

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

**Desarrollo y aplicaciones de implantes
biodegradables de hormona humana
del crecimiento (hGH)**

Autor: García Perdomo, Juan Teodoro

**Directores: Obdulia Pilar Murguía López
y José Bruno Fariña Espinosa**

Departamento de Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica

Cuando veas a un hombre bueno, trata de imitarle;
cuando veas a uno malo, examínate a ti mismo.

Confucio

**A la memoria de Cristina,
una buena mujer,
una madre buena.**

A mi padre y mi hermano.

A Mónica.

Quisiera agradecer a todos los que han hecho posible la realización de esta memoria.

A mis directores de tesis, el Dr. José Fariña y la Dra. Obdulia Munguía, por la posibilidad de realizar junto a ellos este proyecto, por su apoyo y dedicación y, lo que más agradezco, por su sincera amistad. Gracias, de verdad.

Al Dr. Matías Llabrés por sus sugerencias, su esfuerzo y su valiosa experiencia.

Al Dr. Jesús Mallol por su ayuda y colaboración.

A mis compañeros, que han compartido vivencias, malas y buenas, en mi "estancia". A los que de forma desinteresada y eficaz han colaborado en la realización de este trabajo experimental.

Al resto de miembros de la sección de *Tecnología Farmacéutica*, a los que hago extensiva mi gratitud, respeto y admiración por su contribución, su amistad y su profesionalidad.

A mis amigos y mi familia, por todo.

A mi padre, a mi hermano y a mi abuela, por estar ahí.

A Mónica, por estar aquí.

A todos, mi más sincero reconocimiento y enorme gratitud.



UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
Departamento de Ingeniería Química
y Tecnología Farmacéutica
Facultad de Farmacia.

OBDULIA PILAR MUNGUÍA LÓPEZ Y JOSÉ BRUNO FARIÑA ESPINOSA,
PROFESORES TITULARES DEL DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y
TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA DE LA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA.

CERTIFICAN: Que la presente memoria experimental titulada "**Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH)**" elaborada por el Licenciado Juan Teodoro García Perdomo, ha sido realizada bajo su dirección en el departamento de Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica y, hallándose concluida, autorizan su presentación a fin de que pueda ser juzgada por el Tribunal correspondiente.

Y para que conste, expiden y firman la presente certificación en La Laguna, a 15 de noviembre de 2000.

Fdo.: Obdulia P. Munguía López.
Espinosa.

Fdo.: José B. Fariña

Esta tesis doctoral ha sido realizada con la ayuda de una beca predoctoral del Programa Sectorial de Formación de Profesorado Universitario y Personal Investigador del Ministerio de Educación y Cultura (ref.: AP96 45529381, B.O.E. 07.11.96) y se engloba en el proyecto *Desarrollo de sistemas de liberación controlada de fármacos peptídicos: hormona del crecimiento recombinante y vacuna sintética de la malaria SPf66* de la Comunidad Autónoma de Canarias (ref.: 066/97).

Índice

1.- INTRODUCCIÓN.	
1.1. Principio activo.....	Pág. 03
1.2. Sus formulaciones.....	Pág. 12
2.- ANTECEDENTES.	
	Pág. 27
3.- OBJETIVOS.	
	Pág. 31
4.- MATERIALES Y MÉTODOS.	
4.1. Materiales.....	Pág. 35
4.2. Métodos analíticos.....	Pág. 36
4.2.1. Cromatografía líquida de alta resolución por exclusión de tamaños	Pág. 36
4.2.2. Cromatografía de permeación en gel.....	Pág. 41
4.2.3. Resonancia magnética nuclear.....	Pág. 42
4.2.4. Radioinmunoensayo.....	Pág. 43
4.2.5. Microscopía electrónica.....	Pág. 45
4.3. Síntesis de polímeros.....	Pág. 45
4.4. Elaboración de implantes laminares.....	Pág. 47
4.5. Estudios de estabilidad.....	Pág. 53
4.6. Estudios de cesión.....	Pág. 54
4.6.1. <i>In vitro</i>	Pág. 54
4.6.2. <i>In vivo</i>	Pág. 54
4.7. Análisis estadístico.....	Pág. 58

Índice

5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	
5.1. Elaboración de implantes biodegradables.	Pág. 61
5.2. Estabilidad del liofilizado de rhGH.....	Pág. 66
5.3. Ensayos físicos.....	Pág. 72
5.3.1. Microscopía.....	Pág. 72
5.3.2. Dimensiones.....	Pág. 77
5.4. Ensayo de uniformidad de las unidades de dosificación.....	Pág. 79
5.5. Ensayos <i>in vitro</i>	Pág. 82
5.6. Ensayos <i>in vivo</i>	Pág. 94
5.6.1. Ensayo <i>in vivo</i> I.....	Pág. 94
5.6.2. Ensayo <i>in vivo</i> II.....	Pág. 118
5.7. Degradación <i>in vivo</i> del polímero.....	Pág. 121
6.- CONCLUSIONES.	
	Pág. 129
7.- EPÍLOGO.	
	Pág. 135
8.- BIBLIOGRAFÍA.	
	Pág. 139
9.- ANEXO.	
	Pág. 149

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. La hormona del crecimiento.

La hormona del crecimiento o somatotropina (GH, sigla del inglés *Growth Hormone*) fue una de las primeras hormonas hipofisarias descubierta. En 1.886 se describió en humanos la acromegalia asociada a tumores benignos de la hipófisis; sin embargo, a pesar de que se conoce su existencia desde hace más de 100 años, sólo en las últimas décadas se ha logrado una mayor comprensión de los mecanismos reguladores de su secreción y de sus efectos fisiológicos. En gran parte, esta situación es consecuencia de la disponibilidad, en grandes cantidades, de la hormona recombinante humana (rhGH), y también, de la hormona recombinante bovina (rbST). Además, la caracterización química y la síntesis de los factores de crecimiento tipo-insulina (IGF-1, siglas del inglés *Insulin-like Growth Factor-1*) ha permitido contar con otra potencial herramienta terapéutica y de producción animal, ya que algunas acciones fisiológicas de la GH son consecuencia de la activación de la síntesis y secreción de IGF-1.

La GH es una hormona polipeptídica de 191 aminoácidos con 2 puentes disulfuro, producida en los somatotropos de la hipófisis anterior y con un peso molecular de 22 kDa. Se sintetiza como una pre-hormona de 217 aminoácidos. El locus que regula la síntesis de GH humana se encuentra en el cromosoma 17 y consta de 5 genes. Uno de los genes sería el que expresa la GH hipofisaria, mientras que los otros corresponden a la GH placentaria. La GH, junto con la prolactina y el lactógeno placentario, pertenecen a una misma familia de proteínas que comparten un gen ancestral común. Poseen una estructura tridimensional común, lo que explicaría en parte las acciones biológicas compartidas, ya que la GH humana, bovina y ovina son capaces de unirse al receptor de prolactina. Se ha descrito también la existencia de

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

variantes de la GH en el plasma. La variante mayor tiene un peso molecular aproximado de 20 kDa, y además, existe una tendencia a la polimerización de las moléculas de GH, particularmente la GH de no-primates con la presencia de una GH llamada "big-GH" y una "big-big-GH".

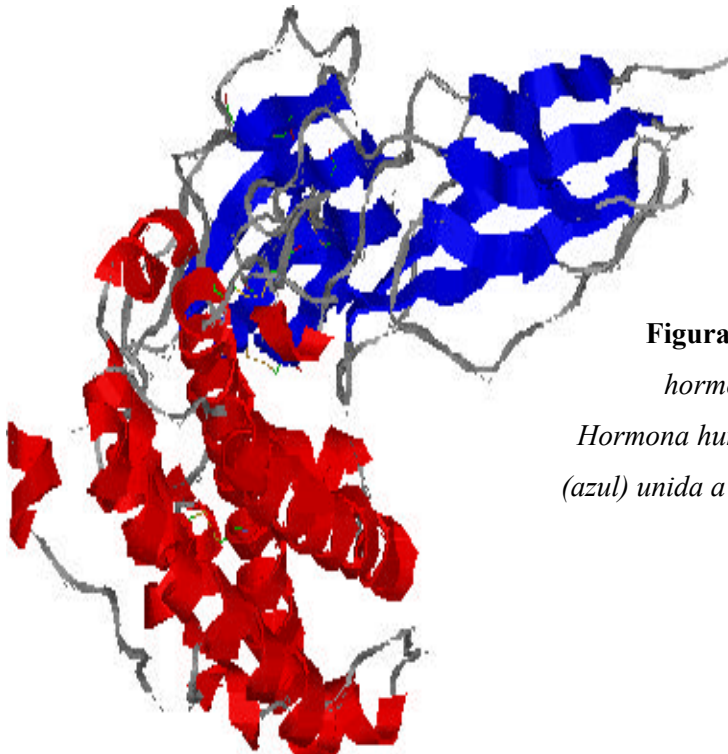


Figura 1.1. *Complejo hormona/receptor.*

Hormona humana de crecimiento (azul) unida a uno de sus receptores (rojo).

Similar a lo que ocurre con otras hormonas hipofisiarias, la GH se secreta en forma pulsátil. La secreción de GH es sexualmente dimórfica en todas las especies de mamíferos; en ratas machos, por ejemplo, los pulsos de GH se presentan cada 4 horas, y se caracterizan por ser de gran amplitud, mientras que en las hembras son de alta frecuencia, forma aleatoria y baja amplitud, con un fuerte componente nocturno. Este patrón de secreción de machos y hembras se inicia en la pubertad.

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

El patrón de secreción de GH está controlado por factores externos como el fotoperíodo y la alimentación, y factores internos como la edad y el sexo. Estos factores son integrados por el sistema nervioso central, el cual integra la información a nivel hipotalámico.

La secreción de GH está regulada por dos neuropéptidos de origen hipotalámico: la hormona liberadora de la GH (GHRH) y la somatostatina (SS).

La GHRH es un péptido de 40 ó 44 aminoácidos cuya unión a receptores específicos en la membrana del somatotropo, y vía AMPc, estimula la síntesis y liberación de la GH. Las neuronas productoras de GHRH se encuentran en el hipotálamo medio basal, particularmente en el núcleo ventromedial (VMN) y el núcleo arqueado (ARN), cuyas fibras se proyectan hacia los vasos portales de la eminencia media. Se acepta que las fibras desde neuronas GHRH del VMN se dirigen hacia el ARN.

La somatostatina (SS) es un péptido de 14 aminoácidos. Se sintetiza en neuronas localizadas en el hipotálamo anterior y en el área preóptica, y se libera en los terminales ubicados en la eminencia media. Se ha demostrado también la existencia y liberación de una somatostatina de 28 aa, que no sería un mero precursor de la SS, sino que tendría actividad endocrinológica propia. En una base molar, la SS-28 tendría mayor actividad inhibitoria, con mayor duración del efecto, debido a una mayor afinidad con el receptor de la SS en el somatotropo y a una mayor vida media. La SS ejerce sus efectos inhibitorios sobre la secreción de GH a través de sus propios receptores, independientes de los receptores de GHRH. Su probable mecanismo de acción sería la inhibición de la síntesis de AMPc.

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

La SS también inhibe la secreción de hormona estimulante del tiroides (TSH) desde la hipófisis y la secreción de insulina desde el páncreas. Varias funciones digestivas son inhibidas por la SS tales como la secreción de gastrina, HCl, pepsina, el vaciamiento gástrico, etc.

Los receptores de GH se encuentran en una variedad de tejidos. Para que un tejido responda directamente a la GH debe presentar los receptores. Entre los tejidos diana se encuentra el hígado, los músculos, los huesos y el tejido adiposo. Algunas de las acciones biológicas de la GH son la promoción del crecimiento y efectos endocrinos en huesos, tejidos blandos, gónadas y vísceras, y son mediadas por los IGF-I e IGF-II. El receptor de GH se caracteriza por ser una proteína lineal con un único dominio de transmembrana. El gen del receptor de GH humano fue clonado en 1.987 y codifica una proteína de 620 aa, dividida en un dominio extracelular de 246 aa, un dominio de transmembrana de 24 aa y un dominio citoplasmático de 350 aa.

Además de los sitios de unión en la membrana celular, se han detectado proteínas ligantes de GH. Estas proteínas solubles, idénticas al dominio extracelular del receptor, se originan bien por rotura proteolítica de los receptores de membrana, bien por rotura alternativa del producto transcrito hacia el receptor completo. El papel de estas proteínas solubles o proteínas ligantes (en inglés, *Binding Proteins*) no está claro, pero podrían proteger a la hormona de su degradación y, por lo tanto, favorecerían una vida media más larga.

El receptor de GH presenta una cierta homología con el receptor de prolactina, con un 30% de secuencia de aa similar, sin embargo, sus estructuras terciarias están altamente relacionadas. La estructura tridimensional analizada por cristalografía muestra que, a pesar de su baja homología secuencial, la estructura

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

tridimensional se superpone casi completamente una con la otra. Esto sugiere que ambas hormonas, al presentar ellas también una alta analogía, podrían unirse a los receptores de la otra.

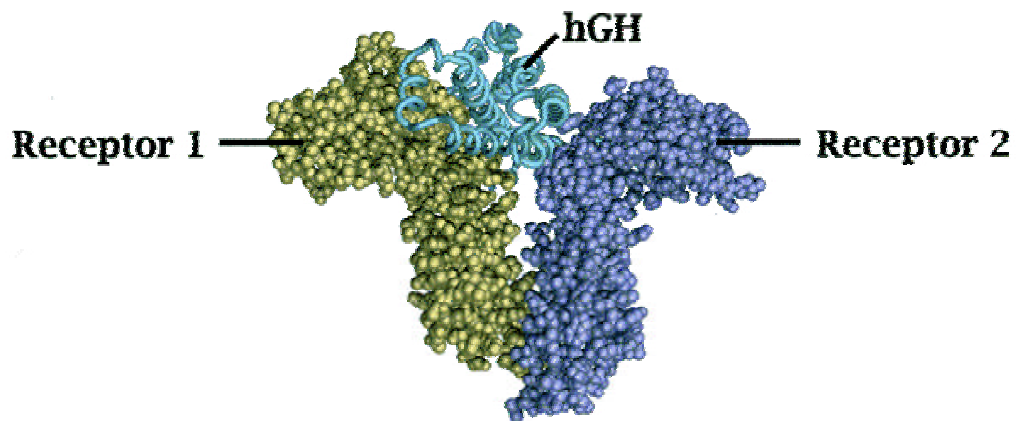


Figura 1.2. *Hormona humana del crecimiento y su receptor.*

El receptor de GH pertenece a una gran superfamilia de receptores llamada receptores de citoquinas clase-1, que comparten características estructurales. A esta superfamilia pertenecen también los receptores para interleucinas, factor estimulante de los granulocitos, factor inhibitorio de leucemia y la eritropoyetina.

