactivos se añade a la fase orgánica que comprende el polímero disuelto y la sustancia activa en la forma de una suspensión. De manera preferible, la fase orgánica se agita durante la adición.

65

ES 2 292 655 T3

5 Siguiendo este procedimiento, el/los disolvente(s) orgánico(s) usado(s) para la preparación de la solución polimérica debe(n) elegirse de manera que sea(n) parcialmente soluble(s) en la solución acuosa del tensioactivo. De manera preferible, la solubilidad del/de los disolvente(s) en soluciones acuosas o tamponadas debería variar en el intervalo entre un 1,5 y un 40% (p/p), de manera más preferida son valores entre un 1,5 y un 30%. Cuando se añade la solución acuosa del tensioactivo bajo agitación a la suspensión obtenida en la etapa a) anterior, el/los disolvente(s) orgánico(s) se disuelve(n) en el agua. Como resultado, el polímero se solidifica y se forma en la solución acuosa una suspensión de las nanopartículas o micropartículas deseadas que comprenden la sustancia activa sólida distribuida (embebida) en un polímero sólido.

10 Se pueden seleccionar disolventes orgánicos adecuados para el polímero en base a su miscibilidad con la solución acuosa del tensioactivo. Los parámetros adecuados para apoyar esta selección son los parámetros de solubilidad (δ (cal/cm³)^{1/2}) del disolvente del polímero y de la solución acuosa del tensioactivo.

15 De manera preferible, estos valores se eligen de forma que cumplan la siguiente ecuación:

$$\delta \text{ (disolvente del polímero)} - \delta \text{ (solución acuosa del tensioactivo)} \leq 0,$$

20 y son particularmente preferidos los valores de la ecuación anterior dentro del intervalo entre 0 y -15 (cal/cm³)^{1/2}.

25 En la tabla siguiente se proporcionan los parámetros de solubilidad de los disolventes adecuados que se pueden usar como disolventes para la preparación de la solución polimérica de la etapa a) anterior. Los disolventes (L1) y no disolventes (L2) adecuados para usar de acuerdo con la realización preferida de la presente invención se pueden elegir también a partir de esta lista no exclusiva dependiendo de la sustancia activa a encapsular. El agua tiene un parámetro de solubilidad δ de 23,41 (cal/cm³)^{1/2}.

Disolvente	Parámetro de solubilidad δ / (cal·cm ⁻³) ^{1/2}
Acetato de metilo	9,65
Acetato de etilo	8,90
Acetato de propilo	8,8
Formiato de metilo	10,2
Acetato de isobutilo	8,3
Acetato de butilo	8,5
Acetato de isopropilo	8,4
Formiato de propilo	9,2
Dimetil sulfóxido	12,0
Formiato de etilo	9,4
Metil-pirrolidon-2(N)	11,3
Tetrahidrofurano	9,1
Metil etil cetona	9,29
Acetona	9,82
Acetonitrilo	11,95
Dioxano	10,02
THF	9,49
DMSO	13,04

65 Los valores para los parámetros de solubilidad de los disolventes se proporcionan, por ejemplo, en "Polymer Handbook" (J. Bransrup, E. H. Immergut, E. A. Grulke, Wiley Interscience 1999).

ES 2 292 655 T3

Para el propósito de la selección de un disolvente adecuado para el polímero, puede despreciarse la influencia del segundo disolvente opcional usado para la disolución de la sustancia activa (tal como L1 en la realización preferida), ya que su volumen es significativamente menor que el volumen del disolvente del polímero.

