



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 290 095**

51 Int. Cl.:
A61K 9/16 (2006.01)
A61K 38/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01272020 .7**
86 Fecha de presentación : **17.12.2001**
87 Número de publicación de la solicitud: **1345593**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **24.09.2003**

54 Título: **Micropartículas lipídicas por micronización criogénica.**

30 Prioridad: **27.12.2000 EP 00128556**
26.10.2001 EP 01125741

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.02.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.02.2008

73 Titular/es: **ARES TRADING S.A.**
Zone Industrielle de l'Ourietaz
1170 Aubonne, CH

72 Inventor/es: **Del Curto, Maria Dorly;**
Chicco, Daniela y
Esposito, Pierandrea

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 290 095 T3

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

DESCRIPCIÓN

Micropartículas lipídicas por micronización criogénica.

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a micropartículas lipídicas que consisten en lípidos enriquecidos en componentes anfífilos, que favorecen la incorporación de péptidos y/o proteínas, a un procedimiento para obtenerlas así como al uso de las mismas. Se describe también un procedimiento de fabricación por micronización criogénica para su preparación.

10 **Antecedentes de la invención**

Las microesferas son un ejemplo de un sistema de administración de fármacos que ha sido evaluado de forma extensa en varios campos terapéuticos. Son esencialmente partículas sólidas con 1 a 500 μm de diámetro que pueden tanto dirigir su carga de fármaco mediante atrapamiento físico en los vasos sanguíneos (quimioembolización) como sostener la acción de un agente terapéutico a través de la liberación controlada. Las microesferas se pueden preparar a partir de una amplia variedad de materiales, incluyendo proteínas, polisacáridos, poliésteres y lípidos mediante una variedad de técnicas diferentes (emulsificación, estabilización por calor, coacervación y tecnología de inversión de fase). Las microesferas son estructuras monolíticas, totalmente sólidas, que se distinguen de los sistemas vesiculares más fluidos y flexibles tales como los liposomas. Normalmente tienen 1-500 μm de diámetro y están entre los gránulos (>100 μm) y las micropartículas ($\geq 1 \mu\text{m}$). Se distinguen de las microcápsulas por su estructura interna, siendo una matriz homogénea en lugar de una forma vesicular. Las microesferas se pueden producir a partir de una serie de diferentes materiales biodegradables biocompatibles tales como proteínas (albúmina y gelatina) (*Biopharm. Drug Dispos.* (1985) 6 pp. 91-104 y *Intern. J. Pharm.* (1987) 35 pp. 177-179), poliésteres (glicolida y lactida) (*J. Microencap.* (1986) 3 pp. 181-193 y *Drug Dev. Ind. Pharm.* (1990) 16 pp. 2353-2367), polisacáridos (almidón, etilcelulosa, alginato y chitosán) (*Drug Dev. Ind. Pharm.* (1996) 22 pp. 457-463 y *J. Contr. Rel.* (1997) 43 pp. 65-74), resinas de intercambio iónico (*J. Contr. Rel.* (1989) 8 pp. 251-257) y lípidos (*Adv. Drug Deliv. Rev.* (1996) 20 pp. 209-219).

Hasta ahora se han desarrollado muchos métodos para formar microesferas a la vez que se encapsula simultáneamente el fármaco, que incluyen técnicas tan diversas como:

- estabilización química (*Biopharm. Drug Dispos.* (1985) 6 pp. 91-104);
- estabilización por calor (*Experientia* (1983) 29 pp. 913-916);
- evaporación de disolvente en emulsión múltiple (*J. Contr. Rel.* (1994) 28 pp. 121-129);
- extracción de disolvente en emulsión múltiple (*J. Contr. Rel.* (1997) 43 pp. 261-272);
- coacervación (*Cancer Res.* (1993) 53 pp. 5841-5844);
- nanoencapsulación con inversión de fase (PIN) (*Nature* (1997) 386 pp. 410-414);
- secado por pulverización (*Pharm. Sci.* (1997) 86 pp. 603-607).

Ocasionalmente, se añade un fármaco a las microesferas o se compleja con ellas después de la formación de partículas. La selección del material de la matriz y el método de preparación son críticos para definir el comportamiento global.

La elección dependerá de varios factores:

- tamaño requerido de las microesferas;
- propiedades inherentes del fármaco, por ejemplo, solubilidad acuosa y estabilidad;
- características superficiales de las partículas, tales como permeabilidad y carga;
- grado de biodegradabilidad y biocompatibilidad;
- perfil deseado de liberación del fármaco.

La velocidad con que se libera el fármaco desde las microesferas depende de tres factores principales:

- solubilidad del fármaco encapsulado y procedimientos de difusión;
- tasa de erosión y biodegradación de las partículas;
- interacción entre el fármaco y la matriz de partículas que lleva a la inmovilización.

Las micropartículas poliméricas se preparan usualmente por técnicas tales como evaporación del disolvente en emulsión simple o doble, coacervación y secado por pulverización.

Estas técnicas tienen sin embargo algunos inconvenientes: en el método de evaporación del disolvente, normalmente se usan grandes cantidades de disolventes orgánicos clorados y rara vez se pueden conseguir condiciones operativas controladas; además, en el caso de péptidos y proteínas, los disolventes usados pueden desnaturalizar la estructura y llevar a una pérdida de potencia. En la emulsión O/W simple y doble se ha señalado también que la acumulación de moléculas anfífilas (es decir, proteínas) en la capa de la interfase orgánica/acuosas podría causar la agregación y precipitación del fármaco. (*Pharmaceuticals Dosage Forms: Disperse systems* 2nd Edition. Marcel Dekker Inc. (1998) pp. 163-193).

El secado por pulverización es una técnica en la que el polímero y el fármaco, solubilizados o suspendidos en un medio, se atomizan a través de una boquilla en una cámara en la que el disolvente es forzado a evaporarse por el efecto de una temperatura relativamente alta y se recogen las micropartículas en forma de polvo al final del proceso. Mediante esta técnica de evaporación las matrices obtenidas son normalmente bastante porosas, llevando a una pobre encapsulación del fármaco dentro de la matriz que da como resultado una liberación rápida y un efecto de una gran liberación inicial (efecto *burst*). Además la interfase aire/líquido formada durante la preparación aumenta la agregación molecular (especialmente para las proteínas) en la superficie. (Mumenthaler M. *et al.*, *Pharm. Res.* 11 (1994), Nº 1).*

Por tanto la micronización criogénica se puede anticipar como un método de fabricación alternativo para obtener micropartículas de material lipídico, que podría aportar notables ventajas, tanto en términos de estabilidad de péptidos/proteínas como en términos de reducción del efecto *burst*. Además, el perfil de liberación del fármaco se puede modular obteniendo un estado físico definido del lípido, teniendo dichos lípidos diferentes estados cristalinos (tales como estados polimórficos).

En la técnica anterior examinada, ya se han descrito algunos ejemplos de micropartículas lipídicas para aplicación industrial en el campo de la liberación de fármacos. W. Steber *et al.*, (American Cyanamid Corporation, EP 257368) describen una composición de microsferas, que contiene de 30 a 95% de grasas o ceras y aproximadamente 2 a 70% de una sustancia biológicamente activa, en la que el componente lipídico tiene un contenido de triestearato de glicerilo de 55 a 79%. M. W. Fountain *et al.* de The Liposome Company, US 4,610,868) reivindican portadores de la matriz lipídica que comprenden un componente hidrófobo, un compuesto anfipático y un agente bioactivo, combinados en forma de una estructura globular, que tiene un diámetro de 500 nm a 100 μ m. Dicho portador se obtiene emulsionando los componentes e inyectando la emulsión en un disolvente orgánico. H. Augart (Warner Lambert Company, US 4,483,847) describió una composición para administración de fármacos, que comprende lípidos tanto de alto punto de fusión como de bajo, que después de fundidos, mezclados y enfriados se granulan para la producción de comprimidos. P. Orsolini *et al.*, (Debiopharm, US 5,192,741) describen un procedimiento que comprende una etapa de molienda criogénica para preparar una composición farmacéutica que contiene polilactida, copolímero de ácido láctico y ácido glicólico y péptidos. Las micropartículas se obtienen disolviendo/dispersando dichos polímeros y el agente bioactivo en un disolvente orgánico y separando el disolvente mientras se da forma al residuo sólido.

Es por tanto un objetivo de la presente invención proporcionar micropartículas lipídicas con liberación sostenida y especialmente con un bajo "efecto *burst*".

45 Descripción de la invención

En particular, el principal objetivo de la invención es proporcionar un nuevo tipo de micropartículas lipídicas que comprenden un fármaco y una matriz lipídica, caracterizado porque dicho fármaco se selecciona del grupo que consiste en un decapeptido que actúa como antagonista de la LHRH y el IFN-beta, y dicha matriz lipídica tiene un contenido de monoglicéridos que es de 70% p/p como mínimo, basándose el porcentaje en el peso de la matriz lipídica.

Para obtener una mejor incorporación de dichos péptidos y/o proteínas en la matriz lipídica, se ha hecho un cribado de varios lípidos con diferentes características hidrófilas/hidrófobas y diferentes composiciones químicas, tales como por ejemplo tri-, di- y mono-glicéridos, PEG- o PPG-glicéridos, sacárido-glicéridos, ácidos grasos y sus mezclas.

Sorprendentemente, se ha observado que la carga máxima de péptidos y/o proteínas se puede obtener utilizando una matriz lipídica que tiene un alto contenido en monoglicéridos, lo que confiere propiedades anfífilas a las micropartículas lipídicas. Se ha encontrado que la cantidad de monoglicéridos de dicha matriz lipídica debería ser de 70% p/p como mínimo, particularmente de 75 a 99% p/p. Por tanto, según la presente invención, se puede utilizar cualquiera de los lípidos mencionados antes o cualquier mezcla de uno o más de ellos, siempre que la cantidad total de monoglicéridos sea de 70% como mínimo, como se ha explicado antes.

65

* El documento DE 198 19 273 por Pharmatec International, describe un portador del fármaco que comprende micropartículas lipídicas cargadas con ciclosporina o derivados de la misma. En particular, describe el uso de lípidos naturales o sintéticos tales como mono-, di- o tri-glicéridos y sus mezclas para la preparación de tales micropartículas junto con algunos otros excipientes.

ES 2 290 095 T3

Las micropartículas lipídicas de la invención pueden incluir también excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como polímeros que tienen propiedades bioadhesivas o mejoradoras de la absorción y seleccionados del grupo que comprende o consiste en polímeros acrílicos (Carbopol[®], polycarbofil, Noveon[®]), ácidos grasos de cadena media y polietilenglicoles. Los excipientes preferidos son los polímeros acrílicos mencionados antes.

Según una realización preferida de la invención, el contenido total de lípidos de las micropartículas es de 90% como mínimo, más preferiblemente 95% p/p.

Una lista no limitativa de los mencionados péptidos que actúan como antagonistas de la LHRH, incluye los siguientes compuestos:

- Abarelix (descrito en el documento WO 9640757), actúa como antagonista de la LHRH y se define por la fórmula que sigue:

D-Alaninamida, N-acetil-3-(2-naftalenil)-D-Ala-4-Cl-D-Phe-3-(3-piridinil)-D-Ala-L-Ser-N-metil-L-Tyr-D-Asn-L-Leu-N6-(1-metiletil)-L-Lys-L-Pro.

