(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 325 141**

(51) Int. Cl.:
A61F 2/02 (2006.01)
A61F 13/02 (2006.01)
A61K 9/20 (2006.01)
A61K 9/48 (2006.01)
A61K 9/50 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **99934132 .4**
(96) Fecha de presentación : **16.07.1999**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1098610**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **16.05.2001**

(54) Título: **Composiciones biodegradables para la liberación controlada de sustancias encapsuladas.**

(30) Prioridad: **17.07.1998 US 93243 P**
25.09.1998 US 101855 P
05.03.1999 US 123097 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.08.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.08.2009

(73) Titular/es: **Pacira Pharmaceuticals, Inc.**
10450 Science Center Drive
San Diego, California 92121, US

(72) Inventor/es: **Mantripragada, Sankaram Bhima**

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Composiciones biodegradables para la liberación controlada de sustancias encapsuladas.

Fundamento de la invención

La invención se refiere a un procedimiento para preparar composiciones farmacéuticas biodegradables que contienen lípido/polímero que están destinadas a proporcionar la liberación controlada de sustancias encapsuladas fisiológicamente activas.

Los sistemas de suministro ofrecen la ventaja de una mejor biodisponibilidad y un índice terapéutico más alto durante un periodo de tiempo prolongado para sustancias activas fisiológicamente. Dos de las clases importantes de sistemas de suministro de fármacos están formados por polímeros biodegradables o bien por lípidos (Langer, R., *Nature* 392: 5-10, 1998). Se han desarrollado sistemas de suministro de fármacos basados en polímeros en forma de microesferas para inyección, implantes, parches transdérmicos y aerosoles para inhalación (Domb *et al*., *Handbook of Biodegradable Polymers*, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 1997; Putney *et al*., *Nature Biotechnology* 16: 153-157, 1998; Edwards *et al*., *Science* 276: 1868-1871, 1997). Se han desarrollado sistemas de suministro de fármacos basados en lípidos en forma de liposomas unilamelares, multilamelares (Gregoriadis, *Liposome Technology*, Vols. I, II, III, CRC Press, Boca Raton, FL, 1993) y multivesiculares (patente de EE.UU. nº 5.422.120 de Kim; patente de EE.UU. nº 5.723.147 de Kim *et al*.; patente de EE.UU. nº 5.767.627 de Sankaram *et al*.; solicitud de patente de EE.UU. nº de serie 08/305.158; solicitud de patente de EE.UU. números de serie 08/723.583, 08/925.532, 08/792.566 y 08/925.531).

Una de las limitaciones del uso de polímeros biodegradables es que las composiciones farmacéuticas, tales como las microesferas, preparadas a partir de polímeros biodegradables requieren almacenamiento bajo condiciones anhidras, debido a su susceptibilidad para la hidrólisis. Como consecuencia, un típico envase farmacéutico de microesferas para inyección consiste en un frasco con una formulación anhidra de un polímero biodegradable y una sustancia activa fisiológicamente como forma de dosificación sólida, y otro frasco con un medio acuoso para reconstitución (p. ej., Lupron Depot, *Physicians Desk Reference*, pp. 2739-2746, Medical Economics Company, Inc., Montvale, NJ, 1997). El contenido de los dos frascos se mezcla inmediatamente antes de la inyección.

Las microesferas se preparan por un procedimiento de emulsionamiento simple (patente de EE.UU. nº 4.389.330 de Tice *et al*.; patente de EE.UU. nº 3.691.090 de Kitajima *et al*.), un procedimiento de emulsionamiento doble (Edwards *et al*., *Science* 276: 1868-1871, 1997), un procedimiento de microencapsulación con inversión de fase (Mathiowitz *et al*., *Nature* 386: 410-413, 1997), o un procedimiento de atomización y congelación (Putney and Burke, *Nature Biotechnology* 16: 153-157, 1998). En el procedimiento de emulsionamiento simple, se homogeneizan una fase de disolvente orgánico volátil que contiene un polímero biodegradable, una solución acuosa que contiene necesariamente un emulsionante tal como poli(alcohol vinílico), y una sustancia activa fisiológicamente, para producir una emulsión. El disolvente se evapora y las microesferas endurecidas resultantes se liofilizan.

En el procedimiento de emulsionamiento doble, se homogeneizan una solución acuosa que puede contener una sustancia activa fisiológicamente y una fase de disolvente orgánico volátil que contiene un polímero biodegradable, para formar una emulsión. La emulsión se mezcla con otra solución acuosa que contiene un emulsionante, tal como poli(alcohol vinílico). La evaporación del disolvente y la liofilización producen microesferas.

En el procedimiento de microencapsulación con inversión de fases, se añade el fármaco a una solución diluida de polímero en un disolvente (p. ej. diclorometano), que después se vierte rápidamente en un baño no agitado de otro líquido (p. ej. éter de petróleo) haciendo que se formen espontáneamente nano y microesferas. En el procedimiento de atomización y congelación, la sustancia activa fisiológicamente micronizada sólida se suspende en una fase disolvente que contiene un polímero biodegradable, que después se atomiza usando tratamiento con ultrasonidos o atomización con aire. Esto produce gotículas que después se congelan en nitrógeno líquido. La adición de otro disolvente, en el que son insolubles tanto el polímero como el fármaco, extrae el disolvente de las microesferas.

Las microesferas preparadas por los métodos del procedimiento de emulsionamiento simple o del procedimiento de emulsionamiento doble pueden ser producidas en aerosol (Edwards *et al*., *Science* 276: 1868-1871, 1997). La adición de dipalmitoil fosfatidilcolina a la fase de disolvente hace aumentar el tamaño de partícula, la porosidad y la eficacia de la aerosolización, y hace disminuir la densidad en masa. Sin embargo, la formación de las grandes partículas porosas requiere aún un emulsionante tal como poli(alcohol vinílico). Se han usado estearato de sacarosa, estearato de magnesio, triestearato de aluminio, ésteres grasos de sorbitán y éteres grasos polioxietilenados como estabilizantes de gotículas en un método de evaporación de disolvente para preparar microesferas a partir de polímeros acrílicos (Yuksel *et al*., *J. Microencapsulation* 14: 725-733, 1997). El Poloxamer 188 o el Pluronic F68 han sido usados como agentes tensioactivos no iónico en la emulsión primaria, además del poli(alcohol vinílico) en la segunda fase acuosa, para producir microesferas a partir de poli(lactida) usando un procedimiento de emulsionamiento doble (Nihant *et al*., *Pharm. Res.* 11: 1479-1484, 1994). Los aditivos hidrófilos, 2-hidroxipropil β-ciclodextrina, metil β-ciclodextrina, Pluronic F-127, dimetil éster del ácido L-tartárico, y un aditivo hidrófobo, cera de abejas (que consiste en ésteres de alcoholes monovalentes de cadena larga con cadenas carbonadas con un número par de carbonos, esterificados con ácidos de cadena larga, que tienen también un número par de átomos de carbono) han sido usados para producir películas de doble capa de poli(lactida-glicolida) (Song *et al*., *J. Controlled Rel.* 45: 177-192, 1997).

Procedimientos de doble emulsionamiento para preparar microesferas que comprenden poli(ácido láctico-co-glicólico) y fosfolípido se describen en Evora *et al*. (*J. Control. Release* 51: 143-152, 1998), y en Madiba y Wu (*Proceed. Inter. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 23: 813-814, 1996).

Sumario de la invención

La invención se basa en el descubrimiento de que pueden producirse microesferas biodegradables que incluyen componentes tanto de polímero como de lípido, y que están libres de agentes tensioactivos introducidos en una segunda fase acuosa de las microesferas. Un agente tensioactivo típico que había sido introducido hasta ahora en dicha segunda fase acuosa es el poli(alcohol vinílico). La producción de las microesferas biodegradables de la presente invención implica la eliminación sustancial o completa del disolvente orgánico volátil de las paredes de la microesfera. Las microesferas pueden ser cargadas con sustancias activas fisiológicamente, que se liberan *in vitro* e *in vivo*. La velocidad de liberación puede ser controlada fácilmente mediante ajustes de la relación lípido/polímero. Las composiciones de microesferas disponibles con anterioridad requerían un cambio en la identidad del polímero.

En un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar composiciones biodegradables que contienen lípido/polímero, el cual procedimiento comprende:

a) formar una emulsión de agua en aceite a partir de una primera fase acuosa y una fase de disolvente orgánico volátil, que comprende al menos un disolvente orgánico volátil, al menos un polímero o copolímero biodegradable que es soluble en el disolvente orgánico, y al menos un lípido, en donde la primera fase acuosa no contiene un agente tensioactivo elegido entre el grupo consistente en poli(alcohol vinílico), estearato de sacarosa, estearato de magnesio, triestearato de aluminio, ésteres grasos de sorbitán, éteres grasos polioxietilenados, Poloxamer 188, Pluronic F68, 2-hidroxipropil β-ciclodextrina, metil β-ciclodextrina, Pluronic F-127 o dimetil éster del ácido L-tartárico;

b) dispersar la emulsión de agua en aceite en una segunda fase acuosa libre de agente tensioactivo para formar esférulas de disolvente; y

c) eliminar el disolvente orgánico volátil de las esférulas de disolvente para formar una composición de microesferas suspendidas en la segunda fase acuosa,

en donde cada microesfera tiene múltiples compartimentos internos no concéntricos rodeados por al menos una pared, comprendiendo la pared el lípido/polímero biodegradable.

La composición puede ser una composición farmacéutica, y la primera fase acuosa puede comprender además una sustancia hidrófila activa fisiológicamente.

El procedimiento puede comprender además eliminar el disolvente orgánico de las esférulas de disolvente. La fase de disolvente orgánico volátil puede comprender además al menos un triglicérido.

En ciertas realizaciones, la composición puede ser una composición farmacéutica, y la fase de disolvente orgánico volátil puede comprender una sustancia hidrófoba activa fisiológicamente. En tales realizaciones, el procedimiento puede comprender además eliminar el disolvente orgánico de las esférulas de disolvente.

En otras realizaciones del procedimiento de la presente invención, al menos uno de los tipos de polímero biodegradable puede ser un homopolímero.

Los polímeros biodegradables pueden ser homopolímeros tales como polilactidas, poliglicolidas, poli(p-dioxanonas), policaprolactonas, polihidroxialcanoatos, polipropilenofumaratos, poliortoésteres, ésteres polifosfato, polianhídridos, polifosfacenos, polialquilcianoacrilatos, polipéptidos, o polímeros preparados por ingeniería genética. Al mismo tiempo, los polímeros biodegradables pueden ser copolímeros (al azar o de bloques) tales como poli(lactida-glicolidas), poli(p-dioxanona-lactidas), poli(p-dioxanona-glicolidas), poli(p-dioxanona-lactida-glicolidas), poli(p-dioxanona-caprolactonas), poli(p-dioxanona-carbonatos de alquileno) poli(p-dioxanona-óxidos de alquileno), poli(p-dioxanona-carbonato-glicolidas), poli(p-dioxanona-carbonatos), poli(caprolactona-lactidas), poli(caprolactona-glicolidas), poli(hidroxialcanoatos), poli(propilenofumaratos), poli(ortoésteres), poli(éter-ésteres), poli(éster-amidas), poli(éster-uretanos), poli(ésteres fosfato), polianhídridos, poli(éster-anhídridos), polifosfacenos, polipéptidos y copolímeros preparados por ingeniería genética. Los lípidos de la composiciones farmacéuticas pueden ser lípidos zwitteriónicos, lípidos ácidos, lípidos catiónicos, esteroles o triglicéridos de muchos tipos, incluyendo muchos fosfolípidos.

Las sustancias activas fisiológicamente pueden ser hidrófilas, en cuyo caso las composiciones deseablemente incluyen también un triglicérido, o pueden ser hidrófobas, en cuyo caso la composición puede ser sustancialmente libre de triglicéridos, o puede ser anfipática. Las sustancias activas fisiológicamente pueden ser clasificadas generalmente como agentes antianginosos, antiarrítmicos, antiasmáticos, antibióticos, antidiabéticos, antifúngicos, antihistamínicos, antihipertensores, antiparasitarios, antineoplásicos, antivíricos, glicósidos cardíacos, citocinas tales como eritropoietina, herbicidas, hormonas, inmunomoduladores, anticuerpos monoclonales, neurotransmisores, ácidos nucleicos, proteínas, agentes de radiocontraste, radionucleidos, sedantes, analgésicos, esteroides, tranquilizantes, vacunas, vasopresores, anestésicos, péptidos, y combinaciones de los mismos.

La hormona puede ser insulina o leuprolida.

En realizaciones alternativas del procedimiento de la presente invención, la sustancia activa fisiológicamente puede ser una citocina. La citocina puede ser eritropoietina.

En otras realizaciones, la sustancia activa fisiológicamente puede ser un antibiótico. El antibiótico puede ser amicacina.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar una nueva composición farmacéutica como un sistema de suministro de fármaco con una sustancia activa fisiológicamente encapsulada en la misma, permitiendo la composición la liberación de la sustancia a lo largo de un periodo de tiempo prologado. Otro objetivo es proporcionar un medio para controlar la velocidad de liberación de la sustancia desde la composición. Otro objetivo es proporcionar un medio para almacenar la composición bien sea como forma de dosificación sólida o como forma de dosificación semisólida.

La preparación de microesferas a partir de polímeros biodegradables de acuerdo con la técnica anterior requiere usar poli(alcohol vinílico) en la segunda solución acuosa de un procedimiento de emulsionamiento doble. Cuando en la segunda fase acuosa de un proceso de emulsión doble no se incluye un emulsionante tal como poli(alcohol vinílico), la sustancia activa fisiológicamente no puede ser encapsulada en las microesferas de la técnica anterior. Las composiciones de la presente invención no usan poli(alcohol vinílico) en la segunda solución acuosa. El poli (alcohol vinílico) tampoco se utiliza en ninguna otra solución acuosa para las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Además de poli(alcohol vinílico), las presentes composiciones no incluyen estearato de sacarosa, estearato de magnesio, triestearato de aluminio, ésteres grasos de sorbitán, éteres grasos polioxietilenados, Poloxamer 188, Pluronic F68, 2-hidroxipropil β-ciclodextrina, metil β-ciclodextrina, Pluronic F-127, o dimetil éster de ácido L-tartárico.

Más bien, la fase de disolvente orgánico volátil contiene una mezcla de lípidos y polímero biodegradable. Se obtienen rendimientos más elevados y una mayor carga de sustancia activa fisiológicamente para las composiciones farmacéuticas que contienen lípido/polímero de la presente invención, que para microesferas de polímero de la técnica anterior.

En las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser encapsuladas una diversidad de sustancias activas fisiológicamente. Las sustancias útiles incluyen pequeñas moléculas, péptidos, proteínas y ácidos nucleicos. Diversos polímeros biodegradables con distintas relaciones lactida:glicolida y distintos pesos moleculares pueden ser usados para preparar las composiciones farmacéuticas de la presente invención.

La composición de lípido puede ser variada con el fin de optimizar el rendimiento y la carga de sustancia activa fisiológicamente. Así, no es preciso cambiar la identidad del polímero para afectar a la carga, al rendimiento o a la velocidad de liberación de las sustancias activas fisiológicamente que se han de liberar. Para sustancias hidrófobas activas fisiológicamente, se obtienen unos excelentes rendimientos y carga cuando la composición farmacéutica no contiene un triglicérido. Para las sustancias hidrófilas activas fisiológicamente, el rendimiento y la carga son excelentes cuando la composición farmacéutica contiene un triglicérido.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención proporcionan la liberación de la sustancia activa fisiológicamente en los fluidos fisiológicos *in vitro* a lo largo de un periodo prolongado. Las sustancias encapsuladas fisiológicamente activas son liberadas en el plasma humano con unas características de liberación mantenida bajo dos condiciones de ensayo diferentes. La variación de la relación lípido:polímero en la composición farmacéutica puede controlar la velocidad de liberación de la sustancia activa fisiológicamente. El control de la velocidad de liberación permite asegurarse de que la concentración de sustancia activa fisiológicamente está constantemente dentro del margen terapéutico; esto es, dentro de un intervalo de concentración que es suficientemente alto para ser beneficioso, pero no tan alto como para ser tóxico.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención proporcionan también la liberación de la sustancia activa fisiológicamente *in vivo* durante un periodo prolongado. Las concentraciones en suero de sustancias activas fisiológicamente determinadas en diversos momentos después de la administración en la forma no encapsulada, encapsulación en una composición sólo de lípido, encapsulación en una composición sólo de polímero, y encapsulación en una composición que contiene lípido/polímero de la presente invención, indican que la concentración en el suero de sustancias activas fisiológicamente presentaban el máximo para un tiempo mayor, y era más alta para las composiciones farmacéuticas de la presente invención que las concentraciones observadas para las otras tres composiciones. Alternativamente, las sustancias fisiológicamente activas encapsuladas que inhiben la liberación de componentes endógenos del suero (por ejemplo hormonas, enzimas, proteínas, carbohidratos y similares) muestran una disminución de la concentración en suero del componente inhibido, que era de duración mayor que la observada para sustancias activas fisiológicamente no encapsuladas.

Las composiciones de microesferas preparadas a partir de polímeros biodegradables de acuerdo con la técnica anterior no son adecuadas para el almacenamiento en un medio acuoso, ya que el polímero se degrada rápidamente al exponerlo al agua. Sin embargo, el polímero en las composiciones que contienen lípido/polímero de la presente invención está protegido contra la hidrólisis tanto en estudios de estabilidad acelerados con sobrecarga térmica y ácida, como bajo condiciones de almacenamiento normales.

La expresión “esférula de disolvente”, como se usa a lo largo de la memoria y las reivindicaciones, significa una gotícula esferoidal microscópica de disolvente orgánico, dentro de la cual hay múltiples gotículas más pequeñas de una primera solución acuosa. Las esférulas de disolvente está suspendidas y totalmente sumergidas en una segunda solución acuosa. La expresión “liberable desde microesferas biodegradables” se refiere a la condición de que, al tener lugar una suficiente biodegradación de las microesferas, la sustancia activa fisiológicamente (encapsulada dentro de la microesfera) es capaz de ejercer su efecto fisiológico. Implícita en la definición está la idea de que cuando la sustancia no es liberada, su efecto disminuye hasta el punto de que no es observable ningún efecto fisiológico. Las sustancias activas fisiológicamente pueden ser liberadas no solo desde el interior de una microesfera, sino también desde la pared de la microesfera (matriz). Si la sustancia activa fisiológicamente está fijada o unida a la matriz, no se requiere la separación física de la microesfera y la matriz para la “liberación desde la microesfera biodegradable”. La expresión “efectiva terapéuticamente”, en lo que atañe a las composiciones de esta invención, significa que una sustancia activa fisiológicamente presente en las microesferas es liberada de una manera suficiente para conseguir un nivel particular de tratamiento de un trastorno.

