PCT ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets 6 : **A61K 9/50, 9/16** | **A1**

(11) Numéro de publication internationale: **WO 95/28149**

(43) Date de publication internationale: 26 octobre 1995 (26.10.95)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/00485

(22) Date de dépôt international: 13 avril 1995 (13.04.95)

(30) Données relatives à la priorité:
94/04511 15 avril 1994 (15.04.94) FR

(71) Déposant *(pour tous les Etats désignés sauf US)*: PIERRE FABRE MEDICAMENT [FR/FR]; 45, place Abel-Gance, F-92100 Boulogne (FR).

(72) Inventeurs; et
(75) Inventeurs/Déposants *(US seulement)*: AROLA, Rosa [ES/ES]; Calle Calabria, 114, E-08015 Barcelone (ES). ASIN, Miguel, Angel [ES/ES]; Calle Francesc Layret, 76B, E-08290 Cerdanyola (ES). FERRET, Eulalia [ES/ES]; Calle Flaquer, 16 Bajos, E-08820 El Prat de Llobregat (ES). GOUTAY, Eric [FR/FR]; 175, les Jardins de Nambours, F-31650 Auzielle (FR). PEREZ, Amadeo [ES/ES]; Pobla de Lillet, 16-18, E-08028 Barcelone (ES). TARIN, Pere [ES/ES]; Calle Soletad, 78, E-08202 Sabadell (ES).

(74) Mandataire: AHNER, Francis; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).

(81) Etats désignés: AU, CA, JP, NZ, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Publiée
Avec rapport de recherche internationale.
Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.

(54) Title: CONTROLLED RELEASE BIODEGRADABLE MICROSPHERES AND METHOD OF PREPARATION

(54) Titre: MICROSPHERES BIODEGRADABLES A LIBERATION CONTROLEE ET LEUR PROCEDE DE PREPARATION

(57) Abstract

Method for the preparation of a pharmaceutical composition in the form of microspheres controllably releasing at least one water soluble active ingredient. The method comprises the steps of dissolving the active ingredient in a suitable quantity of water; emulsifying the aqueous solution containing the active ingredient with a solution of at least a d,l-lactide-co-glycolide-type matrix copolymer in chlorinated hydrocarbon further containing a low molecular weight polyactide release modulating agent, which results in a first microfine and homogeneous emulsion; emulsifying the first emulsion thus obtained in an external aqueous phase, containing a surface active agent; and removing and evaporating the solvent to produce microspheres which are recovered after filtering, washing and drying.

(57) Abrégé

L'invention concerne un procédé de préparation de composition pharmaceutique sous forme de microsphère à libération contrôlée d'au moins un principe actif hydrosoluble, caractérisé par la succession des étapes suivantes: dissolution du principe actif dans une quantité appropriée d'eau, émulsification de la solution aqueuse de principe actif ainsi obtenue avec une solution d'au moins un copolymère matriciel du type d,l-lactide-co-glycolide dans un hydrocarbure chloré contenant en outre un agent modulateur de libération polylactide de faible poids moléculaire, conduisant à une première émulsion microfine et homogène, émulsification de ladite première émulsion ainsi obtenue dans une phase aqueuse externe, contenant un agent tensio-actif, extraction-évaporation du solvant pour obtenir des microsphères que l'on récupère après filtration, lavage et séchage.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	**GB**	Royaume-Uni	**MR**	Mauritanie
AU	Australie	**GE**	Géorgie	**MW**	Malawi
BB	Barbade	**GN**	Guinée	**NE**	Niger
BE	Belgique	**GR**	Grèce	**NL**	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	**HU**	Hongrie	**NO**	Norvège
BG	Bulgarie	**IE**	Irlande	**NZ**	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	**IT**	Italie	**PL**	Pologne
BR	Brésil	**JP**	Japon	**PT**	Portugal
BY	Bélarus	**KE**	Kenya	**RO**	Roumanie
CA	Canada	**KG**	Kirghizistan	**RU**	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	**KP**	République populaire démocratique de Corée	**SD**	Soudan
CG	Congo			**SE**	Suède
CH	Suisse	**KR**	République de Corée	**SI**	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	**KZ**	Kazakhstan	**SK**	Slovaquie
CM	Cameroun	**LI**	Liechtenstein	**SN**	Sénégal
CN	Chine	**LK**	Sri Lanka	**TD**	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	**LU**	Luxembourg	**TG**	Togo
CZ	République tchèque	**LV**	Lettonie	**TJ**	Tadjikistan
DE	Allemagne	**MC**	Monaco	**TT**	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	**MD**	République de Moldova	**UA**	Ukraine
ES	Espagne	**MG**	Madagascar	**US**	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	**ML**	Mali	**UZ**	Ouzbékistan
FR	France	**MN**	Mongolie	**VN**	Viet Nam
GA	Gabon				

MICROSPHERES BIODEGRADABLES A LIBERATION CONTROLEE ET LEUR PROCEDE DE PREPARATION

La présente invention a pour objet la réalisation de microsphères biodégradables à base de composés pharmacologiquement actifs hydrophiles, permettant d'assurer quelle que soit la voie d'administration retenue (par exemple la voie injectable), une libération contrôlée et soutenue de ladite substance active.

De nombreuses formes pharmaceutiques à base de polymères ou de copolymères biodégradables et biocompatibles ont déjà été décrites dans l'état de la technique antérieure. Ces diverses formes sont obtenues par des procédés dont la spécificité est toujours étroitement liée :

- à la voie d'administration souhaitée (taille, forme de la forme galénique),
- aux propriétés physico-chimiques de la molécule encapsulée notamment sa solubilité, sa thermostabilité et sa température de fusion,
- aux propriétés pharmacologiques et pharmacodynamiques de cette molécule active.