- Antarelix (descrito en el documento WO 9219651), actúa como antagonista de la LHRH y se define por la siguiente fórmula:

D-Alaninamida, N-acetil-3-(2-naftalenil)-D-Ala-4-Cl-D-Phe-3-(3-piridinil)-D-Ala-L-Ser-L-Tyr-N6-(aminocarbonil)-D-Lys-L-Leu-N6-(1-metiletil)-L-Lys-L-Pro.

- Azaline B (descrito en el documento U.S. 5296468), actúa como antagonista de la GnRH y se define por la siguiente fórmula:

D-Alaninamida, N-acetil-3-(2-naftalenil)-D-Ala-4-Cl-D-Phe-3-(3-piridinil)-D-Ala-L-Ser-4-[(5-amino-1H-1,2,4-triazol-3-il)amino]-L-Phe-4-[(5-amino-1H-1,2,4-triazol-3-il)amino]-D-Phe-L-Leu-N6-(1-metiletil)-L-Lys-L-Pro.

- Ganirelix (descrito en el documento EP 277829), actúa como antagonista de la LHRH y se define por la siguiente fórmula:

D-Alaninamida, N-acetil-3-(2-naftalenil)-D-Ala-4-Cl-D-Phe-3-(3-piridinil)-D-Ala-L-Ser-L-Tyr-N6-[bis(etilamino)metilen]-D-Lys-L-Leu-N6-[bis(etilamino)metilen]-L-Lys-L-Pro.

En una realización más preferida de la presente invención, dicho péptido que actúa como antagonista de la LHRH es un decapeptido específico denominado Antide. Este decapeptido (N-Ac-D-2-NaI, D-pClPhe, D-3-Pal, NicLys, D-NicLys, Ilys, D-Ala, NH₂) tiene una excelente actividad antiovulatoria así como propiedades antagonistas de la LHRH y ha sido ya descrito (EP 377665 y U.S. 5470947) como actuante directo sobre el metabolismo hormonal de la mujer.

Otro péptido particular preferido que actúa como antagonista de la LHRH es otro decapeptido denominado Cetrotide, (cuya denominación INN es Cetrorelix descrito en el documento EP 299402) que tiene la siguiente fórmula:

D-Alaninamida, N-acetil-3-(2-naftalenil)-D-Ala-4-Cl-D-Phe-3-(3-piridinil)-D-Ala-L-Ser-L-Tyr-N5-(aminocarbonil)-D-ornitil-L-Leu-L-Arg-L-Pro.

Por lo tanto, se señala en esta invención que las micropartículas lipídicas cargadas con péptidos o proteínas son ciertamente adecuadas para ser usadas como un medicamento, para la preparación de una composición farmacéutica. Cuando el péptido es un decapeptido que actúa como antagonista de la LHRH, la composición farmacéutica será útil para la modulación del metabolismo hormonal en un mamífero o para el tratamiento o prevención de trastornos asociados con una actividad anormal del metabolismo hormonal en la mujer. Más específicamente, para el tratamiento o prevención de trastornos asociados con una actividad anormal de la ruta de la LHRH. En este caso específico, las micropartículas lipídicas cargadas con péptidos son útiles para el tratamiento de enfermedades hormonales, estados patológicos o métodos anticonceptivos en los cuales el antagonismo de la LHRH desempeña un importante papel, tal como agente anticonceptivo para inhibir la ovulación en los mamíferos o inhibir el crecimiento de tumores dependientes de las hormonas, o la producción de testosterona en un mamífero. Las micropartículas lipídicas cargadas con péptidos se pueden emplear solas o en combinación con otros agentes farmacéuticos.

Cuando se emplean como productos farmacéuticos, las micropartículas lipídicas cargadas con péptidos o proteínas de la presente invención, se administran típicamente como una forma farmacéutica. Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas que comprenden micropartículas lipídicas cargadas con péptidos o proteínas y excipientes farmacéutica-

mente aceptables, tales como diluyentes, agentes antioxidantes, tensioactivos, co-tensioactivos, agentes viscosizantes, antimicrobianos, crio-protectores, están también dentro del alcance de la presente invención. Dichas composiciones se pueden preparar de una manera bien conocida en la técnica farmacéutica. Generalmente, las micropartículas lipídicas cargadas con péptidos o proteínas de la presente invención se administran en una cantidad terapéuticamente eficaz. La cantidad a administrar realmente será típicamente determinada por un médico, a la vista de las circunstancias relevantes, incluyendo la enfermedad a ser tratada, la vía de administración elegida, la edad, peso, y respuesta del paciente individual, la gravedad de los síntomas del paciente, y similares.

Las composiciones farmacéuticas de estas invenciones, se pueden administrar por una variedad de vías incluyendo las vías oral, intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraarterial, intraperitoneal, dérmica, sublingual, rectal, bucal, vaginal, nasal o pulmonar. La vía subcutánea es la vía de administración preferida según la invención.

Dependiendo de la vía de administración elegida, los compuestos se pueden formular como formas líquidas o como formas sólidas. Las composiciones para administración oral pueden tomar la forma de soluciones o suspensiones líquidas a granel, o de polvos a granel.

Las formas líquidas adecuadas para administración oral pueden incluir vehículos adecuados acuosos o no acuosos junto con tampones, agentes de suspensión y dispensación, colorantes, aromatizantes y similares.

Las formas sólidas pueden incluir, por ejemplo, cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente desintegrante tal como ácido algínico, Primogel, o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como esencia de menta, salicilato de metilo, o esencia de naranja.

Las composiciones inyectables se basan típicamente en solución salina estéril inyectable o solución salina tamponada con fosfato u otros vehículos inyectables conocidos en la técnica.

Otro objeto de la presente invención es un procedimiento para preparar las micropartículas lipídicas cargadas con un péptido o una proteína, que se han expuesto antes. Según un método preferido de producción, las micropartículas lipídicas cargadas con un péptido o una proteína de la presente invención, se pueden preparar por un nuevo procedimiento de fabricación por micronización criogénica para las micropartículas lipídicas que comprenden una sustancia biológicamente activa, preferiblemente un péptido y su uso como una composición farmacéutica.

Dicho nuevo procedimiento se puede considerar como un nuevo modo de obtener un sistema adecuado de administración que comprende un péptido, particularmente decapeptido, y caracterizado por su liberación sostenida. (*Eur. J. Pharm. Biopharm.* 41 (1995) (1) pp. 62-69 y *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 45 (1998) pp.149-155).

Según una realización de la presente invención, el procedimiento de fabricación de las micropartículas lipídicas comprende las etapas de:

- carga del lípido con un fármaco solubilizado en un disolvente;
- eliminación del disolvente;
- enfriamiento de la matriz lipídica cargada con el fármaco;
- pre-reducción por molienda del material así obtenido;
- micronización criogénica realizada después de enfriar, moler y tamizar.

Según otra realización de la invención, el procedimiento de fabricación de las micropartículas lipídicas comprende las etapas de:

- carga de dicho péptido en el lípido fundido;
- enfriamiento de la matriz lipídica cargada con el fármaco;
- pre-reducción por molienda del material así obtenido;
- micronización criogénica realizada después de enfriar, moler y tamizar.

Con respecto al procedimiento de molienda mencionado antes de la última etapa, dicha molienda es un método básico para la reducción del tamaño de partícula de los polvos durante la producción de formas farmacéuticas sólidas (Lachman L. and Lieberman H., *Lea & Febiger* (1986), pp. 21-46). Sin embargo con los últimos avances en el equipo (molinos de alta velocidad, micronizadores, clasificadores en línea) ahora es posible alcanzar con la molienda partículas en el intervalo de las micras y sub-micras con dimensiones y distribución del tamaño controlados.

ES 2 290 095 T3

De forma bastante sorprendente, la molienda se cita raramente como procedimiento de fabricación de micropartículas lipídicas. Cuando la preparación de las micropartículas incluye el uso de polímeros, las fuerzas de impacto/fricción que surgen durante la molienda no son eficientes como medio para la reducción del tamaño de partícula. Esto es debido a la estructura de los polímeros más comúnmente usados, que presentan características gomosas (sucesos de transición vítrea) que disminuyen la eficiencia de la reducción del tamaño de partícula por los métodos de molienda (Geze *et al. Int. J. Pharm.* (1999) pp. 257-268 y Domb *et al. Handbook of Biodegradable Polymers* Harwood Academic Publishers (1997) pp. 3-29).

Por el contrario, cuando se manejan lípidos, debido a su diferente estructura física, que se caracteriza por un cierto grado de cristalinidad, la aplicación de las fuerzas de impacto/fricción, y por tanto de la técnica de molienda, se puede usar de forma satisfactoria.

Por tanto la micronización se puede anticipar como un método alternativo de fabricación para obtener micropartículas de material lipídico, que podría aportar notables ventajas, especialmente cuando se tienen que incorporar péptidos/proteínas.

Además, otra ventaja del procedimiento de micronización es la posibilidad de operar en condiciones criogénicas (“micronización criogénica”), que puede ser útil cuando se trata de fármacos termosensibles (esto es, péptidos, proteínas), materiales con baja temperatura de transición vítrea o bajo punto de fusión, tales como mezclas de lípidos o materiales compuestos con propiedades físico-químicas próximas a la estructura polimérica.

Según un método de producción más preferido, las micropartículas lipídicas cargadas con péptidos de la presente invención, se preparan según la técnica de eliminación del disolvente:

- carga del lípido con el péptido co-solubilizado en el disolvente orgánico;
- eliminación del disolvente;
- enfriamiento de la matriz lipídica cargada con el fármaco;
- pre-reducción por molienda de la matriz así obtenida;
- micronización criogénica;
- molienda y tamizado de las micropartículas así obtenidas.

Según otra realización preferida de la invención, el disolvente usado se selecciona del grupo que consiste en agua, etanol, propanol, alcohol bencílico, isopropanol, o una de sus mezclas, particularmente una mezcla de etanol y alcohol bencílico y más particularmente alcohol bencílico.

En una realización preferida de la invención, la evaporación del disolvente se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 30°C y 90°C, preferiblemente entre 40°C y 80°C y más preferiblemente entre 55°C y 75°C.

Según un método de producción preferido, las micropartículas lipídicas cargadas con péptidos se preparan según la técnica de co-fusión que comprende las etapas que siguen:

- carga del péptido en el lípido fundido;
- enfriamiento de la matriz lipídica cargada con el fármaco;
- pre-reducción del tamaño por molienda de la matriz así obtenida;
- micronización criogénica;
- molienda y tamizado de las micropartículas así obtenidas.

La etapa de pre-reducción de la matriz lipídica se realiza con molino de martillos, molino de cuchillos o molino oscilante.

En la etapa de micronización criogénica, se lleva a cabo el enfriamiento a una temperatura comprendida en el intervalo de -196°C a 0°C, particularmente de -80°C a -20°C y más particularmente de -50°C a -30°C **, antes de que la matriz lipídica cargada con el fármaco sea micronizada. El tamaño de las micropartículas así obtenidas está comprendido en un intervalo de 1 µm a 500 µm, particularmente de 1 µm a 300 µm, más particularmente de 1 a 100 µm y especialmente de 5 a 50 µm.