A menos que se indique otra cosa, todos los términos científicos y técnicos usados en el presente texto tienen el mismo significado que entiende comúnmente un profesional con una experiencia normal en la técnica a la que pertenece esta invención.

Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción detallada que sigue, y a partir de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es una representación gráfica del porcentaje de citarabina encapsulada desde varias composiciones farmacéuticas que contienen lípido/polímero preparadas a partir de citarabina en ácido clorhídrico bajo condiciones estáticas frente al tiempo, *in vitro*.

La Fig. 2 es una representación gráfica del porcentaje de citarabina encapsulada desde varias composiciones farmacéuticas que contienen lípido/polímero preparadas a partir de citarabina en agua bajo condiciones estáticas frente al tiempo, *in vitro*.

La Fig. 3 es una representación gráfica del porcentaje de citarabina encapsulada desde varias composiciones farmacéuticas que contienen lípido/polímero preparadas a partir de citarabina en ácido clorhídrico bajo condiciones dinámicas frente al tiempo, *in vitro*.

La Fig. 4 es una representación gráfica del porcentaje de citarabina encapsulada desde varias composiciones farmacéuticas que contienen lípido/polímero preparadas a partir de citarabina en agua bajo condiciones dinámicas frente al tiempo, *in vitro*.

La Fig. 5 es una representación gráfica de las concentraciones en el suero de amicacina en tiempos diferentes, después de la administración oral de amicacina no encapsulada, amicacina encapsulada en una composición farmacéutica sólo de lípido, una composición farmacéutica que contiene lípido/polímero con una relación lípido:polímero de 1:1, o una composición farmacéutica sólo de polímero.

La Fig. 6 es una serie de cromatogramas de exclusión de tamaños de (A) una solución de composición de sólo polímero en cloroformo, (B) composición de sólo polímero suspendida en cloruro sódico, (C) composición de sólo polímero suspendida en ácido clorhídrico, y (D) composición de sólo polímero suspendida en ácido clorhídrico con sobrecarga térmica.

La Fig. 7 es una serie de cromatogramas de exclusión de tamaños de una suspensión de composiciones farmacéuticas que contienen lípido/polímero con relaciones de lípido: polímero de 1:1 en peso (A) almacenadas en cloruro sódico, (B) almacenadas en ácido clorhídrico, (C) almacenadas en ácido clorhídrico y sometidas a sobrecarga térmica.

La Fig. 8 es una serie de cromatogramas de exclusión de tamaños de una suspensión de (A) una composición farmacéutica recién preparada que contiene lípido/polímero con una relación lípido:polímero de 1:1 en peso, y (B) una muestra idéntica almacenada en el refrigerador durante 9 meses.

La Fig. 9 es una representación gráfica del cambio del peso molecular de PLGA en una composición farmacéutica que contiene lípido/polímero composición con una relación de lípido:polímero de 1:1 en peso (Δ) y una composición farmacéutica sólo polímero (O) frente al tiempo.

La Fig. 10 es una representación gráfica del cambio del diámetro medio de partícula con la osmolalidad del medio de suspensión para0 11 microesferas de lípido/polímero de varias composiciones.

La Fig. 11 es una representación gráfica de las concentraciones de testosterona en el suero de distintos tiempos después de la administración subcutánea de A) una solución de leuprolida en preparación 1,9:1 de lípido/polímero, B) leuprolida libre y C) solución salina al 0,9%.

La Fig. 12 es una representación gráfica ampliada de la Fig. 11.

La Fig. 13 es una representación gráfica del aumento del hematocrito a tiempos distintos después de la administración intraperitoneal de 500 UI de eritropoietina en forma de A) preparación 1:1 de lípido/polímero, B) preparación 4:1 de lípido/polímero, C) eritropoietina libre, y D) blanco 1:1 de lípido/polímero.

Descripción detallada

La invención presenta composiciones que contienen lípido/polímero que pueden ser cargadas con sustancias activas fisiológicamente para proporcionar liberación retardada *in vitro* e *in vivo*. Las composiciones farmacéuticas resultantes pueden ser formuladas para dar una gama de velocidades de liberación. Las composiciones farmacéuticas poseen unas excelentes características de rendimiento y de carga para una diversidad de sustancias activas fisiológicamente.

Polímero biodegradable

Las composiciones de la invención que contienen lípido/polímero contienen al menos un tipo de polímero biodegradable. El polímero biodegradable puede ser un homopolímero, o un copolímero al azar o de bloques, o una mezcla o mezcla física de los mismos, con la limitación de que el polímero sea soluble en disolventes orgánicos volátiles. A menos que la actividad óptica de un material particular se señale con [L]- o [D]-, se supone que el material es aquiral o una mezcla racémica. Los compuestos meso (aquellos compuestos con actividad óptica que se cancela internamente) se consideran también como útiles en la presente invención.

Un polímero biodegradable es un polímero que puede ser degradado hasta un peso molecular bajo y puede o no ser eliminado de un organismo vivo. Los productos de la biodegradación pueden ser las unidades de monómero individuales, grupos de unidades de monómero, entidades moleculares más pequeñas que las unidades de monómero individuales, o combinaciones de tales productos. Tales polímeros pueden también ser metabolizados por organismos. Los polímeros biodegradables pueden estar constituidos por unidades de monómero biodegradables. Un compuesto biodegradable es un compuesto que pueden actuarse bioquímicamente por células u organismos vivos, o partes de estos sistemas, o reactivos que se encuentran comúnmente en tales células, organismos o sistemas, incluyendo agua, y pueden romperseen productos de peso molecular más bajo. Un organismo puede desempeñar un papel activo o pasivo en tales procesos.

Las cadenas de polímero biodegradable útiles en la invención tienen preferentemente pesos moleculares en el intervalo de 500 a 5.000.000. Los polímeros biodegradables pueden ser homopolímeros, o copolímeros al azar o de bloques. El copolímero puede ser un copolímero al azar que contiene un número aleatorio de subunidades de un primer copolímero intermezclado con un número aleatorio de subunidades de un segundo copolímero. El copolímero puede también ser un copolímero de bloques que contiene uno o más bloques de un primer copolímero intermezclado con bloques de un segundo copolímero. El copolímero de bloques puede también incluir un bloque de un primer copolímero conectado con un bloque de un segundo copolímero, sin una interdispersión significativa del primero y del segundo copolímeros.

Los homopolímeros biodegradables útiles en la invención pueden estar constituidos por unidades de monómero elegidas entre los grupos siguientes: ácidos hidroxicarboxílicos tales como ácidos α-hidroxicarboxílicos que incluyen ácido láctico, ácido glicólico, lactida (ácido diláctico esterificado intermolecularmente) y glicolida (ácido diglicólico esterificado intermolecularmente); ácidos β-hidroxicarboxílicos que incluyen β-metil-β-propiolactona; ácidos γ-hidroxicarboxílicos, ácidos δ-hidroxicarboxílicos; y ácidos ε-hidroxicarboxílicos que incluyen ácido ε-hidroxicaproico; lactonas tales como: β-lactonas; γ-lactonas; δ-lactonas que incluyen valerolactona; y ε-lactonas tales como ε-caprolactona; lactonas protegidas con bencil éster tales como bencil malolactona; lactamas tales como: β-lactamas; γ-lactamas; δ-lactamas; y ε-lactamas; tiolactonas tales como 1,4-ditiano-2,5-diona; dioxanones; carbonatos cíclicos no funcionalizados tales como: trimetileno carbonato, trimetileno carbonatos sustituidos con alquilo, y espiro-bis-dimetileno carbonato (2,4,7,9-tetraoxa-espiro[5.5]undecan-3,8-diona); anhídridos; anhídridos N-carboxi sustituidos; propileno fumaratos; ortoésteres; ésteres fosfato; fosfacenos; alquilcianoacrilatos; aminoácidos; polihidroxibutiratos; y variaciones sustituidas de los monómeros anteriores.

El uso de tales monómeros tiene por resultado homopolímeros tales como polilactida, poliglicolida, poli(p-dioxanona), policaprolactona, polihidroxialcanoato, polipropilenofumarato, poliortoésteres, ésteres polifosfato, polianhídridos, polifosfacenos, polialquilcianoacrilatos, polipéptidos, o polímeros preparados por ingeniería genética, y otros homopolímeros que pueden ser formados a partir de los ejemplos de monómeros anteriormente mencionados. También pueden usarse combinaciones de estos homopolímeros para preparar las microesferas de las composiciones farmacéuticas de la presente invención.

Los copolímeros biodegradables pueden ser elegidos entre poli(lactida-glicolida), poli(p-dioxanona-lactida), poli(p-dioxanona-glicolida), poli(p-dioxanona-lactida-glicolida), poli(p-dioxanona-caprolactona), poli(p-dioxanona-alquileno carbonato), poli(p-dioxanona-óxido de alquileno), poli(p-dioxanona-carbonato-glicolida), poli(p-dioxanona-carbonato), poli(caprolactona-lactida), poli(caprolactona-glicolida), poli(hidroxialcanoato), poli(propileno fumarato), poli(orto ésteres), poli(éter-éster), poli(éster-amida), poli(éster-uretano), ésteres polifosfato, polianhídridos, poli(éster-anhídrido), polifosfacenos, polipéptidos o polímeros preparados por ingeniería genética. También pueden usarse combinaciones de estos copolímeros para preparar las microesferas de las composiciones farmacéuticas de la presente invención.

Los polímeros biodegradables preferidos son polilactida, y poli(lactida-glicolida). En algunas realizaciones que contienen lactida, el polímero se prepara por polimerización de una composición que incluye lactida en la que más de aproximadamente el 50% en peso de la lactida es ópticamente activa y menos del 50% es óptimamente inactiva, es decir, [D,L]-lactida racémica y meso [D,L]-lactida. En otras realizaciones, la actividad óptica de los monómeros de lactida se define como [L], y los monómeros de lactida son al menos aproximadamente un 90% de [L]-lactida ópticamente activa. En otras realizaciones, los monómeros de lactida son al menos aproximadamente el 95% de [L]-lactida ópticamente activa.

Lípidos

Las composiciones que contienen lípido/polímero incluyen al menos un tipo de lípido. Los lípidos pueden ser de origen natural o sintético e incluyen fosfolípidos, esfingolípidos, esfingofosfolípidos, esteroles y glicéridos. Los lípidos a usar en las composiciones de la invención son generalmente anfipáticos, lo que significa que tienen un grupo hidrófilo de "cabeza" y un grupo hidrófobo de "cola", y pueden tener capacidad de formación de membranas. Los fosfolípidos y los esfingolípidos pueden ser aniónicos, catiónicos, no iónicos, ácidos o zwitteriónicos (que no tienen una carga neta en su punto isoeléctrico), en donde las dos cadenas hidrocarbonadas de los lípidos son típicamente de una longitud entre 12 y 22 átomos de carbono, y tienen diversos grados de insaturación. Los fosfolípidos aniónicos preferidos incluyen ácidos fosfatídicos, fosfatidilserinas, fosfatidilgliceroles, fosfatidilinositoles y cardiolipinas. Los fosfolípidos zwitteriónicos preferidos son las fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas y esfingomielinas. Los lípidos catiónicos preferidos son diacil dimetilammonio propanos, acil trimetilammonio propanos, y estearilamina. Los esteroles preferidos son el colesterol, ergosterol, nanosterol, o ésteres de los mismos. Los glicéridos pueden ser monoglicéridos, diglicéridos o triglicéridos, incluyendo trioleína, y pueden tener diversos grados de insaturación, con la limitación de que las cadenas hidrocarbonadas del ácido graso de los glicéridos son típicamente de una longitud entre 12 y 22 átomos de carbono, y tienen diversos grados de insaturación. También pueden usarse combinaciones de estos lípidos para preparar las microesferas de las composiciones farmacéuticas de la presente invención.

Sustancia activa fisiológicamente

Sustancia activa fisiológicamente significa un compuesto químico o biológico natural, sintético o preparado por ingeniería genética, que es conocido en la técnica por poseer utilidad para modular procesos fisiológicos con el fin de proporcionar el diagnóstico, la profilaxis o el tratamiento de una condición no deseada existente en un ser vivo. Las sustancias activas fisiológicamente incluyen fármacos tales como agentes antianginosos, antiarrítmicos, antiasmáticos, antibióticos, antidiabéticos, antifúngicos, antihistamínicos, antihipertensores, antiparasitarios, antineoplásicos, fármacos antitumorales, antivíricos, glicósidos cardíacos, herbicidas, hormonas, inmunomoduladores, anticuerpos monoclonales, neurotransmisores, ácidos nucleicos, proteínas, agentes de radiocontraste, radionúclidos, sedantes, analgésicos, esteroides, tranquilizantes, vacunas, vasopresores, anestésicos, péptidos, y combinaciones de los mismos.

Son de particular interés los antibióticos semisintéticos de amino glicósido, entre los que se incluye la amicacina; antidiabéticos; péptidos tales como insulina; fármacos antitumorales entre los que se incluye el paclitaxel; antineoplásicos entre los que se incluye la citarabina, el 5-fluorouracilo, la leuprolida y floxuridina; analgésicos de alcaloides opioides entre los que se incluye la morfina y la hidromorfina; anestésicos locales entre los que se incluye la bupivacaína, esteroides adrenocorticoides antiinflamatorios sintéticos entre los que se incluye la dexametasona; antimetabolitos entre los que se incluye el metotrexato; antibióticos de glicopéptido entre los que se incluye la bleomicina; vincaleucoblastinas y agentes oncológicos estatmocinéticos entre los que se incluye la vincristina y la vinblastina; hormonas tales como eritropoietina, proteínas del plasma, citocinas, factores de crecimiento, DNA y RNA de una diversidad de organismos, y oligonucleótidos antisentido. También pueden emplearse en la invención profármacos que experimentan la conversión en las sustancias activas fisiológicamente indicadas al tener lugar interacciones locales con el medio intracelular, las células o los tejidos. Cualquier sal aceptable farmacéuticamente de una sustancia activa fisiológicamente en particular que sea capaz de formar tal sal se considera también como útil en la presente invención, incluyendo sales haluro, sales fosfato, sales acetato y otras sales.

Las sustancias activas fisiológicamente pueden usarse solas o en combinación, con la limitación de que la cantidad de la sustancia en la composición farmacéutica sea suficiente para permitir el diagnóstico, la profilaxis o el tratamiento de una condición no deseable existente en un ser vivo. Generalmente, la dosificación variará con la edad, la condición, el sexo y la magnitud de la condición no deseada en el paciente, y puede ser determinada por un experto en la técnica. El margen de dosificación apropiado para uso humano incluye un intervalo de 0,1 a 6.000 mg de sustancia activa fisiológicamente por metro cuadrado de superficie corporal.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser administradas parenteralmente por inyección o por infusión gradual a lo largo del tiempo. Las composiciones pueden ser administradas por vía intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intracavidad, o transcutánea. Otros métodos de administración serán conocidos por un experto en la técnica. Para algunas aplicaciones tales como la administración subcutánea, la dosis requerida puede ser bastante pequeña, pero para otras aplicaciones tales como la administración intraperitoneal, la dosis requerida puede ser muy grande. Aunque pueden administrarse dosis fuera del intervalo de dosificación indicado anteriormente, este intervalo comprende el margen de uso para prácticamente todas las sustancias activas fisiológicamente. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse también enteralmente.

Procedimiento de emulsionamiento doble

El procedimiento de emulsionamiento doble comprende un proceso en tres etapas que produce una forma de dosificación semisólida de la composición farmacéutica de la presente invención. En primer lugar, se forma una emulsión del tipo de "agua en aceite" a partir de una primera fase acuosa y una fase de disolvente orgánico volátil, en la que la emulsión contiene una sustancia activa fisiológicamente en la primera fase acuosa o bien en la fase de disolvente orgánico volátil, y la fase de disolvente orgánico volátil incluye al menos un tipo de polímero o copolímero biodegradable y al menos un tipo de lípido. Si la sustancia activa fisiológicamente es hidrófila, está presente en la primera fase acuosa, y, si la sustancia activa fisiológicamente es hidrófoba, está presente en la fase de disolvente orgánico volátil. Las sustancias activas fisiológicamente que son anfipáticas pueden estar presentes en la primera fase acuosa o bien en la fase de disolvente orgánico volátil, o en ambas fases.

La emulsión del tipo "agua en aceite" se caracteriza por la presencia de gotículas acuosas aisladas desconectadas, dispersas en una matriz continua formada por la fase de disolvente orgánico volátil. Pueden usarse éteres, hidrocarburos, hidrocarburos halogenados como disolvente orgánico volátil. Los disolventes orgánicos volátiles preferidos son cloroformo, diclorometano, dietil éter, isopropil éter y combinaciones de los mismos. La primera fase acuosa puede contener excipientes tales como espaciadores osmóticos, ácidos, bases, tampones, nutrientes, suplementos o compuestos similares. La emulsión del tipo "agua en aceite" puede ser producida por agitación mecánica tal como mediante energía ultrasónica, atomización en boquilla, mediante el uso de mezcladores estáticos, mezcladores de paletas o mezcladores del tipo vibratorio. Forzando el paso de las fases a través de un tubo poroso para producir partículas de emulsión de tamaño uniforme, se pueden formar también tales emulsiones. Estos métodos tienen por resultado la formación de esférulas de disolvente.

En segundo lugar, las esférulas de disolvente que se forman a partir de la primera emulsión del tipo "agua en aceite" se introducen en una segunda fase acuosa y se mezclan, de forma análoga a la que se describe para la primera etapa. La segunda fase acuosa puede ser agua, o puede contener electrolitos, sales tampón, u otros excipientes bien conocidos en la técnica de las formas de dosificación semi-sólidas, y preferentemente contiene glucosa y lisina.