Dans la plupart des applications, les voies oculaires, dermiques, auriculaires et orales, il n'est pas nécessaire de mettre au point des formes galéniques de faibles dimensions. C'est pourquoi les procédés de fusion-extrusion, nébulisation, fluidisation, voire compression sur machine à comprimer classique, sont très largement décrits et utilisés.

Pour les formes galéniques implantables, les procédés de fabrication sont également nombreux, car la taille de l'implant ne nécessite pas de descendre très bas en granulométrie et l'on retrouve donc les procédés cités ci-dessus.

En revanche, pour les formes destinées à être administrées par la voie parentérale, les procédés de fabrication se trouvent très fortement liés aux contraintes suivantes :

- d'une part, la taille de la forme galénique, qui doit pouvoir être administrée sous forme de suspension injectable par une seringue appropriée (18 à 22 gauges). Ceci oblige à tenir compte de cette contrainte et à obtenir des microcapsules ou microsphères de taille inférieure à 150 µm,
- d'autre part, la stabilité physico-chimique de la molécule et sa solubilité (hydrosoluble, liposoluble) qui conditionne, pour les procédés en milieu liquide, le sens des émulsions simples ou multiples,
- et enfin, le profil pharmacocinétique optimal de ladite forme qui

conditionne du même coup la durée de l'activité du produit.

Malgré ces contraintes, quelquefois très dures à surmonter, il existe une grande variété de procédés de microencapsulation, parmi lesquels on peut citer :

- l'émulsion-évaporation de solvant,
- l'émulsion-extraction de solvant,
- la séparation de phase,
- la nébulisation ou spray-drying,
- l'extrusion, et
- la fluidisation en lit d'air.

L'objet de la présente invention est relatif à l'élaboration de microsphères à base d'une molécule hydrophile, par un procédé du type émulsion multiple-évaporation de solvant.

De façon générale, dans un procédé de ce type par émulsion multiple E/H/E et évaporation du solvant, le principe actif hydrosoluble est solubilisé tout d'abord dans la phase interne d'une première émulsion E/H, puis, dans un second temps, cette première émulsion est à son tour émulsionnée dans une phase aqueuse externe.

Cette technique s'est avérée particulièrement avantageuse pour formuler des principes actifs très hydrosolubles pour lesquels elle donne une bonne efficacité d'encapsulation.

Le principe physique d'émulsion multiple pour encapsuler des principes actifs hydrosolubles a par exemple été décrit dans US-A-3,523,906.

La présente invention concerne un procédé de préparation de composition pharmaceutique sous forme de microsphère à libération contrôlée d'au moins un principe actif hydrosoluble, caractérisé par la succession des étapes suivantes :

- dissolution du principe actif dans une quantité appropriée d'eau,
- émulsification de la solution aqueuse de principe actif ainsi obtenue avec une solution d'au moins un copolymère matriciel du type d,l-lactide-co-glycolide dans un hydrocarbure chloré contenant en outre un agent modulateur de libération, polylactide de faible poids moléculaire, conduisant à une première émulsion microfine et homogène,
- émulsification de ladite première émulsion ainsi obtenue dans une phase aqueuse externe, contenant un agent tensio-actif,
- extraction-évaporation du solvant pour obtenir des microsphères que

l'on récupère après filtration, lavage et séchage.

D'autres caractéristiques et avantages apparaîtront à la lecture de la description détaillée faite ci-après, notamment en s'appuyant sur quelques exemples de mise en oeuvre particuliers.

Cette invention consiste à élaborer des compositions pharmaceutiques, sous forme de microsphères, destinées à obtenir une libération contrôlée et soutenue d'un principe actif hydrosoluble, selon un procédé d'Emulsion Multiple E/H/E et Extraction-Evaporation du Solvant, dans lequel, selon une caractéristique particulière consistant à utiliser un système évaporateur continu constitué d'une pente de longueur adéquate sur laquelle s'écoule en couche mince la suspension de microsphères, on parvient à diminuer sa durée dans le temps.

Les principes actifs hydrosolubles (I) qui peuvent être utilisés dans le cadre de ce procédé comprennent des substances naturelles ou synthétiques douées d'une activité pharmacologique, telles que peptides, bronchiodilatateurs, antibiotiques, antidépresseurs, analgésiques, anti-inflammatoires, vaccins etc. On citera particulièrement les principes actifs suivants : calcitonine, vasopressine, somatostatine, hormone de croissance, prolactine, hormone lutéinisante, ocytocine, sécrétine, salbutamol, gentamycine, tétracycline, tobramycine, amikacine, salicylate de sodium, diclofenac de sodium, amoxicilline, ampicilline, naproxen sodique, vinorelbine, vincristine, vindesine, methotrexate, cis platine, carmustine, doxorubicine, epirubicine, daunorubicine, ifosfamide, et leurs dérivés. Cette liste de principes actifs n'illustre que des produits susceptibles d'être encapsulés par ce procédé, sans toutefois en exclure d'autres.

Les concentrations utilisées dans la phase aqueuse interne dans le cadre de la présente invention sont fonction de la solubilité du principe actif dans l'eau, des caractéristiques dudit principe actif et de la libération soutenue que l'on désire obtenir. A titre d'exemple, on citera des concentrations allant de 0,01% à 95%, de préférence comprises entre 0,05 et 50%, en particulier entre 0,05 et 2,5%.