Además de los parámetros de solubilidad, la fracción de volumen de la suspensión y de la solución acuosa del tensioactivo combinadas en la etapa b) anterior se seleccionan preferiblemente con el fin de asegurar que se forma una suspensión de las nanopartículas o micropartículas cargadas de fármaco inmediatamente después de combinar la fase orgánica con la solución acuosa del tensioactivo. Por consiguiente, la proporción en volumen entre la fase orgánica y la solución acuosa del tensioactivo está normalmente en el intervalo entre 1:1,5 y 1:30, preferiblemente entre 1:2 y 1:20. En una realización particularmente preferida, el volumen de la fase continua acuosa del tensioactivo requerido para la transición de fase se calcula bajo la suposición de que las micropartículas de polímero suspendidas en la fase continua del tensioactivo ocupan las cavidades en una disposición "cúbica centrada en el cuerpo" o "cúbica centrada en las caras" o "hexagonal compacta". En este caso, la fracción de volumen de la fase acuosa del tensioactivo es mayor de aproximadamente un 60%, de manera preferible entre un 65 y un 80%, y de la manera más preferible entre un 68% y un 74%, en base a las fases acuosa y orgánica combinadas. De esta forma, el volumen requerido de la solución acuosa del tensioactivo es normalmente menor de lo que es en procedimientos de encapsulación convencionales donde se usan disolventes orgánicos no polares que son no miscibles con el agua.

Disolventes ejemplares que se pueden usar para la preparación de la solución polimérica y, si se desea, para la preparación de una solución de la sustancia activa antes de la etapa de precipitación son acetatos de alquilo tales como acetato de metilo, acetato de etilo, acetato de propilo, acetato de isopropilo, acetato de isobutilo, acetato de t-butilo, acetato de n-butilo; formiatos de alquilo tales como formiato de metilo, formiato de etilo, formiato de propilo, formiato de isopropilo, formiato de n-butilo, formiato de isobutilo, formiato de t-butilo; lactatos de alquilo tales como lactato de metilo, lactato de etilo, glicofurol, PEG-100, PEG-200, PEG-300, PEG-400, triacetina, citrato de trietilo, DMSO, THF, acetona, N-metil-2-pirrolidona, 1-metil-2-pirrolidona, dimetilformamida, metil etil cetona, metil isobutil cetona, acetonitrilo, carbonato de dietilo, 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-propanol, etanol, propilenglicol, glicerol, polietilenglicol, dimetilacetamida, propilencarbonato, y caprolactama.

Los disolventes L1 y L2 a usar en el procedimiento de precipitación preferido de la presente invención pueden seleccionarse igualmente a partir de la anterior lista no exhaustiva. Las combinaciones adecuadas de L1 y L2 se seleccionan mejor dependiendo del tipo de sustancia activa que va a ser encapsulada. En este contexto, debe tenerse en cuenta que la sustancia activa debe ser soluble en L1 pero no en L2 y que L1 y L2 deberían ser total o parcialmente miscibles. Como L1 se pueden usar únicamente agua o una solución acuosa como un disolvente. En este caso, el disolvente orgánico L2 debería tener preferiblemente una solubilidad suficientemente elevada en agua, para permitir que todo el L1 se disuelva en D2. La siguiente tabla proporciona algunos valores de solubilidad ejemplares para disolventes orgánicos en agua a 20-25°C para respaldar la elección de un disolvente con el fin de proporcionar la solución polimérica en la etapa a) anterior.

Disolvente	Solubilidad en agua (p/p) [%]
Acetato de metilo	22,8
Acetato de etilo	7,43
Acetato de propilo	1,67
Acetato de isopropilo	3,09
Formiato de metilo	30
Formiato de etilo	8,4
Formiato de propilo	2,82
Metil etil cetona	23

Los tensioactivos adecuados para proporcionar la solución acuosa del tensioactivo usada en la presente invención son aquellos de tipo catiónico, aniónico, no iónico o bipolar, tales como alquil éteres de polietilenglicol, ésteres de carbohidratos tales como sacarosa, polisorbatos (Tween[®], Span[®]), sales alcalinas de ácidos grasos tales como oleato de sodio, éteres de ácidos grasos polioxilados (Brij[®]), glicósidos de alcoholes grasos, polivinilpirrolidona (PVP), poli (alcohol vinílico) (PVA), poloxamer[®], poloxamine[®], Chaps, Chapso, decil-β-D-glicopiranosido, decil-β-D-maltopiranosido, dodecil-β-D-maltopiranosido, ésteres de sacarosa (ésteres de azúcar Ryoto Tokio, Sisterna[®], Países Bajos, SDS, bromuro de cetiltrimetilamonio, cloruro de cetilpiridinio, bromuro de didodecildimetilamonio, colato de sodio, desoxicolato de sodio, glicocolato de sodio o Triton-X-100, todos ellos pueden usarse en solitario o en mezclas de dos o más de los mismos en concentraciones que varían preferiblemente entre un 1 y un 10% (p/p).