En la tercera etapa, se elimina el disolvente orgánico volátil, generalmente por evaporación, por ejemplo bajo presión reducida o haciendo pasar una corriente de gas sobre las esférulas, o a través de las mismas. Los gases representativos satisfactorios para ser usados en la evaporación del disolvente incluyen nitrógeno, helio, argón, dióxido de carbono, aire o combinaciones de los mismos. Cuando el disolvente se elimina sustancialmente o completamente, se forma la composición que contiene lípido/polímero con la primera solución acuosa encapsulada en microesferas biodegradables formadas a partir de los componentes de polímero y lípido, con las microesferas suspendidas en la segunda solución acuosa.

Si se desea, la segunda solución acuosa puede ser cambiada por otra solución acuosa por lavado, centrifugación, filtración, o eliminada mediante liofilización para formar una dosificación sólida. La forma de dosificación sólida de la composición farmacéutica obtenida, por ejemplo, por liofilización, puede ser tratada posteriormente para producir comprimidos, cápsulas, obleas, parches, supositorios, suturas, implantes u otras formas de dosificación sólidas conocidas por los expertos en la técnica.

Composición farmacéutica

Las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden al menos un tipo de polímero o copolímero biodegradable, al menos un tipo de lípido y al menos una sustancia activa fisiológicamente. El polímero biodegradable puede tomar la forma de un copolímero al azar o un copolímero de bloques, que pueden estar constituidos por una diversidad de unidades monómeras. Por ejemplo, si el copolímero biodegradable está formado por ácido láctico (o lactida) y ácido glicólico (o glicolida), la relación de lactida a glicolida puede estar en el intervalo de aproximadamente 99:1 a aproximadamente 2:3, preferentemente de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 1:1. El polímero biodegradable (en cualquier forma, homo- o co-polímero) y el lípido pueden estar presentes en una relación de lípido a polímero de aproximadamente 20:1 a aproximadamente 1:5, preferentemente de aproximadamente 19:1 a aproximadamente 1:3.

El polímero o copolímero biodegradable y el lípido forman una estructura multicompartimental que proporciona compartimentos múltiples no-concéntricos para encapsular sustancias hidrófilas activas fisiológicamente; el polímero biodegradable y el lípido que forman los límites de los compartimentos. Los límites pueden contener sustancias hidrófobas o anfipáticas activas fisiológicamente. La composición farmacéutica puede ser almacenada en una forma de dosificación sólida o semisólida. La expresión "forma de dosificación semisólida" significa una suspensión acuosa de la composición farmacéutica. Una forma de dosificación semisólida puede ser formada por la adición de un medio acuoso a una forma de dosificación sólida de la composición farmacéutica, o puede ser formada directamente por las técnicas de emulsión doble descritas anteriormente. Los medios acuosos preferidos son agua, soluciones acuosas de cloruro sódico, excipientes farmacéuticos y soluciones tamponadas con un pH en el intervalo de 2 a 10. Los excipientes farmacéuticos preferidos son fosfato, citrato, acetato, glucuronato, manitol, polisorbato, carboximetilcelulosa, gelatina y lactato.

La expresión "forma de dosificación sólida" incluye polvos amorfos, comprimidos, cápsulas, aerosoles, obleas, parches transdérmicos, supositorios o implantes. Los polvos amorfos pueden ser formados por liofilización de una for-

ma de dosificación semisólida de la composición farmacéutica. Los comprimidos, cápsulas, aerosoles, obleas, parches, supositorios e implantes pueden ser formados por métodos bien conocidas por los expertos en la técnica.

La composición farmacéutica puede ser administrada a un ser vivo por cualquier vía que se desee, por ejemplo intramuscular, intraarticular, epidural, intratecal, intraperitoneal, subcutánea, intravenosa, intralinfática, oral, submucosal, transdérmica, rectal, vaginal, intranasal, intraocular y por implantación bajo diferentes tipos de epitelios, entre los que se incluye el epitelio bronquial, el epitelio gastrointestinal, el epitelio urogenital y varias membranas mucosas del organismo.

Caracterización de la composición farmacéutica

Con el fin de comparar las composiciones farmacéuticas en sus formas de dosificación de suspensión semisólida, se definen los parámetros que siguen. La cantidad de sustancia activa fisiológicamente en la suspensión se determina mediante un ensayo apropiado que se describe más adelante. El rendimiento de la sustancia activa fisiológicamente se define mediante la ecuación que sigue.

$$\text{Rendimiento (\%)} = [\text{Cantidad recuperada (mg)} / \text{Cantidad de entrada (mg)}] \cdot 100$$

En la anterior ecuación, la cantidad recuperada es la cantidad de sustancia activa fisiológicamente que se ha determinado que está en las microesferas biodegradables de la composición farmacéutica, y la cantidad de entrada es la cantidad total de sustancia activa fisiológicamente usada en la preparación de la composición farmacéutica.

La suspensión se centrifuga en tubos capilares de hematocrito para producir una fracción de sedimento y una fracción sobrenadante. Usando la técnica estándar de medida del hematocrito, los volúmenes relativos del sedimento y de la suspensión vienen dados por la distancia desde el fondo del sedimento a la parte superior del sedimento, y desde el fondo del sedimento hasta la parte superior del sobrenadante, respectivamente. La relación del volumen relativo del sedimento y el volumen relativo de la suspensión se define como la fracción de sedimento y viene dada por la ecuación siguiente.

$$\text{Fracción de sedimento} = (\text{Volumen del sedimento}) / (\text{Volumen de la suspensión})$$

La fracción no encapsulada se define como la fracción de sustancia activa fisiológicamente en la composición farmacéutica, que no está encapsulada y se encuentra fuera de las microesferas biodegradables en el medio de suspensión, y viene dada por la ecuación siguiente.

$$\text{Fracción no encapsulada} = [\text{Cantidad en el sobrenadante (mg)}] / [\text{cantidad en la suspensión (mg)}]$$

La fracción encapsulada es uno menos la fracción no encapsulada. La carga se define como la concentración de la sustancia activa fisiológicamente en la fracción de sedimento de la suspensión, y viene dada por la ecuación siguiente.

$$\text{Carga (mg/mL)} = [(\text{Fracción encapsulada}) / (\text{Fracción de sedimento})] \cdot \text{Concentración en la suspensión (mg/mL)}$$

La invención se describirá con más detalle en los ejemplos que siguen, que no limitan el alcance de la invención descrito en las reivindicaciones.

Ejemplos

Los ejemplos que siguen ilustran la preparación y las propiedades de las composiciones farmacéuticas biodegradables que contienen lípido/polímero de la presente invención.

Ejemplo 1

Preparación de la composición farmacéutica

Las composiciones farmacéuticas indicadas en la Tabla 1 se prepararon por el procedimiento de emulsionamiento doble. La fase acuosa contenía amicacina (Bristol-Myers Squibb, Syracuse, NY) a las concentraciones que se indican en la Tabla 1, y un pH de 8. Adicionalmente, para formulaciones comparativas, la fase acuosa contenía 4% de poli (alcohol vinílico) (Sigma Chemical Co.) como se indica en la Tabla 1.

La fase de disolvente contenía el polímero poli(DL-lactida-glicolida) (PLGA) sólo, a una concentración de 250 mg/mL para fines comparativos, o bien una mezcla de PLGA, dioleoil fosfatidilcolina (DOPC), dipalmitoil fosfatidilglicerol (DPPG), colesterol y trioleína a concentraciones de 22,4 mg/mL, 10,4 mg/mL, 2,1 mg/mL, 7,7 mg/mL, y 2,2 mg/mL, respectivamente. La PLGA era de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO), con una relación lacti-

da:glicolida de 50:50 y un peso molecular de 40.000-75.000. Este material (con una relación lactida:glicolida 1:1) fue usado en todos los experimentos, excepto en los casos en que se indica otra cosa (en el Ejemplo 4). La DOPC, el DPPG y la trioleína eran de Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL), y el colesterol era de Spectrum Chemical Manufacturing Corp. (Gardena, CA). Esto corresponde a una fase de disolvente con polímero sólo, o bien con lípidos y polímero en una relación 1:1 en peso. Las relaciones del volumen de la fase acuosa al volumen de la fase de disolvente orgánico volátil se dan en la Tabla 1. La emulsión de agua en aceite se preparó agitando en un mezclador Homo Mixer (Tokushu Kika Kogyo Co., Ltd., Osaka, Japón) a una velocidad de 9.600 rpm durante 20 min. La segunda fase acuosa era o bien un 4% en peso de poli(alcohol vinílico) (PVA) para formulaciones comparativas, agua, o una mezcla de 5% en peso de glucosa y lisina 40 mM. Las esférulas se formaron agitando a 4.000 rpm durante 1 min. El medio de suspensión se cambió por cloruro sódico al 0,9% en peso lavando y centrifugando a 600 × g dos veces.

La concentración de amicacina en la composición farmacéutica, y el sobrenadante de la composición farmacéutica fueron determinados mediante electroforesis capilar (3D CE modelo 1600, Hewlett-Packard, Irvine, CA) usando una columna de sílice fundida (50 μm de diámetro interior, 50 cm de longitud, Hewlett-Packard, Irvine, CA), y fosfato 0,1 M, pH 2,5 (tampón de separación de péptidos, Sigma Chemical Co.) como tampón de desarrollo. El rendimiento de sustancia activa fisiológicamente y la carga de fármaco se resumen en la Tabla 1.

El diámetro medio de partícula se determinó en un analizador de distribución de tamaños de partículas de dispersión de láser (Modelo LA-910, Horiba Instruments, Irvine, CA) usando la base de distribución ponderada a la longitud y un índice de refracción relativo de 1,18-1,00i. Los diámetros medios de partícula fueron 43,6 μm para la composición farmacéutica de polímero preparada con 4% en peso de poli(alcohol vinílico) (formulación comparativa) en la segunda fase acuosa, y 9,0 μm para la composición farmacéutica que contiene lípido/polímero de la presente invención en la Tabla 1 con una relación de lípido:polímero de 1:1.

TABLA 1

Características de composiciones farmacéuticas de sólo polímero y de composiciones que contienen lípido/polímero

Fase acuosa		Fase de disolvente		Rel. en volumen de fase acuosa: disolvente (mL/mL)	Segunda fase acuosa	Rendimiento (%)	Carga (g/mL)
Amicacina, mg/mL	Excipientes	Polímero	Lípidos				
320	Ninguno	PLGA	Ninguno	5:0.5	4 wt % PVA	31	20,8
320	Ninguno	PLGA	Ninguno	5:0.5	H_2O	0	0
320	Ninguno	PLGA	Ninguno	5:0.5	5 % Glucosa, 40 mM Lisina	0	0
80	4% PVA	PLGA	Ninguno	5:5	H_2O	0	0
80	4% PVA	PLGA	Ninguno	5:5	5% Glucosa, 40 mM Lisina	0	0
80	Ninguno	PLGA	DOPC, DPPG, colesterol, trioleína	5:5	5% Glucosa, Lisina 40 mM	64	65,9

Los resultados de la Tabla 1 indican que es precisa la adición de un emulsionante tal como el poli(alcohol vinílico) para la preparación de microesferas de sólo polímero que contienen sustancias activas fisiológicamente. También muestran que la adición del emulsionante a la segunda fase acuosa es un requisito indispensable para la encapsulación de sustancias activas fisiológicamente para microesferas de sólo polímero. La composición farmacéutica de la presente invención (última entrada de la Tabla 1) no utiliza tal emulsionante, en ninguna de las fases acuosas. En vez de ello, la encapsulación se logra mediante la adición de lípidos a la fase de disolvente orgánico volátil. Por consiguiente, las composiciones farmacéuticas que contienen lípido/polímero de la presente invención son bastante diferentes de las de la técnica anterior.

Adicionalmente, la Tabla 1 demuestra la elevada carga que se logra con las composiciones farmacéuticas de la presente invención, incluso considerando una concentración cuatro veces más baja de composición activa farmacéuticamente en la primera fase acuosa.

Ejemplo 2

Preparación de composiciones farmacéuticas que contienen sustancias activas fisiológicamente

Las composiciones farmacéuticas se prepararon empleando un procedimiento de emulsionamiento doble. La emulsión del tipo "agua en aceite" se preparó a partir de 5 mL de una fase acuosa que contiene la sustancia activa fisiológicamente y excipientes cuyas concentraciones se especifican en la Tabla 2, y 5 mL de una fase de disolvente orgánico volátil, que contiene lípidos y polímero en una relación de 1:1, y se preparó como se describe en el Ejemplo 1. Las sustancias activas fisiológicamente eran citarabina (Pfanstiehl, Waukegan, IL), insulina zinc bovina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), DNA de esperma de arenque (Gibco BRL, Gaithersburg, MD), o fosfato de dexametasona (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). La velocidad de mezclado y el tiempo para producir la emulsión del tipo "agua en aceite" fueron 9.600 rpm durante 20 min. La segunda fase acuosa era 30 mL de una solución que contiene 5% de glucosa y lisina 40 mM. Las esférulas se formaron agitando a 4.000 rpm durante 1 min. El medio de suspensión se cambió por 0,9% en peso de cloruro sódico lavando y centrifugando a 600 × g dos veces.

La concentración de citarabina en la composición farmacéutica, y el sobrenadante de la composición farmacéutica fueron determinados mediante HPLC isocrática de fase inversa (Hewlett-Packard, Wilmington, DE) usando una columna C18 (Vydac, Hespena, CA), fosfato potásico 10 mM, pH 2,8 (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) como fase móvil, una velocidad de flujo de 1 mL/min y 280 nm para la longitud de onda de detección.

La concentración de insulina en la composición farmacéutica, y el sobrenadante de la composición farmacéutica fueron determinados mediante HPLC isocrática de fase inversa usando una columna C18, una solución de 50% en volumen de acetonitrilo (Burdick and Jackson), 50% de agua y 0,1% de ácido trifluoroacético (Pierce, Rockford, IL) como fase móvil, una velocidad de flujo de 1 mL/min y 280 nm para la longitud de onda de detección.

La concentración de DNA de esperma de arenque en la composición farmacéutica, y el sobrenadante de la composición farmacéutica fueron determinados midiendo la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro (Modelo U-2000, Hitachi, Danbury, CT) de la composición farmacéutica disuelta en isopropanol ácido, relativa a la de una solución estándar de DNA de esperma de arenque de concentración conocida.

La concentración de dexametasona en la composición farmacéutica, y el sobrenadante de la composición farmacéutica fueron determinados mediante HPLC isocrática de fase inversa usando una columna C18 (5 μm, 4,6 × 250 mm, Vydac), una mezcla de 60% en volumen de metanol y 40% de fosfato potásico 50 mM, pH 2,8 como fase móvil, una velocidad de flujo de 0,5 mL/min y 254 nm para la longitud de onda de detección.

El rendimiento de la sustancia activa fisiológicamente, la carga de fármaco y el diámetro medio de partícula se resumen en la Tabla 2.

TABLA 2

Características de composiciones farmacéuticas que contienen compuestos activos fisiológicamente

Fase acuosa			Rendimiento (%)	Diámetro medio de partícula (μm)	Carga de fármaco (mg/mL)
Sustancia activa fisiológicamente	Concentración (mg/mL)	Excipientes			
Citarabina	30	HCl 136 mM	70	17	25,0
Citarabina	75	Ninguno	62	14	59.6
Insulina	20	Dextrosa 5%, HCl 50 mM	38	13	10,7
DNA de esperma de arenque	1	Ninguno	45	14	0,16
Fosfato de dexametasona	15	Ninguno	14	7	13,4

Ejemplo 3

Preparación de composiciones farmacéuticas con distintas relaciones lípido:polímero

Las composiciones farmacéuticas se prepararon como se describe en el Ejemplo 2, con las siguientes modificaciones. La fase acuosa contenía 30 mg/mL de citarabina y ácido clorhídrico 136 mM, o bien 20 mg/mL de insulina zinc bovina, 5% de dextrosa y ácido clorhídrico 50 mM. A serie de fases de disolvente orgánico volátil con relaciones de

lípido:polímero de 1:0, 19:1, 4:1, 3:2, 1:1 ó 1:3 se prepararon mezclando en proporciones variables una solución en cloroformo que contiene dioleil fosfatidilcolina, colesterol, dipalmitoil fosfatidilglicerol y trioleína a concentraciones de 20,8 mg/mL, 15,4 mg/mL, 4,2 mg/mL y 4,4 mg/mL, respectivamente, con una solución en cloroformo del polímero a una concentración de 44,8 mg/mL. En la Tabla 3, la primera solución acuosa era una mezcla de 30 mg/mL de citarabina y ácido clorhídrico 136 mM. En la Tabla 4, la primera solución acuosa era una mezcla de 20 mg/mL de insulina, ácido clorhídrico 50 mM y 5% en peso de dextrosa. Las concentraciones de citarabina e insulina fueron determinadas mediante ensayos como se describe en el Ejemplo 2.

Los valores del rendimiento, diámetro medio de partícula y carga de fármaco para las composiciones farmacéuticas que contienen citarabina se dan en la Tabla 3, y las características para las composiciones farmacéuticas que contienen insulina están en la Tabla 4.

TABLA 3

Características de composiciones farmacéuticas que contienen citarabina con distintas relaciones lípido-polímero

Lípido:polímero	Rendimiento (%)	Diámetro medio de partícula, µm	Carga de fármaco (mg/mL)
1:0	56	15	43,5
19:1	58	13	34,6
4:1	78	11	35,5
3:2	80	14	34,1
1:3	31	15	21,7

TABLA 4

Características de composiciones farmacéuticas que contienen insulina con distintas relaciones lípido-polímero

Lípido:polímero	Rendimiento (%)	Diámetro medio de partícula, µm	Carga de fármaco (mg/mL)
1:0	68	17	29,4
4:1	100	16	22,5
3:2	83	14	21,8
1:1	38	13	10,7

Como demuestran los resultados de las Tablas 3 y 4, generalmente se logran altos rendimientos de sustancias activas fisiológicamente mediante el uso de las composiciones que contienen lípido/polímero de la presente invención. Los diámetros medios de partícula están típicamente entre 5 y 25 μm, y normalmente están entre 10 y 20 μm.