Le ou les polymère(s) matriciel(s) utilisable(s) (II) pour préparer des microsphères par E/H/E doivent, d'une part, être solubilisables dans un solvant volatil (III) approprié. A titre d'exemples de tels solvants (III), on citera les alcanes halogénés tels que le chlorure de méthylène, le chloroforme, le chloroéthane, le dichloroéthane, le trichloroéthane et le

tétrachlorure de carbone, l'éthyle acétate, etc. D'autre part, le(s)dit(s) polymère(s) doivt être non miscible à l'eau et enfin, être biodégradable et biocompatible avec l'organisme. L'ample expérience acquise avec les copolymères polylactide-co-glycolide prouve que ceux-ci sont parfaitement tolérés par l'organisme, qu'ils ont une réponse inflammatoire minime, sont absorbés sans s'accumuler dans les organes vitaux et sont finalement totalement éliminés. C'est pour cela que les polymères choisis sont les polylactide-co-glycolides, en particulier les d,l-lactide-co-glycolides, dans des proportions lactique/glycolique de 85:15 et 40:60, de préférence entre 75:25 et 50:50. Ils offrent en effet une vitesse d'hydrolyse plus rapide évitant ainsi les dépôts à l'endroit de l'administration, après la libération du principe actif. L'agent modulateur de la libération (IV) est un polylactide, en particulier un d,l lactide, de faible poids moléculaire qui s'additionne au copolymère polylactide-co-glycolide en proportions quelconques.

Selon le procédé objet de la présente invention, le poids moléculaire du copolymère doit être compris entre 10 000 et 500 000, de préférence entre 10 000 et 250 000, avantageusement entre 12 000 et 34 000, tandis que pour l'agent modulateur de la libération, le poids moléculaire doit être compris entre 1 000 et 10 000, de préférence voisin de 2 000.

Les concentrations et poids moléculaires des polymères utilisés sont fonction du principe actif et de la vitesse de libération souhaitée. Selon le procédé objet de la présente invention, des concentrations appropriées des polymères présents dans la phase organique, sont comprises entre 5% et 50%.

La phase aqueuse externe (V) contient un tensioactif (VI) tel que les polyvinylalcools, les polyvinylpyrrolidones, le polyoxyéthylène mono-oléate de sorbitanne, le polyoxyéthylène monolaurate de sorbitanne, les poloxamers, le carboxyméthylcellulose sodique ou leurs mélanges. Les concentrations à utiliser vont de 0,05 à 25%. Dans ce procédé, le tensioactif retenu préférentiellement est un mélange de polyvinylpyrrolidone et de polyoxyéthylène mono-oléate de sorbitanne.

De façon plus détaillée, le procédé selon l'invention consiste à effectuer les étapes suivantes.

On prépare une quantité de principe actif (I) dissous dans un volume d'eau purifiée. Cette solution s'émulsionne par exemple à l'aide d'un sonicateur, dans un volume de chlorure de méthylène (III)

contenant un copolymère polylactide-co-glycolide (II) et l'agent modulateur de la libération (IV), à savoir le polylactide de faible poids moléculaire. Cette première émulsion doit être microfine et homogène, ce qui permettra de répandre le principe actif sur toute la matrice polymérique, en assurant la reproductibilité des différents lots, sans avoir besoin d'utiliser des tensioactifs ni d'autres agents adjuvants. Une fois la première émulsion formée, on l'émulsionne à son tour dans une phase externe (V), formée par une solution aqueuse contenant de la polyvinylpyrrolidone et du polyoxyéthylène mono-oléate de sorbitanne (VI), sous agitation pendant une courte période. Après quoi, on dilue avec de l'eau purifiée et on fait passer la suspension sur un système évaporateur continu constitué d'une pente de longueur adéquate sur laquelle s'écoule en couche mince la suspension de microsphères, ce qui améliore l'extraction-évaporation du solvant et réduit la durée du procédé. Les microsphères sont récupérées par filtration, lavées avec de l'eau purifiée et séchées par lyophilisation.

Ce procédé, simple à réaliser et reproductible, permet d'obtenir des microsphères d'une taille adéquate pour leur administration.

Une caractéristique importante de cette invention réside dans le fait que l'addition du polylactide de faible poids moléculaire au copolymère polylactide-co-glycolide permet de moduler la libération du principe actif. Il a été constaté qu'en augmentant la proportion de polylactide de faible poids moléculaire, on augmentait la vitesse de libération du produit encapsulé (voir exemple 1 et 2) qui se trouve dans les petits réservoirs à l'intérieur des microsphères (voir exemple 7).

Selon une caractéristique additionnelle de la présente invention, le rapport du copolymère à l'agent modulateur est compris entre 10:90 et 90:10, de préférence entre 50:50 et 90:10.

De façon générale, les microsphères obtenues conformément au procédé de l'invention sont toujours inférieures à environ 250 µm, de préférence inférieures à environ 100 µm, et avantageusement comprises entre 3 et 40 µm.

La formation de la seconde émulsion est l'étape la plus critique de ce procédé, quant à l'efficacité d'encapsulation, surtout si l'on veut obtenir de petites tailles.

L'originalité du procédé selon la présente invention permet de réduire le temps total de mise en oeuvre du procédé, provoque une

stabilisation précoce de la matrice polymérique et évite la perte de produit encapsulé. La vitesse de durcissement des microsphères permet une bonne efficacité d'encapsulation même en ajoutant un polylactide de faible poids moléculaire dans la solution polymérique, sans qu'il faille utiliser d'adjuvants dans la première émulsion. De plus, le procédé est mis en oeuvre à température ambiante et sous pression atmosphérique, ce qui fait que l'on évite des problèmes tels que l'altération des produits thermolabiles ou la cassure de microsphères quand on utilise le vide à l'étape d'extraction-évaporation.