La unión de la GH a su receptor produce homodimerización. La GH tiene 2 sitios de unión llamados 1 y 2, que se unen en forma secuencial, primero con un receptor y luego con otro. La unión al primer receptor es inactiva y, por lo tanto, es muy importante que ambos sitios se acoplen al receptor. Existen análogos de GH, en los que se ha reemplazado la secuencia de aa en el sitio 2, transformándolos en potentes antagonistas. La GH mutada mantiene la capacidad de unirse a un receptor a

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

través del sitio 1, pero como el sitio 2 no es capaz de reconocer o unirse a un receptor, no genera acción biológica y, por lo tanto, actúa como un antagonista. Aunque el receptor no tiene actividad kinasa intrínseca, la fosforilación de tirosina intracelular es una característica común de la activación del receptor. La actividad kinasa dependería de kinasas JAK2, que pertenecen a la familia Janus. El mecanismo por el cual se activa la kinasa se supone consecuencia de la homodimerización del receptor, que permite que 2 moléculas de JAK2 se unan facilitando la transfosforilación en las tirosinas y la subsiguiente activación de la enzima, la cual, a su vez, activa a la proteína Stat-5, que es un tipo de proteína ligante de DNA (Stat proviene del inglés: *Signal Transducer and Activator of Transcription*, una familia de proteínas citoplasmática, que comprende 8 miembros: Stat-1, Stat-2, etc.). Se supone, entonces, que en una célula inactiva, las proteínas Stats permanecen en el citosol. Una vez que se activa el receptor y se fosforila por las quinasas Janus, las tirosinas fosforiladas se transforman en sitios de unión para las Stats. Una vez que se unen con el receptor, las Stats son fosforiladas por las quinasas Janus asociadas al receptor, y se disocian del receptor por mecanismos poco conocidos. Se homodimerizan y se translocan al núcleo, donde interactúan y activan elementos DNA específicos, que se encuentran en los genes blancos de las citoquinas.

La GH tiene un amplio espectro de acciones biológicas. La más destacable de todas es la promoción del crecimiento de los huesos, tejidos blandos y vísceras. Esto se debe a una acción directa para estimular la diferenciación clonal, y una indirecta para promover la expansión clonal de los condriocitos, mediada por los IGF-I y II (anteriormente conocidos como factores de sulfatación I y II respectivamente). Los IGF-s tienen actividad tipo insulina en las células adiposas y estimulan la

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

incorporación de sulfato, la síntesis de glicosaminoglicanos y de DNA en el cartílago y la formación de colágeno, permitiendo de este modo el crecimiento. Estas acciones biológicas son particularmente importantes y atribuidas al IGF-I durante el período de crecimiento del animal, pero con escasa participación durante el desarrollo fetal y neonatal. Durante estas etapas, el IGF-II tiene un rol más destacado. En humanos, la GH e IGF-I promueven el crecimiento de los huesos largos en las placas epifisiarias, donde se encuentran las células cartilaginosas activas, y en especial, durante el período de crecimiento rápido puberal. Este efecto se detiene una vez que las epífisis se cierran al final de la pubertad. De acuerdo con un modelo de acción de la GH en el crecimiento longitudinal de los huesos, la GH actúa directamente sobre los huesos, estimulando la diferenciación de los precondrocitos en células que producen IGF-s.

Las acciones directas de la GH están íntimamente relacionadas con el metabolismo. Con relación al metabolismo de los hidratos de carbono, la GH reduce el transporte y metabolismo de la glucosa por medio de una reducción de los receptores de insulina en el hígado. Una concentración elevada de GH puede conducir a resistencia insulínica periférica e hiperglucemia. Por el contrario, en humanos se ha observado que una inyección de GH tiene un efecto tipo-insulina agudo. En cuanto al metabolismo de los lípidos, aumenta la lipólisis en los adipocitos con liberación de ácidos grasos libres. Con respecto al metabolismo proteico, la GH tiene una clara acción anabólica, promoviendo la síntesis proteica, aumentando la transcripción y translación del RNA en el hígado y músculos, y además, aumentando el transporte de aminoácidos en el músculo, hígado y tejido adiposo. El resultado es una mayor retención de N.

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

La GH también influye en el metabolismo mineral, promoviendo la retención de Na, K, y P. Se ha observado que la administración de GH se asocia con un aumento en la absorción intestinal de Ca, pero como la excreción de Ca urinario también aumenta, el efecto neto es prácticamente cero.

En ausencia de otro proceso patológico susceptible de reducir la velocidad de crecimiento, la explicación más probable de este trastorno en la infancia es la existencia de un defecto en la secreción de la GH. Este déficit puede detectarse midiendo la secreción espontánea o la provocada por diferentes estímulos.

A partir del momento en que se sospecha que el crecimiento de un niño se está realizando lentamente por defecto en la secreción de GH, debe administrarse GH recombinante a dosis de 15 U.I./m²/semana (0,5 U.I./kg./semana) y esperar una respuesta específica en función de la velocidad de crecimiento antes del tratamiento. Si el niño no responde como estaba previsto, el diagnóstico es erróneo o el tratamiento no se ha seguido. De manera excepcional, pudiera darse un fallo en la recepción del mensaje hormonal.

La producción de anticuerpos contra las preparaciones altamente purificadas de GH sintética disponibles, normalmente aparece en pacientes que han tenido una delección del gen codificador de esta hormona, situación extremadamente rara.

Una velocidad de crecimiento lenta o débil, relacionada con una insuficiencia de la secreción de GH, es la única indicación absoluta para utilizar este tratamiento. Siguiendo esta indicación, la GH ha sido empleada a lo largo de las últimas tres décadas.

Cuando la GH sintética estuvo disponible en 1.986 y la única limitación para su uso era el precio, se hicieron numerosos estudios en diferentes situaciones:

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

síndrome de Turner, displasia ósea, insuficiencia renal, etc. Casi todas las respuestas iniciales fueron favorables, incluso, si las dosis utilizadas eran considerablemente más elevadas que las necesarias para el tratamiento de deficiencia de GH, quedando demostrado claramente que todo niño al que se le administre GH crecerá más rápido siempre y cuando se le administre la dosis adecuada, sin embargo en ninguna de las situaciones mencionadas ha quedado claro el beneficio de esta modalidad terapéutica, según los trabajos de Underwood y Van Wyk (1.992), y de Van Buul-Offers y Van den Brande (1.985).

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

1.2. Sus formulaciones.

En la tabla 1.1 se recogen las especialidades comerciales de rhGH que en la actualidad se encuentran registradas en España, todas con régimen de dispensación de Diagnóstico Hospitalario.

Nombre Especialidad	Genotonorm®	Humatrope®	Norditropin®	Saizen®	Zomacton®
Laboratorio	Pharmacia Upjohn	Lilly	Novo Nordisk	Serono	Ferring
Presentación	2 UI x 10 jeringas 3 UI x 10 jeringas 4 UI x 1 vial 4 UI x 1 vial doble 4 UI x 5 viales dobles 4 UI x 10 jeringas 12 UI x 1 vial 16 UI x 1 vial doble 16 UI "Kabipen" 36 UI "Kabipen" 36 UI "Kabivial"	4 UI x 1 vial 16 UI x 1 vial 18 UI x 1 cartucho 36 UI x 1 cartucho 72 UI x 1 cartucho	4 UI x 1 vial 4 UI x 10 viales 12 UI "Penset" 24 UI "Penset"	4 UI x 1 vial 4 UI x 10 viales 10 UI x 1 vial 10 UI x 2 viales	4 UI x 1 inyectable 4 UI x 10 inyectables 12 UI x 5 inyectables 12 UI x 1 inyectable 18 UI x 1 inyectable

Tabla 1.1. *Especialidades de rhGH comercializadas en España.*

Recientemente se han realizado estudios en los que se compara la eficacia de una administración pulsátil, basada en inyecciones diarias, con una perfusión continua empleando una bomba externa, observándose que no existen diferencias significativas ni en la seguridad farmacológica ni en la eficacia clínica entre ambos

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

tratamientos, según Cavallo *et alii* (1.998). Estos resultados justifican la posible utilización de formulaciones de cesión sostenida de esta hormona, que conducirían a una mejor aceptación del tratamiento por el paciente al disminuir la recurrencia del actual.

Los esfuerzos para mejorar los tratamientos con GH se han centrado en el diseño de formulaciones que permitan reducir el número de dosis y mantener el efecto terapéutico durante períodos prolongados de tiempo. Quizás los resultados más esperanzadores se hayan obtenido con los implantes biodegradables. En la tabla 1.2 se recoge un resumen de los trabajos más relevantes en este campo.

Somatotropina	Sistema	Excipientes básicos	Referencia
bSt	Microesferas.	Diestearato y triestearato de glicerol.	<i>Steber et alii</i> (1.989)
hGH	Microesferas.	Copolímeros de los ácidos láctico y glicólico.	<i>Auer et alii</i> (1.994)
Zn/bST	Gel oleoso.	Aceite de sésamo y 5% de monoestearato de Al.	<i>Mitchell</i> (1.991)
bST	Gel oleoso.	Aceite de sésamo y cacahuete. Cera blanca y amarilla de abeja.	<i>Ferguson et alii</i> (1.990)
hGH	Gel oleoso.	Derivados del aceite de sésamo con Gelurice® 64/02.	<i>Thakkar et alii</i> (1.988)
Varias	Gel oleoso.	L- α -fosfatidilcolina y tocoferol.	<i>Kim et alii</i> (1.991)
Varias	Hidrogel.	Copolímeros de HEMA, GMA y MMA.	<i>Sanders y Domb</i> (1.990)
bST	Liposomas.	Fosfatidilcolina, etanolamina, hemisuccinatos de α -tocoferol y tampón Tris.	<i>Janoff et alii</i> (1.989)
bST	Emulsión múltiple.	Tampón carbonato, aceite mineral, trioleato de sorbitan, sorbitol y polisorbato 80.	<i>Tyle y Cady</i> (1.989,1.990)
bST, hGH	Complejos.	Albúmina sérica bovina o inmunoglobulinas.	<i>Aston et alii</i> (1.991)
pST	Implante.	Aldehídos aromáticos.	<i>Clark et alii</i> (1.993)
pST	Implante cilíndrico.	Silicona.	<i>Azain et alii</i> (1.989)
pST	Implante laminado.	Glicerina, cera y tensioactivo.	<i>Raman y Gray</i> (1.994)
Zn:pST	Implante.	L-arginina y cera.	<i>Sivaramakrishnan</i> (1.991)

pST	Implante recubierto.	Etilcelulosa y polietilenglicol.	<i>Lindsey y Clark (1.991)</i>
Cr:pST	Implante recubierto.	Alcohol polivinílico.	<i>Castillo et alii (1.991)</i>
PST	Implante recubierto.	Eudragit®.	<i>Steber et alii (1.993)</i>
pST, bST	Implante.	Matrices comprimidas de etilcelulosa, ésteres del ácido láctico y azúcares.	<i>Sivaramakrishnam et alii (1.989, 1.990)</i>
PST	Implante recubierto.	Chitosan y alcohol polivinílico.	<i>Pitt et alii (1.992)</i>
PST	Sistema osmótico.	Glicerol, gelatina, gel de L-histidina y agentes osmóticamente activos.	<i>Eckenhoff et alii (1.990)</i>
Varias	Sistema osmótico.	Polivinilpirrolidona, estearato magnésico, aceite vegetal hidrogenado, clorhidrato de histidina, butirato acetato y tributil citrato de celulosa, policarbonato y cera microcristalina.	<i>Wong et alii (1.991,1.992)</i>
PST	Sistema osmótico.	Fosfato sódico monobásico, agua, polisorbato 80.	<i>Magruder et alii (1.992)</i>
HGH	Discos cerámicos.		<i>Downes et alii (1.991)</i>
HGH	Lámina flexible.	Hidroxiethylcelulosa y polietilenglicol 6000.	<i>Hoelgaard (1.991)</i>
HGH	Microesferas bioadhesivas.	Almidón.	<i>Illum (1.991)</i>
HGH	Aerosol.		<i>Wearly (1.991)</i>

Tabla 1.2. Relación de las formulaciones de cesión sostenida para las somatotropinas.

◆ Microesferas inyectables.

En teoría, este tipo de formulación es la que cuenta con mayores posibilidades de utilización. Steber *et alii* (1.989) elaboraron microesferas de diestearato y triestearato de glicerol cargadas con somatotropina bovina (bST) que, para su administración, suspendían en un vehículo adecuado, aceite de soja/Miglyol® 812.

Auer *et alii* (1.994) prepararon microesferas de hGH. Emplearon como base copolímeros de los ácidos láctico y glicólico, y como método de elaboración, la atomización en nitrógeno líquido. La hormona incorporada se liofilizó previamente de forma conjunta con sales de zinc y bicarbonato sódico. La presencia de los iones metálicos posibilitó la complejación de las unidades proteicas, aportando, de esta manera, mayor estabilidad. La evaluación *in vivo* de las microesferas, con una carga del 10% en ratas hipofisectomizadas, mostró un rápido crecimiento inicial (1ª semana), seguido de una ralentización en el crecimiento posterior. Esto sugiere una cesión de orden distinto de cero a partir de estructuras monolíticas.

◆ Geles oleosos.

