

## Microencapsulación de un péptido análogo del factor de liberación de la hormona luteinizante (LHRH).

Defain Tesoriero, M.V.<sup>(1)</sup>; Frangie, S.<sup>(1)</sup>; Stratico, M.; Elizondo, A.<sup>(1)</sup>; Murano, M.<sup>(1)</sup>; Lagomarsino, A.

<sup>(1)</sup>INTI-Química

### Introducción

La mayoría de los péptidos y proteínas con valor terapéutico necesitarían regímenes de administración diaria con múltiples inyecciones. Es así como la mayor aceptación de estos principios activos, por parte de los pacientes, depende del desarrollo de nuevas tecnologías para mejorar la liberación controlada de drogas <sup>[1][2]</sup>. En estos últimos años, el desafío para la tecnología farmacéutica se ha centrado en el diseño de nuevos sistemas de liberación de drogas. Dentro de ellos, encontramos las microesferas, utilizando polímeros biodegradables, entre los que se encuentran los poliláctidos, a saber, polilácticos (PLA), poliláctico-co-glicólicos (PLGA) y poliglicólicos (PGA), que se degradan para formar ácido láctico y glicólico. Estos polímeros son los únicos aprobados para uso humano y han sido usados en los últimos 30 años en suturas resorbibles <sup>[3][4]</sup>.

Existen análogos del LHRH que son indicados para el tratamiento de tumores dependientes de hormonas esteroideas como el cáncer de próstata.

Con el objeto de conseguir un producto de administración parenteral de liberación sostenida durante un mes, se prepararon micropartículas de un péptido análogo del LHRH por el método de doble emulsión. Luego de optimizarse el proceso, evaluando diferentes variables, a escala laboratorio, se ensayó el mismo en atmósfera estéril. En este trabajo se muestra en forma particular el estudio del perfil de liberación según la forma obtenida de las micropartículas.

### Metodología / Descripción Experimental

Preparación de las micropartículas. Las micropartículas fueron preparadas según el procedimiento standard de doble emulsión y evaporación con solvente <sup>[1]</sup>. Brevemente, la fase interna ( $W_1$ ) se preparó con una solución acuosa del péptido. La fase orgánica (O) consistió en una solución de PLGA en diclorometano. Dicha solución se mezcló con la  $W_1$  y se obtuvo una emulsión utilizando un homogeneizador (Heidolph 900X). La emulsión obtenida ( $W_1/O$ ) se agregó a la fase externa ( $W_2$ ), una solución de alcohol polivinílico (PVA) al 1% emulsionando con un homogeneizador (Heidolph 900X). La evaporación del diclorometano

se realizó por agitación vigorosa de la emulsión  $W_1/O/W_2$ . Las micropartículas obtenidas se lavaron con agua destilada, se liofilizaron y almacenaron a 4°C.

Obtención de micropartículas en atmósfera estéril. Se realizó según el método descrito anteriormente, luego de optimizarse el proceso.

Morfología y tamaño de partícula. La forma y la superficie de las micropartículas y tamaño de las mismas fueron analizados por microscopía electrónica.

Contenido de la droga. Para la determinación del contenido del oligopéptido en las micropartículas se disolvieron las mismas en dimetilsulfóxido. Las muestras se cuantificaron por HPLC en fase reversa en un equipo Shimadzu LC-10. Las condiciones analíticas de la HPLC fueron las siguientes: la cromatografía fue realizada con una columna Lichrospher RP-18 (Merck), utilizando un detector de longitud de onda variable a 220 nm, la fase móvil utilizada fue metanol: acetato de amonio (0.25 M) 60:40, el caudal fue de 0.8 ml/min.

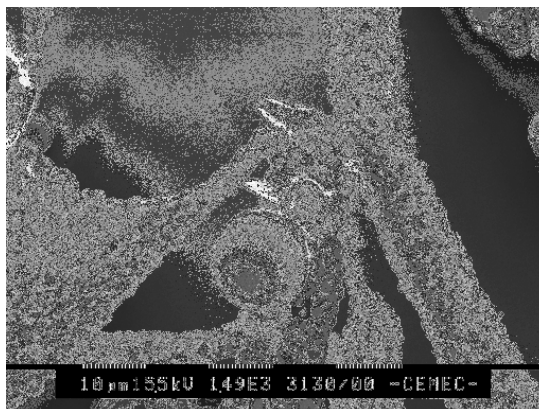


Fig. 1: Microfotografía de micropartículas con forma esférica

(Muestra E-46)

**Evaluación de la cinética de liberación in vitro.** Las micropartículas (aprox. 50mg) fueron suspendidas en 10 ml de buffer fosfato 150 mM pH 7.4 adicionado con Tween 80 0.05 M y se incubaron en un baño con agitación constante a  $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ . Se evaluó por duplicado el contenido de droga remanente y liberada durante 28 días con el método analítico descrito anteriormente.