Selon une autre caractéristique additionnelle de la présente invention, la proportion entre les phases de la première émulsion est comprise entre 1:100 et 25:100.

L'un des buts essentiels de cette invention est de moduler la libération du principe actif en ajustant la proportion entre le polylactide de faible poids moléculaire et le polylactide-co-glycolide pour l'élaboration des microsphères. Cette forme de modulation est facilement reproductible.

Pour garantir la reproductibilité de la libération (voir exemple 3), il est indispensable que la proportion du copolymère et de l'agent modulateur se maintienne dans la matrice polymérique. Il a été constaté expérimentalement par RMN qu'il y avait une corrélation linéaire entre le pourcentage théorique de polylactide de faible poids moléculaire incorporé et le pourcentage réel trouvé. Pour chaque niveau de polylactide de faible poids moléculaire (entre 10% et 90%) les résultats obtenus sont reproductibles (voir exemple 4).

Exemple 1

On dissout 20 mg de tartrazine dans 1 ml d'eau purifiée. Cette solution s'émulsionne à l'aide d'un sonicateur dans 10 ml de chlorure de méthylène contenant 15% de mélange d'un copolymère, poly(d,l-lactide-co-glycolide) 50:50 avec une viscosité inhérente d'approximativement 0,4 dl/g dans du $CHCl_3$ et des quantités croissantes d'un agent modulateur de la libération, poly (d,l-lactide) de poids moléculaire 2000. Une fois formée la première émulsion, on l'émulsionne à son tour dans 1000 ml de solution aqueuse formée par de la polyvinylpyrrolidone à 4% et du polyoxyéthylène mono-oléate de sorbitanne à 0,25 %, sous agitation d'hélice pendant 90 secondes. Après quoi, on passe la suspension par un système évaporateur continu constitué d'une pente de longueur adéquate

sur laquelle s'écoule en couche mince la suspension de microsphères. On récupère les microsphères sous filtration, on lave avec de l'eau purifiée et on sèche sous lyophilisation.

Avec ce procédé, on a élaboré des microsphères avec les proportions de polylactide de faible poids moléculaire suivantes :

Exemples	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.6
%polylactide	0%	10%	20%	30%	40%	50%

Pourcentage de tartrazine libérée à partir de microsphères en tampon phosphate à pH 7,4 et à 37°C (moyenne de deux valeurs ou plus)

Exemple	4h	6h	24h	48h
1.1	4,1	3,9	5,9	5,3
1.2	9,4	9,6	12,2	20,6
1.3	27,9	27,8	36,7	72,6
1.4	30,1	30,5	47,6	88,3
1.5	51,3	50,6	73,4	104,2
1.6	79,2	82,6	97,1	102,2

Exemple 2

On dissout 20 mg de tartrazine dans 1 ml d'eau purifiée. Cette solution s'émulsionne à l'aide d'un sonicateur dans 10 ml de chlorure de méthylène contenant 20% de mélange d'un copolymère, poly (d,l-lactide-co-glycolide) 50:50 avec une viscosité inhérente d'approximativement 0,2 dl/g dans du $CHCl_3$ et des quantités croissantes d'un agent modulateur de la libération, poly (d,l-lactide) de poids moléculaire 2000. Pour l'élaboration des microsphères, on procède comme à l'exemple 1.

Avec ce procédé, on a élaboré des microsphères avec les proportions de polylactide de faible poids moléculaire suivantes :

Exemple	2.1	2.2	2.3	2.4
%polylactide	0%	10%	20%	40%

Pourcentage de tartrazine libérée à patir de microsphères en tampon phosphate à pH 7.4 et à 37°C (moyenne de deux valeurs ou plus)

Exemple	4h	6h	24h	48h
2.1	5,2	5,3	5,6	6,5
2.2	12,4	11,6	14,7	22,4
2.3	43,2	53,0	71,8	82,4
2.4	81,4	88,2	103,6	102,3

Exemple 3

Etude de reproductibilité de la libération "in vitro" de 3 formulations des exemples 1 et 2.

Pourcentage de tartrazine libérée à partir de microsphères en tampon phosphate à pH 7,4 et à 37°C (moyenne de deux valeurs ou plus)

Exemple	6h	24h	48h	72h	96h
1.4	31,2	43,6	-----	97,8	99,1
1.4	30,5	47,6	88,3	100,1	101,8
2.2	14,8	18,3	21,7	27,3	36,8
2.2	11,6	14,7	22,4	32,0	-----
2.3	53,0	71,8	82,4	85,1	89,5
2.3	-----	77,8	82,1	92,8	94,5

Exemple 4

Etude par RMN de la reproductibilité du mélange polymérique que forme la matrice de microsphères élaborées selon le procédé décrit dans les exemples 1 et 2.

% PLA théorique	% PLA réel
10	8,9
20	16,3 16,9 15,5
30	24,0 24,6
40	33,1 35,2 35,0 34,4
50	44,0 42,4 42,7
60	52,9 51,5 51,9
70	59,1 60,5 59,5
80	69,4 69,8 68,4
90	78,4 77,7 77,9

PLA : polylactide de p.m. 2 000

La variation des valeurs corrélées statistiquement de % PLA réel en fonction de PLA théorique est représentée sur le schéma de la Figure 1 annexée.

Exemple 5

Elaboration de microsphères selon le procédé décrit à l'exemple 1, en utilisant la calcitonine de saumon comme principe actif.