Ejemplo 4

Preparación de composiciones farmacéuticas con distintas relaciones lípido:polímero y con polímeros de distinto peso molecular y distintas relaciones lactida:glicolida

Las composiciones farmacéuticas se prepararon empleando un procedimiento de emulsionamiento doble. La emulsión del tipo de "agua en aceite" se preparó a partir de una fase acuosa que contiene sustancia activa fisiológicamente, citarabina, a una concentración de 30 mg/mL en ácido clorhídrico 136 mM, y una fase de disolvente orgánico volátil que contiene dioleil fosfatidilcolina, colesterol, dipalmitoil fosfatidilglicerol, trioleína y un polímero de poli(lactida-glicolida) (Alkermes, Inc., Blue Ash, OH), como se presentó en el Ejemplo 3. Los rendimientos de la sustancia activa fisiológicamente, los valores del diámetro medio de partícula y la carga de fármaco para la composición farmacéutica con polímeros de distintas relaciones lactida:glicolida y diversas relaciones lípido:polímero se resumen en las Tablas 5, 6 y 7, respectivamente.

TABLA 5

Rendimiento de sustancia activa fisiológicamente obtenido con distintos pesos moleculares y relaciones lactida:glicolida

Relación lactida:glicolida	Peso molecular del polímero	Rendimiento (%) a diferentes relaciones lípido:polímero			
		4:1	3:2	1:1	0:1
100:0	128.450	50	54	56	0
85:15	149.000	55	56	51	0
75:25	130.132	43	58	60	0
65:35	141.000	49	50	55	2
50:50	69.587	51	63	54	2

TABLA 6

Diámetro medio de partícula de composiciones farmacéuticas obtenidas con distintos pesos moleculares y relaciones lactida:glicolida

Relación lactida:glicolida	Peso molecular del polímero	Diámetro medio de partícula (µm) a diferentes relaciones lípido:polímero			
		4:1	3:2	1:1	0:1
100:0	128.450	12	11	11	ND
85:15	149.000	12	11	11	4
75:25	130.132	15	11	11	ND
65:35	141.000	12	10	10	77
50:50	69.587	11	10	11	5

TABLA 7

Carga de sustancia activa fisiológicamente en composiciones farmacéuticas obtenidas con distintos pesos moleculares y relaciones lactida:glicolida

Relación lactida:glicolida	Peso molecular del polímero	Carga en la composición farmacéutica a diferentes relaciones lípido:polímero			
		4:1	3:2	1:1	0:1
100:0	128.450	44,9	43,0	38,6	0
85:15	149.000	46,9	47,0	40,0	0
75:25	130.132	45,2	46,7	32,8	0
65:35	141.000	46,2	41,0	34,7	4,5
50:50	69.587	42,0	45,5	38,7	7,7

Los resultados expuestos en las Tablas 5, 6 y 7 demuestran que las composiciones farmacéuticas de la invención muestran generalmente elevados rendimientos y carga uniforme de sustancia activa fisiológicamente al margen de la relación lactida:glicolida, el peso molecular del polímero biodegradable o la relación lípido:polímero, siempre y cuando algo de lípido esté presente en las composiciones. Las composiciones farmacéuticas de la invención tienen diámetros medios de partícula notablemente similares, cayendo generalmente todos ellos entre 5 y 25 μm, y normalmente entre 10 y 20 μm.

Ejemplo 5

Composición farmacéutica que contiene una sustancia hidrófoba activa fisiológicamente con y sin triglicérido

Dos composiciones farmacéuticas, una con triglicérido y otra sin triglicérido, se prepararon de la forma que se describe de un modo general en el Ejemplo 2, con las siguientes modificaciones. La sustancia hidrófoba activa fisiológicamente era paclitaxel. Para la composición con triglicérido, la solución en cloroformo contenía poli(lactida-glicolida), DOPC, DPPG, colesterol y trioleína (el triglicérido) a las concentraciones que se dan en el Ejemplo 2, y paclitaxel (ICN Biochemicals, Aurora, OH) a una concentración de 5 mg/mL. Para la composición sin triglicérido, la solución de cloroformo contenía poli(lactida-glicolida), DOPC, DPPG y colesterol a las concentraciones que se dan en el Ejemplo 2 y paclitaxel a una concentración de 5 mg/mL. Para las dos composiciones, la relación lípido:polímero fue 1:1. Para las dos composiciones, se usaron 5 mL de una solución acuosa que contiene 10% en peso de sacarosa (Pfanstiehl, Waukegan, IL) para preparar una emulsión de tipo de "agua en aceite".

La concentración de paclitaxel en las composiciones farmacéuticas se determinó mediante HPLC de fase inversa con una columna C18 (5 μm, 4,6 × 250 mm, 90 A, Vydac), un gradiente de agua (Mallinckrodt, Paris, KY): acetonitrilo con una velocidad de flujo de 1 mL/min y usando 273 nm como longitud de onda de detección. Los resultados de rendimiento, tamaño de partícula y carga de fármaco para las dos composiciones se muestran en la Tabla 8.

TABLA 8

Características de composiciones farmacéuticas que contienen Paclitaxel en presencia y en ausencia de triglicérido

Composición	Rendimiento (%)	Diámetro medio de partícula (µm)	Carga de fármaco (mg/mL)
Con triglicérido	52	16	4,0
Sin triglicérido	53	16	12,1

Este ejemplo indica que se obtiene una carga de sustancias hidrófobas activas fisiológicamente significativamente más alta cuando se omite el triglicérido de la composición.

Ejemplo 6

Composición farmacéutica que contiene una sustancia hidrófila activa fisiológicamente con y sin triglicérido

Dos composiciones farmacéuticas, una con triglicérido y otra sin triglicérido, se prepararon de la forma que se describe de un modo general en el Ejemplo 2 con las modificaciones siguientes. La sustancia hidrófila activa fisiológicamente era amicacina. Para la composición con triglicérido, la solución en cloroformo contenía poli(lactida-glicolida), DOPC, DPPG, colesterol y trioleína (el triglicérido) a las concentraciones que se dan en el Ejemplo 2. Para la composición sin triglicérido, la solución en cloroformo contenía poli(lactida-glicolida), DOPC, DPPG y colesterol a las concentraciones que se dan en el Ejemplo 2. Para las dos composiciones, la relación lípido:polímero fue 1:1. Para las dos composiciones, se usaron 5 mL de una solución acuosa que contiene 80 mg/mL de amicacina, pH 8, para preparar la emulsión de agua en aceite. Los resultados del rendimiento, tamaño de partícula y carga de fármaco para las dos composiciones se muestran en la Tabla 9.

TABLA 9

Características de composiciones farmacéuticas que contienen amicacina en presencia y en ausencia de triglicérido

Composición	Rendimiento (%)	Diámetro medio de partícula (µm)	Carga de fármaco (mg/mL)
Con triglicérido	64	9	65,9
Sin triglicérido	0	4	0

Este ejemplo indica que la carga de sustancias hidrófilas activas fisiológicamente no tiene lugar cuando se excluye un triglicérido de la composición. En cambio, tiene lugar una carga significativa de sustancias hidrófilas activas fisiológicamente con el triglicérido presente en la composición.

Ejemplo 7

Liberación retardada in vitro de sustancias encapsuladas activas fisiológicamente a partir de una composición farmacéutica

Se realizaron estudios de liberación *in vitro* en plasma humano bajo condiciones estáticas y dinámicas. Se prepararon dos conjuntos de composiciones farmacéuticas para los estudios de liberación *in vitro* como se describe en el Ejemplo 2 con las modificaciones que siguen. Un conjunto se preparó a partir de una fase acuosa que contiene 30 mg/mL de citarabina en ácido clorhídrico 136 mM. Otro conjunto se preparó a partir de una fase acuosa que contiene 75 mg/mL de citarabina en agua. Por cada conjunto se prepararon tres composiciones como se describe en el Ejemplo 3 con relaciones de lípido:polímero de 4:1, 3:2 y 1:1. Para las seis composiciones farmacéuticas, la concentración de citarabina se ajustó en 10 mg/mL. La composición farmacéutica (1 mL) se mezcló con plasma humano tipo O (24 mL) (NABI Biomedical, Scottsdale, AZ) y 1% en peso de azida sódica (150 μL) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO).

Para los estudios de liberación *in vitro* bajo condiciones estáticas, partes alícuotas de 1,5 mL por triplicado se pusieron en frascos que se incubaron a 37ºC durante distintos periodos de tiempo que se extienden hasta 14 días. Para los estudios de liberación *in vitro* bajo condiciones dinámicas, los frascos se pusieron en un aparato rotatorio (Hematology/Chemistry Mixer, Modelo 346, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) que gira continuamente a 16 rpm. La plataforma se puso en un incubador a 37ºC durante distintos periodos de tiempo que se extienden hasta los 14 días.

Para cada tiempo estudiado, se añadieron 10 μL de cloruro sódico al 0,9% a una parte alícuota, y la suspensión resultante se centrifugó durante 10 min a 600 × g. Los sobrenadantes se desecharon y los sedimentos se solubilizaron en una solución de acetonitrilo: alcohol isopropílico: ácido clorhídrico 1N 12:3:1. La cantidad de sustancia activa fisiológicamente en el sedimento solubilizado se determinó como se describe en el ensayo de la citarabina (véase el Ejemplo 2). El porcentaje de fármaco encapsulado en las Figs. 1, 2, 3 y 4 se define mediante la siguiente ecuación.

Fármaco encapsulado (%) = {[Cantidad en el sedimento (mg)] / [Cantidad en el sedimento a tiempo cero (mg)]} · 100

Los perfiles de liberación *in vitro* en el plasma para las composiciones farmacéuticas que contienen lípido/polímero de relaciones lípido:polímero 4:1, 3:2 y 1:1 con 30 mg/mL de citarabina en ácido clorhídrico 136 mM, bajo condiciones estáticas para el ensayo de liberación *in vitro* se muestran en la Fig. 1. Los correspondientes perfiles de liberación para las composiciones farmacéuticas 4:1, 3:2 y 1:1 que contienen lípido/polímero que contienen 75 mg/mL de citarabina en agua obtenidas bajo condiciones estáticas se muestran en la Fig. 2. Los perfiles de liberación para las composiciones farmacéuticas que contienen lípido/polímero, medidos bajo condiciones dinámicas se muestran en las Figs. 3 (30 mg/mL de citarabina en ácido clorhídrico136 mM) y 4 (75 mg/mL de citarabina en agua).

Estos datos indican que se obtiene liberación retardada de la sustancia encapsulada activa fisiológicamente en el medio fisiológico para las dos composiciones bajo diferentes condiciones de ensayo. También indican que la liberación retardada puede ser controlada variando la relación lípido:polímero.

Ejemplo 8

Liberación retardada in vivo de sustancia encapsulada activa fisiológicamente desde la composición farmacéutica después de una administración oral individual

Se prepararon una composición farmacéutica sólo de lípido y una composición farmacéutica que contiene lípido/polímero con una relación lípido:polímero de 1:1, como en el Ejemplo 1 con las modificaciones que siguen. La solución acuosa contenía 80 mg/mL de amicacina, pH 8. Para preparar la composición farmacéutica que contiene lípido/polímero con una relación de lípido a polímero de 1:1 en peso, la solución en cloroformo era como se describe en el Ejemplo 2. Para la composición farmacéutica sólo de lípido, la solución en cloroformo contenía DOPC, DPPG, colesterol y trioleína en las concentraciones especificadas en el Ejemplo 2, sin el polímero. Los diámetros medios de partícula para las composiciones de polímero solo y las composiciones farmacéuticas que contienen lípido/polímero 1:1 con una relación en peso de lípido a polímero de 1:1 fueron 8,4 y 7,8 μm, respectivamente.

Para la preparación de la composición farmacéutica sólo polímero, se usaron 5 mL de una solución en cloroformo que contiene poli(lactida-glicolida) a una concentración de 250 mg/mL, y 0,5 mL de una solución acuosa que contiene 320 mg/mL de amicacina, pH 8. La segunda emulsión se formó mediante la adición de 20 mL de una solución al 4% de poli(alcohol vinílico), y agitando a 4000 rpm durante 1 minuto. El contenido del recipiente de mezclado se vertió en un matraz Erlenmeyer de 1 litro contiene 30 mL de poli(alcohol vinílico) al 4%. Una corriente de nitrógeno gas ajustada a 3,5 at durante 20 minutos a 37ºC se hizo circular por el matraz para evaporar el cloroformo. El diámetro medio de partícula para la composición farmacéutica de polímero fue 42,1 μm.

Las composiciones farmacéuticas sólo lípido, lípido/polímero 1:1 y sólo polímero con amicacina encapsulada en las mismas, o amicacina no encapsulada en forma de solución a pH 8, se administraron oralmente de forma forzada a ratas albinas machos Harlan Sprague Dawley de 300 g. El número de animales por grupo era de seis. La dosis fue de 20 mg por rata y el volumen fue 2 mL. El suero se recogió mediante punción venosa (en la vena safena) a partir de

animales no anestesiados, a los 15, 45, 90 min, 3, 8, 24, y 48 horas. Los especímenes se mantuvieron a -40ºC hasta su análisis.

La concentración de amicacina en el suero se determinó usando un inmunoensayo competitivo de concentración de partículas de fluorescencia. Las esferas de poliestireno (Idexx Research Product Division, Memphis, TN) fueron primero recubiertas con anticuerpos anti-amicacina (The Binding Site, San Diego, CA). Las esferas se incubaron con una combinación de amicacina marcada fluorescentemente (The Binding Site) y suero que contiene amicacina que compite por los sitios del anticuerpo anti-amicacina en las esferas. La cantidad de amicacina marcada con fluorescencia unida a las esferas se midió mediante un analizador de concentración de fluorescencia (Idexx Research Product Division), cantidad que es inversamente proporcional a la concentración de amicacina en el suero.

La concentración de amicacina (μg/mL) en el suero a distintos valores del tiempo tras la administración oral para los cuatro grupos de tratamiento se muestra en la Fig. 5. Como se ve en esta figura, los picos de los niveles circulatorios se alcanzaron a los 45 minutes para la amicacina no encapsulada, la composición farmacéutica de lípido y la de polímero, mientras que para la composición farmacéutica que contiene lípido/polímero 1:1, el pico o nivel máximo se prolongó a los 90 minutos. Este resultado demuestra que el uso de la composición farmacéutica que contiene lípido/polímero tiene por resultado una duración más larga de la liberación para la sustancia encapsulada activa fisiológicamente. Además, la concentración de amicacina en circulación alcanzó niveles pico de 1,82 ± 0,73, 1,25 ± 0,32 y 0,87 ± 0,13 μg/mL para las composiciones farmacéuticas de amicacina no encapsulada y de lípido y de polímero respectivamente, mientras que para la composición farmacéutica que contiene lípido/polímero 1:1, se obtuvo un nivel pico mucho mayor, de 2,77 ± 0,39 μg/mL. Este resultado indica que la biodisponibilidad de la sustancia activa fisiológicamente se mejora mediante el uso de la composición farmacéutica que contiene lípido/polímero.

Ejemplo 9

Estabilidad de los polímeros al almacenamiento en medio acuoso

El efecto de la exposición a un medio acuoso, acelerado por el calor y el medio ácido, sobre el peso molecular del polímero, poli(lactida-glicolida), sólo o cuando está presente en la composición que contiene lípido/polímero, se determinó mediante cromatografía de exclusión de tamaños. Una composición farmacéutica que contiene lípido/polímero con una relación lípido:polímero de 1:1 en peso y citarabina como sustancia activa fisiológicamente se preparó como se describe en Ejemplo 3. La fracción de sedimento se ajustó para que fuese 0,2. El medio de suspensión era cloruro sódico al 0,9%.

El peso molecular medio del polímero se determinó mediante cromatografía de exclusión de tamaños usando un detector de dispersión de luz evaporativo (Richard Scientific, Laurel, MD), dos columnas de filtración en gel acopladas en serie (Phenogel 10^3 y 10^4 A, 7,8 × 300 mm, Phenomenex, Torrance, CA) y cloroformo como fase móvil, a una velocidad de flujo de 1 mL/min. La curva de calibración se obtuvo usando soluciones en cloroformo de 1 mg/mL de patrones de poliestireno de peso molecular 12600, 20800, 37400, 53500, 79000 y 95050 (American Polymer Standards Corporation, Mentor, OH). El peso molecular medio se calculó siguiendo procedimientos estándar: Método de ensayo estándar para medias de peso molecular y distribución de pesos moleculares mediante cromatografía líquida de exclusión (cromatografía de permeación en GEL - GPC) (American Society for Testing and Materials, D 3536-91, pág. 352-362, 1992; método de ensayo estándar para valores medios de peso molecular y distribución de pesos moleculares de poliestireno mediante cromatografía de exclusión de tamaños de alto rendimiento, American Society for Testing and Materials, D 5296-92, pág. 1-14, 1992).

Para la composición testigo de sólo polímero, se preparó una solución de 2 mg/mL de poli(lactida-glicolida) en cloroformo. Se prepararon muestras para la determinación del efecto de la exposición a un medio acuoso, y para estudios de sobrecarga ácida y térmica de la forma que sigue. Una solución de 1 mg/mL del polímero se secó en un desecador bajo vacío con el fin de formar un residuo seco en un frasco de vidrio. Se añadió solución salina normal (750 μL de cloruro sódico al 0,9%) al frasco de vidrio. Esta muestra se usó para determinar el efecto de la exposición a un medio acuoso sobre la estabilidad de polímero. Para determinar el efecto del ácido, se dispersó en un frasco de vidrio 1 mg del residuo seco del polímero formado, en 750 μL de ácido clorhídrico 1 N y se incubó durante 1 hora. Para determinar el efecto del ácido y del calor, se dispersó en 750 μL de ácido clorhídrico 1 N, en un frasco de vidrio, 1 mg del residuo seco formado, y se puso en un baño de agua hirviendo durante 1 hora. Una vez incubadas las muestras como se describió anteriormente, el polímero se extrajo añadiendo 750 μL de cloroformo. La capa de cloroformo se secó en un desecador bajo vacío. El residuo seco se recogió en cloroformo para dar una concentración de 2 mg/mL para cromatografía de exclusión de tamaños. Los cromatogramas de exclusión de tamaños de una solución del polímero en cloroformo (curva A), el polímero suspendido en solución salina (curva B), la suspensión del polímero suspendido en ácido clorhídrico 1 N (curva C), y la suspensión del polímero en ácido clorhídrico 1 N con sobrecarga adicional por calor (curva D) se muestran en la Fig. 6. Como se ve en la Fig. 6, el tiempo de retención del polímero aumenta al añadir solución salina, o cuando el polímero es sometido al calor o a un medio ácido, lo que indica una degradación del polímero en fragmentos de menor peso molecular.