Estos sistemas inyectables se basan en dispersiones de somatotropina en aceites vegetales inertes con agentes viscosizantes que permiten la inyección con aguja hipodérmica. En el control de la viscosidad es necesario alcanzar un compromiso entre la jeringabilidad y la estabilidad e integridad de la formulación una vez administrada. En estos sistemas no se produce la hidratación de la somatotropina y la consiguiente agregación. Existe una gran variedad de agentes viscosizantes y un amplio grado de hidrofobia de los aceites que permiten optimizar la estabilidad y eficiencia de la formulación. Los geles basados en aceites son de fácil manufactura, pero el principal inconveniente es la inconsistencia de la geometría *in*

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

situ en el lugar de implantación, que ejerce una importancia determinante en el perfil de cesión.

Mitchell (1.991) preparó un gel oleoso de somatotropina bovina con metionina N-terminal complejada con iones zinc, utilizando aceite de sésamo y un 5% de monoestearato de aluminio como agente viscosizante. La formulación no presentó un perfil de cesión de orden cero, sino más bien de orden uno, pero demostró su efectividad; tanto es así que sirvió como base para la aparición en el mercado de una especialidad veterinaria de bST.

Ferguson *et alii* (1.990) diseñaron varias formulaciones oleosas de bST basadas en mezclas aceite/cera. Para incrementar la viscosidad, los aceites (de sésamo o de cacahuete) se calentaron incorporando las ceras (blanca o amarilla de abejas), y homogeneizando por congelación hasta la consistencia deseada.

Thakkar *et alii* (1.988) prepararon formulaciones inyectables para la hGH a partir de matrices oleosas de aceites y diversos glicéridos (derivados del aceite de sésamo). El agente regulador de la viscosidad, y a la larga, de la cesión, fue el Gelurice[®] 64/02, un éster de glicerol con un punto de fusión de $\cong 64^{\circ}\text{C}$ y un HLB de 2. El ensayo *in vivo* con ratas sin hipófisis muestra un crecimiento significativo tras la administración de este gel.

Kim *et alii* (1.991) prepararon liofilizados de distintas somatotropinas y L- α -fosfatidilcolina que se homogeneizaron empleando tocoferol en su forma acetato.

◆ Hidrogeles.

Sanders y Domb (1.990) describieron en su trabajo sistemas basados en el uso de hidrogeles (copolímeros de hidroxietilmetacrilato, HEMA, glicerol metacrilato, GMA, y/o metilmetacrilato, MMA) como base para una cesión controlada de varios

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

polipéptidos, incluidas varias somatotropinas. La permeabilidad y el transporte activo a través de la membrana de estos sistemas dependen de la relación cuantitativa de sus componentes hidrófilos e hidrófobos, del grado de entrecruzamiento de la matriz, así como de los demás factores que controlan la geometría de la membrana delimitante (superficie específica, espesor, etc.). Para los autores, la solubilidad del polipéptido es una característica determinante, muchas veces crítica. Estos mismos autores patentaron sistemas de este tipo con distintas composiciones y configuraciones de membrana para la cesión controlada de acetato de nafarelina.

◆ **Liposomas.**

A partir de fosfatidilcolina, etanolamina, hemisuccinatos de α -tocoferol y tampón Tris se han elaborado vesículas con las cuales se ha conseguido mantener una cesión controlada de bST durante una semana, según trabajos de Janoff *et alii* (1.989).

◆ **Emulsiones.**

Tyle (1.989) y Tyle y Cady (1.990) desarrollaron un sistema de cesión sostenida de bST a partir de una emulsión múltiple w/o/w. La bST se disolvió en un tampón carbonato formándose la fase acuosa primaria, para después mezclarla con un aceite mineral y trioleato de sorbitán. La emulsión resultante se añadió sobre la segunda fase acuosa, constituida por un tampón carbonato, sorbitol y polisorbato 80, sometándose todo a agitación intensa. La eficacia de esta formulación se demostró en un ensayo *in vivo* con ratas hipofisectomizadas.

◆ **Complejos hidrófilos.**

Aston *et alii* (1.991) prepararon conjugados de bST y hGH con albúmina sérica bovina (BSA), usando glutaraldehído, o con inmunoglobulinas (Ig), usando

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

carbiimida. Estos complejos mejoraron la solubilidad y estabilidad de las somatotropinas en pH ácidos. Así mismo, Cady *et alii* (1.993) desarrollaron una formulación inyectable de varias somatotropinas utilizando dextrinas, heteropolisacáridos y varias gomas.

◆ **Implantes.**

Teóricamente, estos sistemas cuentan con una ventaja importante, ya que permiten un mejor control de la cesión basado en un control efectivo de su geometría. Asimismo, presentan desventajas; primero, las concentraciones de somatotropinas aquí son mayores que en formulaciones inyectables y eso puede originar problemas de estabilidad *in vivo*. Por otro lado, aumentan las complicaciones tecnológicas al tener que diseñarse un sistema de administración adecuado. Y finalmente, el proceso tecnológico de elaboración de los implantes generalmente necesita más etapas que otras formulaciones, por lo que el coste de elaboración podría encarecerse.

En un primer grupo tenemos los implantes no recubiertos. Clark *et alii* (1.993) prepararon complejos de somatotropina porcina (pST) y aldehidos aromáticos, unos complejos que se comprimieron y demostraron su efectividad administrados subcutáneamente en un ensayo de tres semanas, y usando cerdos como modelo animal. Azain *et alii* (1.989) idearon formulaciones cilíndricas de silicona cuyos extremos eran los puntos de cesión de la pST contenida en el sistema. Modificando las dimensiones del sistema y la carga de la somatotropina alcanzaron niveles significativamente más altos que los controles tras dos meses de tratamiento.

Raman y Gray (1.994) formularon, mediante compresión, láminas de pST, glicerina, cera y un tensioactivo. Sivaramakrishnan (1.991) preparó una matriz a

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

partir de cera y sales de pST: Zn/L-arginina. La mezcla homogénea la realizó calentando la cera, y congelándola después, consiguiéndose así la matriz grasa con la pST atrapada. La cesión *in vitro* mostró una liberación de un 20% de la dosis por semana.

En un segundo grupo estarían los genéricamente denominados implantes recubiertos. El primer ejemplo son los diseñados por Lindsey y Clark (1.991) que, para mejorar la estabilidad de comprimidos implantables de pST y leupeptina, un tripéptido inhibidor de la proteasa, procedieron a recubrirlos con una disolución orgánica de etilcelulosa y polietilenglicol. Estos comprimidos recubiertos se implantaron subcutáneamente en el cuello de cerdos, y los resultados mostraron un incremento del 65% en el peso, en comparación con el grupo control, con una inyección diaria de somatotropina.

Castillo *et alii* (1.991) prepararon comprimidos de complejos de pST:Cr, que luego recubrieron en lecho fluido con alcohol polivinílico (PVA). La modulación de la cesión la consiguieron modificando la estructura de los núcleos mediante cambios en la solubilidad de la somatotropina, variando el tipo y la cantidad de sales metálicas empleadas. Este tipo de formulación, según sus autores, es potencialmente desarrollable para aplicaciones comerciales.

Steber *et alii* (1.993) emplearon el mismo esquema de compresión-cobertura para desarrollar implantes de pST. El núcleo a recubrir incluía grasas, azúcares y sales, mientras que el agente de recubrimiento estaba constituido por Eudragit®. Una vez laminadas por compresión las distintas mezclas que contienen la carga adecuada de somatotropina, se obtuvieron por troquelado los implantes y se dejó una de las caras del cilindro sin recubrir. Los autores indican que la cesión *in vitro* dependía de

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

la composición del núcleo, las dimensiones del implante y la naturaleza y espesor del recubrimiento.

Sivaramakrishnam *et alii* (1.989, 1.990) diseñaron y evaluaron implantes basados en matrices comprimidas de etilcelulosa, ésteres del ácido láctico y azúcares con pST y bST. En sus ensayos pusieron de manifiesto la existencia de un retraso y una mejor modulación de la cesión cuando los implantes se recubrían con ceras o polietileno microporoso.

Pitt *et alii* (1.992) elaboraron implantes comprimiendo mezclas de chitosán y somatotropina. Éstos se recubrieron en lecho fluido utilizando una disolución al 2,5% p/v de PVA. En los ensayos *in vitro* observaron que la velocidad de cesión de la pST era inversamente proporcional al espesor del recubrimiento, controlado por el período de nebulización del recubridor. Los resultados de los ensayos *in vivo*, utilizando como modelo animal especímenes de salmón Coho, muestran que los salmones tratados con estas formulaciones presentaron un crecimiento significativamente superior en comparación a los que se trataron con una inyección diaria, apreciándose también la relación inversa entre el espesor y la evolución del crecimiento. Estos resultados han sido ratificados en el trabajo de McLean *et alii* (1.994), utilizando implantes de similares características.

◆ Sistemas osmóticos.

Eckenhoff *et alii* (1.990) prepararon un implante osmótico conteniendo pST, glicerol, gelatina y gel de L-histidina. El diseño del dispositivo se planteó sobre la base de varios compartimentos, conteniendo dosis unitarias de la somatotropina y agentes osmóticamente activos, todos incluidos en una matriz gelosa.

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

Wong *et alii* (1.991, 1.992) diseñaron un dispositivo dispensador para la liberación discreta de varios “pellets” mediante su expansión lineal con activación fluido dependiente (tabla 1.2). El dispensador se formuló utilizando una membrana semipermeable y otra impermeable combinadas con sustancias osmóticamente activas. Existen varias patentes americanas basadas en los trabajos de estos autores, todas ellas en el campo veterinario.

Magruder *et alii* (1.992) tienen patentadas una serie de formulaciones no biodegradables e implantables para la cesión sostenida de pST. Uno de los sistemas (tabla 1.2) consiste en una cubierta semipermeable que recubre una masa comprimida de sustancias osmóticamente expandibles; al expandirse imprimen movimiento a un pistón elastomérico lubricado, que libera la somatotropina contenida en una cámara impermeable. En versiones más avanzadas, el dispositivo se recubre con una carcasa no degradable con la finalidad de dar robustez y protección contra la bioerosión.

◆ Miscelánea.

Downes *et alii* (1.991) prepararon discos cerámicos cargados con hGH. La carga de estos discos se realizó mediante absorción, introduciendo éstos en una disolución acuosa de la somatotropina. Los estudios *in vitro* mostraron una cesión bifásica del principio activo, y los resultados *in vivo*, una asimilación del dispositivo por parte del hueso donde fue implantado.

Hoelgaard (1.991) elaboró una lámina fina, porosa y flexible de hidroxietilcelulosa y polietilenglicol (PEG) 6000, conteniendo hGH, y usando la liofilización como método de elaboración.

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

Illum (1.991) demostró la efectividad de la cesión intranasal de hGH a partir de microesferas bioadhesivas de almidón.

Wearly (1.991) desarrolló un aerosol para administrar mediante nebulización hGH. El estudio *in vivo* demostró que con ella se consigue un crecimiento equivalente al conseguido con la inyección subcutánea.

2. ANTECEDENTES.

Consideramos como base para el diseño de un nuevo sistema de cesión sostenida para la hormona humana de crecimiento a los implantes biodegradables, debido a las ventajas que presentan respecto a otros sistemas de cesión. Teóricamente, aparte de su biocompatibilidad e histocompatibilidad, estos sistemas cuentan con una ventaja importante, permiten un mejor control de la cesión en base a un control efectivo de su geometría y, además se puede ejercer un mejor control las variables tecnológicas, ampliando y facilitando de esta manera las posibilidades en su elaboración y administración.

Bodmeier y Chen (1.989) prepararon películas a partir de mezclas de poliláctico (PLA) de alto y bajo peso molecular. Las películas se prepararon mediante la deposición de una dispersión de distintos medicamentos en una disolución del polímero en acetona sobre unas placas de Petri; la evaporación del disolvente a temperatura ambiente condujo a la formación de la mencionada película.

Shah *et alii* (1.992) mezclaron una disolución acuosa de testosterona con una disolución de poliláctidoglicólico (PLGA) 50/50 en una mezcla de diclorometano y hexafluorisopropanol sobre placas teflonadas. El disolvente se eliminó a vacío y temperatura ambiente.

Gould *et alii* (1.994) prepararon discos de 5-fluorouracilo (5-FU) y PLGA 50/50 mediante una combinación de la eliminación del disolventes y fusión-compresión. Las partículas del citostático se dispersaron en una disolución del polímero en diclorometano. Esta suspensión se introdujo en metanol helado, de forma que el polímero precipitó y atrapó las partículas del medicamento. Esta mezcla se liofilizó para evaporar el disolvente y se comprimió para obtener las láminas.

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

Borhani *et alii* (1.993) prepararon implantes de 5-FU utilizando como excipiente la policaprolactona. Disolvieron el polímero y el medicamento por separado en tetrahidrofurano. Tras mezclarlo con agitación para formar una única disolución homogénea, que se introduce en un molde adecuado. Tras el secado a vacío durante 24 horas, se forman las películas de policaprolactona con las partículas del medicamento atrapadas.

Son también numerosos los trabajos en los que se han desarrollado implantes laminares adheridos a distintas prótesis empleadas en cirugía traumatológica. Zhang *et alii* (1.994) estudiaron la aplicación de películas de polímeros y copolímeros biodegradables para la administración de antibióticos en el tratamiento de la osteomielitis. Agrawal *et alii* (1.997) propusieron láminas de PLGA conteniendo factor de crecimiento tisular para adherir a las prótesis de titanio con el objetivo regenerar el tejido adyacente. Price *et alii* (1.996) plantearon la utilización de implantes peliculares de PLGA cargados con gentamicina para el tratamiento de la osteomielitis crónica, una de las complicaciones más importantes de las fracturas óseas abiertas. Con el mismo objetivo, Calhoun y Mader (1.997) elaboraron implantes peliculares conteniendo vancomicina.

Athanasίου *et alii* (1.996), en su trabajo sobre la esterilización, toxicidad, biocompatibilidad, aplicaciones clínicas de distintos sistemas con posibilidades en el campo ortopédico, plantearon las grandes ventajas de las películas biodegradables.

Benoit *et alii* (1.997) desarrollaron el control de la cesión de antibióticos de una matriz polimérica, recurriendo al uso de láminas de PLGA empleadas como recubrimiento.

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

3. OBJETIVOS.

El objetivo fundamental de la presente tesis fue la elaboración de implantes laminares biodegradables y biocompatibles, que permitiesen la cesión sostenida de rhGH durante un período de al menos 15 días, con la administración de una única dosis y produzcan un efecto terapéutico equiparable al obtenido con el tratamiento convencional, basado en múltiples inyecciones subcutáneas.