Exemple 5.1

On dissout 7,5 mg de calcitonine de saumon dans 1 ml d'eau purifiée et on l'émulsionne dans 10 ml de chlorure de méthylène contenant 1 500 mg de poly (d,l-lactide-co-glycolide) 50:50 d'une viscosité inhérente d'approximativement 0,4 dl/g dans du $CHCl_3$. Pour l'élaboration des

microsphères, on procède comme à l'exemple 1.

La taille moyenne en aire, obtenue par "laser light scattering", est de 16,8µm. L'efficacité est de 92,5%.

Exemple 5.2

On dissout 7,5 mg de calcitonine de saumon dans 1 ml d'eau purifiée et on l'émulsionne dans 10 ml de chlorure de méthylène contenant un mélange formé par 1050 mg de poly(d,l-lactide-co-glycolide) 50:50 avec une viscosité inhérente d'approximativement 0,4 dl/g dans du $CHCL_3$ et 450 mg d'un agent modulateur de la libération, poly(d,l-lactide) de poids moléculaire 2000. Pour l'élaboration des microsphères, on procède comme à l'exemple 1.

La taille moyenne en aire, obtenue par "laser light scattering", est de 22,9µm. L'efficacité est de 102,5%. Une photographie des microsphères sélectionnées par cryofracture, obtenue au microscope électronique à balayage, est représentée à la figure 2 annexée.

Exemple 5.3

On dissout 7,5 mg de calcitonine de saumon dans 1 ml d'eau purifiée et on l'émulsionne dans 10 ml de chlorure de méthylène contenant un mélange formé par 900 mg de poly(d,l-lactide-co-glycolide) 50:50 avec une viscosité inhérente d'approximativement 0,4 dl/g dans du $CHCL_3$ et 600 mg d'un agent modulateur de la libération, poly(d,l-lactide) de poids moléculaire 2000. Pour l'élaboration des microsphères, on procède comme à l'exemple 1.

La taille moyenne en aire, obtenue par "laser light scattering", est de 17,6µm. L'efficacité est de 98,5%.

Exemple 5.4

On dissout 10 mg de calcitonine de saumon dans 1 ml d'eau purifiée et on l'émulsionne dans 10 ml de chlorure de méthylène contenant 2000 mg de poly(d,l-lactide-co-glycolide) 50:50 avec une viscosité inhérente d'approximativement 0,2 dl/g dans du $CHCL_3$. Pour l'élaboration des microsphères, on procède comme à l'exemple 1.

La taille moyenne en aire, obtenue par "laser light scattering", est de 30,4µm. L'efficacité est de 92,6%.

Exemple 5.5

On dissout 10 mg de calcitonine de saumon dans 1 ml d'eau purifiée et on l'émulsionne dans 10 ml de chlorure de méthylène contenant un mélange composé de 1400 mg de poly(d,l-lactide-co-glycolide) 50:50 avec une viscosité inhérente d'approximativement 0,2 dl/g dans du $CHCL_3$ et 600 mg

d'un agent modulateur de la libération, poly(d,l-lactide) de poids moléculaire 2000. Pour l'élaboration des microsphères, on procède comme à l'exemple 1.

La taille moyenne en aire, obtenue par "laser light scattering", est de 36,2µm. L'efficacité est de 106,5%.

Exemple 5.6

On dissout 10 mg de calcitonine de saumon dans 1 ml d'eau purifiée et on l'émulsionne dans 10 ml de chlorure de méthylène contenant un mélange composé de 1200 mg de poly(d,l-lactide-co-glycolide) 50:50 avec une viscosité inhérente d'approximativement 0,2 dl/g dans du $CHCL_3$ et 800 mg d'un agent modulateur de la libération, poly(d,l-lactide) de poids moléculaire 2000. Pour l'élaboration des microsphères, on procède comme à l'exemple 1.

La taille moyenne en aire, obtenue par "laser light scattering", est de 39,8µm. L'efficacité est de 86,4%.

Exemple 5.7

On dissout 51 mg de calcitonine de saumon dans 1 ml d'eau purifiée et on l'émulsionne dans 10 ml de chlorure de méthylène contenant un mélange composé de 1200 mg de poly(d,l-lactide-co-glycolide) 50:50 avec une viscosité inhérente d'approximativement 0,2 dl/g dans du $CHCL_3$ et 800 mg d'un agent modulateur de la libération, poly(d,l-lactide) de poids moléculaire 2000. Pour l'élaboration des microsphères, on procède comme à l'exemple 1.

La taille moyenne en aire, obtenue par "laser light scattering", est de 32,2µm. L'efficacité est de 109,4%.

Exemple 5.8

Une solution de 100 µl de calcitonine de saumon à 12,5% est émulsionnée dans 10 ml de chlorure de méthylène contenant 2250 mg de poly(d,l-lactide-co-glycolide) 50:50 d'une viscosité inhérente d'approximativement 0,2 dl/g dans du $CHCl_3$ et 250 mg d'un agent modulateur de la libération, poly (d,l-lactide) de poids moléculaire 2000, à l'aide d'un sonicateur. Une fois formée la première émulsion, on l'émulsionne à son tour dans 300 ml d'une solution aqueuse de polyoxyéthylène mono-oléate de sorbitanne à l'aide d'un homogénéisateur Ultraturrax pendant 3 minutes. Après quoi, on passe la suspension par un système évaporateur continu constitué d'une pente de

longueur adéquate sur laquelle s'écoule en couche mince la suspension de microsphères et on sèche les microsphères par lyophilisation.

La taille moyenne en aire, obtenue par "laser light scattering", est de 8µm. L'efficacité est de 72,4%.