** El enfriamiento a estas temperaturas se puede realizar insuflando nitrógeno líquido

ES 2 290 095 T3

Con respecto a la etapa de tamizado, esta operación depende de los requerimientos de tamaño de partícula y del tipo de molino usado y el tamaño de partícula del producto obtenido por micronización ya puede ser adecuado para algunas aplicaciones y por tanto no es necesario el tamizado.

5 Un problema común con la liberación del fármaco desde las microesferas es conocido como el “efecto *burst*” (o de liberación inicial rápida) cuando un gran porcentaje (30-70%) de la carga total se puede liberar de las partículas en un corto periodo de tiempo (1 h o menos). Se cree que esto es debido a la liberación rápida del fármaco que está cerca de la superficie de las microesferas o a matrices muy porosas o a la rápida erosión del material polimérico.

10 De forma bastante sorprendente, se ha observado que las micropartículas lipídicas cargadas con Antide y obtenidas por el procedimiento según la invención mostraban una liberación sostenida *in vivo* durante al menos 1 mes, con un efecto *burst* inicial que podría ser controlado y modulado (menos del 10% de fármaco liberado en 24 horas), tanto por las condiciones de fabricación operativas (esto es, método de incorporación) como por las características físico-químicas de los materiales (esto es, composición de los glicéridos), como se muestra en la Figura 5. Sorprendentemente, estos dos factores afectan al ordenamiento estructural de la propia matriz lipídica y de la matriz cargada con el fármaco, lo que da como resultado la posibilidad de controlar la liberación del fármaco y ajustar la liberación inicial (el *burst*) a los valores deseados. Además se ha observado que un alto contenido en monoglicéridos de la fase lipídica produce un “efecto *burst*” inicial más bajo (véase la Figura 10).

20 Este párrafo proporciona abreviaturas y definiciones de los diferentes términos biológicos y analíticos así como las abreviaturas usadas a lo largo de esta solicitud de patente y se pretenden aplicar uniformemente a lo largo de la memoria descriptiva y reivindicaciones a menos que se indique expresamente otra cosa.

25 “Anfífilo” se refiere a un compuesto que tiene afinidad por dos ambientes diferentes -por ejemplo una molécula con regiones hidrófilas (polares) y lipófilas (no polares). Los detergentes son ejemplos clásicos.

“Antide”, para el cual Iturelix es el propuesto INN, se refiere al siguiente decapeptido: N-Ac-D-2-NaI, D-*p*ClPhe, D-3-Pal, Ser, NicLys, D-NicLys, Leu, Ilys, Pro, D-Ala, NH₂.

30 “Efecto *burst*” se refiere a un problema común con la liberación del fármaco desde las microesferas donde un gran porcentaje (50-70%) de la carga total puede ser liberado de las partículas en un corto periodo de tiempo (1 h). Esto es debido a la rápida liberación del material que no está correctamente embebido en las microesferas.

“Técnica de co-fusión”: técnica que permite cargar un fármaco en un material fundido determinado en fase líquida.

35 “2-NaI” se refiere a 3-(2-naftil)alanina

“Ilys” se refiere a N-isopropil-lisina

40 “NicLys” se refiere a N-nicotinoil-lisina

“3-Pal” se refiere a 3-(3-piridil)alanina

45 “DMPC” se refiere a dimiristoil-fosfatidil-colina

“DMPG” se refiere a dimiristoil-fosfatidil-glicerol

“Glicéridos” significa ésteres de glicerol de ácidos grasos C₄-C₃₀ saturados o insaturados

50 “HPH” se refiere a homogenización de alta presión

“LD” se refiere a difracción láser

“LHRH” se refiere a hormona liberadora de la hormona luteinizante

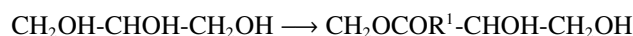
55 “Lípido”, según la presente invención, se refiere a una sustancia que es poco soluble en agua pero es soluble en disolventes orgánicos. Según la presente invención, los lípidos incluyen ácidos grasos, mono- di- y tri-glicéridos, fosfolípidos, PEG-glicéridos, sacárido-glicéridos o ceras y sus mezclas. Según la invención, siempre se busca que la matriz lipídica sea farmacéuticamente aceptable.

60 “LM” se refiere a micropartículas lipídicas.

“Micropartículas” se refiere a partículas cuyo diámetro medio está comprendido en un intervalo entre 3 μm y 500 μm.

65 “Monoglicéridos” se refiere a compuestos obtenidos aplicando la esterificación por un ácido graso de una de las funciones alcoholílicas del glicerol tal como se muestra a continuación:

ES 2 290 095 T3



Glicerol

Monoglicérido

5 donde R¹ es una cadena hidrocarbonada C₄-C₃₀ saturada o insaturada;

o por hidrólisis parcial de los triglicéridos.

“NMR” se refiere a resonancia magnética nuclear.

10

“PCS” se refiere a espectroscopía de correlación fotónica.

“PEG” se refiere a polietilenglicol.

15

“Péptido” significa una cadena principal de poliamida que contiene átomos de carbono en disposición tetrahédrica entre los grupos amida. La cadena peptídica se obtiene a partir de la condensación de aminoácidos: el grupo amino de uno se une con el grupo carboxilo del próximo, formando un enlace peptídico.

20

“Farmacéuticamente aceptable” significa que incluye cualquier sustancia, que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica del ingrediente activo y que no es tóxica para el receptor a quien se administra.

25

“Proteínas” se refiere a una molécula que comprende una secuencia polipeptídica de aminoácidos. La principal distinción entre péptidos y proteínas es el tamaño. Según la presente invención, los péptidos no contienen más de 100 aminoácidos, mientras que las proteínas contienen más de 100 aminoácidos.

“Sacárido” se refiere a un grupo aldehído o a un grupo cetona que tiene al menos dos grupos hidroxilo, adoptando dicho sacárido varias formas: forma de monómero (monosacárido), forma de dímero (disacárido), forma de trímero (trisacárido), oligómero (oligosacárido) y polímero (polisacárido).

30

“Técnica de eliminación del disolvente”: técnica que permite cargar el fármaco (esto es, el péptido), solubilizado en un disolvente, en un material portador (esto es, lípido) fundido o solubilizado en un disolvente.

35

“Cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad que es suficiente para afectar al curso y a la gravedad de las enfermedades descritas antes, llevando a la reducción o remisión de dicha patología. La cantidad eficaz dependerá de la vía de administración y del estado del paciente.

“p/p” se refiere a peso/peso.

40

La presente invención se ilustra por algunos ejemplos, que demuestran la posibilidad de usar diferentes procedimientos con diferentes lípidos para conseguir diferentes cargas de fármaco y para obtener diferentes velocidades de liberación. Los Ejemplos harán referencia a las siguientes Figuras.

Descripción de los dibujos

45 Figura 1

Esta figura se refiere a la tensión superficial de soluciones acuosas de Antide a diferentes concentraciones del fármaco.

50 Figura 2

Evaluación de la bioactividad *in vitro* de Antide incorporado en diferentes matrices lipídicas.

Formulación A = Matriz de Compritol E ATO cargada con 2% de Antide por co-fusión.

55

Formulación B = Matriz de Compritol E ATO cargada con 2% de Antide con eliminación del disolvente.

Figura 3

60

Curvas de frecuencia LD (forma de campana) y de volumen por debajo de lo normal (forma sigmoideal) de las micropartículas lipídicas de Imwitor 900 cargadas con 2% de Antide por co-fusión (a), y de las micropartículas lipídicas de Compritol E ATO cargadas con 2% de Antide con eliminación del disolvente (b).

Figura 4

65

Espectros ¹³C-NMR en estado sólido obtenidos en el fármaco a granel (B) y en la matriz de Imwitor 900 con disolvente eliminado, que contiene 20% de Antide (A).

ES 2 290 095 T3

Figura 5

Espectros ^{13}C -NMR en estado sólido obtenidos en el fármaco a granel (B) y en la matriz de Imwitor 900 de co-fusión, que contiene 10% de Antide (A).

5

Figura 6

Perfiles acumulativos de liberación de Antide de diferentes matrices lipídicas cargadas con el 2% (p/p) de Antide.

Figura 7

Liberación de Antide de matrices de Compritol E ATO con eliminación del disolvente, a diferentes cargas de fármaco.

Figura 8

Perfiles de concentración plasmática de Antide /tiempo después de administración s.c. *in vivo* en ratas de matrices lipídicas cargadas con el 2% de Antide.

Figura 9

Esta figura se refiere a niveles plasmáticos de testosterona después de administración s.c. en ratas de las cuatro formulaciones de micropartículas lipídicas mencionadas en la descripción previa de la figura.

25 Formulación 1: Antide (2% p/p)-Compritol E ATO (disolvente eliminado)

Formulación 2: Antide (2% p/p)-Imwitor 900 (disolvente eliminado)

Formulación 3: Antide (2% p/p)-Compritol E ATO (co-fundidos)

30

Formulación 4: Antide (2% p/p)-Imwitor 900 (co-fundidos)

Figura 10

35 Esta Figura muestra los perfiles de liberación en agua de LM-Antide 2%-Compritol C888 (lote 93) y LM-Antide 2%-Compritol E ATO (lote 106). El Compritol 888 tiene un contenido de monoglicérido entre 12 y 18% mientras que el Compritol E ATO tiene un contenido de monoglicérido de aproximadamente 80%.

Ejemplos

40

El péptido usado en los Ejemplos detallados a continuación es Antide. Este péptido tiene características anfífilas, como se demuestra por los siguientes datos:

45 *Análisis de tensión superficial:* la medida de la tensión superficial se llevó a cabo usando un tensiómetro Kruss (sistema de análisis de la forma de la gota) sobre soluciones acuosas de Antide a diferentes concentraciones de fármaco, concretamente 0,01, 0,1, 1,0, 10 mM. Los resultados se muestran en la Figura 1.

50 *Coefficiente de reparto:* Se determinó usando octanol como fase orgánica y agua como fase hidrófila. Las dos fases se saturaron en primer lugar una con otra durante 24 horas a temperatura ambiente. Se disolvió después Antide en la fase acuosa a una concentración muy por debajo de la saturación. Se añadió seguidamente un volumen igual de fase orgánica a la fase acuosa y se mantuvo la mezcla en agitación durante 24 horas a temperatura ambiente. Se determinó la concentración de Antide en las dos fases por RP-HPLC y se obtuvo el coeficiente de reparto de la relación entre la concentración de fármaco en la fase orgánica y acuosa.

55 El coeficiente resultante octanol/agua fue $8,56 \cdot 10^{-2}$

Los resultados de la evaluación semi-cuantitativa de la solubilidad de Antide en algunos lípidos, junto con el contenido en monoglicéridos del lípido se muestran en la Tabla 1.

60 *Materiales y equipo*

Antide a granel, Bachem.

Imwitor 900 (monoestearato de glicerilo), Condea Chemie-DE.

65

Compritol E ATO (monobehenato de glicerilo), Gattefossé-FR.

Compritol 888 ATO (behenato de glicerilo), Gattefossé-FR.

ES 2 290 095 T3

Imwitor 312 (monoglicérido de ácido láurico), Condea Chemie-DE.