Para la consecución de dicho objetivo es necesario:

- Evaluar la capacidad de los polímeros biodegradables para formar películas.
- Estudiar la estabilidad de la rhGH en los disolventes y en las condiciones empleadas durante el desarrollo galénico de las formulaciones.
- Desarrollar una metodología que permitiera modular la cesión desde los implantes elaborados.
- Realizar ensayos *in vitro* para conocer los perfiles de cesión de cada formulación y, ensayos *in vivo* en ratas hipofisectomizadas y normales, para comparar el efecto terapéutico las formulaciones diseñadas con una formulación comercializada, y determinar los niveles plasmáticos de hormona.
- Emplear un paquete estadístico que permitió a realizar contrastes multivariantes de las respuestas obtenidas con los formulaciones ensayadas y establecer diferencias.

4. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1. Materiales.

- *Polímeros.*

Los polímeros empleados se recogen en la siguiente tabla:

Siglas	Nomenclatura
PLA	<i>Poli(láctico).</i>
PLGA	<i>Poli(láctico-glicólico).</i>
PLAmPEG	<i>Poli(láctico-metoxipolietilenglicol).</i>
PLGAPEG	<i>Poli(láctico-glicólico- polietilenglicol).</i>

Tabla 4.1. *Polímeros empleados.*

- *Principios activos.*

Hormona humana del crecimiento, rhGH (*Novo Nordisk*), obtenida mediante técnicas de ADN-recombinante y suministrada bajo la forma de Norditropin® 4 U.I. Cada vial contenía rhGH (5% relación peso/peso), bicarbonato sódico, glicina y manitol como excipientes.

- *Disolventes.*

Agua obtenida a partir de un sistema Milli-Q® (*Millipore*)

Acetona, diclorometano (DCM), tetrahidrofurano (THF), cloroformo, 1,4-dioxano, acetato de etilo y metanol, todos de grado para análisis (*Merck*).

Deuterocloroformo (*Aldrich*).

Dimetilsulfóxido deuterado (*Sigma*).

- *Reactivos.*

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

Ácido orto-fosfórico al 85%, fosfato disódico dihidratado y cloruro sódico, de grado para análisis (*Merck*).

Octanoato de estaño, alcohol láurico, polietilenglicolmonometoxilado 5000 (*Sigma*).

Polietilenglicol 4000 (*Escuder*).

3,6-Dimetil-1,4-dioxano-2,5-diona (d,l-lactida) (*Aldrich*).

Glicolida (*Boehringer Ingelheim*).

4.2. Métodos analíticos.

4.2.1. Cromatografía líquida de alta resolución por exclusión de tamaños.

Las determinaciones *in vitro* de los niveles de las proteínas empleadas en la parte experimental se llevaron a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución por exclusión de tamaños (SEC) con un cromatógrafo Waters, compuesto por una bomba (modelo 600E, System Controller), un inyector automático (modelo Wisp 700), un detector UV-Visible de longitud de onda variable (modelo 490E) y un sistema de adquisición de datos Maxima 820.

La fase estacionaria estuvo constituida por una columna Shodex[®] KW-823, mientras que la fase móvil empleada fue una disolución acuosa de fosfato disódico dihidratado 25 mM y cloruro sódico 300 mM, ajustada a pH 7,0 con ácido o-fosfórico. Las condiciones de trabajo empleadas fueron: flujo de $1,0 \pm 0,05$ ml/min., longitud de onda de 214 nm, tiempo de análisis de 15 min. y volumen de inyección de $100 \pm 2,0$ μ l.

Para la validación, según las normas de la Conferencia Internacional sobre Armonización (I.C.H., siglas del inglés de *International Conference on Harmonization*), del método cromatográfico empleado se prepararon ocho patrones

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

de hormona humana de crecimiento con concentraciones que oscilaron entre 4 y 64 $\mu\text{g/ml}$, y se procedió a su análisis cromatográfico. La siguiente tabla recoge las áreas totales correspondientes a cada uno de los patrones:

C ($\mu\text{g/ml}$)	Áreas ($\mu\text{V} \cdot \text{seg}$)			
4	45.091	43.185	42.747	44.561
10	100.760	113.153	103.576	96.046
14	140.932	148.782	159.780	147.659
20	189.589	184.454	185.820	182.163
28	286.795	295.749	290.418	293.540
45	458.593	430.695	450.934	433.673
50	509.284	522.449	480.995	518.331
64	653.503	643.152	633.987	638.956

Tabla 4.2. Áreas correspondientes a los picos cromatográficos obtenidos para diferentes concentraciones de rhGH.

La ecuación de la recta de regresión que se obtuvo fue:

$$\text{Área } (\mu\text{V} \cdot \text{seg.}) = 2.791 + 10.000 C (\mu\text{g/ml}); r = 0,999$$

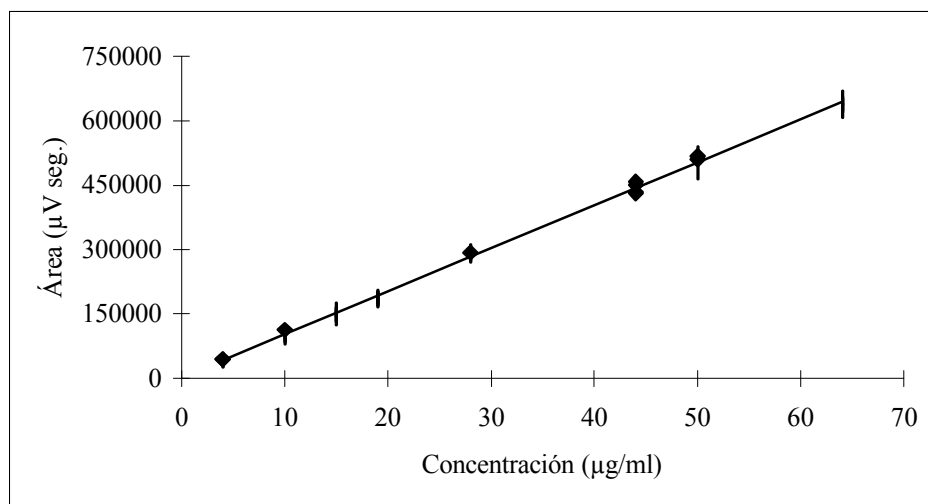


Figura 4.1. Recta de calibrado, obtenida por regresión lineal, de rhGH en fase móvil.

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

Los resultados del análisis de varianza de la regresión (ANOVA) se recogen en la siguiente tabla 4.3. Estos resultados nos permiten afirmar que el modelo lineal propuesto es adecuado, presentando el método analítico un coeficiente de variación del 3,54% (Hunter y Lamboy, 1.981).

Origen de variación	S.C. ·(10 ⁻⁷)	gl	C.M. ·(10 ⁻⁷)	F
Regresión	126.941	1	12.694	11.609
Residual	328,03	30	10,93	
Desviación linealidad	79,691	30	13,28	1,28
Error	248,34	0	10,35	
Total	127.269	31		

Tabla 4.3. Resultados del ANOVA de la recta de regresión ($\alpha = 0,05$).

Para calibrar el sistema cromatográfico se analizó diariamente una muestra patrón con una concentración teórica de hormona de 10 µg/ml. La media del área estimada para esta concentración patrón fue de 101.038± 2.037 µV seg. (n=19), siendo el c. v. del 2%. Se obtuvo para el tiempo de retención un valor medio de 11,4±0,05 min. (n=19), siendo el c. v. del 0,6%.

Por otra parte, se planteó un test de robustez para examinar el efecto de los variables operacionales sobre los resultados y se usaron como parámetros de control el tiempo de retención y el área del pico cromatográfico. Se estableció una zona de tolerancia marcada por los límites de acción, promedio ± 3 desviaciones estándar, y los límites de prevención, promedio ± 2 desviaciones estándar. Debemos señalar que si los resultados obtenidos se encuentran en esta zona de tolerancia del método, garantizamos, en cada momento, que éstos son aceptables y han sido obtenidos

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

mediante un método robusto. Las figuras 4.2 y 4.3 (página) nos dan idea de la robustez del método analítico.

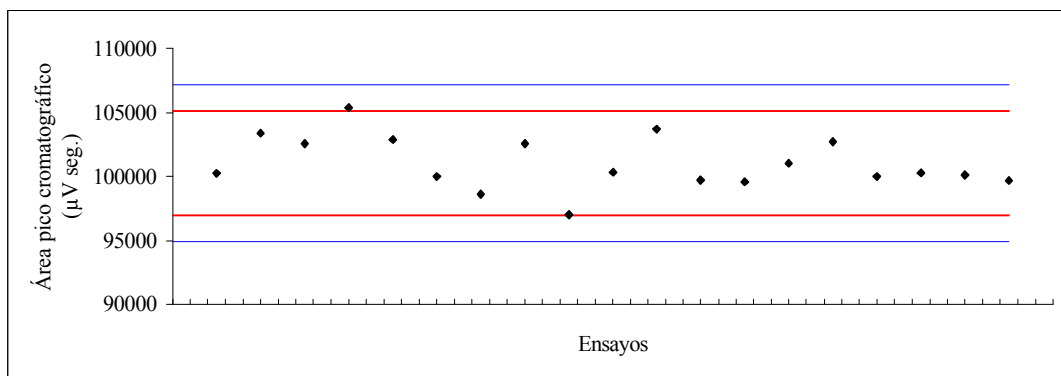


Figura 4.2. Carta control del método analítico empleado. Límites de acción (en azul) y de prevención (en rojo)

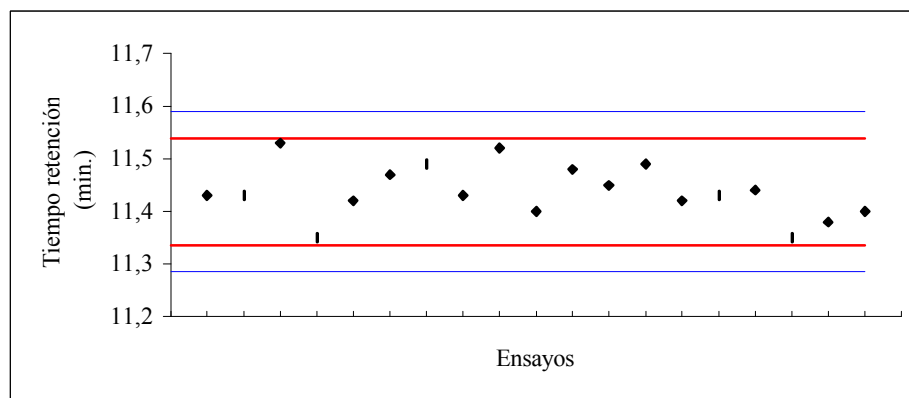


Figura 4.3. Carta control del método analítico empleado. Límites de acción (en azul) y de prevención (en rojo).

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

La repetibilidad se fijó analizando tres replicados de tres concentraciones distintas, siendo el coeficiente de variación $< 3,5\%$ para el área del pico cromatográfico.

En la tabla 4.4 se muestra la exactitud del sistema, expresada como el porcentaje de recuperación de una cantidad conocida de hormona, siendo el valor medio de $101 \pm 1,8 \mu\text{g}$ con un coeficiente de variación del $1,8\%$.

C ($\mu\text{g/ml}$)		% Recuperación
Teórica	Real	
10	9,90	99,0
10	10,4	104
10	10,3	103
20	20,1	101
20	20,3	102
20	19,7	99,5
50	49,8	99,6
50	50,0	100
50	50,3	101

Tabla 4.4. *Exactitud del sistema SEC.*

A partir de la desviación estándar de la respuesta y la pendiente, se fijó el límite de detección en $3,4 \mu\text{g/ml}$ y el de cuantificación en $10,2 \mu\text{g/ml}$.

4.2.2. Cromatografía de permeación en gel .

Los distintos pesos moleculares se determinaron por cromatografía de permeación en gel (GPC), utilizando un equipo *Waters* compuesto por una bomba (modelo 510), un refractómetro diferencial (modelo 410), con un inyector manual *Rheodyne* y un horno para el control de la temperatura de las tres columnas *Styragel*[®], colocadas en serie y con un tamaño de poro de 10^3 , 10^4 y 10^5 Å. Para la adquisición de datos y su análisis, se empleó el sistema Maxima 820.

Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron: temperatura de 31°C (detector y columnas) y tetrahidrofurano filtrado (*Millipore* FH[®] 0,5 µm) y desgasificado con helio, como fase móvil; flujo de 0,9 ml/min., tiempo de análisis de 40 min. y volumen de inyección de 20 µl.

La recta de calibrado del sistema se realizó utilizando patrones monodispersos de poliestireno con pesos moleculares: 2.800, 5.570, 10.300, 43.900, 102.000, 190.000, 355.000 y 710.000 (*Tokyo Soda Ltd.*). Las muestras patrón se prepararon con una concentración del 0,04% (p/v) en tetrahidrofurano; en cambio, las muestras problema se hicieron con una concentración del 0,5% (p/v). En la figura 4.4 vemos la carta control del método, en la que se representan los resultados correspondientes a los patrones diarios.

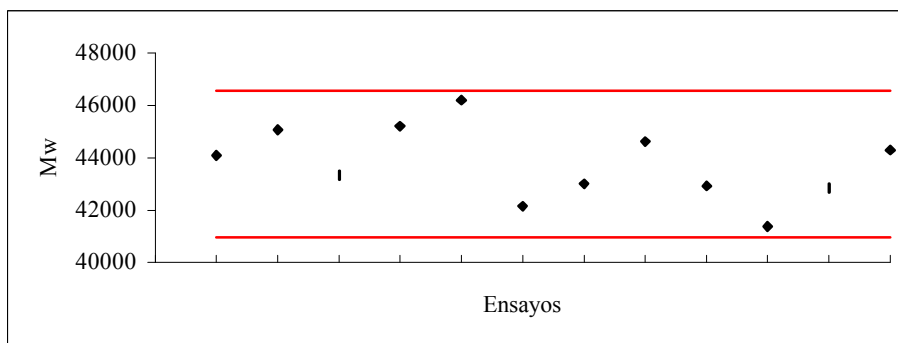


Figura 4.4. Carta control del método GPC. En rojo los límites de prevención (promedio $\pm 2 s$).