Con el fin de determinar la degradación del polímero cuando está presente en las composiciones que contienen lípido/polímero de la presente invención, bajo condiciones de sobrecarga ácida y térmica, se centrifugaron a 600 × g 10 mL de una composición farmacéutica que contiene lípido/polímero con una relación de lípido a polímero de

1:1 en peso que contiene citarabina, preparada como se describe en el Ejemplo 2, con una fracción de sedimento de 0,2, suspendida en cloruro sódico al 0,9%. Para determinar el efecto del ácido, la mayor parte del sobrenadante (7,5 mL) se desechó y se reemplazó con 7,5 mL de ácido clorhídrico 1 N, y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Para determinar el efecto del ácido y el calor, la suspensión en ácido clorhídrico 1 N se calentó en un baño de agua hirviendo durante 1 hr. Los cromatogramas de exclusión de tamaños de la muestra no sometida a sobrecarga almacenada como suspensión en cloruro sódico al 0,9% (curva A), la muestra sometida a sobrecarga por ácido (curva B), y la muestra sometida a sobrecarga por ácido y por calor (curva C), se muestran en la Fig. 7. Como se ve en la Fig. 7, el tiempo de retención del polímero no se ve afectado en gran parte por la adición de ácido, o el calor, lo que indica que el polímero está protegido contra la hidrólisis por la presencia del lípido en las composiciones farmacéuticas.

Con el fin de determinar la degradación del polímero bajo condiciones normales de almacenamiento, se preparó una composición farmacéutica que contiene lípido/polímero con una relación de lípido:polímero 1:1 en peso y citarabina como sustancia activa fisiológicamente, como se describe en el Ejemplo 2. La composición farmacéutica se almacenó en forma de una suspensión en cloruro sódico al 0,9% en un refrigerador (2 - 8ºC) durante 9 meses. Los cromatogramas de exclusión de tamaños de una composición farmacéutica que contiene lípido/polímero recién preparada (curva A) y de una composición preparada hace 9 meses (curva B), se muestran en la Fig. 8. Como se ve en la Fig. 8, el polímero no ha experimentado una hidrólisis significativa durante las condiciones de almacenamiento normales.

Se realizó otro estudio de estabilidad acelerado con el fin de comparar el cambio de peso molecular del polímero en función del tiempo de incubación a 37ºC para una composición farmacéutica que contiene lípido/polímero con una relación de lípido a polímero de 1:1 en peso y una formulación de sólo polímero sin lípido. La composición farmacéutica que contiene lípido/polímero contenía una sustancia activa fisiológicamente, citarabina, y se preparó como se describe en Ejemplo 3. La formulación de sólo polímero contenía también citarabina y se preparó como se describe en Ejemplo 8, excepto que el primer medio acuoso contenía 150 mg/mL de citarabina en agua. El peso molecular medio de cada polímero a distintos tiempos de incubación a 37ºC se calculó como se describió anteriormente.

Los resultados de este estudio, indicados en la Fig. 9 como círculos para la composición farmacéutica sólo polímero y como triángulos para la composición farmacéutica que contiene lípido/polímero 1:1 de la presente invención, indican que la velocidad de degradación del polímero es menor para la composición farmacéutica que contiene lípido/polímero que para la composición farmacéutica de sólo polímero.

Ejemplo 10

Sensibilidad osmótica de la composición farmacéutica

Una composición farmacéutica sólo polímero y una composición farmacéutica que contiene lípido/polímero con una relación lípido-polímero 9:1, 1:1, o 1:3 se prepararon como en el Ejemplo 1 y en el Ejemplo 8. Para preparar la composición farmacéutica que contiene lípido/polímero con una relación de lípido a polímero de 9:1, 1:1 y 1:3 en peso, la solución en cloroformo fue como se describe en el Ejemplo 2.

Se añadió cloruro sódico (Fisher Scientific) a agua en cantidades variables, que dieron por resultado soluciones con las siguientes osmolalidades: 57, 116, 180, 269, 341, 422 mOsm/kg. La composición farmacéutica que contiene lípido/polímero con una relación lípido-polímero de 9:1, 1:1 y 1:3, o la composición farmacéutica sólo polímero, se añadieron a cada una de las soluciones de cloruro sódico. Los diámetros de partícula se midieron usando un analizador de distribución de tamaños de partículas de dispersión de láser (Modelo LA-910, Horiba Instruments, Irvine, CA) usando la base de distribución ponderada por la longitud y un índice de refracción relativo de 1,18 - 1,00i. Los diámetros medios de partícula en función de la osmolalidad se muestran en la Fig. 10.

La Fig. 10 muestra que el tamaño de las composiciones de microesferas de lípido/polímero indica una dependencia de la osmolalidad del medio de suspensión. No obstante, el tamaño de la microesfera de sólo polímero es independiente de la sobrecarga osmótica bajo estas condiciones.

Ejemplo 11

Liberación retardada in vivo de una sustancia encapsulada activa fisiológicamente desde la composición farmacéutica, después de la administración subcutánea

Una composición farmacéutica que contiene lípido/polímero con una relación lípido:polímero de 1,9:1 se preparó como en el Ejemplo 1 con las siguientes modificaciones. La solución acuosa contenía 15 mg/mL de leuprolida. Para preparar la composición farmacéutica que contiene lípido/polímero con una relación de lípido a polímero de 1,9:1 en peso, la solución en cloroformo es como se describe en el Ejemplo 2. La solución en cloroformo contenía el polímero poli(DL-lactida) (PLA) a una concentración de 37,22 mg/mL, DEPC, DPPG, colesterol y trioleína a concentraciones de 35,6 mg/mL, 6,225 mg/mL, 23,1 mg/mL, 6,5 mg/mL, respectivamente. La PLA era de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO), con un peso molecular de 106.000. Una solución separada de leuprolida contenía 6,0 mg/mL en agua. La DEPC, la DPPG, y la trioleína eran de Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) y el colesterol era de Spectrum Chemical Manufacturing Corp. (Gardena, CA). La leuprolida era de Bachem (Torrance, CA). La relación del volumen de fase

acuosa al volumen de fase de disolvente orgánico volátil era de 5 mL a 5 mL. La emulsión de "agua en aceite" se preparó agitando en un aparato mezclador Homo Mixer (Tokushu Kika Kogy Co., Ltd., Osaka, Japón) a una velocidad de 9000 rpm durante 8 min. La segunda fase acuosa era una mezcla de 5% en peso de glucosa y lisina 40 mM. Las esférulas se formaron agitando a 4000 rpm durante 1 min. Una corriente de nitrógeno gas ajustada a 3,5 at durante 20 minutos a 37ºC se hizo circular a través de la suspensión de esférulas para evaporar el cloroformo. El medio de suspensión se cambió por cloruro sódico al 0,9% en peso lavando y centrifugando a 600 × g dos veces.

El diámetro medio de partícula se determinó en un analizador de distribución de tamaños de partícula de dispersión de láser (Modelo LA-910, Horiba Instruments, Irvine, CA). El diámetro medio de partícula para la composición farmacéutica de lípido/polímero era 15,9 μm.

La concentración de leuprolida en la composición farmacéutica, y el sobrenadante de la composición farmacéutica fueron determinados mediante cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC) (Modelo 1100, Hewlett-Packard, Irvine, CA) usando una columna C-18 de fase inversa primesphere de 4,6 × 250 mm (Phenomenex, Torrance, CA). La fase móvil consistía en un gradiente de 75% de solución A a 25% de solución B a tiempo 0, que aumentó a 100% de solución B a los 12 minutos. La solución A era ácido trifluoroacético al 0,1%, y la solución B era ácido trifluoroacético al 0,1%. Los picos se registraron a 280 y 550 mm.

La composición farmacéutica lípido/polímero 9:1, la solución de leuprolida no encapsulada y la solución de NaCl al 0,9% fueron administradas mediante una inyección subcutánea en la región lumbar lateral a ratas albinas macho Harlan Sprague Dawley de 400 g. El número de animales por grupo era de seis. La dosis fue de 3,6 mg por rata y el volumen fue 600 μL. El suero de recogió mediante punción venosa (en la vena safena) a partir de animales no anestesiados, a 0, 1,5 horas, 1, 3, 7, 14, 28, 60, 88, 92, 106 días. Los tiempos para la recogida del grupo de leuprolida no encapsulada fueron 0, 1,5 horas, 1, 3, 7, 14 días. Las muestras de suero se guardaron a -40ºC hasta su análisis.

Los niveles de testosterona en el suero fueron determinados con un *kit* de radioinmunoensayo (RIA) en fase sólida. El *kit* de testosterona total Coat-A-Count fue adquirido de Diagnostic Products Corporation (Los Angeles, CA). El ensayo está destinado a la medida cuantitativa de testosterona en el suero. El ensayo se basa en el anticuerpo específico para la testosterona inmovilizado en la pared de un tubo de polipropileno. La testosterona marcada con ^{125}I compite durante un tiempo fijado con la testosterona en la muestra de suero por los sitios del anticuerpo. Después se decanta el tubo para separar el anticuerpo unido del libre. La muestras de suero animal se sometieron a conteo en un contador gamma (Modelo 1175 Searle, Des Plaines, IL). Las concentraciones de testosterona en el suero fueron determinadas a partir de una curva de calibración, (logaritmo de testosterona frente a logaritmo de porcentaje unido).

Las concentraciones de testosterona en el suero (μg/dL) a distintos valores del tiempo después de la administración subcutánea para los tres grupos de tratamiento se muestran en la Fig. 11. Los datos del día 3 al día 106 se representan gráficamente en una escala expandida en la Fig. 12.

Las Figs. 11 y 12 (escala vertical expandida) indican la liberación retardada de leuprolida durante un tiempo de hasta 80 a 90 días después de la administración parenteral de microesferas de lípido/polímero que contienen leuprolida.

Ejemplo 12

Preparación de la composición farmacéutica

Una composición farmacéutica que contiene lípido/polímero con una relación lípido:polímero de 1:1,12 se preparó como en el Ejemplo 1 con las siguientes modificaciones. La solución acuosa contenía 80 mg/mL de amicacina, pH 8. Para preparar la composición farmacéutica que contiene lípido/polímero con una relación de lípido a polímero de 1:1,12 en peso, la solución en cloroformo es como se describe en Ejemplo 2. La solución en cloroformo contenía el polímero poli(lactida-co-caprolactona) (PLC) a una concentración de 50 mg/mL, DOPC, DPPG, colesterol y trioleína a concentraciones de 10,4 mg/mL, 2,1 mg/mL, 7,7 mg/mL y 2,2 mg/mL, respectivamente. La PLC era de Birmingham Polymers Inc. (Birmingham, AL), con una relación de lactida:caprolactona ratio de 75:25. La DOPC, la DPPG, y la trioleína eran de Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) y el colesterol era de Spectrum Chemical Manufacturing Corp. (Gardena, CA). La relación del volumen de fase acuosa al volumen de fase de disolvente orgánico volátil era de 5 mL a 5 mL. La emulsión de agua en aceite se preparó agitando en un mezclador Homo Mixer (Tokushu Kika Kogyo Co., Ltd., Osaka, Japón) a una velocidad de 9000 rpm durante 10 min. La segunda fase acuosa era una mezcla de glucosa al 5% en peso y lisina 40 mM. Las esférulas se formaron agitando a 6000 rpm durante 1 minuto. Una corriente de nitrógeno gas ajustada a 3,5 atm durante 20 minutos a 37ºC se hizo circular por la suspensión de esférulas para evaporar el cloroformo. El medio de suspensión se cambió por cloruro sódico al 0,9% en peso lavando y centrifugando a 600 × g dos veces.

El diámetro medio de partícula se midió usando un analizador de distribución de tamaños de partícula de dispersión de láser (Modelo LA-910, Horiba Instruments, Irvine, CA) usando la base de distribución ponderada por la longitud y un índice de refracción relativo de 1,18-1,00i. El diámetro medio de partícula para la composición farmacéutica de lípido/polímero fue 8,23 μm. El tamaño medio de partícula ponderado por el volumen fue 123,4 μm.

Ejemplo 13

Liberación retardada in vivo de sustancia encapsulada activa fisiológicamente desde composiciones farmacéuticas después de la administración interperitoneal

Las composiciones farmacéuticas se prepararon empleando un procedimiento de emulsionamiento doble. La emulsión del tipo "agua en aceite" se preparó a partir de 5 mL de tampón de arginina-glicina-glicina 25 mM (Sigma, St. Louis, MO) pH 7,9 que contiene 4 por ciento de dextrosa (Fisher, Fair Lawn, NJ) y eritropoietina con 2,5 mg/mL de albúmina de suero humano (obsequio de UC San Diego Medical Center, San Diego, CA). La fase orgánica volátil contenía lípidos y polímero a una relación 1:1, con o sin eritropoietina, o una relación lípido/polímero de 4:1 con eritropoietina. La fase de disolvente inmiscible con agua contenía una mezcla de fosfolípidos, colesterol, triglicéridos y PLGA (poli DL-lactida-co-glicolida). Para la formulación 1:1 (masa de lípido:masa de polímero), la fase de disolvente contenía 10,4 mg/mL de DOPC (dioleil fosfatidilcolina), 2,1 mg/mL de DPPG (dipalmitoil fosfatidilglicerol, sal sódica), 2,2 mg/mL de trioleína, todo ello de Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL), 7,7 mg/mL de colesterol (Spectrum, Garden, CA), y 22,4 mg/mL de PLGA (Sigma, St. Louis, MO) disuelto en cloroformo (Spectrum, Gardena, CA). Para la formulación 4:1 la relación en peso de lípido a polímero se varió, manteniendo constante la concentración total de lípido más polímero. La velocidad de agitación y el tiempo para producir la emulsión tipo "agua en aceite" fue 9.000 rpm durante 8 minutes en un agitador Homo Mixer (Tokoshu Kika Kogyo Co., Ltd., Osaka, Japón). La segunda fase acuosa eran 20 mL de una solución que contiene 4% de glucosa (McGaw, Irvine, CA) y lisina 40 mM (Degussa, Courbevoie, Francia). La segunda fase acuosa se añadió a la suspensión de "agua en aceite" y se agitó a 4.000 rpm durante 1 minuto. El disolvente orgánico se eliminó agitando lentamente a 37ºC pasando gas nitrógeno a razón de 50 litros/minuto durante 20 minutos. El medio de suspensión se cambió por tampón de arginina-glicina-glicina 25 mM pH 7,9 lavando y centrifugando a 600 × g dos veces.

Los diámetros medios de partícula fueron determinados en un analizar de distribución de tamaños de partícula de dispersión de láser (Modelo LA-910, Horiba Instruments, Irvine, CA). Los diámetros medios de partícula fueron 26,1 μm, 23,1 μm, 24,5 μm para las composiciones farmacéuticas de lípido/polímero 1:1 y 4:1, y el blanco de lípido/polímero 1:1, respectivamente.

La concentración de eritropoietina en la composición farmacéutica se determinó mediante un ELISA de tipo sándwich colorimétrico cuantitativo (R&D Systems, Minneapolis, MN) para eritropoietina humana. Las placas se leyeron en un lector de microplacas EL312E Bio-Kinetics (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT) a 450 nm de longitud de onda para la detección. La concentración de albúmina de suero humana (HSA) en el blanco se determinó mediante cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC) (Modelo 1100, Hewlett-Packard, Irvine, CA) usando una columna C18 de proteína y péptido, de 4,6 X 250 mm (Vydac, Hespena, CA). La fase móvil consistió en un gradiente de 5% de solución A a 80% de solución B en 18 minutos. La solución A era 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) (Pierce, Rockford, IL) en agua HPLC de Mallinckrodt (Paris, KY), y la solución B era 0,1% de TFA en metanol de Burdick & Jackson (Muskegon, MI) con una velocidad de flujo de 1 mL por minuto. Los picos se registraron a 280 nm de longitud de onda.

La concentración de la composición farmacéutica y la de eritropoietina no encapsulada se ajustaron a 500 UI de eritropoietina con tampón de arginina-glicina-glicina a pH 7,9. El blanco se ajustó para contener 0,4 mg/mL de proteína HSA. Cinco ratones hembras CDl/ICR Harlan Sprague Dawley con un peso de 28 a 32 gramos fueron inyectados por vía intraperitoneal (IP) para cada composición farmacéutica. La dosis era 500 UI de eritropoietina en un volumen total de 1 mL. La sangre se recogió a través del seno orbital de animales anestesiados con 2,5% de Halothane y 1 L/minute de oxígeno. Los hematocritos se tomaron los días 0, 1, 3, 6, 10, 13, 17, 21 y 24. La sangre se recogió directamente en un tubo capilar y se centrifugó durante 6 minutos en una centrífuga de hematocrito.

Los resultados de la Fig. 13 indican un efecto retardado del hematocrito que dura hasta 13 días con la composición farmacéutica lípido/polímero 4:1 y hasta 10 días para la composición farmacéutica de lípido/polímero 1:1.

El aumento de hematocrito resultante de una inyección de eritropoietina libre (no encapsulada) no es tan pronunciado como con el fármaco encapsulado. La eritropoietina libre (no encapsulada) inyectada tuvo por resultado que este efecto durase solamente hasta 6 días. La composición de lípido:polímero 4:1 muestra un aumento del 15,6 por ciento del hematocrito en comparación con el fármaco no encapsulada. La composición farmacéutica 1:1 muestra un 7,8 por ciento en el hematocrito en comparación con el fármaco no encapsulado. La composición farmacéutica de lípido:polímero 4:1 tuvo por resultado el hematocrito más alto en total.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para preparar composiciones biodegradables que contienen lípido/polímero, el cual procedimiento comprende:

a) formar una emulsión de agua en aceite a partir de una primera fase acuosa y una fase de disolvente orgánico volátil que comprende al menos un disolvente orgánico volátil, al menos un polímero o copolímero biodegradable que sea soluble en el disolvente orgánico, y al menos un lípido, en donde la primera fase acuosa no contiene un agente tensioactivo elegido entre el grupo consistente en poli(alcohol vinílico), estearato de sacarosa, estearato de magnesio, triestearato de aluminio, ésteres grasos de sorbitán, éteres grasos polioxietilenados, Poloxamer 188, Pluronic F68, 2-hidroxipropil β-ciclodextrina, metil β-ciclodextrina, Pluronic F-127 o dimetil éster del ácido L-tartárico;

b) dispersar la emulsión de agua en aceite en una segunda fase acuosa libre de agente tensioactivo, para formar esférulas de disolvente; y

c) eliminar el disolvente orgánico volátil de las esférulas de disolvente para formar una composición de microesferas suspendidas en la segunda fase acuosa, en donde dicha microesfera tiene múltiples compartimentos internos no concéntricos rodeados por al menos una pared, comprendiendo la pared el lípido/polímero biodegradable.