Imwitor 928 (mono-/di-cocoato de glicerilo), Condea Chemie-DE.

5 Geleol (mono-palmitato/estearato de glicerilo), Gattefossé-FR.

Compritol HD 5 ATO (behenato de glicerilo/polietilenglicol), Gattefossé-FR.

Superpolystate (estearato de polietilenglicol), Gattefossé-FR.

10

Precirol ATO 5 (mono-/di-/tri-palmitato/estearato de glicerilo), Gattefossé-FR.

Witepsol E 85 (tri-glicéridos de ácidos grasos C₁₀-C₁₈ saturados), Massa Witepsol

15

Softisan 142 (coco-glicéridos hidrogenados), Condea Chemie-DE.

Gelot 64 (palmitato/estearato de glicerilo/polietilenglicol), Gattefossé-FR.

Monosteol (palmitato/estearato de propilenglicol), Gattefossé-FR.

20

Gelucire 44/14 (mezcla definida de mono-/di-/tri-ésteres de ácido láurico con glicerol y polietilenglicol), Gattefossé-FR.

25

Gelucire 50/13 (mezcla definida de mono-/di-/tri-ésteres de ácido esteárico con glicerol y polietilenglicol), Gattefossé-FR.

Alcohol cetílico, Sigma

Etanol, Merck-D

30

Alcohol bencílico, Sigma-USA

Formulación líquida de IFN- β (REBIF®-Serono)

35

Estufa de vacío OVAO31.XX1.5, Sanyo Gallenkamp; bomba de vacío LA.12, D.V.P. Vacuum Technology

Sistema de autotamizado, Retsch AS 200

Laser Diffractometer Mastersizer Microplus MAF 5001, Malvern

40

Sistema Waters HPLC: módulo de separación 2690; columna RP, Jupiter 5 μ m C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m); detector de absorbancia 2487 Dual λ

Molino criogénico Apex, Mod. MPX3: adaptado como se describe a continuación.

45

El molino criogénico usado para estos estudios es un molino de martillos convencional equipado con una boquilla adecuada para la introducción de un gas de enfriamiento (esto es, N₂ líquido) en la cámara. Después de ensayos preliminares de molienda, se realizó una adaptación en el molino, con el fin de hacerle más adecuado para las necesidades. Se hicieron las siguientes modificaciones:

50

- introducción de una sonda termométrica para la medida de la temperatura en la cámara de molienda;
- sellado de la criba del fondo con una paleta cegada para evitar la pérdida de polvo desde la cámara de molienda;
- 55 - instalación de un pistón para la introducción del polvo a la cámara de molienda; y
- conexión al tanque de N₂ líquido mediante una tubería termo-aislada.

60 Ejemplo 1

Micropartículas lipídicas cargadas con 2% de fármaco, preparadas por la técnica de eliminación de disolvente usando Compritol E ATO como matriz lipídica

65

El péptido (Antide) y el lípido (Compritol E ATO) en una relación p/p de 2:98 se solubilizaron a 85°C en el disolvente orgánico (mezcla de alcohol bencílico y etanol, 1:5) con agitación. Se evaporó el disolvente bajo vacío a 80°C. Se enfrió entonces la matriz lipídica hasta temperatura ambiente, se pre-trituró y se micronizó en condiciones criogénicas. Finalmente se tamizaron las microesferas a 125 μ m y se recogieron.

ES 2 290 095 T3

Ejemplo 2

Micropartículas lipídicas cargadas con 2% de fármaco, preparadas por la técnica de eliminación de disolvente usando Imwitor 900 como matriz lipídica

5 El péptido (Antide) y el lípido (Imwitor 900) en una relación p/p de 2:98 se solubilizaron a 80°C en el disolvente orgánico (mezcla de alcohol bencílico y etanol, 1:2) con agitación. Se evaporó el disolvente bajo vacío a 60°C. Se enfrió entonces la matriz lipídica hasta temperatura ambiente, se pre-trituró y se micronizó en condiciones criogénicas. Finalmente se tamizaron las microsferas a 125 µm y se recogieron.***

10

Ejemplo 3

Micropartículas lipídicas cargadas con 2% de fármaco, preparadas por la técnica de co-fusión usando Compritol E ATO como matriz lipídica

15

El péptido (Antide) se incorporó al lípido fundido (Compritol E ATO) con agitación (la relación p/p fármaco-lípido fue 2:98). La matriz lipídica se enfrió entonces en un baño de hielo, se pre-trituró y se micronizó en condiciones criogénicas. Finalmente las microsferas se tamizaron a 125 µm y se recogieron.

20 Ejemplo 4

Micropartículas lipídicas cargadas con 2% de fármaco, preparadas por la técnica de co-fusión usando Imwitor 900 como matriz lipídica

25 El lípido (Imwitor 900) se fundió a 15°C por encima de su punto de fusión. Después se incorporó el péptido (Antide) al lípido fundido con agitación (la relación p/p fármaco-lípido fue 2:98). La matriz lipídica se enfrió entonces en un baño de hielo, se pre-trituró y se micronizó en condiciones criogénicas. Finalmente las microsferas se tamizaron a 125 µm y se recogieron.***

30 Ejemplo 5

Micropartículas lipídicas (LM) cargadas con IFN-Beta, preparadas por la técnica de co-fusión usando Imwitor 900 y Imwitor 312 (25:75) como matriz lipídica

35 Se mezclaron en estado sólido Imwitor 900 y Imwitor 312 en forma de polvo y después se co-fundieron en un baño de agua con termostato a 58°C ± 2°C. Se añadió la formulación líquida de IFN-beta (245 µg/ml) al lípido fundido mantenido a 58°C ± 2°C y se dejó que se disolviera en 20 minutos con un mezclado suave. Después se enfrió espontáneamente la masa a temperatura ambiente, se redujo manualmente a partículas gruesas y se almacenó a -80°C. Antes de moler la formulación lipídica de IFN-beta se mantuvo a -80°C durante al menos 12 horas. Se realizó la molienda usando como condiciones de operación una velocidad del rotor de 18000 rpm y un tamaño de tamiz de 0,5 mm. El material triturado se almacenó a 4°C. Las micropartículas lipídicas se caracterizaron con su distribución de tamaño de partícula usando un difractor láser. Los resultados del análisis de tamaño de partícula se dan en la Tabla 6.

45 Ejemplo 6

Micropartículas lipídicas cargadas con 10% de fármaco, preparadas por la técnica de eliminación de disolvente usando Compritol E ATO como matriz lipídica

50 El péptido (Antide) y el lípido (Compritol E ATO) en una relación p/p de 1:9 se solubilizaron a 85°C en el disolvente orgánico (alcohol bencílico) con agitación. Se evaporó el disolvente bajo vacío a 85°C. Se enfrió entonces la matriz lipídica hasta temperatura ambiente, se pre-trituró y se micronizó en condiciones criogénicas. Finalmente se tamizaron las microsferas a 125 µm y se recogieron.

55 Ejemplo 7

Micropartículas lipídicas cargadas con 20% de fármaco, preparadas por la técnica de eliminación de disolvente usando Compritol E ATO como matriz lipídica

60 El péptido (Antide) y el lípido (Compritol E ATO) en una relación p/p de 1:4 se solubilizaron a 85°C en el disolvente orgánico (alcohol bencílico) con agitación. Se evaporó el disolvente bajo vacío a 85°C. Se enfrió entonces la matriz lipídica hasta temperatura ambiente, se pre-trituró y se micronizó en condiciones criogénicas. Finalmente se tamizaron las microsferas a 125 µm y se recogieron.

65

*** las microsferas así obtenidas no forman parte de la invención reivindicada

ES 2 290 095 T3

Ejemplo 8

Micropartículas lipídicas cargadas con 2% de fármaco, preparadas por la técnica de co-fusión usando Compritol 888 ATO como matriz lipídica

5

El péptido (Antide) se incorporó al lípido fundido (Compritol 888 ATO) con agitación (la relación p/p fármaco-lípido fue 2:98). La matriz lipídica se enfrió entonces en un baño de hielo, se pre-trituró y se micronizó en condiciones criogénicas. Finalmente se tamizaron las microesferas a 125 μm y se recogieron.***

10 Ejemplo 9

Micropartículas lipídicas cargadas con 2% de fármaco, preparadas por la técnica de eliminación de disolvente usando Compritol 888 ATO como matriz lipídica

15 El péptido (Antide) y el lípido (Compritol 888 ATO) en una relación p/p de 2:98 se solubilizaron a 85°C en el disolvente orgánico (alcohol bencílico) con agitación. Se evaporó el disolvente bajo vacío a 85°C. Se enfrió entonces la matriz lipídica hasta temperatura ambiente, se pre-trituró y se micronizó en condiciones criogénicas. Finalmente se tamizaron las microesferas a 125 μm y se recogieron.***

20 Ejemplo 10

Micropartículas lipídicas cargadas con 10% de fármaco, preparadas por la técnica de eliminación de disolvente usando Compritol 888 ATO como matriz lipídica

25 El péptido (Antide) y el lípido (Compritol 888 ATO) en una relación p/p de 1:9 se solubilizaron a 85°C en el disolvente orgánico (alcohol bencílico) con agitación. Se evaporó el disolvente bajo vacío a 85°C. Se enfrió entonces la matriz lipídica hasta temperatura ambiente, se pre-trituró y se micronizó en condiciones criogénicas. Finalmente las microesferas se tamizaron a 125 μm y se recogieron.*** La caracterización de las micropartículas lipídicas preparadas como se describe en los Ejemplos 1-10 se detalla más adelante.

30

Ejemplo 11

Determinación de la eficiencia de encapsulación

35 El contenido de Antide en las micropartículas lipídicas se determinó por RP-HPLC: 50 mg de micropartículas lipídicas cargadas con Antide se disolvieron en primer lugar en 5 ml de acetona, se agitaron y se sonicaron durante 2 minutos. Se añadieron 5 ml de agua destilada a la solución de acetona. La mezcla obtenida se sonicó durante 2 minutos y posteriormente se centrifugó durante 15 minutos a 8000 rpm.

40 La solución transparente se inyectó en la columna de HPLC. Los valores de la eficiencia de encapsulación para algunas de las formulaciones de micropartículas lipídicas se presentan más adelante. La eficiencia de encapsulación se calculó como sigue:

45
$$\% \text{ eficiencia de encapsulación} = \frac{\text{contenido de fármaco (ensayo HPLC)}}{\text{contenido teórico de fármaco}} \times 100$$

Como se describe en la Tabla 2, se puede ver que se consiguió una eficiencia de encapsulación satisfactoria con ambos métodos de incorporación del fármaco y con ambos lípidos ensayados.

50 Ejemplo 12

Determinación de la estabilidad del péptido dentro de la matriz lipídica

55 Se determinó el contenido en fármaco de las micropartículas lipídicas por RP-HPLC, como se ha descrito en la sección previa, para dos formulaciones de Imwitor 900 cargadas con Antide a t = 0 y t = 3 meses, y los resultados se muestran en la Tabla 3.