ES 2 292 655 T3

Además, pueden estar presentes en la solución acuosa tampones tales como tris(hidroximetil)aminometano, fosfatos o citrato, y estos tampones se usan en general en concentraciones entre 5 mmol/l y 300 mmol/l.

Una vez se haya completado la solidificación del polímero en la etapa b) del procedimiento de la invención, el disolvente o mezcla de disolventes orgánicos pueden retirarse mediante procedimientos convencionales, tales como la aplicación de una presión reducida y/o un flujo de aire o nitrógeno, la filtración o la extracción.

Después de su recuperación a partir de la suspensión acuosa, las nanopartículas o micropartículas pueden lavarse con agua, de manera opcional repetidamente, para retirar cualquier disolvente y tensioactivo restantes así como las trazas de agente activo que puedan estar presentes en la superficie de las mismas. De manera alternativa, las partículas pueden someterse a una filtración de flujo cruzado para este fin.

Con el fin de aumentar su estabilidad, las nanopartículas o micropartículas cargadas de fármaco pueden liofilizarse, opcionalmente junto con un crioprotector tal como un azúcar, alcohol de azúcar o un derivado de polivinilpirrolidona.

La presente invención permite la provisión de nanopartículas y micropartículas que están específicamente diseñadas para cumplir los requisitos de sus aplicaciones respectivas. A este respecto, uno de los beneficios del procedimiento descrito en la presente memoria es que dicho procedimiento permite o al menos facilita cambios en el rendimiento de la partícula sin la necesidad de cambios significativos en el equipamiento usado. Por ejemplo, el tamaño de las partículas de la sustancia activa embebida en el interior del polímero, y como resultado del mismo, el perfil de liberación de esta sustancia, pueden variar aplicando velocidades de agitación específicamente adoptadas durante la precipitación de la sustancia activa. Si se usa un agitador o mezclador de alta velocidad (tal como un dispositivo de dispersión), los agregados de la sustancia activa serán pequeños. Por el contrario, una reducción de la velocidad de agitación conducirá a partículas de la sustancia activa con un diámetro medio grande. Debido a su menor proporción superficie/volumen, dichas partículas más grandes mostrarán una velocidad de liberación que está reducida en comparación con la de las partículas pequeñas. En consecuencia, se puede preparar un amplio intervalo de tamaños de partículas combinando las medidas anteriormente mencionadas en la dirección deseada.

Además, la etapa de precipitación *in situ* (la etapa a) previamente mencionada) proporciona partículas de la sustancia activa que son muy homogéneas en su aspecto y muestran una distribución de tamaños de partícula estrecha. Como consecuencia, la liberación inicial inmediata de la sustancia activa, que representa un problema habitual en las formulaciones de liberación controlada, puede reducirse por debajo de un 20, un 10 o incluso un 5% en peso de la carga útil total de las nanopartículas o micropartículas.

Los siguientes ejemplos están destinados a ilustrar la presente invención.

Ejemplo 1

Se disuelven 3,0 gramos de Resomer[®] 756 en 11,5 ml de formiato de etilo y se transfieren a un recipiente de acero de doble pared (altura interior de 11,0 cm, diámetro interior de 4 cm). Posteriormente, se añaden lentamente gota a gota 2,7 ml de una solución en DMSO, que contiene 100 mg de acetato de goserelina, bajo agitación (600 rpm) con un agitador mecánico (Dispermat FT.VMA-Getzmann GmbH, disco para disolución de 2 cm) a la solución polimérica. La suspensión resultante se agita a 6000 rpm durante 6 minutos, y posteriormente se añaden como una fase continua 50 ml de una solución acuosa, tris-tamponada (pH = 7,4) que contiene 2 gramos de Pluronic[®] F-68. Después de cinco minutos de agitación, la suspensión de micropartículas se transfiere a un matraz de dos bocas y se agita con un agitador magnético. A continuación, el disolvente se retira a temperatura ambiente mediante la aplicación de vacío o mediante extracción con agua.