2. Un procedimiento según la reivindicación 1ª, en el que la composición es una composición farmacéutica, y la primera fase acuosa comprende además una sustancia hidrófila activa fisiológicamente.

3. El procedimiento según la reivindicación 1ª, que comprende además eliminar el disolvente orgánico de las esférulas de disolvente.

4. El procedimiento según la reivindicación 1ª, en el que la fase de disolvente orgánico volátil comprende además al menos un triglicérido.

5. El procedimiento según la reivindicación 1ª, en el que la composición es una composición farmacéutica, y la fase de disolvente orgánico volátil comprende una sustancia hidrófoba activa fisiológicamente.

6. El procedimiento según la reivindicación 5ª, que comprende además eliminar el disolvente orgánico de las esférulas de disolvente.

7. El procedimiento según la reivindicación 1ª, en el que al menos uno de los tipos de polímero biodegradable es un homopolímero.

8. El procedimiento según la reivindicación 7ª, en el que al menos uno de los homopolímeros biodegradable se elige entre el grupo que consiste en polilactidas, poliglicolidas, poli(p-dioxanonas), policaprolactonas, polihidroxialcanoatos, polipropilenofumaratos, poliortoésteres, ésteres polifosfato, polianhídridos, polifosfacenos, polialquilcianoacrilatos, polipéptidos, y polímeros preparados por ingeniería genética.

9. El procedimiento según la reivindicación 1ª, en el que al menos uno de los tipos de polímero biodegradable es un copolímero al azar o de bloques.

10. El procedimiento según la reivindicación 9ª, en el que al menos uno de los copolímeros biodegradables al azar o de bloques se elige entre el grupo que consiste en poli(lactida-glicolidas), poli(p-dioxanona-lactidas), poli(p-dioxanona-glicolidas), poli(p-dioxanona lactida-glicolidas), poli(p-dioxanona-caprolactonas), poli(p-dioxanona- alquileno carbonatos), poli(p-dioxanona-óxidos de alquileno), poli(p-dioxanona-carbonato-glicolidas), poli(p-dioxanona-carbonatos), poli(caprolactona-lactidas), poli(caprolactona-glicolidas), poli(hidroxialcanoatos), poli(propileno fumaratos), poli(ortoésteres), poli(éter-ésteres), poli(éster-amidas), poli(éster-uretanos), ésteres polifosfato, polianhídridos, poli(éster-anhídridos), polifosfacenos, polipéptidos y copolímeros preparados por ingeniería genética.

11. El procedimiento según la reivindicación 1ª, en el que al menos uno de los tipos de lípido comprende un lípido zwitteriónico.

12. El procedimiento según la reivindicación 1ª, en el que al menos uno de los tipos de lípido comprende un lípido ácido.

13. El procedimiento según la reivindicación 1ª, en el que al menos uno de los tipos de lípido comprende un esterol.

14. El procedimiento según la reivindicación 1ª, en el que al menos uno de los tipos de lípido comprende un triglicérido.

15. El procedimiento según la reivindicación 2ª, en el que la sustancia activa fisiológicamente es hidrófila, y en el que la composición comprende además un triglicérido.

16. El procedimiento según la reivindicación 5ª, en el que la sustancia activa fisiológicamente es hidrófoba, y en el que la composición está libre de triglicéridos.

17. El procedimiento según las reivindicaciones 2ª o 5ª, en el que la sustancia activa fisiológicamente se elige entre el grupo que consiste en agentes antianginosos, antiarrítmicos, antiasmáticos, antibióticos, antidiabéticos, antifúngicos, antihistamínicos, antihipertensores, antiparasitarios, antineoplásicos, antivíricos, glicósidos cardíacos, herbicidas, hormonas, inmunomoduladores, anticuerpos monoclonales, neurotransmisores, ácidos nucleicos, proteínas, agentes de radiocontraste, radionucleidos, sedantes, analgésicos, esteroides, tranquilizantes, vacunas, vasopresores, anestésicos, péptidos, y combinaciones de los mismos.

18. El procedimiento según la reivindicación 17ª, en el que la sustancia activa fisiológicamente es una hormona.

19. El procedimiento según la reivindicación 18ª, en el que la hormona es insulina o leuprolida.

20. El procedimiento según las reivindicaciones 2ª o 5ª, en el que la sustancia activa fisiológicamente es una citocina.

21. El procedimiento según la reivindicación 20ª, en el que la citocina es eritropoietina.

22. El procedimiento según las reivindicaciones 2ª o 5ª, en el que la sustancia activa fisiológicamente es un antibiótico.

23. El procedimiento según la reivindicación 22ª, en el que el antibiótico es amicacina.

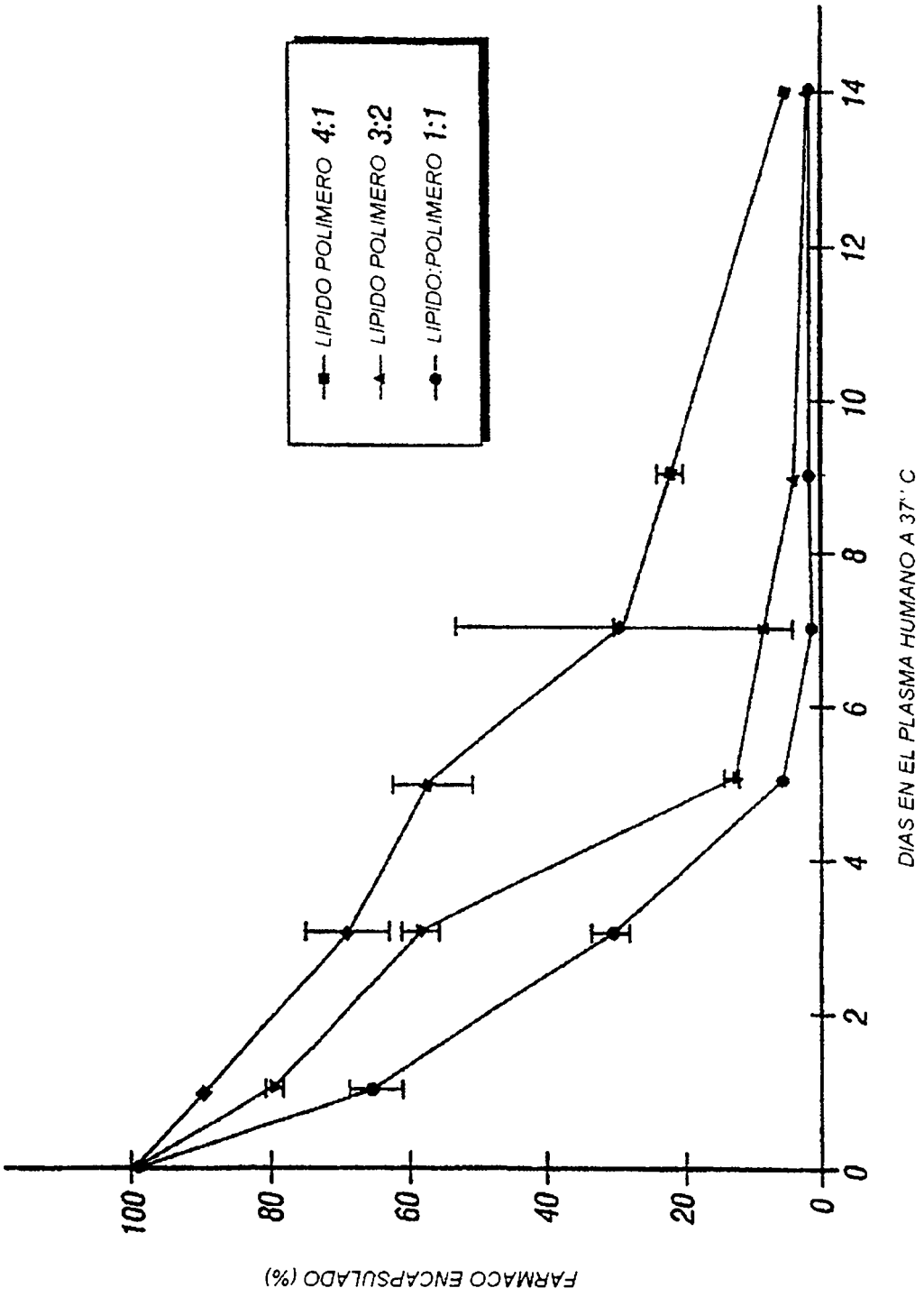

LIPIDO POLIMERO 4:1
LIPIDO POLIMERO 3:2
LIPIDO:POLIMERO 1:1
FARMACO ENCAPSULADO (%)
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
12
14
DIAS EN EL PLASMA HUMANO A 37° C

FIG. 1

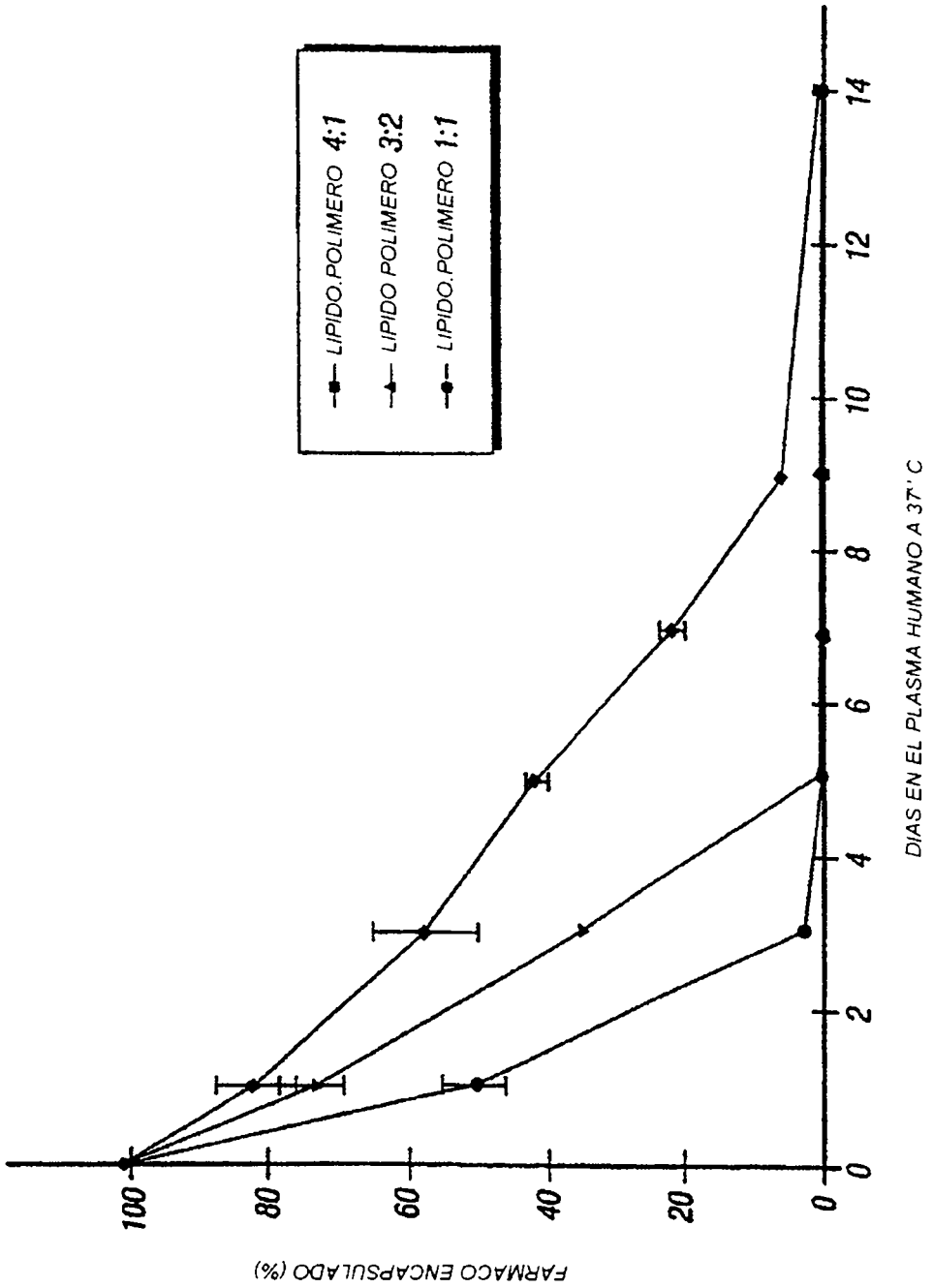

LIPIDO.POLIMERO 4:1
LIPIDO POLIMERO 3:2
LIPIDO.POLIMERO 1:1
FARMACO ENCAPSULADO (%)
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
12
14
DIAS EN EL PLASMA HUMANO A 37° C

FIG. 2

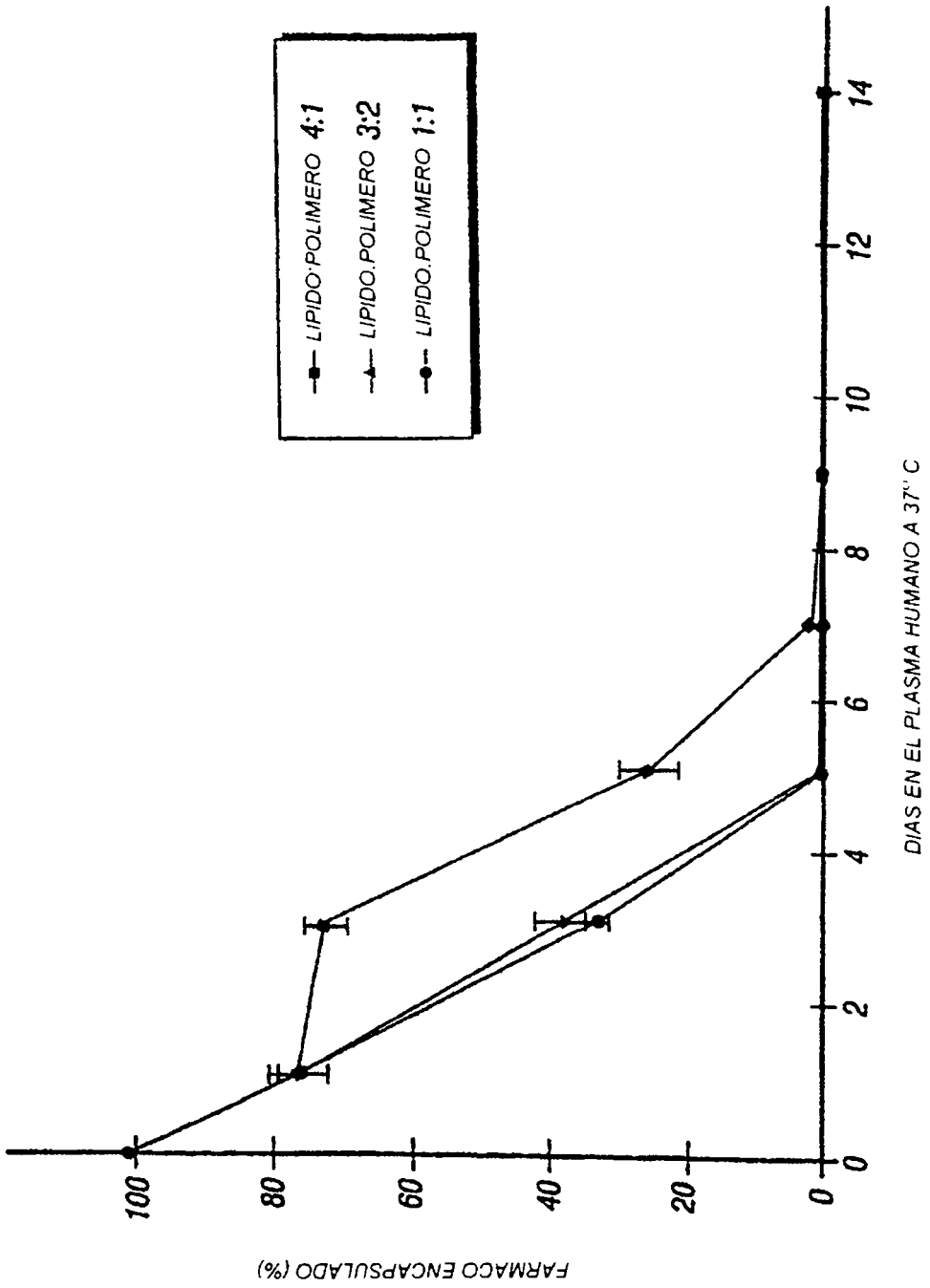

LIPIDO:POLIMERO 4:1
LIPIDO.POLIMERO 3:2
LIPIDO.POLIMERO 1:1
FARMACO ENCAPSULADO (%)
0
20
40
60
80
100
0
2
4
6
8
10
12
14
DIAS EN EL PLASMA HUMANO A 37° C