Exemple 5.9

On dissout 7,5 mg de calcitonine de saumon dans 1 ml d'eau purifiée et on l'émulsionne dans 10 ml de chlorure de méthylène contenant un mélange composé de 150 mg de poly(d,l-lactide-co-glycolide) 50:50 avec une viscosité inhérente d'approximativement 0,4 dl/g dans du $CHCL_3$ et 1350 mg d'un agent modulateur de la libération, poly(d,l-lactide) de poids moléculaire 2000. Pour l'élaboration des microsphères, on procède comme à l'exemple 1.

La taille moyenne en aire, obtenue par "laser light scattering", est de 19,7µm. L'efficacité est de 95,3%.

Exemple 5.10

On dissout 10 mg de calcitonine de saumon dans 1 ml d'eau purifiée et on l'émulsionne dans 10 ml de chlorure de méthylène contenant un mélange composé de 200 mg de poly(d,l-lactide-co-glycolide) 50:50 avec une viscosité inhérente d'approximativement 0,2 dl/g dans du $CHCL_3$ et 1800 mg d'un agent modulateur de la libération, poly(d,l-lactide) de poids moléculaire 2000. Pour l'élaboration des microsphères, on procède comme à l'exemple 1.

La taille moyenne en aire, obtenue par "laser light scattering", est de 33,1µm. L'efficacité est de 98,5%.

Exemple 6

Effet produit par l'inclusion de quantités croissantes de poly(d,1-lactide) de poids moléculaire 2000, dans la matrice polymérique de poly(d,1-lactide-co-glycolide) 50:50, de viscosité inhérente de 0.4 dl/g dans du $CHCl_3$, sur la libération "in vitro" de la calcitonine de saumon.

Pourcentage de calcitonine de saumon libérée à partir de microsphères en tampon phosphates à pH 7,4 et à 37°C.

Exemple	1j	3j	4j	9j	10j
5.1	-----	0	0	0,7	1,0
5.2	-----	1,8	2,3	5,0	5,0
5.3	5,3	6,4	7,9	10,4	11,4

Effet que produit l'inclusion de quantités croissantes de poly(d,1-lactide) de poids moléculaire 2000, dans la matrice polymérique de poly(d,1-lactide-co-glycolide) 50:50, de viscosité inhérente de 0,2 dl/g dans du $CHCl_3$, sur la libération "in vitro" de la calcitonine de saumon.

Pourcentage de calcitonine de saumon libérée à partir de microsphères en tampon phosphates à pH 7,4 et à 37°C.

Exemple	1j	4j	6j	8j	10j
5.4	0,8	0,8	0,8	1,2	2,2
5.5	5,7	12,0	14,2	17,0	18,0
5.6	8,9	16,1	17,7	18,9	20,9

Enfin, à titre d'exemples additionnels, on mentionnera ci-après quelques principes actifs qui ont été incorporés dans des microsphères préparées selon le procédé décrit dans les exemples 1 et 2, et qui ont conduit aux temps de libération indiqués ci-après.

Principe actif	Temps de libération
Amoxicilline sodique	1 jour à 1 semaine
Naproxen sodique	1 jour à 1 mois
Salbutamol sulfate	1 semaine à 1 mois
Vinorelbine	1 semaine à 1 mois
Vincristine	1 semaine à 1 mois
Vindesine	1 semaine à 1 mois
Methotrexate	1 semaine à 1 mois
Cis platine	1 semaine à 1 mois
Carmustine	1 semaine à 1 mois
Doxorubicine	1 semaine à 1 mois
Epirubicine	1 semaine à 1 mois
Daunorubicine	1 semaine à 1 mois
Ifosfamide	1 semaine à 1 mois

REVENDICATIONS

1. Procédé de préparation de composition pharmaceutique sous forme de microsphère à libération contrôlée d'au moins un principe actif hydrosoluble, caractérisé par la succession des étapes suivantes :

- dissolution du principe actif dans une quantité appropriée d'eau,
- émulsification de la solution aqueuse de principe actif ainsi obtenue avec une solution d'au moins un copolymère matriciel du type d,l-lactide-co-glycolide dans un hydrocarbure chloré contenant en outre un agent modulateur de libération polylactide de faible poids moléculaire, conduisant à une première émulsion microfine et homogène,
- émulsification de ladite première émulsion ainsi obtenue dans une phase aqueuse externe, contenant un agent tensio-actif,
- extraction-évaporation du solvant pour obtenir des microsphères que l'on récupère après filtration, lavage et séchage.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le principe actif est choisi parmi les substances suivantes : calcitonine, vasopressine, somatostatine, hormone de croissance, prolactine, hormone lutéinisante, ocytocine, sécrétine, salbutamol, gentamycine, tétracycline, tobramycine, amikacine, salicylate de sodium, diclofenac de sodium, amoxicilline, ampicilline, naproxen sodique, vinorelbine, vincristine, vindesine, methotrexate, cis platine, carmustine, doxorubicine, epirubicine, daunorubicine, ifosfamide, et leurs dérivés.

3. Procédé selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que dans ledit copolymère matriciel la proportion lactique : glycolique est comprise entre 75 : 25 et 50 : 50.

4. Procédé selon l'une des revendication 1 à 3, caractérisé en ce que le poids moléculaire du copolymère matriciel est compris entre 10 000 et 250 000, de préférence entre 12 000 et 34 000.

5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le poids moléculaire du polylactide modulateur est compris entre 1 000 et 10 000, de préférence voisin de 2 000.

6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la proportion entre le copolymère matriciel et le polylactide modulateur est comprise entre 10:90 et 90:10, de préférence entre 50:50 et 90:10.