### Resultados

Con el fin de obtener micropartículas con una buena eficiencia de entrapamiento fue necesario lograr emulsiones  $W_1/O$  con viscosidades elevadas. La forma de las micropartículas obtenidas fue esférica (ver Fig. 1) o no esférica. (ver Fig. 2)

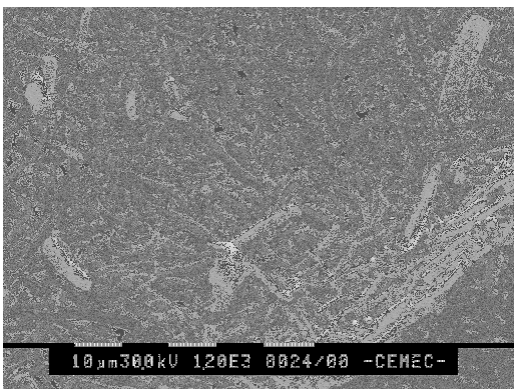


Fig. 2: Microfotografía de micropartículas con forma no esférica (Muestra E-54 M)

Se observó que esta característica influyó sobre el perfil de liberación del producto obtenido. La liberación del oligopéptido de las micropartículas esféricas presenta una mejor performance, debido a que la velocidad de liberación del péptido es menor, alcanzando la liberación total del mismo a las cuatro semanas, mientras que las micropartículas no esféricas lo hacen a las tres semanas. (ver Fig. 3)

El producto obtenido bajo atmósfera estéril, presentó un porcentaje de entrapamiento aceptable con una cinética de liberación adecuada. Los ensayos de control microbiológico del producto fueron satisfactorios.

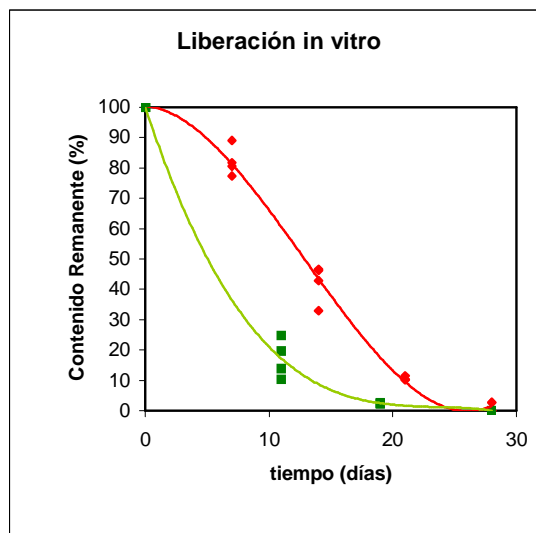


Fig. 3: Cinética de liberación in vitro.

(●) Forma esférica (■) Forma no esférica

### Conclusiones

Las variables que influyen en la performance de este tipo de productos, entre otras, son el peso molecular del polímero utilizado, la temperatura de evaporación del solvente, la relación fase interna/ fase externa (rel.  $f_i / f_e$ ). Es bien conocido que la viscosidad de la fase interna influye sobre la eficiencia de entrapamiento [1], pero si la misma es muy elevada puede llevar a la obtención de micropartículas no esféricas que presentarían una cinética de liberación no deseada.

Todos los productos de administración parenteral deben ser estériles. Esto puede lograrse por la esterilización final del producto o por obtención del producto en forma aséptica. Dada la susceptibilidad de las materias primas utilizadas en este caso, este producto debió obtenerse bajo atmósfera controlada.

### Referencias

- [1] Ogawa, Y.; Yamamoto, M.; Okada, H.; Yashiki, T.; Shimamoto, T. A new technique to efficiently entrap leuprolide acetate into microcapsules of polylactic acid or copoly (lactic/glycolic) acid. *Chem.Pharm.Bull.* (1987) 36: (3) 1095-1103.
- [2] Ogawa, Y.; Yamamoto, M.; Takada, S.; Shimamoto, T. Controlled release of leuprolide acetate from polylactic acid or copolymer ratio of polymer. *Chem.Pharm.Bull.* 36 (1988) 1502-1507.
- [3] Okada, H.; Tigouchi, H. Biodegradable Microspheres in Drug Delivery. *Crit. Reviews Therap. Drug Carrier Syst.* 12(1) (1995) 1-99.
- [4] Sinha, V.R.; Trehan, A. Biodegradable microspheres for protein delivery. *J. Control. Release* 90 (2003) 261-280.

Para mayor información contactarse con:  
Defain Tesoriero, María Victoria – [mvd@inti.gov.ar](mailto:mvd@inti.gov.ar)