4.2.3 Resonancia magnética nuclear.

La composición de las muestras poliméricas se determinó empleando la resonancia magnética nuclear de protón (RMN- ^1H) como propusieron por Gilding y Reed (1.979, 1.981), usando un espectrómetro *Bruker* (modelo AMX 400) con deuterocloroformo como disolvente. La señal a 4,8 δ se asignó al grupo metileno de la unidad del ácido glicólico, a 5,2 δ al grupo metino de la unidad de ácido láctico, y la señal compleja a 1,6 δ al grupo metilo de este mismo ácido. De la relación de áreas de las dos primeras señales descritas podemos determinar la composición, dada en % de moles de láctico/glicólico. La señal correspondiente al metileno del polietilenglicol apareció como señal compleja en torno a 3,7 δ .

Las proporciones relativas de las unidades láctico-glicólico y glicólico-glicólico se determinaron mediante la técnica propuesta por Bendix (1.990), y utilizando la RMN- ^{13}C con un espectrómetro de la casa *Bruker* (modelo AMX 400) con dimetilsulfóxido deuterado como disolvente.

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

Las señales a 166,5 y 166,6 ppm correspondieron, respectivamente, a los grupos carbonilos de las unidades láctico-glicólico y glicólico-glicólico; a partir de la intensidad relativa de dichas señales, se determinó la proporción relativa de estas unidades.

4.2.4. Radioinmunoensayo.

Las muestras de suero sanguíneo se analizaron con un kit comercial de ^{125}I -radioinmunoensayo (RIA) para la rhGH (*DPC*[®]) basado en el procedimiento de doble anticuerpo, con modificaciones. En este ensayo, la hormona de crecimiento marcada con ^{125}I compitió con la hormona presente en la muestra problema por los sitios de unión en el anticuerpo específico. Después de una incubación, la separación de la porción ligada de la libre se llevó a cabo por adición de un complejo de polietilenglicol. Los tubos, tras centrifugación y retirada del sobrenadante, se contaron en un contador gamma (*Camberra, Co.*), siendo el número de cuentas inversamente proporcional a la cantidad de hormona presente en las muestras problema. Se realizó una recta de calibrado empleando una serie de patrones (en un rango de concentraciones de 1 a 30 ng/ml) y una representación logit-log. Los coeficientes de variación intra e inter ensayos estuvieron en torno a un 5 y 7%, respectivamente.

En la figura 4.5 queda representado de forma esquemática el protocolo seguido en el radioinmunoensayo llevado a cabo.

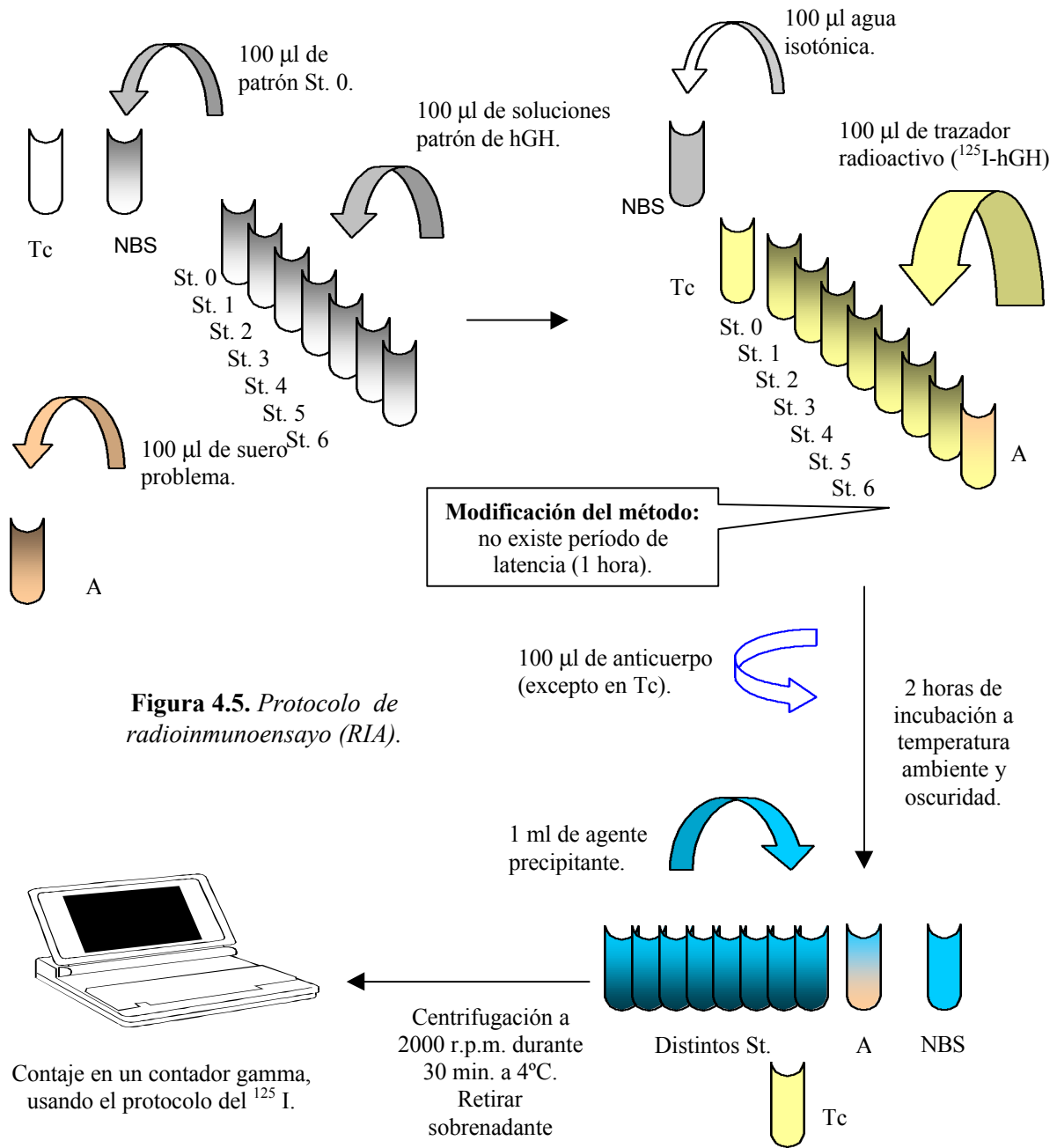


Figura 4.5. Protocolo de radioinmunoensayo (RIA).

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

Nomenclatura empleada en figura 4.5:

Muestra Tc (Total count): nos indica el número de cuentas totales.

Muestra NBS (No Specific Binding): nos indica la “fuerza de ligazón”.

Muestra St. 0: Patrón de hGH “marcada” con 0 ng/ml de concentración.

Muestra St. 1: Patrón de hGH “marcada” con 1 ng/ml de concentración.

Muestra St. 2: Patrón de hGH “marcada” con 2 ng/ml de concentración.

Muestra St. 3: Patrón de hGH “marcada” con 5 ng/ml de concentración.

Muestra St. 4: Patrón de hGH “marcada” con 10 ng/ml de concentración.

Muestra St. 5: Patrón de hGH “marcada” con 20 ng/ml de concentración.

Muestra St. 6: Patrón de hGH “marcada” con 30 ng/ml de concentración.

Muestra A: Muestra problema de suero sanguíneo de rata.

4.2.5. Microscopía electrónica.

La morfología de los implantes se estudió usando la microscopía electrónica de barrido, empleando un microscopio Jeol JSM 6.300 30Kv. Las muestras, dependiendo del caso, se cubrieron o no con oro como tratamiento previo a su visualización.

4.3. Síntesis de los polímeros.

Los polímeros utilizados se sintetizaron, en nuestro propio laboratorio, mediante polimerización por apertura del anillo de los correspondientes dímeros cíclicos, d,l-lactida y glicolida.

La d,l-lactida (pf: 124-126°C) se purificó mediante recristalizaciones sucesivas en acetato de etilo. Su almacenamiento, una vez purificada, se realizó en

deseCADador a vacío y a temperatura ambiente. La glicolida (pf: 88-90°C) no se sometió a proceso de purificación alguno; se almacenó en ambiente hermético a 4°C. Las variedades de polietilenglicol tampoco se sometieron a purificación.

La síntesis del PLA se realizó modificando el método descrito por Kulkarni *et alii* (1.966), mientras que para la síntesis de los PLGA, se utilizó, según el método descrito por Gilding y Reed, (1.979), el alcohol láurico en un porcentaje determinado según relación peso-peso, como controlador de la cadena. Por último, la síntesis del PLAmPEG y del PLGAPEG se llevó a cabo modificando el método de Gref *et alii* (1.995).

En todos los casos, la polimerización o copolimerización se llevó a cabo en ampollas a vacío (0,1-0,2 mm Hg), en un baño termostatzado de silicona con agitación magnética y usando octanoato de estaño como catalizador en un determinado porcentaje con relación al peso de la mezcla inicial. Se modificaron convenientemente la temperatura, los tiempos de síntesis, los disolventes de extracción y el método precipitación. En todos los casos, tras la eliminación del disolvente residual, se almacenaron en desecador a vacío. En la tabla 4.5 se muestran, de forma resumida, las condiciones de síntesis para cada uno de los polímeros.

Siglas	PLA	PLGA	PLGA	PLAmPEG	PLGAPEG
Composición (%)	100	80:20	75:25	90:10	70:20:10
Catalizador (%)	0,1	0,05	0,1	0,2	0,1
A. láurico (%)		0,01	0,01		
Temperatura (°C)	152	150	140	150	130
Tiempo (min.)	15	15	60	60	60
Extrayente	1,4-dioxano	1,4-dioxano	Cloroformo	1,4-dioxano	1,4-dioxano
Precipitante	agua	agua	Metanol	agua	agua

Tabla 4.5. *Condiciones de síntesis.*

4.4. Elaboración de implantes laminares.

Los implantes laminares se elaboraron a partir de películas poliméricas. La preparación de éstas se realizó en moldes teflonados, y se basó en la evaporación del disolvente orgánico de una disolución del polímero en diclorometano.

Se elaboraron tres series de implantes:

- Implantes F-1. Se disolvieron en agua 75 mg de Norditropin® (conteniendo 3,9 mg de rhGH), y esta disolución se depositó en un molde teflonado de 40 mm de diámetro, liofilizándose en un liofilizador de bandejas Labconco (modelo Lymph-Lock® 6). El ciclo consistió en una congelación a -45°C en 30 min., seguida de una desecación primaria a -10°C durante 24 h. y de una desecación secundaria a 5°C durante 10 h. Se añadió a la torta una solución al 20% (p/v) del polímero en diclorometano. La evaporación del disolvente orgánico se llevó a cabo a presión ambiental y temperatura de refrigeración (4°C) durante 48 h. El disolvente residual se eliminó en desecador a vacío durante 12 h. Transcurrido ese tiempo, se separó la lámina formada y se procedió a la medida del espesor en diferentes zonas con un

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

micrómetro digital Mitutoyo, con una precisión de 0,001 mm. El grosor medio fue de $420\pm 29\ \mu\text{m}$ ($n=10$). Para obtener los implantes se troqueló esta lámina utilizando punzones de acero inoxidable y 6 mm de diámetro. El contenido declarado de hormona en estos implantes fue de 85 μg .

- Implantes F-2. En una solución del polímero al 20% (p/v) se dispersaron 75 mg de Norditropin[®] (conteniendo 3,9 mg de rhGH) con agitación en Vortex[®]. La suspensión se depositó en el molde de Teflón[®] y se procedió a la evaporación del disolvente durante 48 h. a temperatura de 4°C y presión atmosférica. Se realizó una desecación posterior durante 12 h. en desecador a vacío para eliminar el diclorometano residual. La lámina obtenida, de un grosor de $350\pm 20\ \mu\text{m}$ ($n=10$), se sometió al ciclo de liofilización ya descrito; de esta manera, se emplearon las mismas condiciones que en el caso anterior. Posteriormente, se procedió al corte de la lámina haciendo uso de un troquel de 6 mm, consiguiendo que el contenido declarado en cada uno de los implantes fuese de 85 μg .