Ejemplo 13

60 *Caracterización físico-química de las micropartículas*

Se hizo una caracterización físico-química completa de las micropartículas lipídicas evaluando su distribución de tamaño de partícula (determinada mediante análisis por difractorómetro láser), análisis de superficie de las matrices lipídicas e investigaciones NMR. Se determinó también el rendimiento en peso de partículas por debajo de 125 μm , ya que esta fracción es adecuada para la administración sub-cutánea.

65

*** las microesferas así obtenidas no forman parte de la invención reivindicada

ES 2 290 095 T3

El tamaño de partícula y la distribución de tamaño de partícula de la formulación de micropartículas lipídicas cargadas con Antide, se evaluaron por difracción láser (LD), usando el difractor láser de Malvern. Se dispersó una pequeña cantidad de micropartículas lipídicas (aproximadamente 40 mg) en 50 μ l de Tween 20 y después se diluyó en 5 ml de agua desionizada, para obtener así un valor de oscurecimiento entre 5% y 30%. Se mantuvo la muestra en circulación dentro de la unidad de dispersión durante el análisis. Se hicieron al menos tres medidas para cada muestra y se procesaron los datos usando el modelo de difracción de Fraunhofer.

Ejemplos de curvas de frecuencia de LD y los parámetros $D(v, 0,1)$, $D(v, 0,5)$ y $D(v, 0,9)$, que definen la distribución de tamaño de la población como sigue:

$D(v, 0,1)=10\%$ (en volumen) de las partículas tienen un tamaño por debajo de este valor;

$D(v, 0,5)=50\%$ (en volumen) de las partículas tienen un tamaño por debajo de este valor;

$D(v, 0,9)=90\%$ (en volumen) de las partículas tienen un tamaño por debajo de este valor;

se muestran en la Figura 3 y en la Tabla 4. Como se puede ver, ambos métodos de fabricación produjeron una distribución similar de tamaño de micropartículas, principalmente comprendida entre 1 y 125 μ m.

El análisis del ángulo de contacto de las matrices lipídicas se llevó a cabo usando un tensiómetro de Kruss (sistema de análisis de la forma de la gota). El ángulo de contacto es el ángulo entre una gotita líquida y la superficie sobre la que se extiende. Puede ser 0° , lo que significa humectación completa, o 180° , en el que la humectación es insignificante. El ángulo de contacto puede tener también cualquier valor entre estos límites.

Se llevó a cabo el análisis usando agua y preparando las matrices lipídicas según los métodos de fabricación descritos. La comparación de los resultados del análisis de superficie de las matrices lipídicas cargadas con Antide, con disolvente eliminado y co-fundidas, se presenta en la Tabla 5.

Sorprendentemente, los dos métodos de fabricación dieron valores θ^o muy diferentes, lo que significa que las matrices con eliminación del disolvente son bastante menos humedecibles por agua (más lipófilas) que las matrices de co-fusión (más hidrófilas), e indica igualmente un ordenamiento estructural muy diferente del componente lipídico en la matriz y en las partículas. La presencia del fármaco no modificó significativamente las características superficiales de las matrices lipídicas. Se puede esperar por tanto que las propiedades de humectabilidad de la matriz no se ven afectadas por el fármaco incorporado.

Las matrices lipídicas se caracterizaron por análisis NMR en estado sólido. Los espectros ^{13}C -NMR de configuración de Antide en el fármaco a granel y en las matrices lipídicas preparadas según las técnicas mencionadas, se muestran en las figuras 4 y 5. Sorprendentemente, los picos anchos (residuos 3, 5, 6 en piridina) observados en el Antide a granel están aún presentes cuando se incorpora el fármaco por medio del método de eliminación del disolvente, mientras que los mismos picos son significativamente más agudos cuando se carga el fármaco por la técnica de co-fusión. Esto demuestra que la estructura del fármaco dentro de las dos matrices y el orden estructural del sistema total fármaco-lípido depende del método de fabricación usado y de la composición. Esto se podría atribuir a la presencia de "microdominios" de moléculas de fármaco cuando se usa la co-fusión. Por el contrario se forma una "solución sólida" verdadera por la eliminación del disolvente.

Ejemplo 14

Evaluación del patrón de liberación cinética in vitro

La liberación de Antide desde las micropartículas lipídicas se evaluó usando agua (+ NaN_3 al 0,05% como conservante) o PBS (solución salina tamponada con fosfato) como medio de liberación. Se realizaron los experimentos suspendiendo aproximadamente 40 mg de micropartículas lipídicas en 20 ml de medio de liberación. Se mantuvieron las suspensiones con agitación en un baño de agua con termostato a 37°C . Se tomaron muestras de 1 ml a diferentes tiempos, usando una jeringa de Teflón y un filtro Acrodisc de 0,2 μ m. Las micropartículas lipídicas filtradas se volvieron al vaso, volviendo a introducir una cantidad equivalente de medio de liberación.

Los perfiles de liberación de diferentes formulaciones de micropartículas lipídicas se muestran en la Figura 6. Inesperadamente, el "efecto *burst*" se redujo espectacularmente con todas estas formulaciones. Especialmente, con algunas formulaciones se redujo hasta menos del 10% en 1 hora. Además, para todos los diferentes lípidos ensayados, las matrices privadas de disolvente, mostraron una velocidad de liberación más baja. Esto se explica por su humectabilidad en la superficie más baja, como se demuestra por la medida del ángulo de contacto, y por la presencia de grupos de fármaco en las micropartículas procedentes de co-fusión, como se muestra por los espectros ^{13}C NMR.

Especialmente, en el caso de las matrices de Compritol E ATO obtenidas por el método de eliminación del disolvente, se alcanzó una velocidad de liberación casi de "orden cero", siendo este un perfil altamente deseable en el caso de la administración a largo plazo de fármacos anti-cáncer. Este es realmente un fenómeno sorprendente, puesto que una cinética de liberación del fármaco de orden cero usualmente no es obtenible por los sistemas de microesferas biodegradables.

ES 2 290 095 T3

Asombrosamente, esta liberación de “orden casi cero” parece ser casi independiente de la carga de fármaco, al menos dentro del intervalo estudiado de 2-20% p/p. De hecho, como se puede ver en la Figura 6, la fracción de Antide liberada, así como su cinética de liberación, a partir de las micropartículas lipídicas de Compritol E ATO cargadas con el 10% dentro de las primeras 24 horas, son comparables a las obtenidas con la correspondiente matriz cargada con el 2%. Esto es bastante inesperado, puesto que se observa comúnmente que la liberación rápida inicial (*burst*) del fármaco desde los sistemas de micropartículas aumenta espectacularmente con la carga del fármaco.

Además, la liberación del fármaco desde las matrices de Compritol E ATO fue sorprendentemente más lenta que la cinética de liberación desde las matrices de Imwitor 900. Esto se puede atribuir a la diferente composición de glicéridos y a las propiedades físico-químicas del lípido portador.

Resultados biológicos

Ejemplo 15

Ensayo in vitro

Los resultados mostrados en la Figura 2 confirman que el método de preparación de las micropartículas lipídicas no causó ninguna modificación importante en la actividad del fármaco. Esto se ha demostrado en el ensayo de las células pituitarias de la rata, realizado como se describe a continuación.

Se estableció un cultivo primario de células pituitarias de rata partiendo de la digestión enzimática de las glándulas pituitarias separadas de ratas hembras. Las células recogidas se distribuyeron en placas a $2,5 \cdot 10^5$ /pocillo en placas de 24 pocillos y se cultivó durante 72 horas a 37°C y 5% de CO₂.

Se lavaron los pocillos tres veces y después se trataron durante 24 horas con 0,75, 1,5, 3, 6, y 12 ng/ml de dos formulaciones de micropartículas lipídicas con Antide o del Antide estándar de referencia propio, por triplicado. Los pocillos para el nivel basal y máximo de la LH secretada recibieron medio de cultivo solo.

A continuación, después de lavado, se renovaron las diluciones de las muestras y del Antide de referencia y se añadió LHRH (10^{-8} M) a todos los pocillos excepto a los pocillos basales que recibieron un volumen igual de medio de cultivo. Se recogió el medio de cultivo acondicionado de cada pocillo después de 4 horas de incubación (37°C, 5% de CO₂) y se almacenó a -20°C hasta que se realizó el ensayo de contenido en LH.

Para la evaluación de la LH secretada, se usó un equipo de radio-inmuno ensayo (RIA) comercial (Amersham Pharmacia Biotech). Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición de la secreción de LH por Antide.

Evaluando la inhibición *in vitro* de la secreción de LH por las micropartículas lipídicas sobre las células pituitarias de rata, se demostró que el procedimiento de fabricación de las micropartículas no reduce la integridad biológica de los péptidos. Los resultados de la Figura 2 muestran que la bioactividad de Antide se mantiene en las preparaciones ensayadas.

Ejemplo 16

Ensayo in vivo

Se han usado en el estudio ratas machos adultas (63-70 días y aproximadamente 300 g) Sprague Dawley. La dieta estuvo disponible “*ad libitum*” para todos los animales. El agua de beber también se les ofreció a los animales “*ad libitum*”.

Para ensayar las formulaciones que contienen micropartículas lipídicas de Antide, se han administrado como una única dosis subcutánea de 0,6 mg (aproximadamente 2 mg/kg) como Antide a cada grupo de ratas por vía subcutánea, las micropartículas lipídicas de Antide se han administrado en una solución acuosa de glucosa aproximadamente al 5% que contiene 0,05% de Tween 20.

El contenido de micropartículas en el vehículo fue de aproximadamente 50 mg/ml. El volumen de administración fue de 1 ml por rata.

ES 2 290 095 T3

Se siguió el siguiente diseño experimental:

		Grupo									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
5	Artículo de ensayo	Antide	Antide μ -partículas Forma 1	Antide μ -partículas Forma 2	Antide μ -partículas Forma 3	Antide μ -partículas Forma 4	Antide μ -partículas Forma 1	Antide μ -partículas Forma 2	Antide μ -partículas Forma 3	Antide μ -partículas Forma 4	Placebo μ -partículas
10	Dosis de Antide (mg)	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0
15	No. de ratas/grupo	3	3	3	3	3	36	36	36	36	12
	Muestreo de sangre	0,5, 1, 2, 4, 8, 24 h	0,5, 1, 2, 4, 8, 24 h	0,5, 1, 2, 4, 8, 24 h	0,5, 1, 2, 4, 8, 24 h	0,5, 1, 2, 4, 8, 24 h	0, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 21, 30 días	0, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 21, 30 días	0, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 21, 30 días	0, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 21, 30 días	1, 4, 8, 14, días

Formulación 1: Antide (2% p/p)-Compritol E ATO (disolvente eliminado)

Formulación 2: Antide (2% p/p)-Imwitor 900 (disolvente eliminado)

Formulación 3: Antide (2% p/p)-Compritol E ATO (co-fundidos)

Formulación 4: Antide (2% p/p)-Imwitor 900 (co-fundidos)

Se han administrado los compuestos a los animales que se mantuvieron en ayunas toda la noche anterior a la administración.

De los animales de los grupos 1-5, se extrajeron aproximadamente 0,5-1 ml de sangre de una vena sublingual o de la cola a cada tiempo de muestreo hasta las 8 horas. A las 24 horas (72 horas para el grupo 1) se anestesiaron los animales con éter y se sacrificaron por desangrado desde la aorta abdominal.