Por medio de centrifugación o de filtración se retira de las micropartículas el exceso de tensioactivo y de agente activo no encapsulado, éstas se lavan repetidamente con agua y se liofilizan bajo la adición de un crioprotector.

El liofilizado, resuspendido en agua o una solución acuosa contiene microesferas con un contenido de goserelina del 2,80% (masa de goserelina * 100 / (masa de polímero + masa de goserelina) = grado de carga) y con un diámetro de entre 1 y 40 μm .

Ejemplo 2

Se disuelven 3,0 gramos de Resomer[®] 756 en 11,5 ml de formiato de etilo y se transfieren a un recipiente de acero de doble pared (altura interior de 11,0 cm, diámetro interior de 4 cm). Posteriormente, se añaden lentamente gota a gota 2,7 ml de una solución en NMP, que contiene 100 mg de acetato de goserelina, bajo agitación (600 rpm) con un agitador mecánico (Dispermat FT.VMA-Getzmann GmbH, disco para disolución de 2 cm) a la solución polimérica. La suspensión resultante se agita a 6000 rpm durante 6 minutos, y posteriormente se añaden como una fase continua 50 ml de una solución acuosa, tris-tamponada (pH = 7,4) que contiene 2 gramos de Pluronic[®] F-68. Después de cinco minutos de agitación, la suspensión de micropartículas se transfiere a un matraz de dos bocas y se agita con un agitador magnético. A continuación, el disolvente se retira a temperatura ambiente mediante la aplicación de vacío o mediante extracción con agua.

ES 2 292 655 T3

Por medio de centrifugación o de filtración se retira de las micropartículas el exceso de tensioactivo y de agente activo no encapsulado, éstas se lavan repetidamente con agua y se liofilizan bajo la adición de un crioprotector.

5 El liofilizado, resuspendido en agua o una solución acuosa contiene microesferas con un contenido de goserelina del 2,78% (masa de goserelina * 100 / (masa de polímero + masa de goserelina) = grado de carga) y con un diámetro de entre 1 y 40 μm .

Ejemplo 3

10 Se disuelven 3,0 gramos de Resomer[®] 756 en 11,5 ml de formiato de etilo y se transfieren a un recipiente de acero de doble pared (altura interior de 11,0 cm, diámetro interior de 4 cm). Posteriormente, se añaden lentamente gota a gota 2,7 ml de una solución en PEG-200, que contiene 100 mg de acetato de goserelina, bajo agitación (600 rpm) con un agitador mecánico (Dispermat FT.VMA-Getzmann GmbH, disco para disolución de 2 cm) a la solución polimérica. La suspensión resultante se agita a 6000 rpm durante 6 minutos, y posteriormente se añaden como una fase continua 15 50 ml de una solución acuosa, tris-tamponada (pH = 7,4) que contiene 2 gramos de Pluronic[®] F-68. Después de cinco minutos de agitación, la suspensión de micropartículas se transfiere a un matraz de dos bocas y se agita con un agitador magnético. A continuación, el disolvente se retira a temperatura ambiente mediante la aplicación de vacío o mediante extracción con agua.

20 Por medio de centrifugación o de filtración se retira de las micropartículas el exceso de tensioactivo y de agente activo no encapsulado, éstas se lavan repetidamente con agua y se liofilizan bajo la adición de un crioprotector.

25 El liofilizado, resuspendido en agua o una solución acuosa contiene microesferas con un contenido de goserelina del 2,88% (masa de goserelina * 100 / (masa de polímero + masa de goserelina) = grado de carga) y con un diámetro de entre 1 y 40 μm .