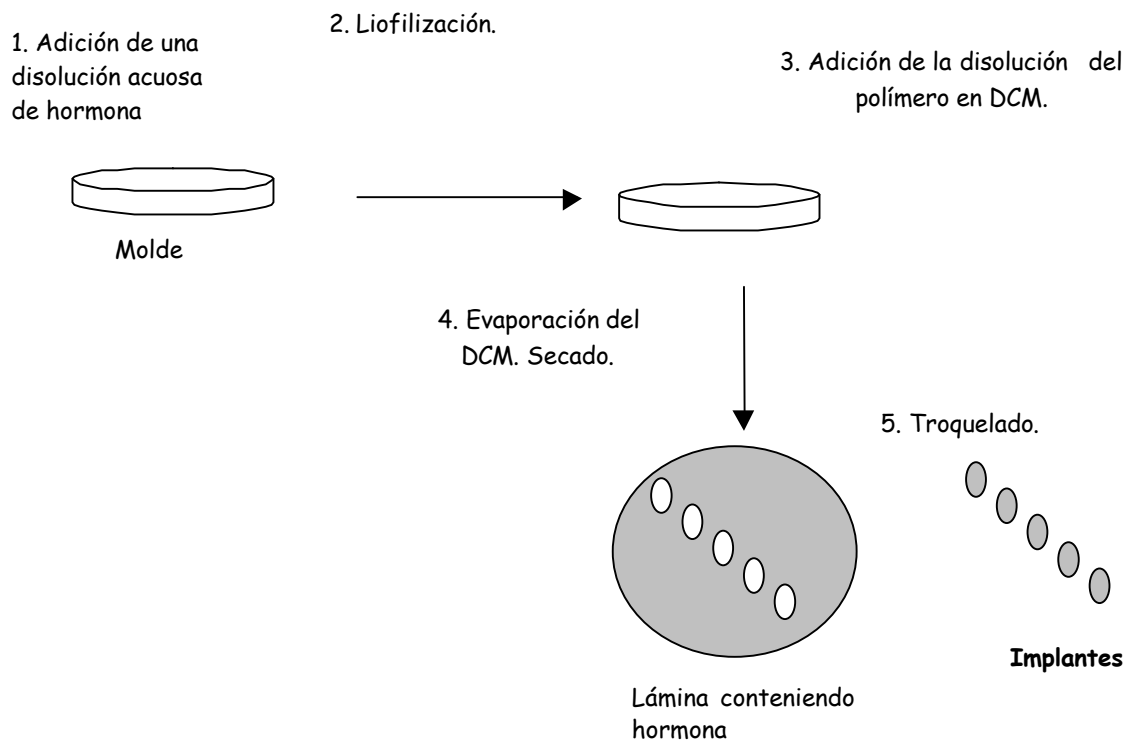


Figura 4.6. *Elaboración de los implantes F-1.*

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

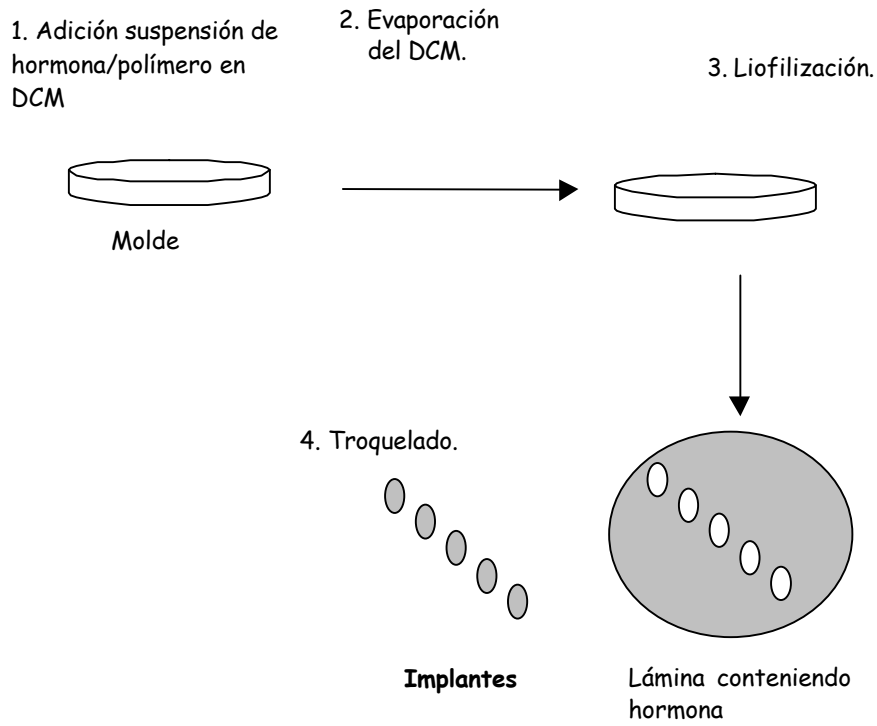


Figura 4.7. *Elaboración de los implantes F-2.*

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

- Implantes F-3. En primer lugar, se elaboraron dos láminas vacías de polímero; para ello, se depositaron 300 ml de solución polimérica en dos moldes teflonados, eliminándose el disolvente por evaporación según las condiciones ya descritas. Sobre las películas contenidas en los moldes se añadieron 5 ml de disolución acuosa con 75 mg de liofilizado Norditropin[®] (conteniendo 3,9 mg de rhGH). Las láminas con la disolución acuosa de proteína se liofilizaron, como en los casos anteriores. Tras este proceso, se separaron las láminas y se enfrentaron por las caras del liofilizado (anverso), de tal manera que éstas quedaron en el interior de un “emparedado”. Para consolidar este sistema, se le sometió a una presión de 3 Tm durante 1 min. empleando una prensa hidráulica Perkin-Elmer[®]. El sistema así obtenido, con un espesor medio de 180 ± 11 nm (n=10), se troqueló obteniendo implantes de 5 mm de diámetro.

Estas láminas, de forma individual, se emparedaron con dos películas vacías de 7 mm de diámetro. Para formar el implante definitivo, se aplicó una presión de 1 Tm durante 4 min., obteniendo un espesor final de 266 ± 9 μ m (n=10). A estos implantes se les realizó un orificio central de lado a lado utilizando un punzón de 0,5 mm de diámetro. Finalmente, el contenido declarado en estos implantes fue de 60 μ g.

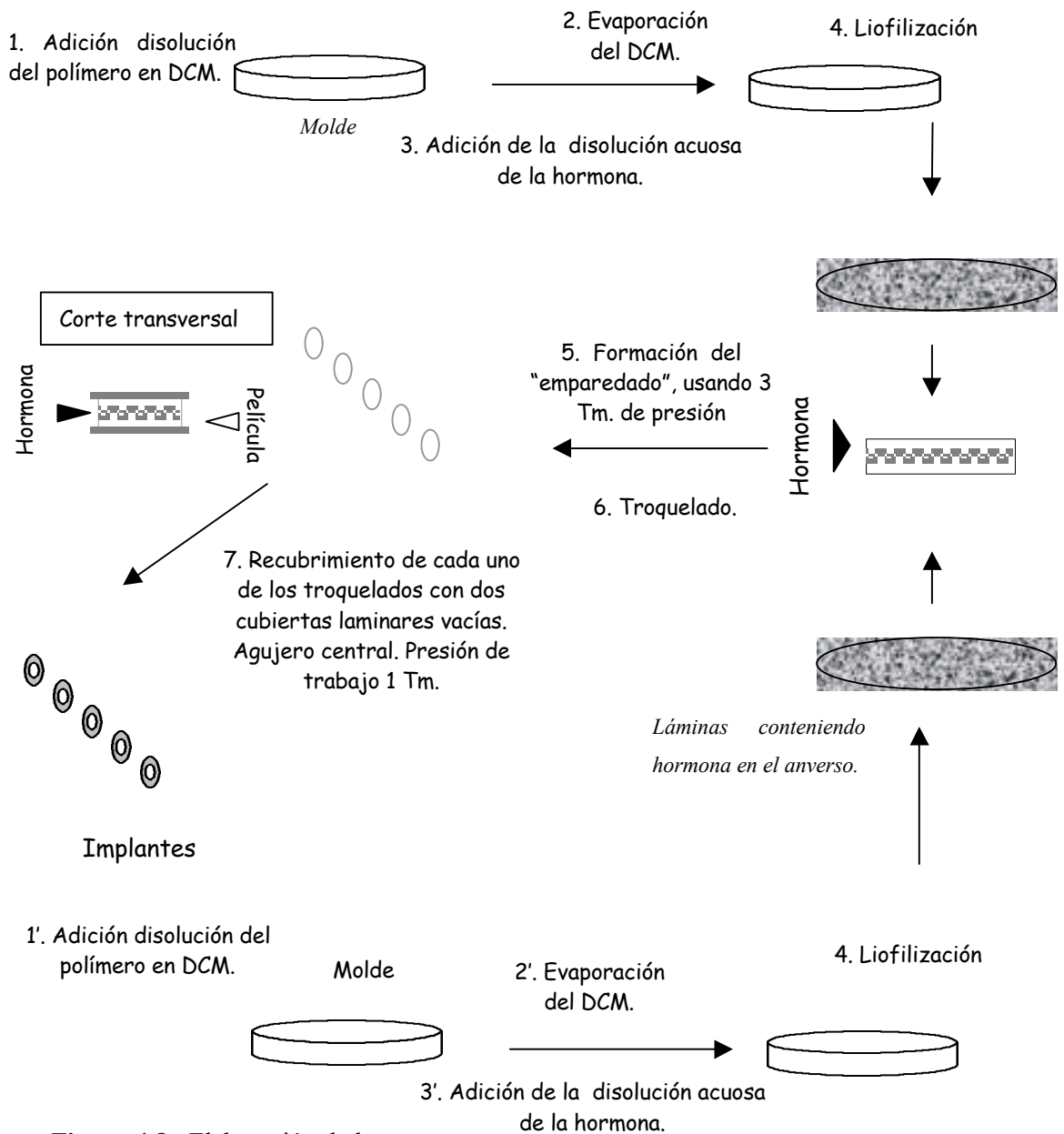


Figura 4.8. Elaboración de los implantes F-3.

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

La uniformidad en el contenido de las distintas láminas elaboradas se determinó disolviendo porciones de éstas (n=10), con peso y área conocida, en tetrahidrofurano. Una vez disuelto el polímero y liberada la carga de hormona, la dispersión se centrifugó a 4.000 r.p.m. durante 10 min. Se retiró el sobrenadante (disolución de polímero en tetrahidrofurano) y se secó a vacío el residuo. Este precipitado se disolvió en tampón fosfato y se cuantificó la cantidad de hormona presente por SEC.

En la siguiente tabla se resumen las características de los implantes obtenidos.

	Implante F-1	Implante F-2	Implante F-3
Diámetro (mm)	6	6	7
Espesor (µm)*	420±29	350±20	266±9
Área (mm ²)	28,3	28,3	38,5
Dosis teórica(µg)	85	85	60
Carga (%) *	10±0,1	10±0,1	0,9±0,1
* Promedio ± s (para n=10).			
* Cantidad de principio activo con relación al peso total del implante.			

Tabla 4.6. Características de los implantes elaborados.

4.5. Estudios de estabilidad.

Se realizaron estudios por duplicado para comprobar la estabilidad de la hormona en los disolventes orgánicos con los que entró en contacto, diclorometano y tetrahidrofurano. Se suspendió una cantidad conocida de hormona en un volumen conocido del disolvente y, a intervalos predeterminados de tiempo durante 24 horas, se determinó cromatográficamente la concentración de hormona presente.

Se estudió la estabilidad de una solución patrón de hormona en fase móvil y en tampón fosfato (medio de cesión) a 37°C durante varios días.

4.6. Estudios de cesión.

4.6.1. *In vitro*.

Los ensayos de cesión se llevaron a cabo por duplicado, en tubos de hidrólisis previamente xilanizados, en un baño a 37°C sin agitación durante 15 días. Cada implante se sumergió en 2 ml de tampón fosfato Sörensen isotónico y pH 7.4. La toma de muestras para el análisis se realizó retirando todo el volumen y reponiendo con tampón fresco cada vez.

La hormona se determinó utilizando el método cromatográfico anteriormente descrito.

4.6.2. *In vivo*.

Se realizaron dos ensayos de 15 días y se emplearon animales de experimentación que se mantuvieron en el animalario sometidos a dieta y ciclo de luz/oscuridad normal.

En el ensayo I se estudió el efecto de los implantes F-1 y F-2. Se seleccionaron 24 ratas OFA macho hipofisectomizadas (*Iffa Credo*, Francia). Los animales tenían un peso inicial de 85-105 mg y no ganaron más de 10% de peso corporal durante la semana de aclimatación, cumpliendo de esta manera con las normas de la *Farmacopea Europea*.

Se formaron cuatro grupos de siete individuos cada uno, elegidos al azar. Para evitar confusiones, los animales son marcados conveniente en la cola con tinta indeleble, para diferenciar los grupos, y en las orejas, para distinguir los individuos. Se asignó la siguiente nomenclatura:

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

Grupo 1: implante vacío.

Grupo 2: inyecciones de Norditropin®.

Grupo 3: formulación F-1.

Grupo 4: formulación F-2.

El grupo 2 o "Norditropin" recibió una dosis de 105 µg, dividida en siete inyecciones subcutáneas en días alternos.

Los otros dos grupos (3,4) recibieron una dosis total de 85 µg de rhGH contenida en las formulaciones, que se les implantó subcutáneamente en la parte posterior del cuello. Los animales se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal de una mezcla ketamina/xylazina (9:10 mg/kg.), y la incisión quirúrgica (<1cm.) se suturó con dos puntos simples de sutura 4/0.

El grupo 1 constituyó el grupo placebo o "*blanco*", al que se le implantó una serie de implantes vacíos.

El peso corporal de todos los individuos se determinó por duplicado, utilizando una balanza electrónica AND (con una precisión de 0,01 g), calibrada todos los días con una serie de patrones (ver *Anexo*).

Al 15º día se realizó el sacrificio de los animales mediante una inyección eutanásica de Euta-lender® Normon. Se extrajeron el timo, el bazo, el corazón, las tibias posteriores y suero sanguíneo. Se eligieron estos órganos basándonos en el trabajo de Battersby *et alii* (1.996), en el que se concluye que un incremento en el peso de éstos es un buen indicador de una presencia continua de hormona de crecimiento. Dichos órganos se transportaron y conservaron en formaldehído. Se empleó una balanza Sartorius (0,001 g de precisión) para realizar las pesadas y un micrómetro Stanley (precisión 0,01 mm) para la medida de las dimensiones de las tibias.

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

En el *ensayo II* se estudiaron los niveles de hormona cedida a partir de los implantes F-3, así como la degradación del polímero durante los 15 días que duró el ensayo. Se utilizaron 28 ratas Wistar macho con función hipofisaria normal, repartidos en dos grupos de 14 individuos. En el día 0 del ensayo, a estos animales se les implantó en la base del cuello las formulaciones F-3, con una dosis teórica de 60 μg , empleando metodología quirúrgica ya descrita. Cada día se sacrificaron dos individuos, de los que se recuperaron los implantes y se les extrajo una muestra de suero. Los sueros sirvieron para conocer los niveles de hormona presentes en el animal. De los implantes, a partir de la hormona remanente en ellos, se pudo calcular la hormona cedida, y además, se evaluó la variación en el tiempo del peso molecular del polímero.