7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que l'on dissout le principe actif hydrosoluble dans de l'eau pour former

la phase aqueuse interne, sans l'addition d'aucune substance qui retienne le principe actif, ni d'agents stabilisateurs de l'émulsion, ni aucune opération destinée à augmenter la viscosité; on émulsionne cette phase dans une phase organique formée par un mélange dudit copolymère et dudit agent modulateur de la libération, constitué d'un homopolymère du polylactide de bas poids moléculaire et dudit hydrocarbure chloré, pour préparer la première émulsion (E/H); on ajoute celle-ci à une troisième phase aqueuse qui contient un tensioactif, pour préparer la seconde émulsion (E/H/E); et on élimine rapidement le solvant à température ambiante et sous pression atmosphérique pour produire les microsphères.

8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que ladite première émulsion est microfine et homogène.

9. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que la proportion entre les phases de la première émulsion est comprise entre 1:100 et 25:100.

10. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que ledit solvant est rapidement éliminé, à température ambiante et sous pression atmosphérique, selon un système évaporateur continu constitué d'une pente de longueur adéquate sur laquelle s'écoule en couche mince la suspension de microsphères.

11. Procédé selon les revendications 1 à 10, caractérisé en ce que ledit hydrocarbure chloré est le chlorure de méthylène.

12. Procédé selon les revendications 1 à 11, caractérisé en ce que ledit tensioactif est un mélange de polyvinylpyrrolidone et polyoxyéthylène mono-oléate de sorbitanne.

13. Microsphères obtenues par la mise en oeuvre du procédé selon l'une des revendications 1 à 12.

14. Microsphères selon la revendication 13, caractérisées en ce que leur taille est de 250 µm ou moins, de préférence de 125 µm ou moins, et de façon encore préférentielle de 50 µm ou moins.