Los animales de los grupos 5-8 fueron muestreados mediante desangrado desde la aorta abdominal a los tiempos de muestreo indicados.

Se recogió la sangre en tubos heparinizados y se separó el plasma por centrifugación (2500 x g) a 4°C. El plasma obtenido al sacrificio se dividió en 3 alícuotas de 1 ml como mínimo.

Las concentraciones plasmáticas de Antide se determinaron por un método de HPLC con detección por espectrometría de masas (HPLC/MS/MS).

Se midió el marcador farmacodinámico testosterona en todas las muestras de plasma tomadas al sacrificio.

Se determinaron los niveles de testosterona usando un kit RIA de Diagnostic Product Corporation (DPC).

Se midieron los niveles plasmáticos de Antide y testosterona a diferentes tiempos después de la administración y los resultados se muestran en la Figura 8 y en la Figura 9. Dentro de las primeras 24 horas el perfil plasmático confirma la "reducción del *burst*" observada en el ensayo de velocidad de disolución *in vitro*. Durante 1 mes de observación tanto el perfil PK del fármaco como el efecto PD sobre la reducción de la testosterona estuvieron de acuerdo con el comportamiento de liberación sostenida del sistema de administración.

ES 2 290 095 T3

TABLA 1

Carga máxima de Antide en los lípidos pre-cribados, y contenido de monoglicéridos de los lípidos

LÍPIDOS			Carga
Producto	Descripción química	Contenido en monoglicérido (%)	Carga de Antide (%)
Imwitor 312	Monoglicérido de ácido láurico	95,30	2,2
Imwitor 900*	Mono-/di-estearato de glicerilo	40-50	2,0
Imwitor 928	Mono-/di-cocoato de glicerilo	43,5	$8,5 \times 10^{-1}$
Geleol	Mono-palmitato/estearato de glicerilo	35	1,8
Compritol E ATO	Mono-/di-/tri-behenato de glicerilo	80,40	1,7
Compritol 888 ATO	Behenato de glicerilo	12-18	$4,3 \times 10^{-1}$
Compritol HD 5 ATO	Behenato de glicerilo/ polietilenglicol	1	$1,7 \times 10^{-2}$
Superpolystate	Estearato de polietilenglicol	<1	$1,7 \times 10^{-1}$
Precirol ATO 5	Mono-/di-/tri-palmitato/estearato de glicerilo	8-17	$5,9 \times 10^{-2}$
Witepsol E 85	Triglicéridos de ácidos grasos C ₁₀ -C ₁₈ saturados	<1	$1,4 \times 10^{-2}$ - no soluble
Softisan 142	Cocoglicéridos hidrogenados	<1 %	$1,7 \times 10^{-2}$ - no soluble
Gelot 64	Palmitato/estearato de glicerilo/polietilenglicol	<1 %	$5,8 \times 10^{-2}$ - no soluble
Monosteol	Palmitato/estearato de propilenglicol	<1 %	$3,2 \times 10^{-2}$ - no soluble
Gelucire 44/14	Mezcla definida de mono-/di-/tri-ésteres de ácido láurico con glicerol y polietilenglicol	<1 %	$4,0 \times 10^{-2}$ - no soluble
Gelucire 50/13	Mezcla definida de mono-/di-/tri-ésteres de ácido esteárico con glicerol y polietilenglicol	<1 %	$3,0 \times 10^{-2}$ - no soluble
Alcohol cetílico	Alcohol cetílico	<1 %	$3,7 \times 10^{-2}$ - no soluble
Tagat S		<1 %	$2,7 \times 10^{-2}$ - no soluble

TABLA 2

Eficiencia de la encapsulación de algunas formulaciones de micropartículas lipídicas obtenidas con incorporación de Antide en matrices lipídicas usando dos técnicas diferentes (eliminación de disolvente y co-fusión)

	Eficiencia de la encapsulación (%)
2 % de Antide-Compritol E ATO LM (disolvente eliminado)	88,5
2 % de Antide-Imwitor 900 LM (disolvente eliminado)	89,8
2 % de Antide-Compritol E ATO LM (co-fusión)	92,0
2 % de Antide-Imwitor 900 LM (co-fusión)	92,9

ES 2 290 095 T3

TABLA 3

Contenido de Antide (% p/p) en las matrices de Imwitor obtenidas por co-fusión y por eliminación del disolvente a t = 0 y después de 3 meses, determinado por RP-HPLC

	Contenido de Antide (% p/p)	
	t = 0	t = 3 meses
Antide-Imwitor 900 LM por co-fusión	1,7	1,8
Antide-Imwitor 900 LM por eliminación del disolvente	1,7	1,7

TABLA 4

Parámetros D (v, 0,1), D (v, 0,5) y D (v, 0,9) de 2 formulaciones de micropartículas lipídicas

	D (v, 0,1) (μm)	D (v, 0,5) (μm)	D (v, 0,9) (μm)
Matriz de Imwitor 900 cargada con 2 % de Antide, por co-fusión	3,72	29,27	72,90
Matriz de Compritol E ATO cargada con 2 % de Antide, por eliminación del disolvente	6,38	40,65	94,09

TABLA 5

Comparación entre el ángulo de contacto de las matrices de Imwitor 900 (ambas, placebo y cargadas con Antide) obtenidas por dos técnicas diferentes: co-fusión y eliminación del disolvente

	Ángulo de contacto (θ°)	
	Matriz por co-fusión	Matriz por eliminación del disolvente
Matriz de Imwitor 900 con placebo	36,42°	106,37°
Matriz de Imwitor 900 cargada con 2 % de Antide	34,49°	100,53.°

TABLA 6

Distribución del tamaño de partícula en micropartículas lipídicas cargadas con IFN usando la técnica de co-fusión

	% <125 μm	D (v, 0,5) (μm)	D (v, 0,9) (μm)
	100	10,12	29,03
	100	8,78	22,23
	99,96	5,75	11,71
avg	99,99	8,22	20,99
sd	0,02	2,24	8,73

“avg” significa la media y “sd” significa la desviación estándar

ES 2 290 095 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Micropartículas lipídicas que comprenden un fármaco y una matriz lipídica, **caracterizadas** porque dicho fármaco se selecciona del grupo que consiste en un decapeptido que actúa como antagonista de LHRH y IFN-beta y dicha matriz lipídica tiene un contenido de monoglicéridos que es como mínimo el 70% p/p, estando basado el porcentaje en el peso de la matriz lipídica.
- 10 2. Las micropartículas lipídicas según la reivindicación 1, **caracterizadas** porque dicho contenido de monoglicéridos está comprendido entre 75 y 99% p/p, estando basado el porcentaje en el peso de la matriz lipídica.
- 15 3. Las micropartículas lipídicas según las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizadas** porque dicho decapeptido es N-Ac-D-2-Nal-D-pClPhe-D-3-Pal-Ser-NicLys-D-NicLys-Leu-Ilys-Pro-D-Ala-NH₂.
- 20 4. Las micropartículas lipídicas según las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizadas** porque dicho decapeptido es cetorelix.
- 25 5. Las micropartículas lipídicas según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizadas** porque dichas micropartículas comprenden también otros excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 30 6. Las micropartículas lipídicas según la reivindicación 5 **caracterizadas** porque dichos excipientes son polímeros con propiedades bioadhesivas o de mejora de la absorción seleccionados del grupo que consiste en polímeros acrílicos, ácidos grasos de cadena media y polietilenglicoles.
- 35 7. Las micropartículas lipídicas según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizadas** porque dichas micropartículas tienen un diámetro medio comprendido en un intervalo entre 3 μm y 500 μm .
- 40 8. Las micropartículas lipídicas según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para uso como un medicamento.
- 45 9. Una composición farmacéutica que contiene micropartículas lipídicas según cualquiera de las reivindicaciones precedentes y un portador, diluyente o excipiente de la misma farmacéuticamente aceptable.
- 50 10. Un procedimiento para la fabricación de micropartículas lipídicas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende la etapa de realizar una micronización criogénica mediante la molienda de la mezcla que contiene el lípido y el fármaco a una temperatura comprendida entre -196°C a 0°C.
- 55 11. El procedimiento según la reivindicación 10, en el que la temperatura de la micronización criogénica está comprendida entre -80°C y -20°C.
- 60 12. El procedimiento según las reivindicaciones 10 o 11, en el que la temperatura de la micronización criogénica está comprendida entre -50°C y -30°C.
- 65 13. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, que comprende una etapa de tamizado después de la micronización criogénica.
14. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, que comprende una etapa de pre-reducción del tamaño mediante molienda antes de la micronización criogénica.
15. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, **caracterizado** porque el enfriamiento de la mezcla que contiene el lípido y el fármaco se realiza insuflando nitrógeno líquido.