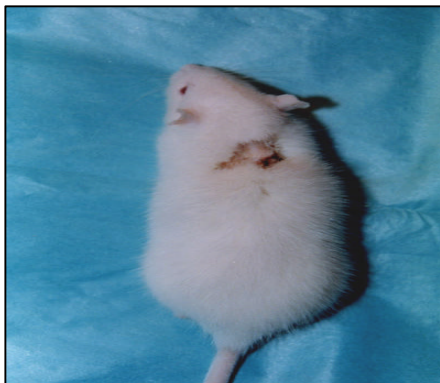


Figura 4.9. *Fotografía del animal tras la administración de la formulación por implantación subcutánea.*

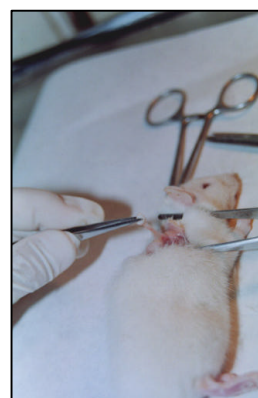


Figura 4.10. *Fotografías con detalles de la extracción de los implantes.*

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

4.7. Análisis estadístico.

Los resultados se analizaron estadísticamente usando el paquete informático *SPSS 9.0*.

El procedimiento *Modelo Lineal General* Multivariante proporciona un análisis de regresión y un análisis de varianza para variables dependientes múltiples por una o más covariables o variables de factor. Estas últimas dividen a la población en grupos. Utilizando este modelo es posible contrastar la hipótesis nula de los efectos de las variables de un factor sobre las medias. Asimismo, se pueden investigar las interacciones entre los factores y los efectos individuales de los mismos, y se pueden incluir los efectos de las covariables y las interacciones de las covariables con los factores.

Pueden emplearse pruebas *post hoc* para evaluar las diferencias entre las medias cuando alguna prueba F global ha mostrado cierta significación. Las pruebas de comparaciones múltiples *post hoc* se realizan por separado para cada variable dependiente.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1. Elaboración de implantes biodegradables.

La capacidad y versatilidad de los polímeros y copolímeros de los ácidos láctico y glicólico para el control de la cesión de medicamentos se ha estudiado ampliamente (Manson *et alii*, 1.976; Waykiyama *et alii*, 1.982; Langer y Peppas, 1.981). Estos polímeros cuentan con una serie de ventajas: solubilidad en disolventes orgánicos, maleabilidad y ductibilidad a temperatura ambiente, biocompatibilidad y baja toxicidad (Yamaguchi y Anderson, 1.993; Sanders *et alii*, 1.985), y cuando se utilizan como implantes al terminar la liberación del principio activo, por su biodegradación, no hay necesidad de intervención quirúrgica para su eliminación, pero hay que recordar que esta degradación va a depender mucho del tipo de polímero a emplear (García *et alii*, 1.999).

Todo esto nos condujo a seleccionar una gama de polímeros, sintetizados en nuestro laboratorio, que nos permitió conjugar una serie de propiedades directamente relacionadas con el control de la cesión (ver tabla 5.1). Los polímeros obtenidos a partir de un isómero, D o L, son de naturaleza cristalina, mientras que el formado a partir de la mezcla racémica es amorfo. En general, suelen ser hidrófobos y solubles en disolventes orgánicos, si bien su solubilidad es variable y va a depender de su composición y peso molecular. En este sentido, hay que decir que el PLA debido al grupo metilo adicional es más hidrofóbico que el PLGA, y que la introducción de unidades de polietilenglicol aumenta la hidrofilia, caso del PLAmPEG y del PLGAPEG. En igualdad de composición, a menor peso molecular mayor hidrofilia. La velocidad de degradación de estos polímeros es otro factor importante, y está influenciada por varios factores: peso molecular, cristalinidad y composición, y generalmente, una adecuada selección de la composición del polímero permite modular la velocidad de degradación. (Cutright *et alii*, 1.974; García *et alii*, 1.999).

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

ímero	PLA	PLGA	PLGA	PLAmPEG	PLGAPEG
Monómeros	LA	LA/GA	LA/GA	LA/mPEG	LA/GA/PEG
Composición (%) ¹	100	75:25	80:20	86:14	69:23:08
Proporción enlaces (LA-GA/GA-GA) ¹		1:1	1:1		1:2
Mw ²	90.000	40.000	150.000	30.000	60.000
Polidispersividad ³	1,09	1,81	1,43	1,35	1,46
Rendimiento (%) ⁴	76,0	98,2	79,6	43,6	51,3
Hidrofilia ⁵	1	4	3	2	5
Tiempo Degradación ⁶ (semanas)	32-48	2-3	4-5	8-12	5-6
LA: á. láctico; GA: á. glicólico; mPEG: polietilenglicol monometoxilado; PEG: polietilenglicol 4000					

Tabla 5.1. Características de los polímeros empleados. ¹ Por resonancia magnética nuclear ¹H y ¹³C. ² Peso molecular medio en peso. ³ Entendida como la relación entre el peso molecular en peso y el peso molecular en número. ⁴ Entendido como la masa de producto sintetizado con relación a la masa inicial de reactivos. ⁵ Escala en orden creciente de 1 a 5. ⁶ Tiempo aproximado obtenido a partir de estudios preliminares.

La capacidad de formar películas es un factor crítico a considerar a la hora de elaborar implantes laminares con espesor adecuado para una correcta administración. El método que hemos empleado es la dispersión de una disolución del polímero en una superficie plana y posterior evaporación del disolvente orgánico. En los estudios

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

previos se prepararon disoluciones de 100 mg de cada polímero en 10 ml de diclorometano, depositándola en una placa Petri y dejando transcurrir 24 horas a presión atmosférica y temperatura ambiente.

Se comprobó que todos forman películas; los polímeros PLAmPEG y PLGAPEG forman unas poco translúcidas, rígidas y muy fácilmente moldeables, mientras los polímeros PLGA 75:25 y PLGA 80:20 forman películas totalmente transparentes, maleables y de fácil moldeado; el polímero PLA, aunque forma una película translúcida, su moldeado entraña mucha dificultad debido a su tendencia a plegarse.

Los polímeros con mayor facilidad para formar películas utilizando este método de elaboración son los polímeros derivados del PLGA. En nuestro caso nos decidimos por el PLGA 75:25 de peso molecular intermedio. Este copolímero cuenta con varias ventajas respecto a los demás. La primera, su proceso degradativo ya ha sido estudiado *in vitro*, y podemos caracterizarlo como un proceso autocatalítico típico de los poliortoésteres con un descenso del pH y permaneciendo el polímero remanente en un estado amorfo (García *et alii*, 1.999). Segunda, posee unas propiedades químicas, relación de monómeros y distribución de pesos moleculares, que facilitan su caracterización y, con nuestra experiencia previa, nos hacen pensar en una vida “útil” de semanas antes de su bioasimilación. Y por último y, no menos importante, en su síntesis se obtiene un alto rendimiento y replicabilidad.

Una vez fijada la naturaleza del polímero candidato, nos planteamos la selección del tipo de material a utilizar en el molde para la consecución de películas con suficiente superficie y espesor adecuado para la obtención de un lote con número suficiente de formulaciones, adecuada versatilidad a la hora del moldeado y facilidad en su troquelado. Se decidió probar varios materiales: vidrio (sin tratar y

con xilanizado), acero inoxidable, aluminio y Teflón[®]. Los mejores, a la hora del moldeado de la película, son el vidrio xilanizado y el Teflón[®]. Se decidió por este último material, debido a que con él es más fácil lograr moldes de distinto diámetro.

Material	Vidrio	Vidrio xilanizado	Acero inoxidable	Aluminio	Teflón [®]
Moldeado ¹	-	+	+/-	-	++
Troquelado ²	+	+	+/-	+	++
Versatilidad ³	+/-	+/-	+	+	++

+: Bueno. -: Malo.

Tabla 5.2. Resumen de las características del molde dependiendo del material empleado en su elaboración. ¹ Incluye el grado de extensibilidad de la disolución polimérica sobre la superficie y la facilidad para la separación de la lámina formada. ² Hace referencia a la facilidad de realizar el troquelado en el mismo molde. ³ Facilidad para la obtención de moldes de distinto diámetro y su facilidad de manejo.

Para facilitar la separación de la lámina del molde se procedió a la evaporación del disolvente a una temperatura de 4°C y su posterior humectación, sin embargo, la mejor separación, sin ocasionar roturas o discontinuidades, se consigue liofilizando la película.

En la figura 5.1 se presenta una fotografía en la que se muestra el aspecto de un troquelado de película de PLGA 75:25 elaborada en molde de Teflón[®], observándose una superficie estriada cuyo origen se atribuye a imperfecciones en el molde.

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

La fotografía electrónica, figura 5.2, nos muestra en detalle un corte transversal de esta misma lámina. Vemos que son más apreciables los microcanales en el anverso de la lámina, es decir, en aquella que ha estado en contacto con el aire, siendo más compacta la parte en contacto con el molde.

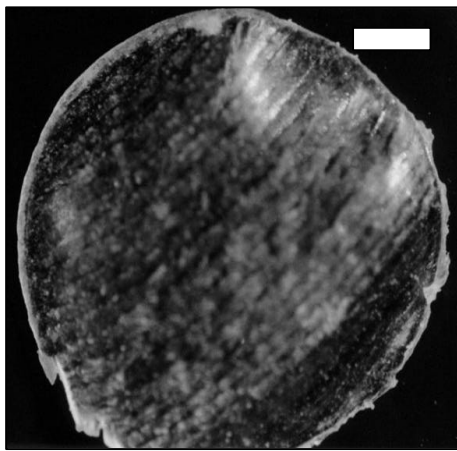


Figura 5.1. *Fotografía de una porción de película de PLGA. La barra equivale a 1 mm.*

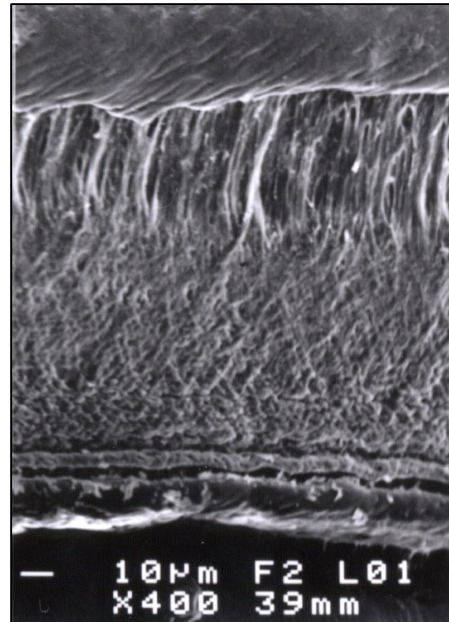


Figura 5.2. *Microfotografía electrónica correspondiente a un corte transversal de película de PLGA. 400 aumentos*

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

5.2. Estabilidad del liofilizado de rhGH.

Con el objeto de comprobar la estabilidad del liofilizado de rhGH en las diferentes condiciones a las que se le somete durante el proceso de elaboración de los implantes, se realizaron diferentes ensayos de estabilidad en los disolventes utilizados para la preparación de la película (DCM) y para la extracción de la hormona (THF), en la fase móvil utilizada para el análisis cromatográfico y en el medio para la realización de los ensayos de cesión *in vitro*.

La evolución de la masa de rhGH con el tiempo se siguió durante un período de 24 horas, tiempo que sobrepasa con creces el tiempo real en el que la hormona permanece en contacto con estos disolventes orgánicos durante el proceso de elaboración y de extracción. En las tablas 5.3 y 5.4 se recogen los valores de la masa de rhGH, en los dos disolventes estudiados, y a distintos tiempos. En las figuras 5.3 y 5.4 se representa la evolución de la masa de rhGH en contacto con los disolventes orgánicos.

Tiempo (horas)	Masa (μg)		Promedio
	(1)	(2)	
0	11,0	11,0	11,0
2	10,9	11,1	11,0
4	10,6	11,0	10,8
6	11,1	10,9	11,0
10	10,9	11,2	11,1
24	10,6	10,4	10,5

Tabla 5.3. Ensayo de estabilidad de rhGH en diclorometano (DCM).

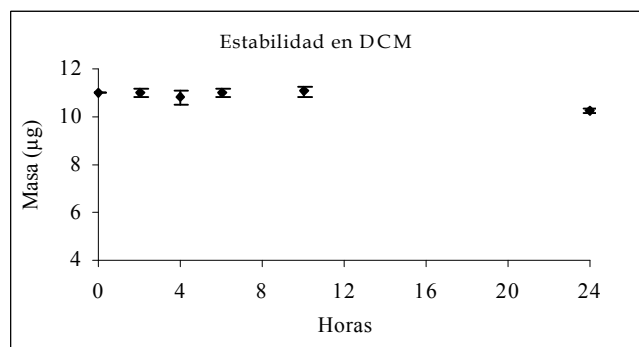


Figura 5.3. Ensayo de estabilidad con la rhGH.

Tiempo (horas)	Masa (μg)		Promedio
	(1)	(2)	
0	11,0	11,0	11,0
2	11,0	10,9	10,9
6	11,3	11,1	11,2
10	11,1	10,8	10,9
24	10,2	10,1	10,1

Tabla 5.4. Ensayo de estabilidad de rhGH en tetrahidrofurano (THF).

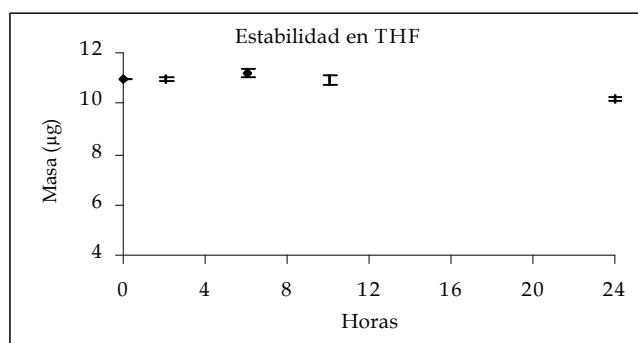


Figura 5.4. Ensayo de estabilidad con la rhGH.

Como puede observarse, el contacto con ambos disolventes orgánicos producen una pérdida, a las 24 horas, de menos del 10% de la cantidad inicial. El análisis de la regresión demostró que no se ha producido degradación, al aceptarse la hipótesis nula de la pendiente igual a cero para $\alpha=0,05$ (ver tabla 5.5). Esto supone

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

que durante los tiempos de contacto de la hormona con ellos en los procesos de elaboración y extracción, menos de 1 hora en el primer caso, y no más de 15 minutos en el segundo, no se produce degradación.

Ensayo	Pendiente	Probabilidad
con DCM	- 0,019	0,057
con THF	- 0,037	0,052

Tabla 5.5. Pendientes de las rectas de estabilidad de la rhGH.