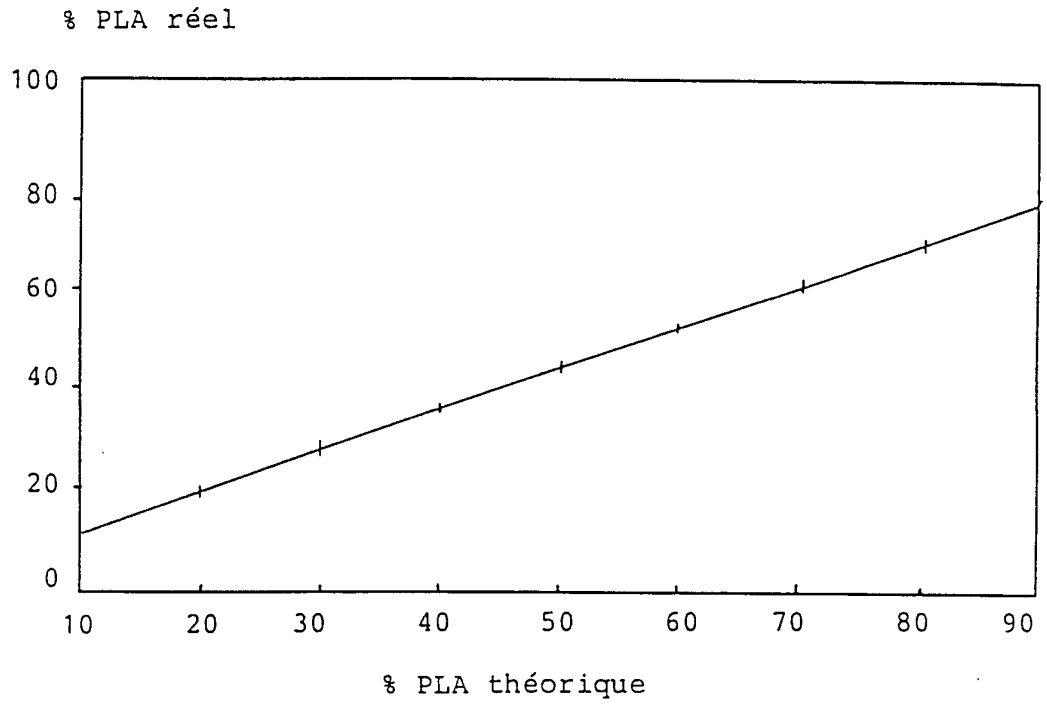


Fig. 1

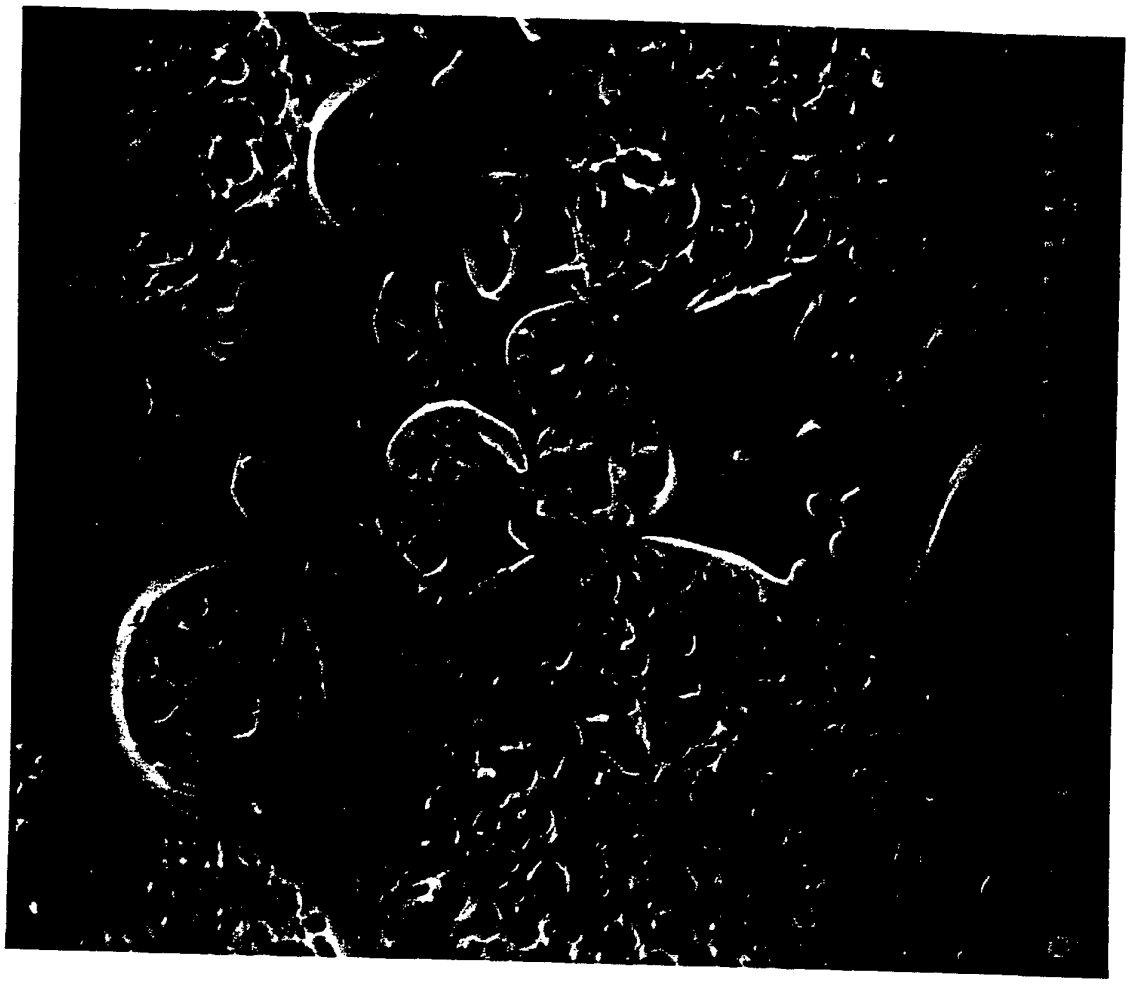


Fig. 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intx onal Application No
PCT/FR 95/00485

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K9/50 A61K9/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP,A,0 481 732 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) 22 April 1992 see the whole document see page 6 - page 7; example 5 see page 9 - page 10; example 7	1-9, 11-14
A	WO,A,93 25191 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)) 23 December 1993 see the whole document	1-14
A	WO,A,93 25221 (ALKERMES CONTROLLED THERAPEUTICS, INC.) 23 December 1993 see page 13, line 12 - line 23 see page 26 - page 28; example 4	1-14

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
2 August 1995	22.08.95

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Benz, K

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, vol.30, no.3, July 1994, AMSTERDAM (NL) pages 201 - 211, XP453418 H. SAH ET AL. 'the influence of biodegradable microcapsule formulations on the controlled release of a protein'	1-14

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inte onal Application No
PCT/FR 95/00485

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP-A-0481732	22-04-92	AT-T-	119035	15-03-95
		AU-B-	644019	02-12-93
		AU-A-	8586491	30-04-92
		CN-A-	1060851	06-05-92
		DE-D-	69107773	06-04-95
		DE-T-	69107773	29-06-95
		ES-T-	2069221	01-05-95
		JP-A-	5112468	07-05-93
		US-A-	5304377	19-04-94
		ZA-A-	9108168	14-04-93
WO-A-9325191	23-12-93	FR-A-	2692147	17-12-93
		EP-A-	0646001	05-04-95
WO-A-9325221	23-12-93	AU-B-	4630893	04-01-94
		CA-A-	2136434	23-12-93
		EP-A-	0644771	29-03-95

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De de Internationale No
PCT/FR 95/00485

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 A61K9/50 A61K9/16

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP,A,0 481 732 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) 22 Avril 1992 voir le document en entier voir page 6 - page 7; exemple 5 voir page 9 - page 10; exemple 7 ---	1-9, 11-14
A	WO,A,93 25191 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)) 23 Décembre 1993 voir le document en entier ---	1-14
A	WO,A,93 25221 (ALKERMES CONTROLLED THERAPEUTICS, INC.) 23 Décembre 1993 voir page 13, ligne 12 - ligne 23 voir page 26 - page 28; exemple 4 --- -/--	1-14

[X] Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

[X] Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
2 Août 1995	22.08.95

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Benz, K

Formulaire PCT/ISA/210 (deuxième feuille) (juillet 1992)

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P,X	JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, vol.30, no.3, Juillet 1994, AMSTERDAM (NL) pages 201 - 211, XP453418 H. SAH ET AL. 'the influence of biodegradable microcapsule formulations on the controlled release of a protein' -----	1-14

1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Der e Internationale No
PCT/FR 95/00485

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
EP-A-0481732	22-04-92	AT-T-	119035	15-03-95
		AU-B-	644019	02-12-93
		AU-A-	8586491	30-04-92
		CN-A-	1060851	06-05-92
		DE-D-	69107773	06-04-95
		DE-T-	69107773	29-06-95
		ES-T-	2069221	01-05-95
		JP-A-	5112468	07-05-93
		US-A-	5304377	19-04-94
		ZA-A-	9108168	14-04-93
WO-A-9325191	23-12-93	FR-A-	2692147	17-12-93
		EP-A-	0646001	05-04-95
WO-A-9325221	23-12-93	AU-B-	4630893	04-01-94
		CA-A-	2136434	23-12-93
		EP-A-	0644771	29-03-95