Figura 1

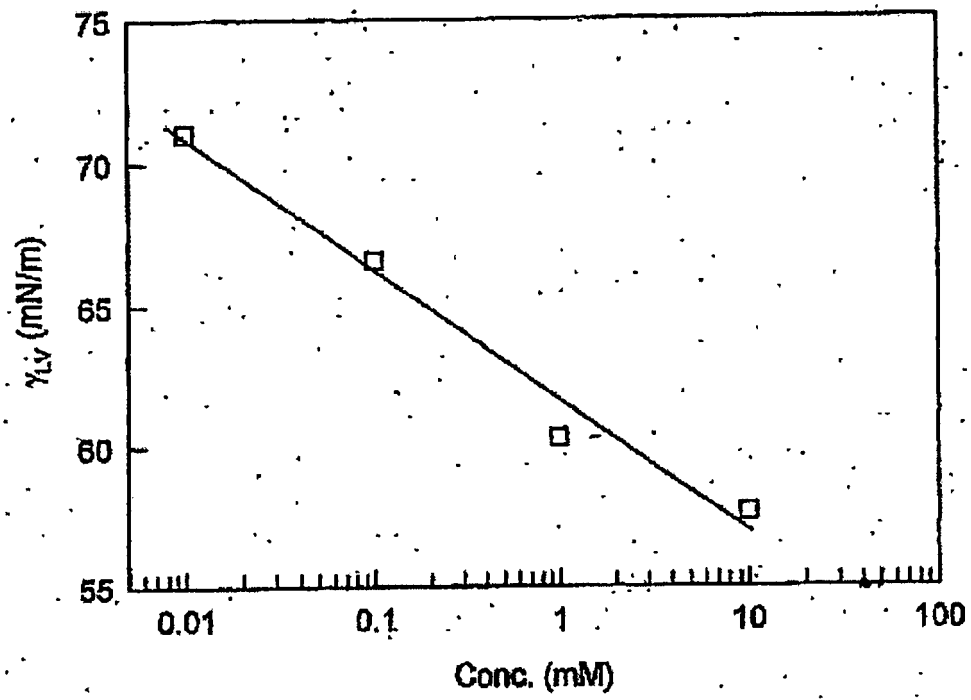


Figura 2

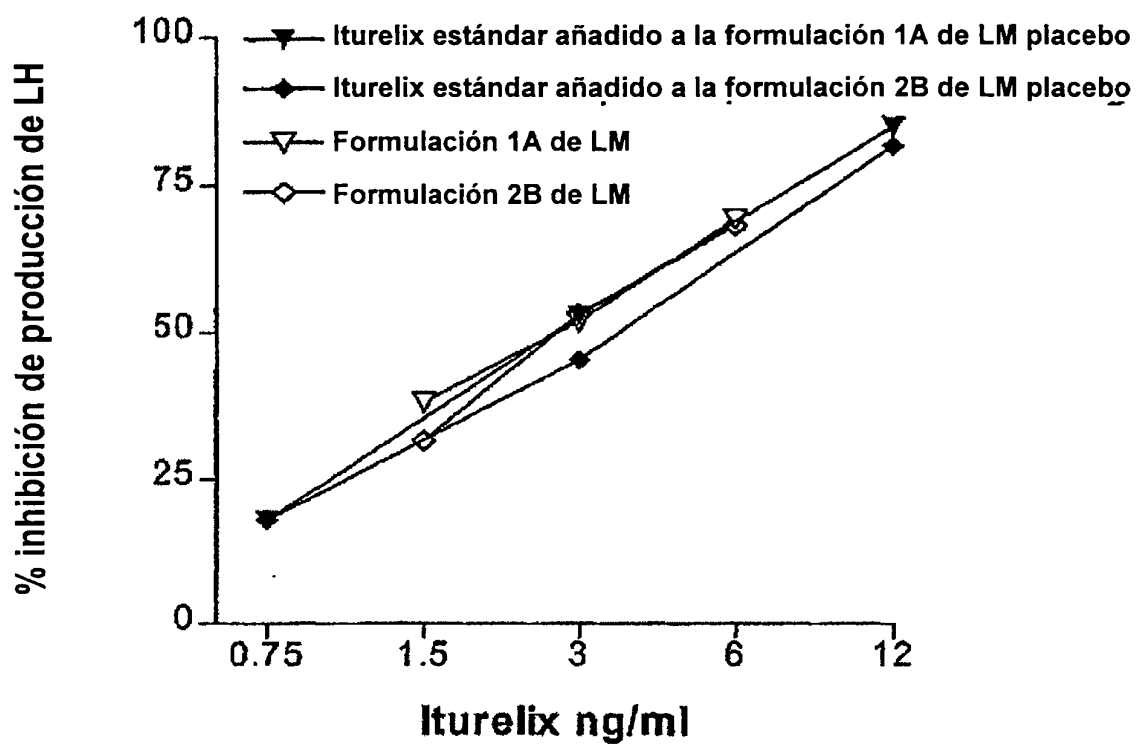
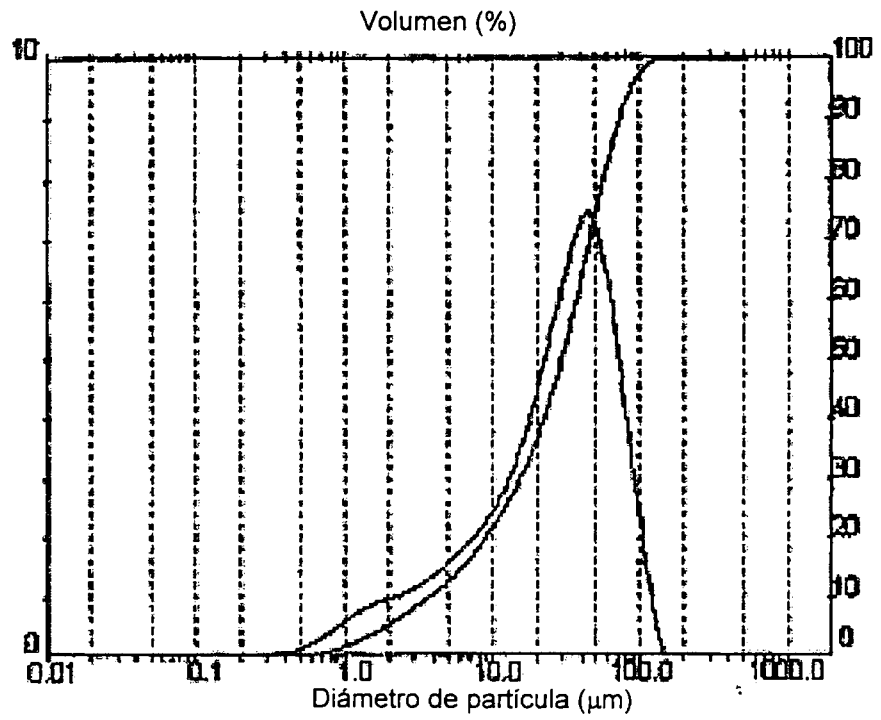


Figura 3

(a)



(b)

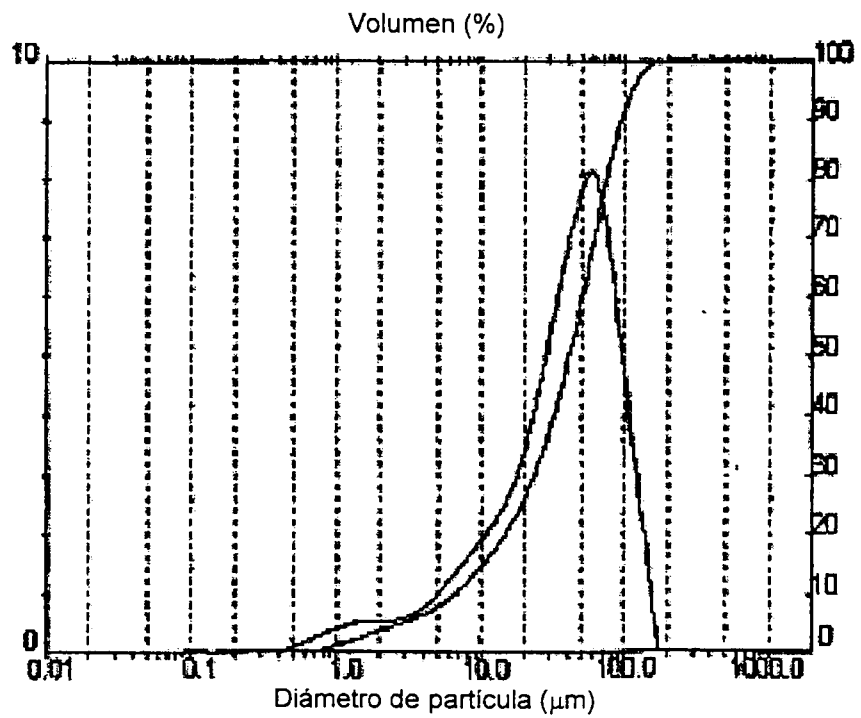


Figura 4

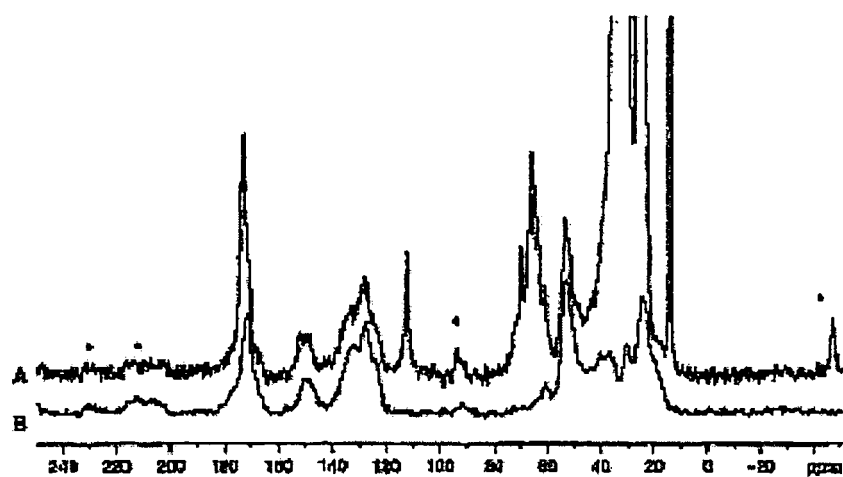


Figura 5

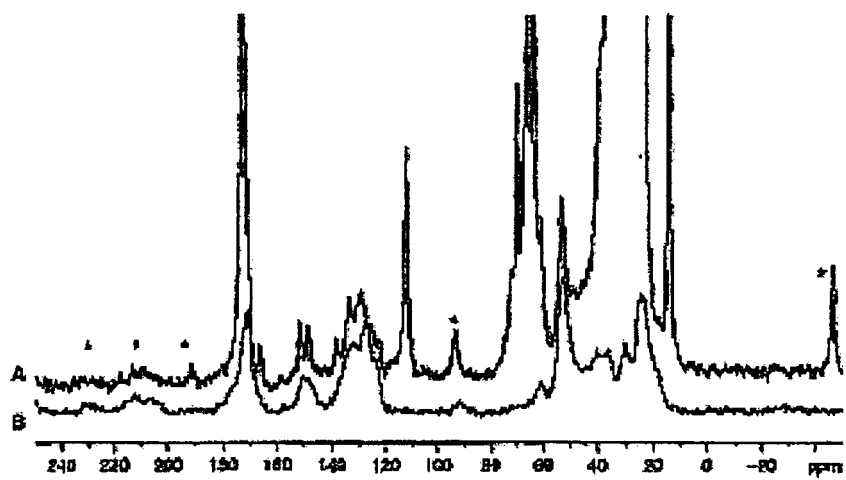
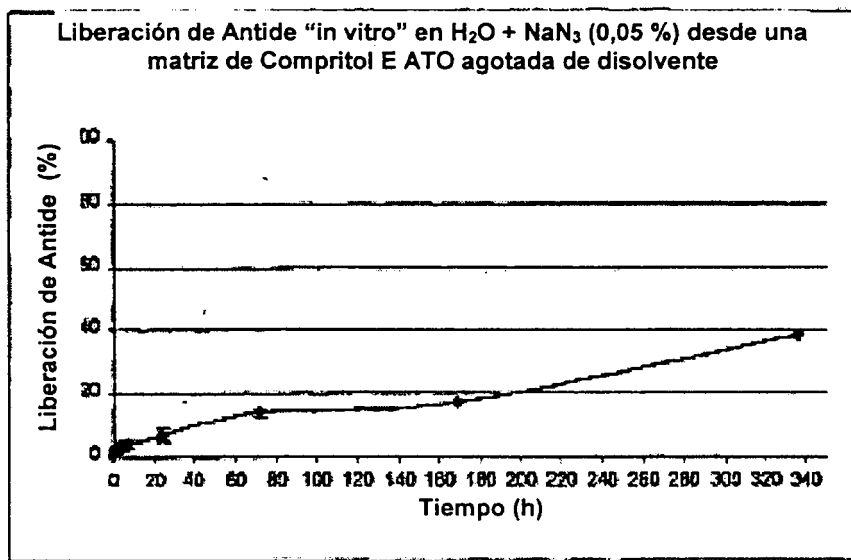
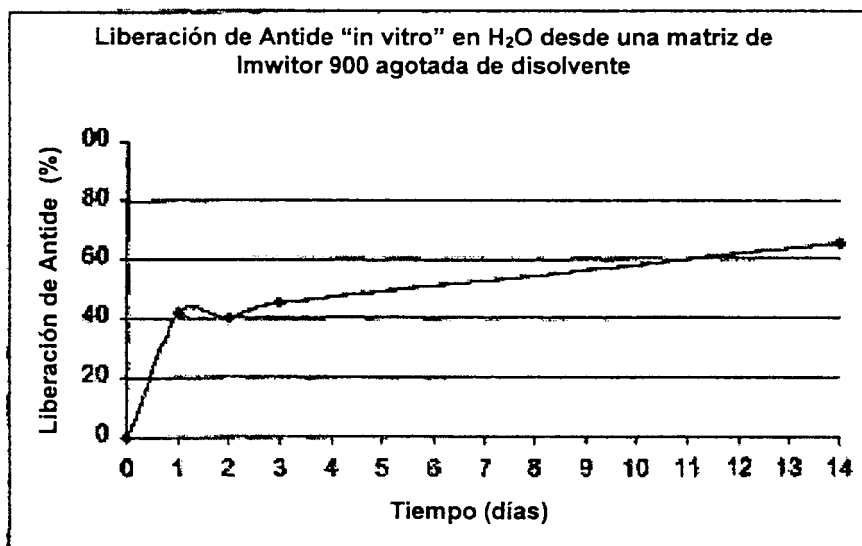