Ejemplo 4

30 Se disuelven 3,0 gramos de Resomer[®] 756 en 11,5 ml de formiato de etilo y se transfieren a un recipiente de acero de doble pared (altura interior de 11,0 cm, diámetro interior de 4 cm). Posteriormente, se añaden lentamente gota a gota 2,7 ml de una solución en 2-pirrolidona, que contiene 100 mg de acetato de goserelina, bajo agitación (600 rpm) con un agitador mecánico (Dispermat FT.VMA-Getzmann GmbH, disco para disolución de 2 cm) a la solución polimérica. La suspensión resultante se agita a 6000 rpm durante 6 minutos, y posteriormente se añaden como una fase continua 35 50 ml de una solución acuosa, tris-tamponada (pH = 7,4) que contiene 2 gramos de Pluronic[®] F-68. Después de cinco minutos de agitación, la suspensión de micropartículas se transfiere a un matraz de dos bocas y se agita con un agitador magnético. A continuación, el disolvente se retira a temperatura ambiente mediante la aplicación de vacío o mediante extracción con agua.

40 Por medio de centrifugación o de filtración se retira de las micropartículas el exceso de tensioactivo y de agente activo no encapsulado, éstas se lavan repetidamente con agua y se liofilizan bajo la adición de un crioprotector.

45 El liofilizado, resuspendido en agua o una solución acuosa contiene microesferas con un contenido de goserelina del 2,90% (masa de goserelina * 100 / (masa de polímero + masa de goserelina) = grado de carga) y con un diámetro de entre 1 y 40 μm .

Ejemplo 5

50 Se disuelven 3,0 gramos de Resomer[®] 756 en 11,5 ml de formiato de etilo y se transfieren a un recipiente de acero de doble pared (altura interior de 11,0 cm, diámetro interior de 4 cm). Posteriormente, se añaden lentamente gota a gota 2,7 ml de una solución en NMP, que contiene 100 mg de acetato de goserelina, sin agitación a la solución polimérica. La suspensión resultante se agita con un agitador mecánico (Dispermat FT.VMA-Getzmann GmbH, disco para disolución de 2 cm) a 6000 rpm durante 6 minutos, y posteriormente se añaden como una fase continua 50 ml de una solución acuosa, tris-tamponada (pH = 7,4) que contiene 2 gramos de Pluronic[®] F-68. Después de cinco minutos de agitación, la suspensión de micropartículas se transfiere a un matraz de dos bocas y se agita con un agitador 55 magnético. A continuación, el disolvente se retira a temperatura ambiente mediante la aplicación de vacío o mediante extracción con agua.

60 Por medio de centrifugación o de filtración se retira de las micropartículas el exceso de tensioactivo y de agente activo no encapsulado, éstas se lavan repetidamente con agua y se liofilizan bajo la adición de un crioprotector.

65 El liofilizado, resuspendido en agua o una solución acuosa contiene microesferas con un contenido de goserelina del 2,94% (masa de goserelina * 100 / (masa de polímero + masa de goserelina) = grado de carga) y con un diámetro de entre 1 y 40 μm .

Ejemplo 6

Se disuelven 3,0 gramos de Resomer[®] 756 en 11,5 ml de acetato de etilo y se transfieren a un recipiente de acero de doble pared (altura interior de 11,0 cm, diámetro interior de 4 cm). Posteriormente, se añaden lentamente gota

ES 2 292 655 T3

a gota 2,7 ml de una solución en NMP, que contiene 75 mg de acetato de goserelina, a la solución polimérica bajo agitación (600 rpm) con un agitador mecánico (Dispermat FT.VMA-Getzmann GmbH, disco para disolución de 2 cm). La suspensión resultante se agita a 6000 rpm durante 6 minutos, y posteriormente se añaden como una fase continua 50 ml de una solución acuosa, tris-tamponada (50 mmoles, pH = 7,2) que contiene 2 gramos de Pluronic® F-68. Después de cinco minutos de agitación, la suspensión de micropartículas se transfiere a un matraz de 500 ml y de dos bocas y se agita con un agitador magnético. A continuación, el disolvente se retira a temperatura ambiente mediante la aplicación de vacío o mediante extracción con agua.