FIG. 3

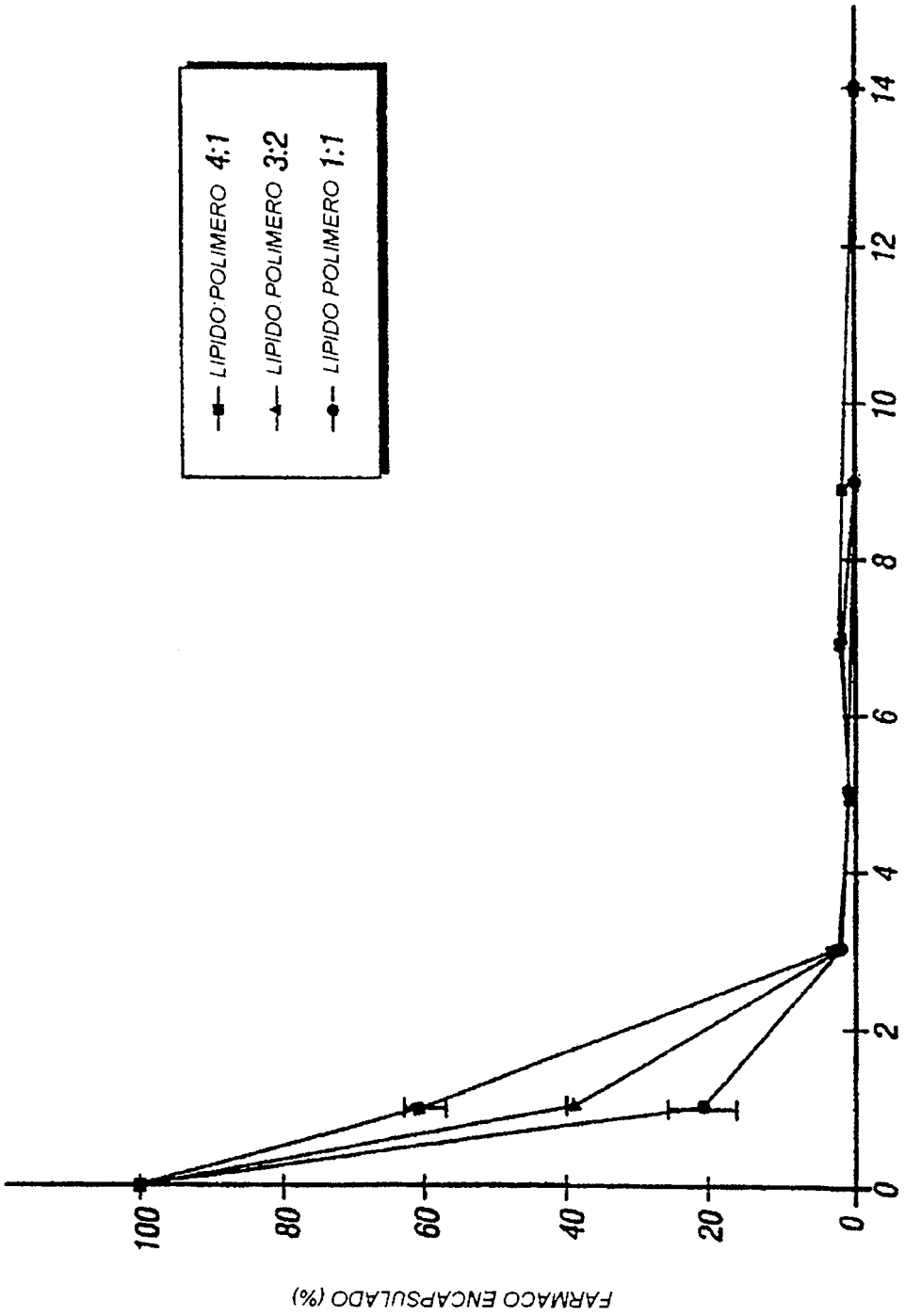

LIPIDO:POLIMERO 4:1
LIPIDO POLIMERO 3:2
LIPIDO POLIMERO 1:1
FARMACO ENCAPSULADO (%)
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
12
14
DIAS EN EL PLASMA HUMANO A 37'' C

FIG. 4

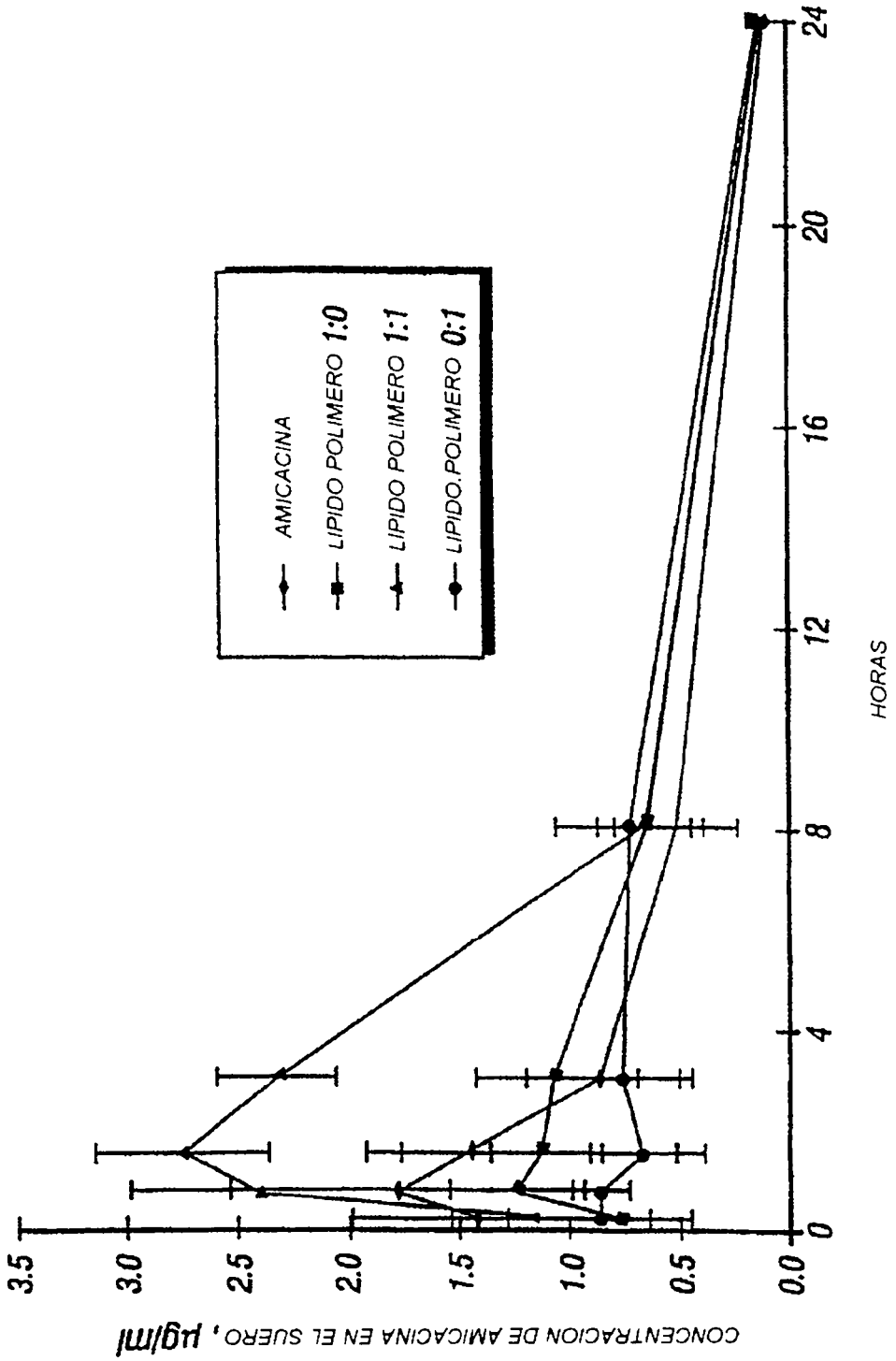

AMICACINA
LIPIDO POLIMERO 1:0
LIPIDO POLIMERO 1:1
LIPIDO.POLIMERO 0:1
CONCENTRACION DE AMICACINA EN EL SUERO, µg/ml
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
4
8
12
16
20
24
HORAS

FIG. 5

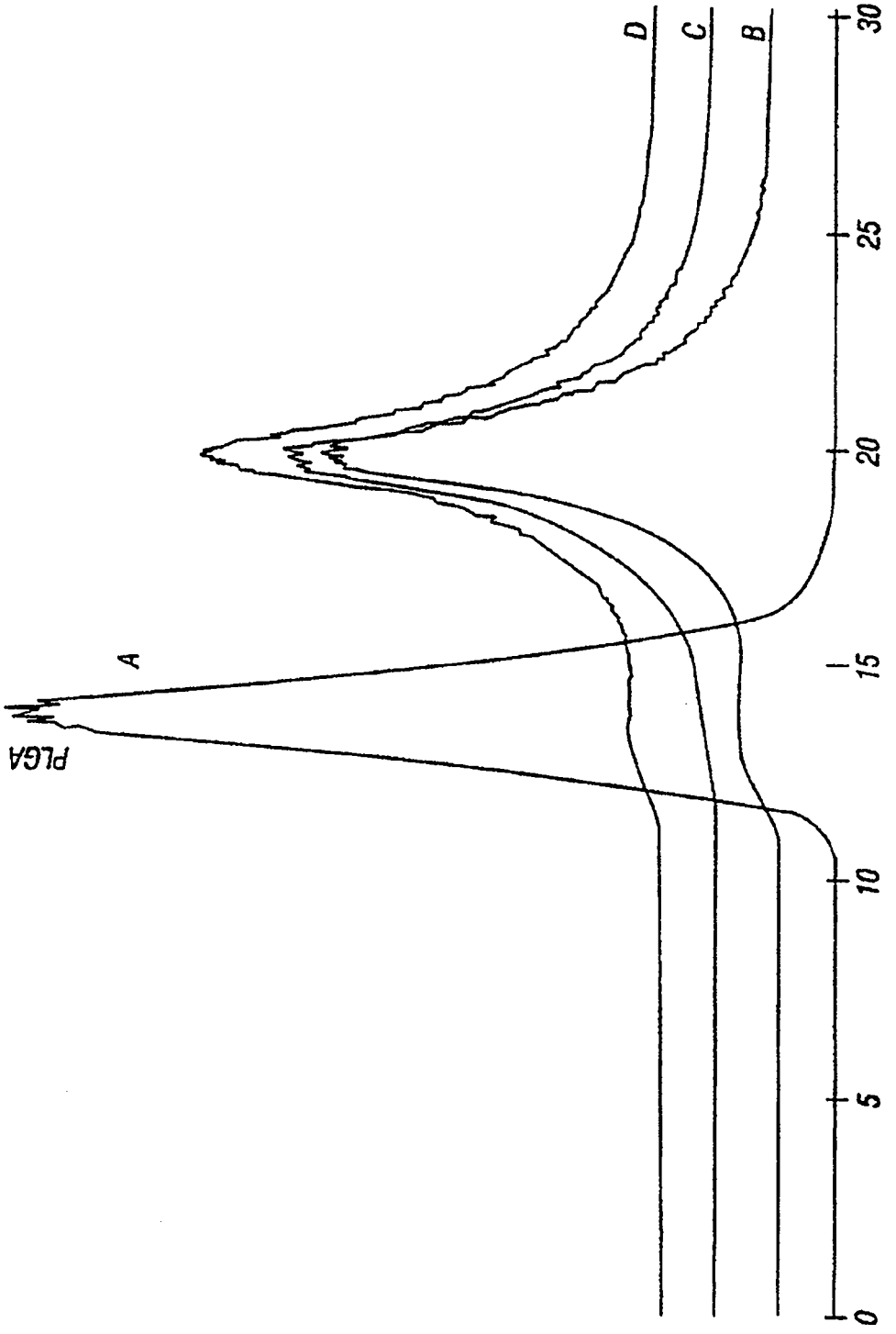


FIG. 6

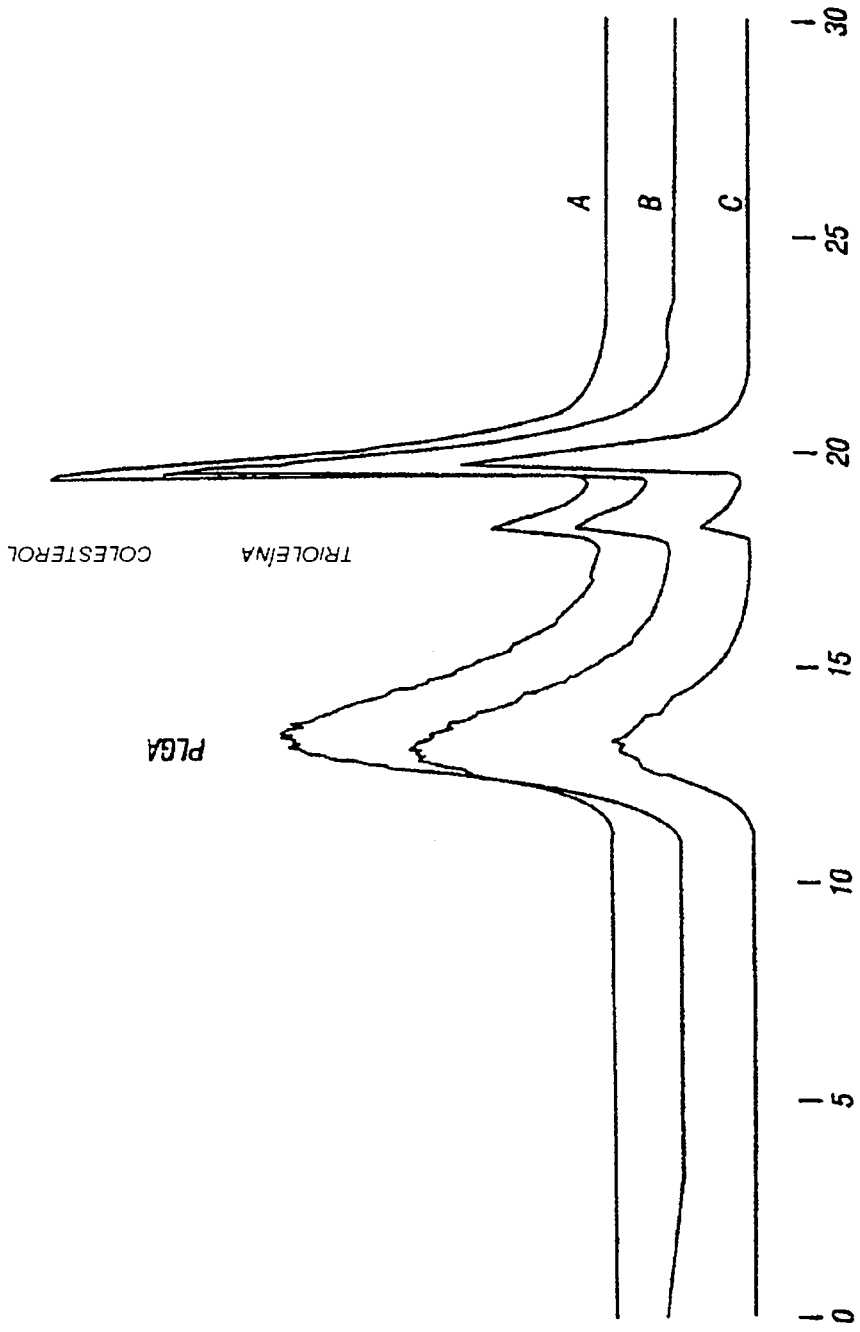

A
B
C
PLGA
TRIOLEÍNA
COLESTEROL
0
5
10
15
20
25
30
TIEMPO DE RETENCION (MIN)

FIG. 7

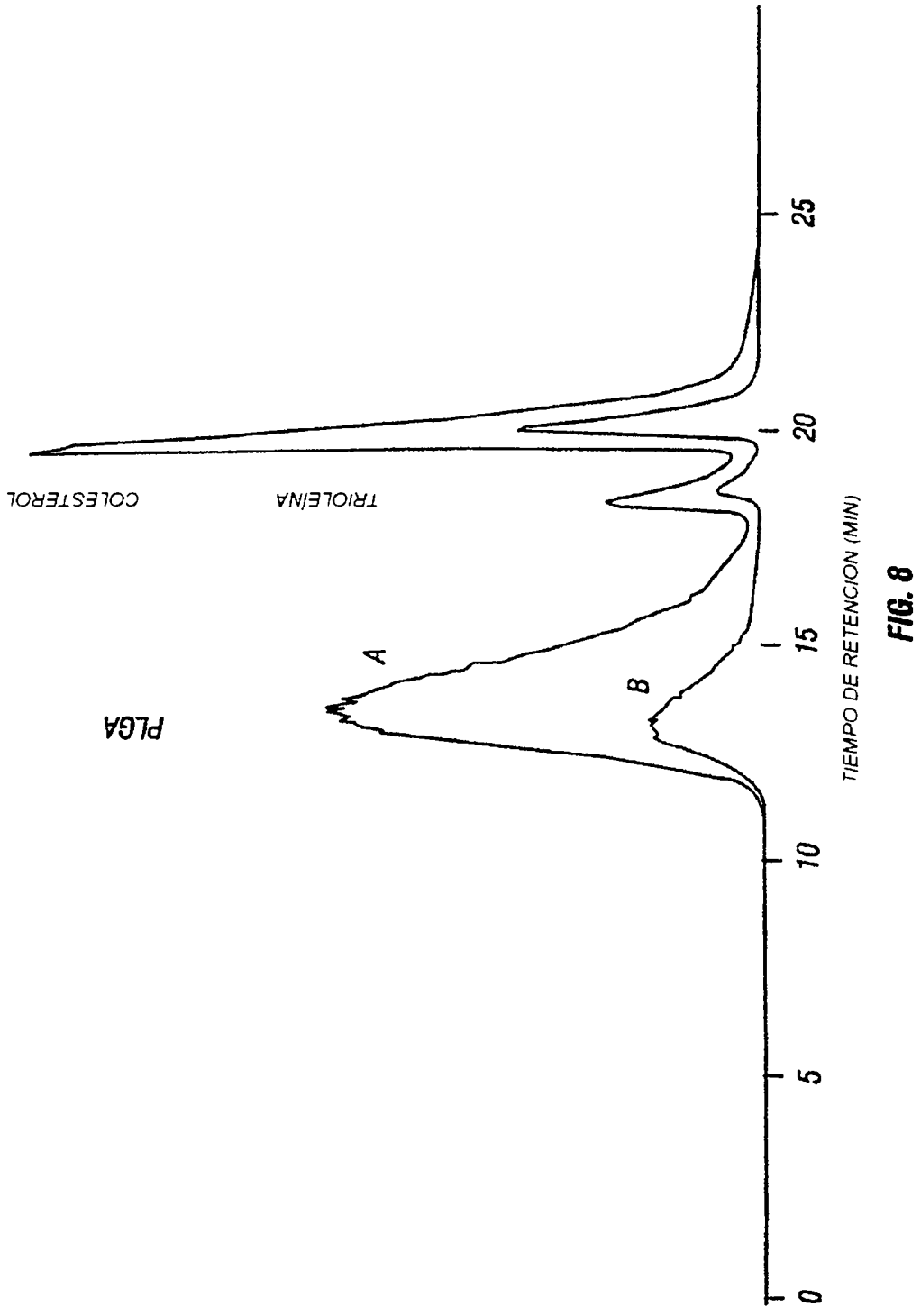

PLGA
A
B
TRIOLEÍNA
COLESTEROL
0
5
10
15
20
25
TIEMPO DE RETENCION (MIN)