Figura 6

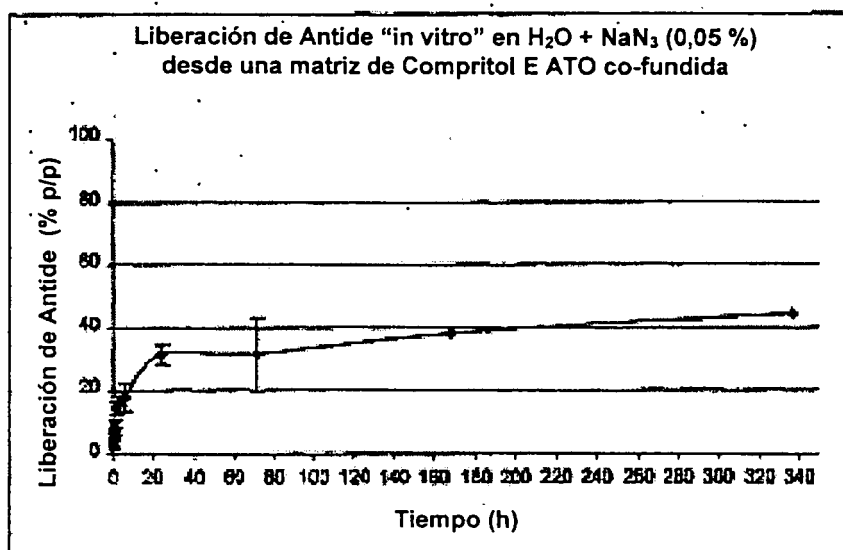


(b)



(véase la Fig. 6, página anterior)

(c)



(d)

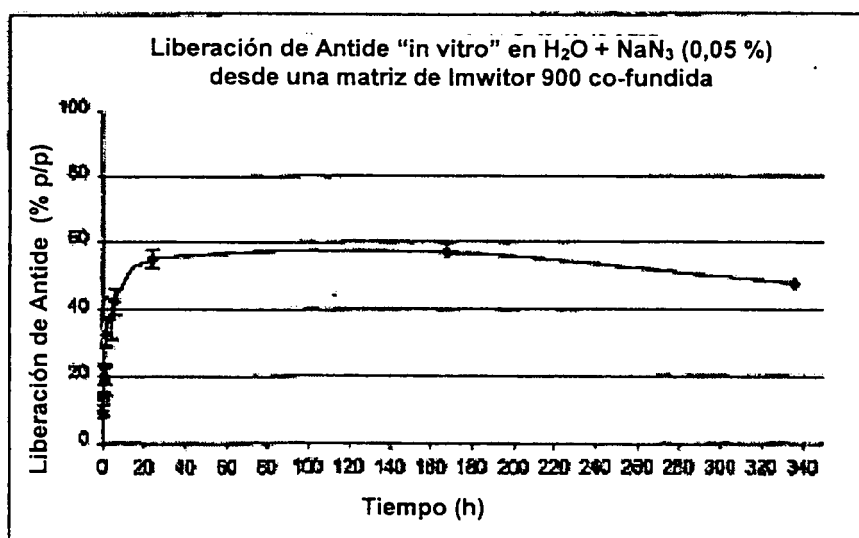


Figura 7

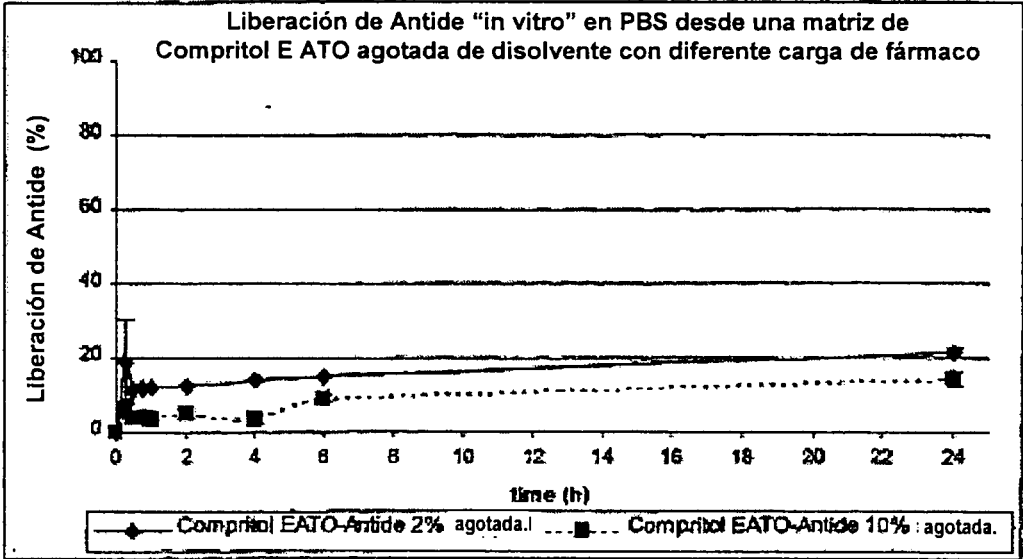


Figura 8

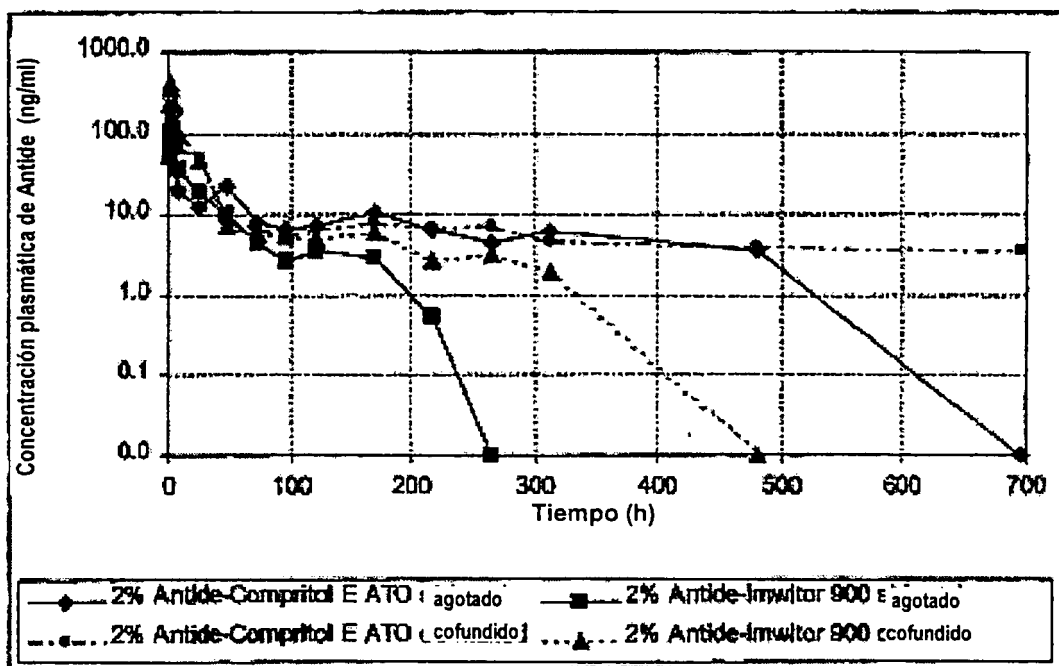


Figura 9

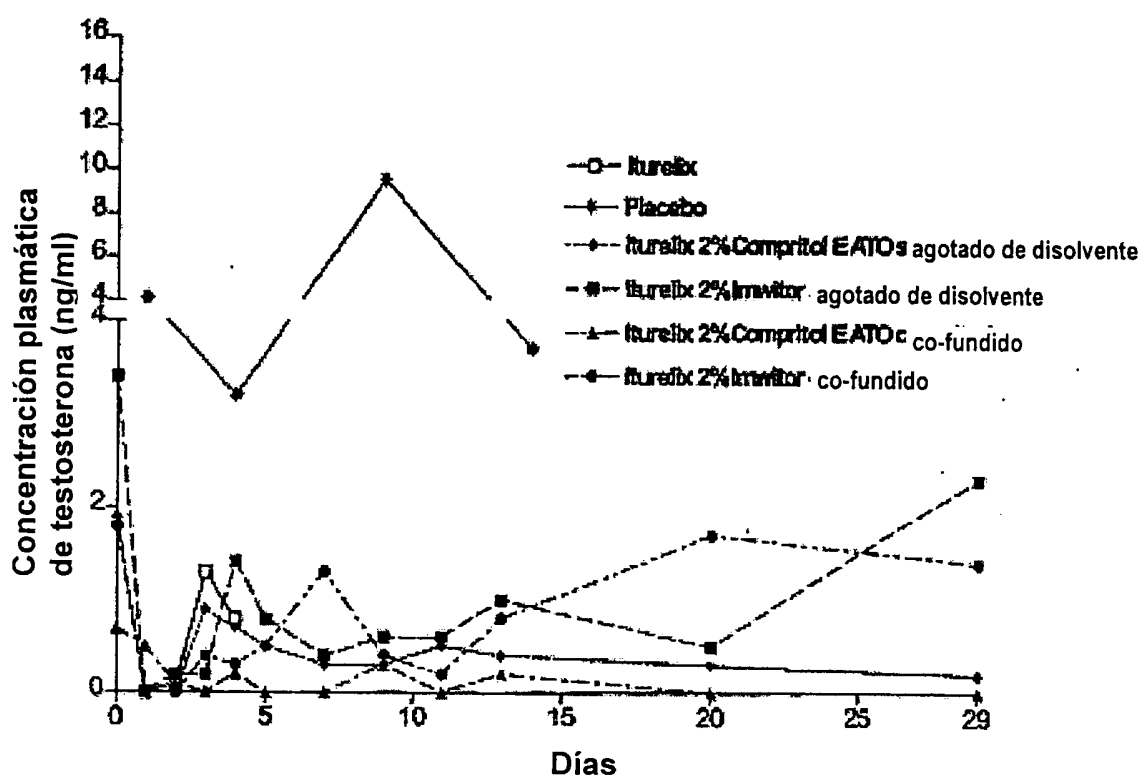


Figura 10