Por medio de centrifugación o de filtración se retira de las micropartículas el exceso de tensioactivo y de agente activo no encapsulado, éstas se lavan repetidamente con agua y se liofilizan bajo la adición de un crioprotector.

El liofilizado, resuspendido en agua o una solución acuosa contiene microesferas con un contenido de goserelina del 2,09% (masa de goserelina * 100 / (masa de polímero + masa de goserelina) = grado de carga) y con un diámetro de entre 1 y 40 µm.

Ejemplo 7

Se disuelven 3,0 gramos de Resomer® 756 en 11,5 ml de formiato de isopropilo y se transfieren a un recipiente de acero de doble pared (altura interior de 11,0 cm, diámetro interior de 4 cm). Posteriormente, se añaden lentamente gota a gota 2,7 ml de una solución en 2-pirrolidona, que contiene 75 ml de acetato de goserelina, a la solución polimérica bajo agitación (600 rpm) con un agitador mecánico (Dispermat FT.VMA-Getzmann GmbH, disco para disolución de 2 cm). La suspensión resultante se agita a 6000 rpm durante 6 minutos, y posteriormente se añaden como una fase continua 50 ml de una solución acuosa, tris-tamponada (50 mmoles, pH = 7,2) que contiene 2 gramos de Pluronic® F-68. Después de cinco minutos de agitación, la suspensión de micropartículas se transfiere a un matraz de 500 ml y de dos bocas y se agita con un agitador magnético. A continuación, el disolvente se retira a temperatura ambiente mediante la aplicación de vacío o mediante extracción con agua.

Por medio de centrifugación o de filtración se retira de las micropartículas el exceso de tensioactivo y de agente activo no encapsulado, éstas se lavan repetidamente con agua y se liofilizan bajo la adición de un crioprotector.

El liofilizado, resuspendido en agua o una solución acuosa contiene microesferas con un contenido de goserelina del 2,16% (masa de goserelina * 100 / (masa de polímero + masa de goserelina) = grado de carga) y con un diámetro de entre 1 y 40 µm.

Ejemplo 8

Se disuelven 3,0 gramos de Resomer® 756 en 11,5 ml de formiato de etilo y se transfieren a un recipiente de acero de doble pared (altura interior de 11,0 cm, diámetro interior de 4 cm). Posteriormente, se añaden lentamente gota a gota 2,7 ml de una solución en DMSO, que contiene 75 mg de eST (Somatotropina equina), a la solución polimérica bajo agitación (600 rpm) con un agitador mecánico (Dispermat FT.VMA-Getzmann GmbH, disco para disolución de 2 cm). La suspensión resultante se agita a 6000 rpm durante 6 minutos, y posteriormente se añaden como una fase continua 50 ml de una solución acuosa, tris-tamponada (50 mmoles, pH = 7,2) que contiene 2 gramos de Pluronic® F-68. Después de cinco minutos de agitación, la suspensión de micropartículas se transfiere a un matraz de 500 ml y de dos bocas y se agita con un agitador magnético. A continuación, el disolvente se retira a temperatura ambiente mediante la aplicación de vacío o mediante extracción con agua.

Por medio de centrifugación o de filtración se retira de las micropartículas el exceso de tensioactivo y de agente activo no encapsulado, éstas se lavan repetidamente con agua y se liofilizan bajo la adición de un crioprotector.

El liofilizado, resuspendido en agua o una solución acuosa, contiene microesferas con un contenido de goserelina del 2,08% (masa de goserelina * 100 / (masa de polímero + masa de goserelina) = grado de carga) y con un diámetro de entre 1 y 40 µm.