FIG. 8

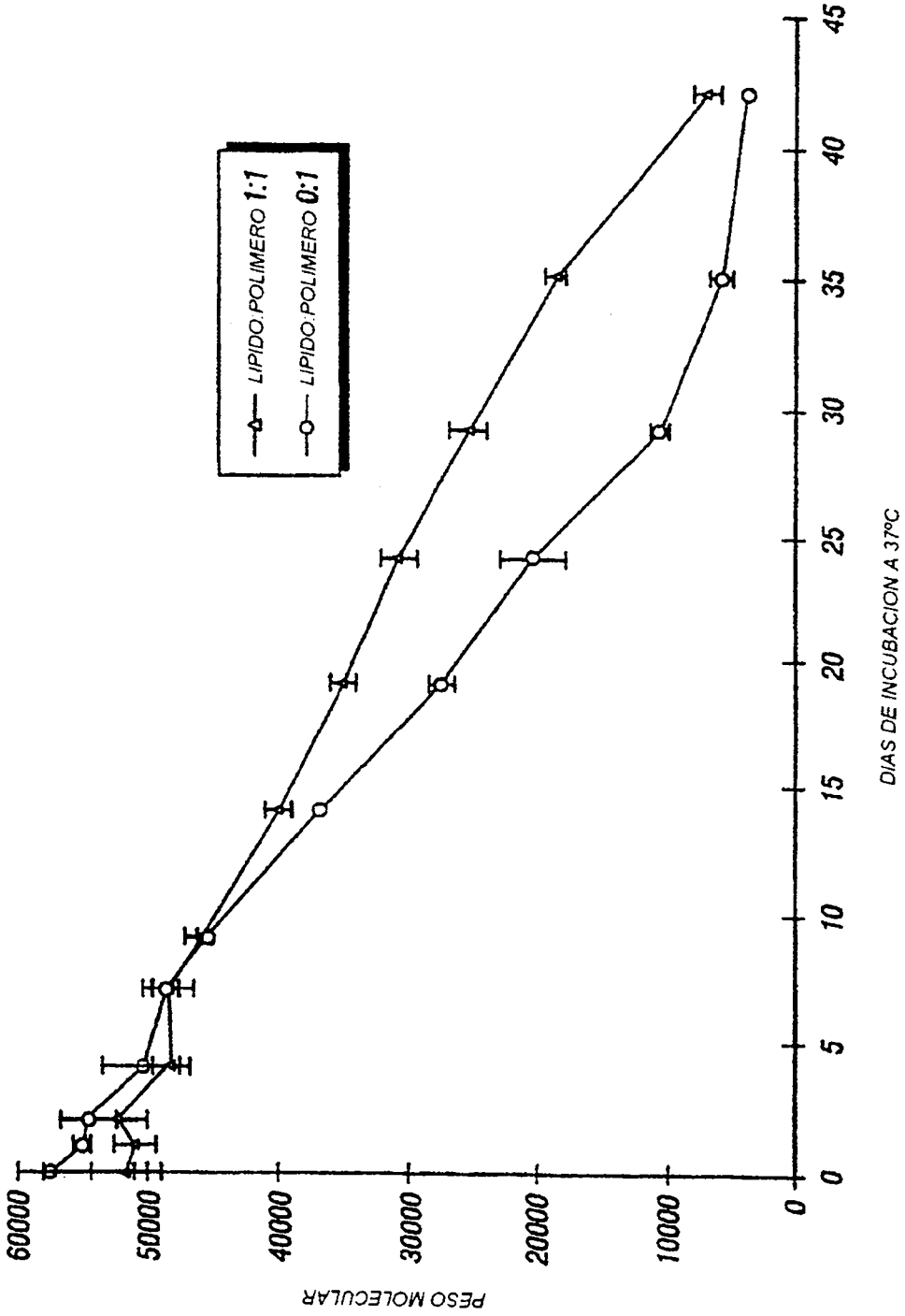

LIPIDO:POLIMERO 1:1
LIPIDO:POLIMERO 0:1
PESO MOLECULAR
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
DIAS DE INCUBACION A 37ºC

FIG. 9

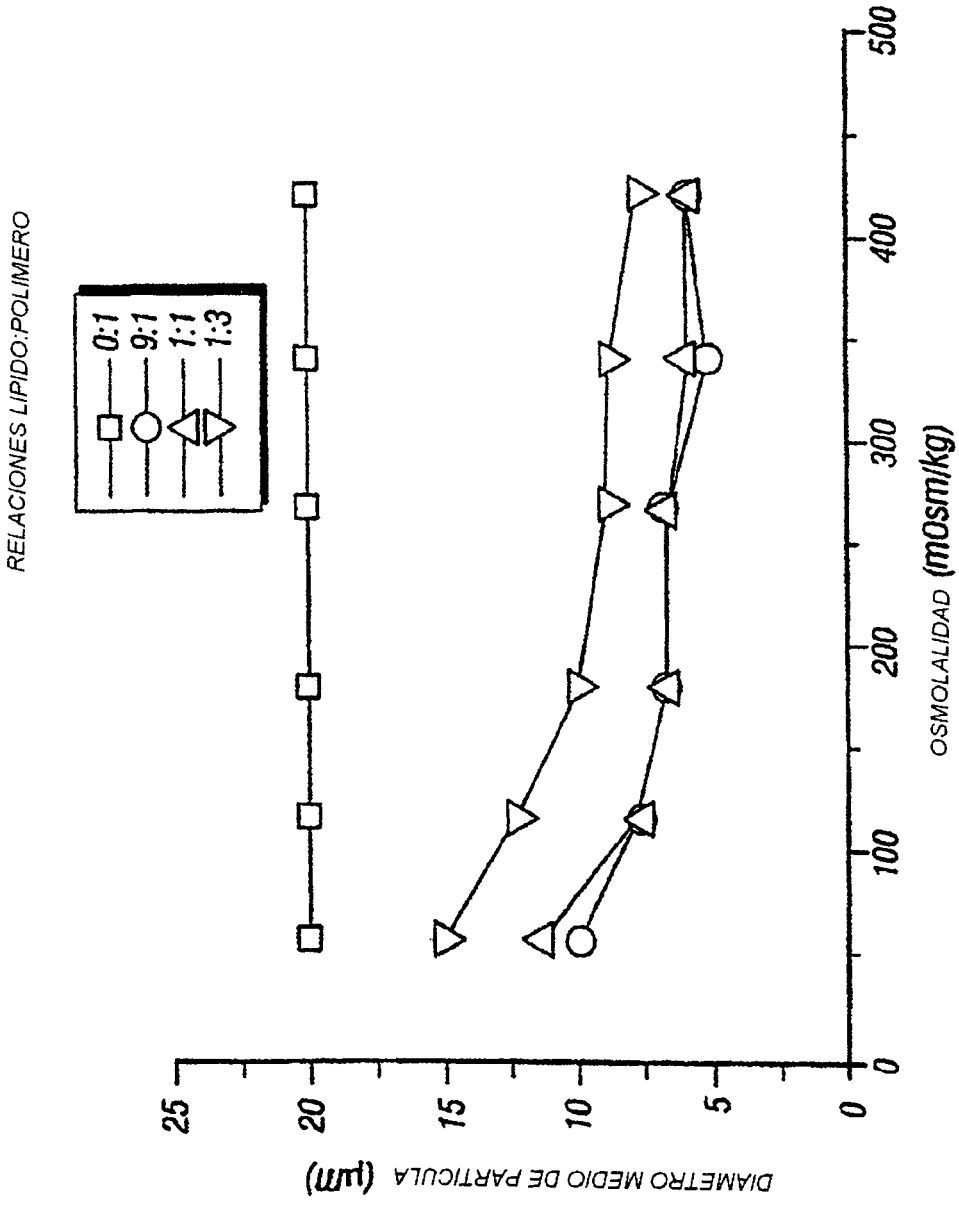

RELACIONES LIPIDO:POLIMERO
0:1
9:1
1:1
1:3
DIAMETRO MEDIO DE PARTICULA (µm)
25
20
15
10
5
0
0
100
200
300
400
500
OSMOLALIDAD (mOsm/kg)

FIG. 10

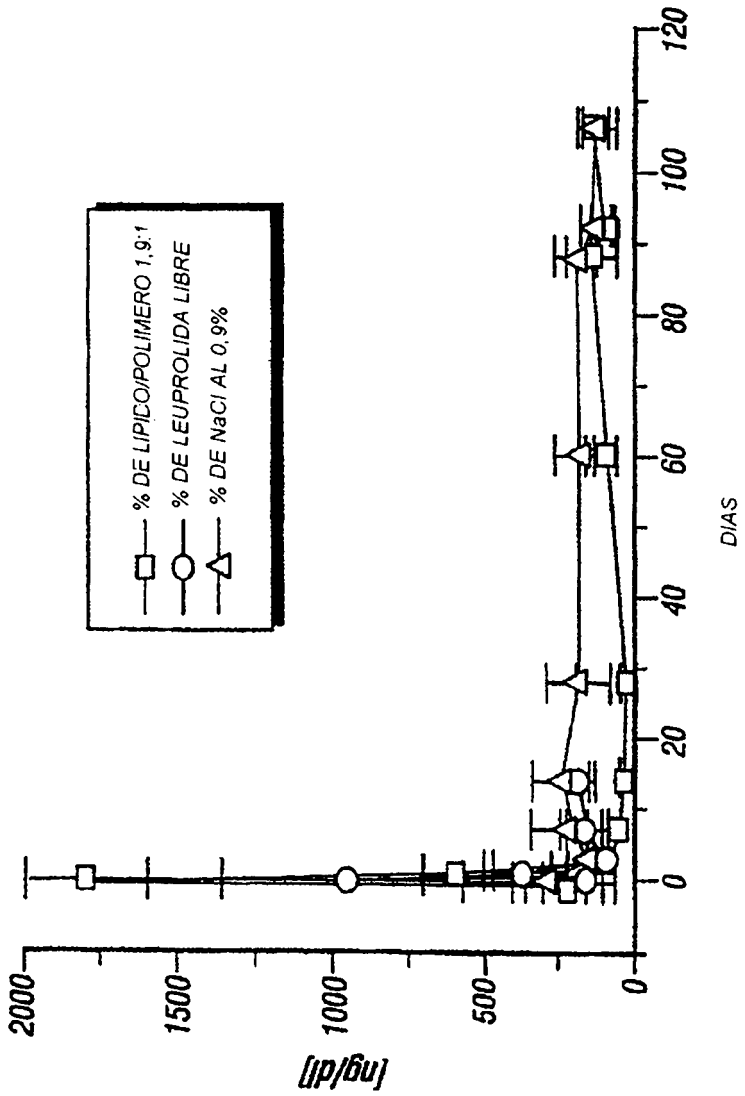

% DE LIPICO/POLIMERO 1,9:1
% DE LEUPROLIDA LIBRE
% DE NaCl AL 0,9%
2000
1500
1000
500
0
(pg/dl)
0
20
40
60
80
100
120
DIAS

FIG. 11

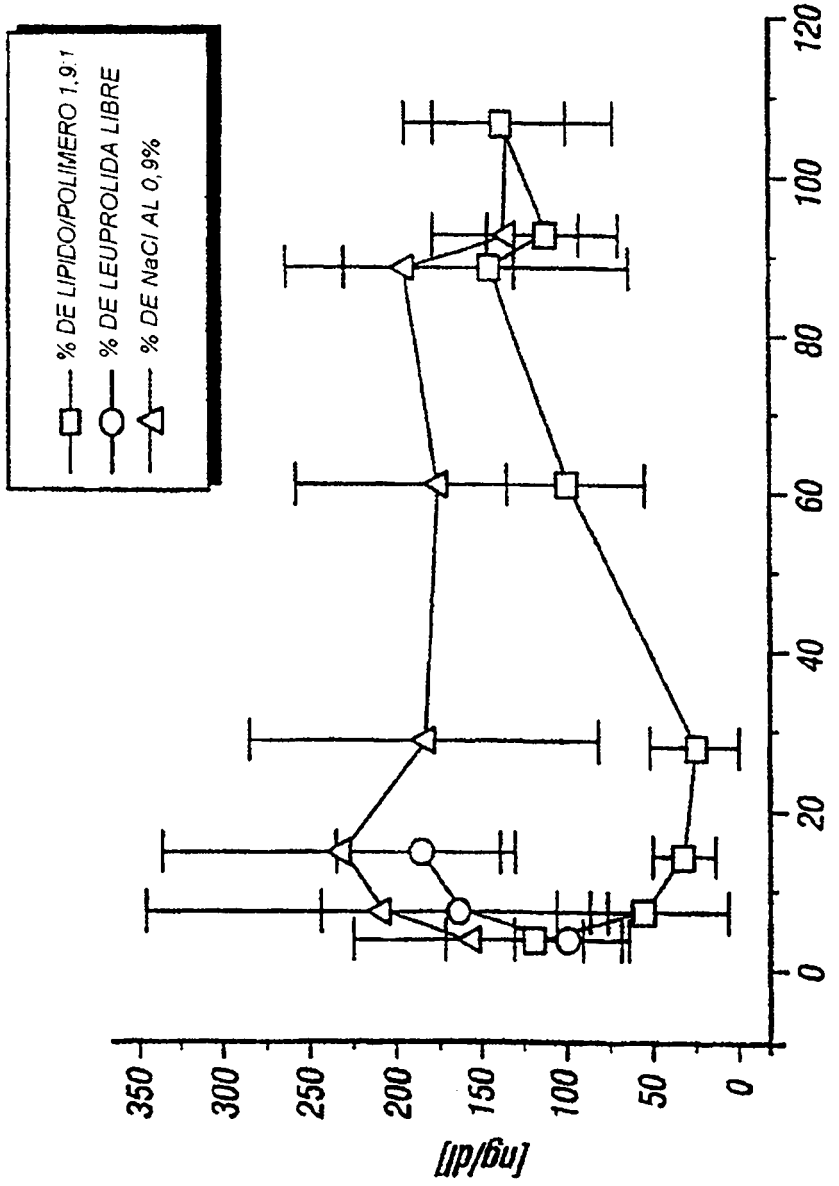

% DE LIPIDO/POLIMERO 1,9:1
% DE LEUPROLIDA LIBRE
% DE NaCl AL 0,9%
[ng/dl]
350
300
250
200
150
100
50
0
0
20
40
60
80
100
120
DIAS

FIG. 12

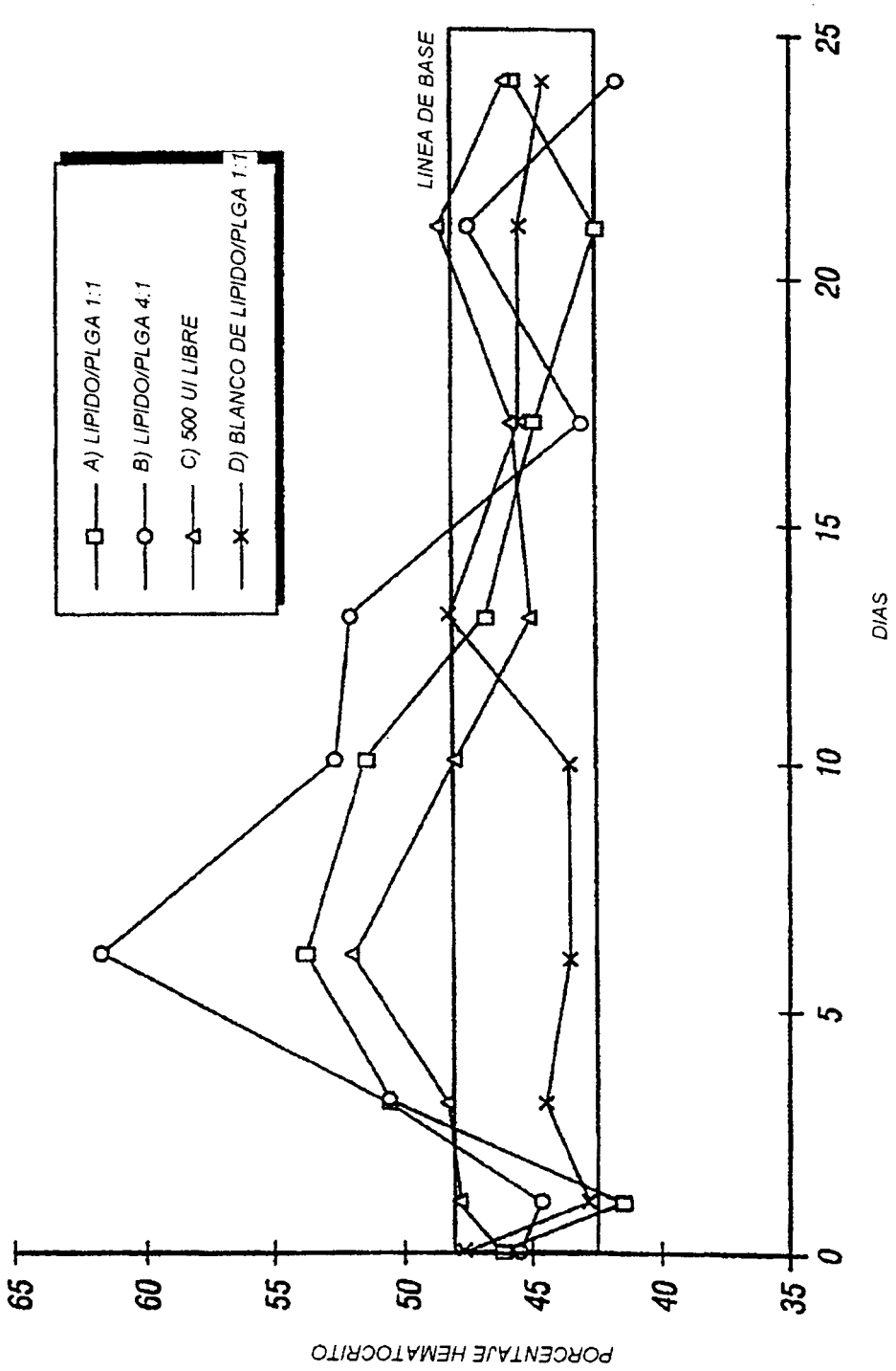

A) LIPIDO/PLGA 1:1
B) LIPIDO/PLGA 4:1
C) 500 UI LIBRE
D) BLANCO DE LIPIDO/PLGA 1:1
LINEA DE BASE
PORCENTAJE HEMATOCRITO
65
60
55
50
45
40
35
0
5
10
15
20
25
DIAS

FIG. 13