Ejemplo 9

Se disuelven 3,0 gramos de Resomer® 756 en 11,5 ml de formiato de etilo y se transfieren a un recipiente de acero de doble pared (altura interior de 11,0 cm, diámetro interior de 4 cm). Posteriormente, se añaden lentamente gota a gota 2,7 ml de una solución en DMSO, que contiene 75 mg de insulina, a la solución polimérica bajo agitación (600 rpm) con un agitador mecánico (Dispermat FT.VMA-Getzmann GmbH, disco para disolución de 2 cm). La suspensión resultante se agita a 6000 rpm durante 6 minutos, y posteriormente se añaden como una fase continua 50 ml de una solución acuosa, tris-tamponada (50 mmoles, pH = 7,2) que contiene 2 gramos de Pluronic® F-68. Después de cinco minutos de agitación, la suspensión de micropartículas se transfiere a un matraz de 500 ml y de dos bocas y se agita con un agitador magnético. A continuación, el disolvente se retira a temperatura ambiente mediante la aplicación de vacío o mediante extracción con agua.

Por medio de centrifugación o de filtración se retira de las micropartículas el exceso de tensioactivo y de agente activo no encapsulado, éstas se lavan repetidamente con agua y se liofilizan bajo la adición de un crioprotector.

ES 2 292 655 T3

El liofilizado, resuspendido en agua o una solución acuosa, contiene microesferas con un contenido de goserelina del 2,08% (masa de goserelina * 100 / (masa de polímero + masa de goserelina) = grado de carga) y con un diámetro de entre 1 y 40 μm .

5 Ejemplo 10

Se pesaron aproximadamente 20 mg de micropartículas cargadas de fármaco en viales de 10 ml y se suspendieron en 5 ml de PBS 10 mM (pH = 7,4) que contenía Tween 20 al 0,1%. Las muestras se agitaron a 130 rpm en un agitador orbital a 37°C. Después de haber transcurrido el tiempo deseado se retiraron 2 ml de la suspensión y se filtraron para separar el medio de liberación de las partículas. Posteriormente se midió el contenido de goserelina en el medio de liberación.

En la figura 1 se muestran los perfiles de liberación *in-vitro* de los ejemplos 2 y 5.

15 Ejemplo 11

Mediciones de conductividad

Con el fin de detectar la transición de fase desde la fase orgánica como una fase continua hasta la fase acuosa del tensioactivo como una fase continua durante la adición de la última a la suspensión de la sustancia activa obtenida en una fase orgánica, se ha llevado a cabo la siguiente medición de conductividad en un experimento modelo. Se añadió lentamente una solución tampón citrato a 15 ml de formiato de etilo mientras se controlaba la conductividad de la fase líquida. Después de la adición de aproximadamente 40 ml de la solución tampón, tuvo lugar la transición de fase, conduciendo a un aumento significativo de la conductividad tal y como se muestra en la figura 2.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 292 655 T3

REIVINDICACIONES

5 1. Un procedimiento para la preparación de nanopartículas o micropartículas que contienen una sustancia activa embebida en una matriz polimérica, que comprende las etapas de:

a) llevar a cabo la precipitación de una sustancia activa en una solución que comprende un polímero disuelto en un disolvente orgánico para obtener una suspensión de la sustancia activa,

10 b) mezclar la suspensión obtenida con una solución acuosa de tensioactivo y solidificar el polímero para obtener una suspensión de nanopartículas o micropartículas que contienen una sustancia activa.

15 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la precipitación de la etapa a) se lleva a cabo combinando una cantidad más pequeña de un primer disolvente L1 que disuelve la sustancia activa con una cantidad más grande de un segundo disolvente orgánico L2 que disuelve el polímero, y en el que L2 es un no disolvente para la sustancia activa.

3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2 en el que L1 y L2 son total o parcialmente miscibles.

4. El procedimiento de la reivindicación 2 o 3, en el que L1 y L2 se combinan bajo agitación.

20 5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el/los disolvente(s) orgánico(s) usado(s) es/son parcialmente soluble(s) en agua.

25 6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que la suspensión de las nanopartículas o micropartículas se obtiene en la etapa b) añadiendo la solución acuosa del tensioactivo a la suspensión de la etapa a).

7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la fracción de volumen de la solución acuosa del tensioactivo varía entre un 60 y un 80% de los disolventes acuoso y orgánico combinados en la etapa b).

30 8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la sustancia activa es una proteína o un péptido.

35 9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el polímero es un poli(DL-lactida-co-glicólido).

35

40

45

50

55

60

65

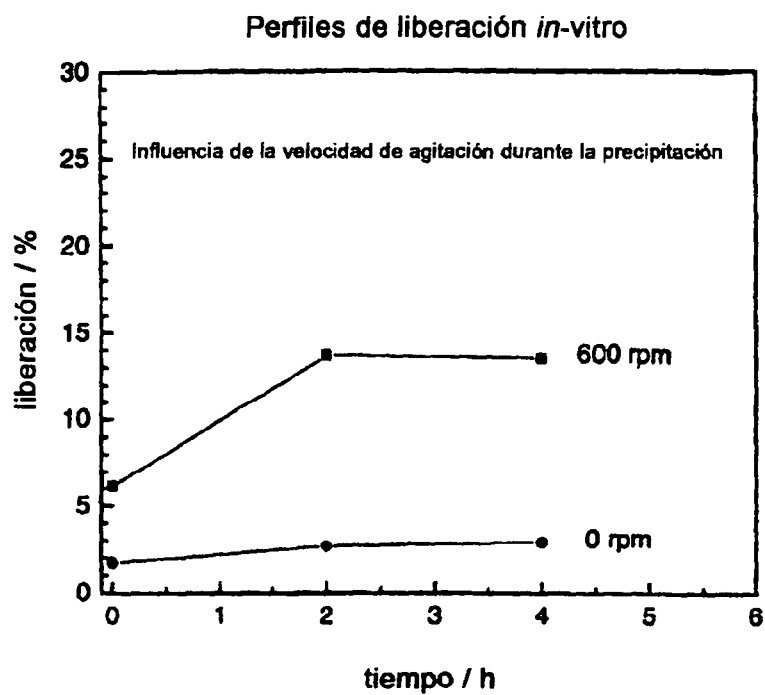


Fig. 1

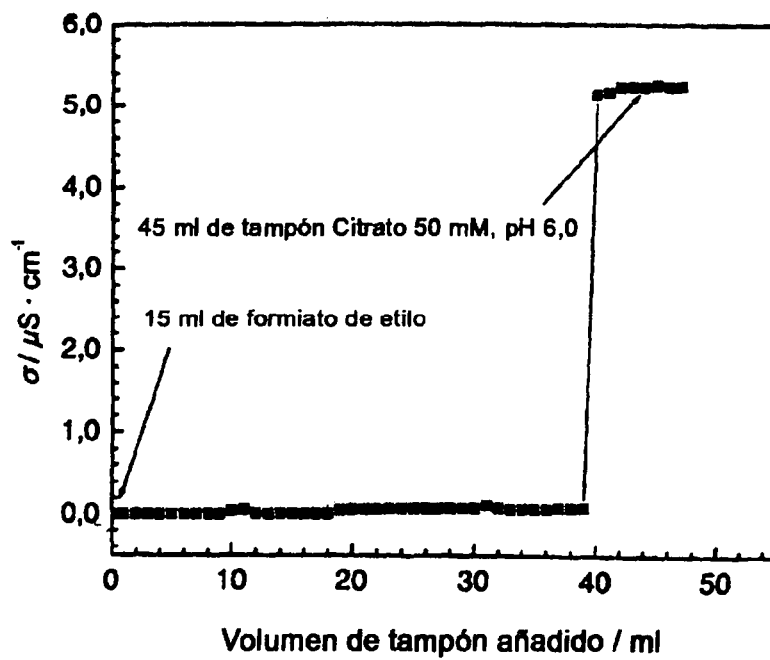


Fig. 2