Estos ensayos se han realizando con la rhGH en forma de Norditropin[®], por lo que hay que tener en cuenta el posible efecto protector de los excipientes implicados, manitol y glicina.

En las tablas 5.6-5.7 y las figuras 5.5-5.6 se muestran los resultados del ensayo de estabilidad de un patrón de rhGH (Norditropin[®]) en tampón fosfato a 37°C y en fase móvil a temperatura ambiente.

Como puede observarse, a las 48 horas existe una reducción significativa de la concentración que supera el 20%, por lo que no sería razonable demorar más de 24 horas la toma y posterior análisis de las muestras.

Tiempo (horas)	Concentración ($\mu\text{g/ml}$) $\cdot 10^3$		Promedio	% del valor inicial
	(1)	(2)		
0	15,4	15,4	15,4	100
3	15,3	15,3	15,2	99,2
19	15,5	15,8	15,6	102
23	15,1	15,4	15,2	98,9
27	15,3	15,2	15,3	99,2
43	13,6	13,8	13,7	88,9
47	12,1	12,8	12,5	80,9
52	10,4	11,8	11,1	72,1
54	8,82	8,24	8,53	55,4

Tabla 5.6. Ensayo de estabilidad de rhGH en tampón fosfato a 37°C.

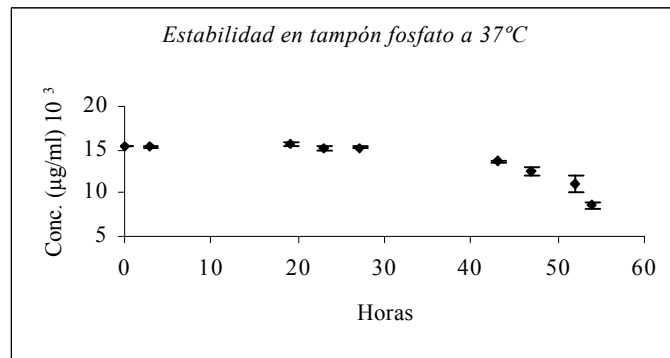


Figura 5.5. Ensayo de estabilidad con la rhGH.

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

Tiempo (horas)	Concentración ($\mu\text{g/ml}$) $\cdot 10^3$		Promedio	% del valor inicial
	(1)	(2)		
0	15,0	15,0	15,0	100
2	15,3	15,2	15,3	102
16	15,1	15,1	15,1	100
24	15,0	15,4	15,2	101
30	15,2	15,2	15,2	102
42	14,2	13,8	14,0	93,3
48	11,4	11,8	11,6	77,3

Tabla 5.7. Ensayo de estabilidad de rhGH en fase móvil a temperatura ambiente.

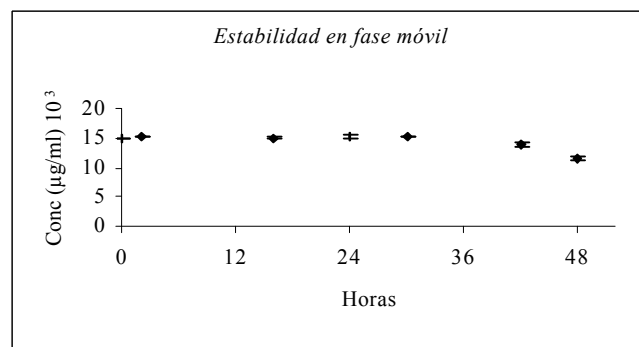


Figura 5.6. Ensayo de estabilidad con la rhGH.

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

5.3. Ensayos físicos.

5.3.1. Microscopía.

En las siguientes fotografías vemos el aspecto microscópico de cada una de las formulaciones.

Las figuras 5.7 y 5.8 muestran las fotografías correspondientes a un implante de la formulación F-1. No es posible distinguir, a simple vista, diferencias entre el anverso y reverso de esta formulación.

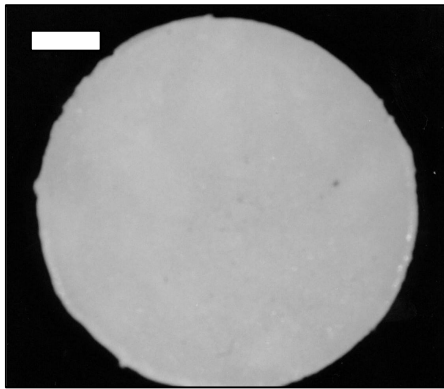


Figura 5.7. *Fotografía del anverso de un implante F-1. La barra equivale a 1 mm.*

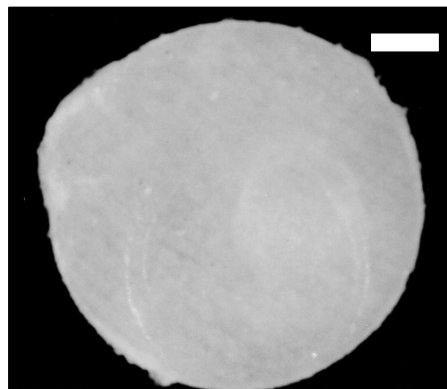
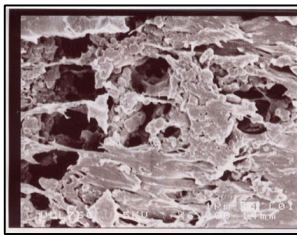
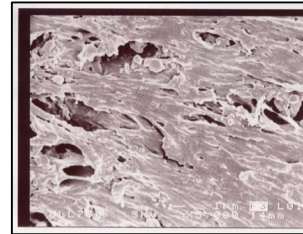


Figura 5.8. *Fotografía del reverso de un implante F-1. La barra equivale a 1 mm.*

Con la microscopía electrónica, figura 5.9, podemos apreciar detalles de la superficie del anverso de un implante F-1, así como el aspecto de un corte transversal del mismo. Se nos muestra una superficie e interior poroso.



Corte transversal a 6000 aumentos



Superficie a 5000

Figura 5.9. *Microfotografías electrónicas del implante F-1.*

En la figura 5.10 se muestra la fotografía que recoge el aspecto de un implante F-1, antes y después del ensayo de cesión *in vitro*. Podemos compararlo con un implante vacío. Vemos como en ambos casos, los implantes se han engrosado y han reducido su diámetro.

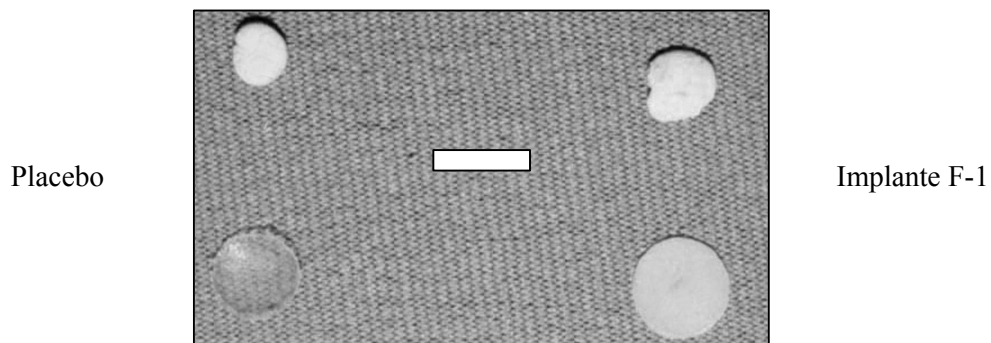
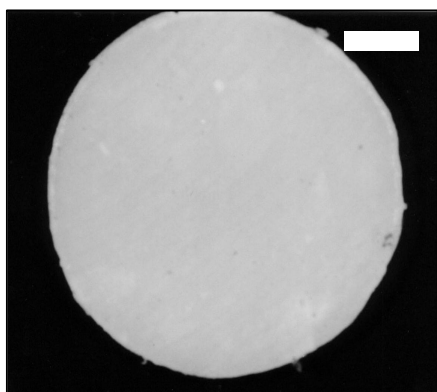
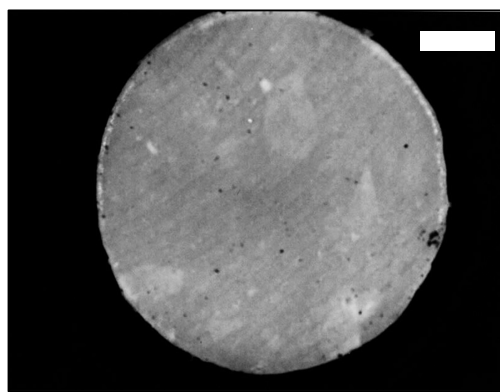


Figura 5.10. *Fotografía de F-1 antes y después del ensayo in vitro. La barra equivale a 6 mm.*

En la formulación F-2 podemos distinguir ambas caras por su aspecto, esto sin duda debido al método de elaboración, que implica una deposición de la dispersión de hormona en la disolución polimérica. Las fotografías de la figura 5.11 corresponden al anverso y reverso, respectivamente, de un implante de la formulación F-2.



Anverso de un implante F-2. La barra equivale a 1 mm.

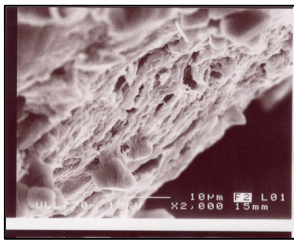


Reverso de un implante F-2. La barra equivale a 1 mm.

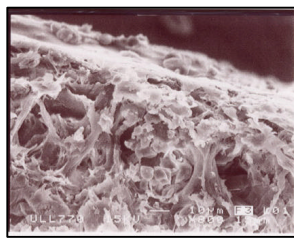
Figura 5.11. *Fotografías del implante F-2.*

En las siguientes microfotografías electrónicas, figuras 5.12 y 5.13, vemos con detalle las superficies del anverso y reverso de la formulación F-2 desde distintos ángulos. Distinguimos las partículas de liofilizado de rhGH atrapadas entre haces de fibras poliméricas. Se distingue, también, una superficie porosa, no obstante, la microscopía electrónica no nos aporta información complementaria a la obtenida con la microscopía óptica, con lo que no podemos justificar, *a priori*, posibles diferencias en la cesión del principio activo.

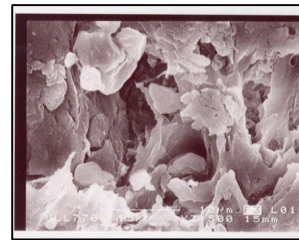
Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).



2000 aumentos

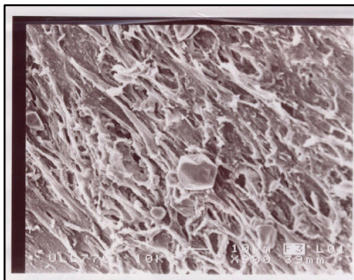


3500 aumentos

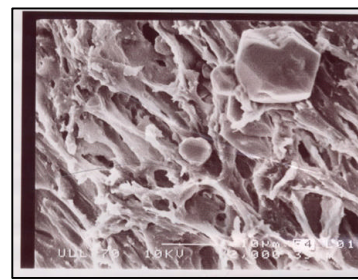


8000 aumentos

Figura 5.12. Microfotografías electrónicas con detalles del anverso de F-2.



900 aumentos



2000 aumentos.

Figura 5.13. Microfotografía electrónica con detalles del reverso de F-2.

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

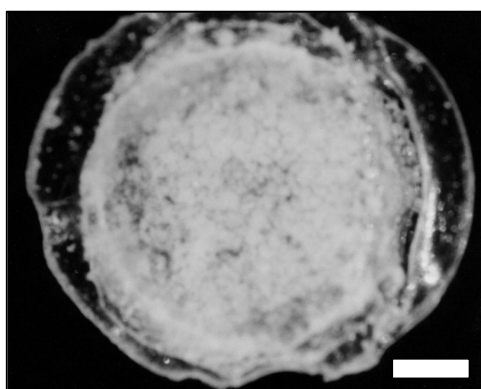


Figura 5.14. *Fotografía de un implante de la formulación F-3. La barra equivale a 1 mm.*

La figura 5.14 muestra una fotografía que corresponde a un implante de la formulación F-3. Distinguimos claramente el sistema de “emparedado”, conteniendo en su interior al reservorio de liofilizado de hormona sellado con láminas de polímero.

5.3.2. Dimensiones.

La difusión de la hormona, en estos sistemas, se verá condicionada por el espesor de la formulación. El espesor de las implantes elaborados va a depender

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

fundamentalmente de la concentración de polímero en la disolución orgánica y su viscosidad, del método de elaboración y del número de películas empleadas en su elaboración.

La medida de los espesores resulta crucial para obtener resultados reproducibles, por ello, Se determinó el espesor medio de cada una de las formulaciones diseñadas, tomando 10 medidas aleatorias con el micrómetro. Los resultados se exponen en la tabla 5.8. En estos resultados vemos, como era lógico de esperar, que son más finas aquellas que han sido sometidas a presión durante su elaboración. Como puede observarse, en ninguna de las formulaciones mencionadas se observaron variaciones de este parámetro superior al 7 %.

En la tabla 5.9 se muestran los resultados para el caso de la formulación F-3. Vemos que con el sellado se incrementa el valor del espesor inicial, que correspondería al espesor del “emparedado” obtenido en el primer paso de la elaboración de F-3.

	F-1	F-2
Espesor (nm)	450	350
	390	361
	435	365
	376	315
	469	357
	422	355
	401	319
	439	380
	395	352
	425	345
Promedio	420	350
S	29	20
c.v. %	7,0	5,7

Tabla 5.8. *Espesores medios en F-1 y F-2.*

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

	F-3	
	Espesor (nm)	182
	179	269
	196	281
	165	255
	182	249
	175	261
	185	269
	192	265
	180	263
	160	275
Promedio	180	266
S	11	9
c.v. %	6	3,5

Tabla 5.9. *Espesores medios en F-3. ¹Una vez sellado*

5.4. Ensayo de uniformidad de las unidades de dosificación.

En las tablas, de la 5.10 a 5.12, se exponen los resultados de la determinación de la uniformidad en contenido. En todos los casos se emplearon 10 troquelados con área y peso conocido, y la dosis declarada fue de 9,5 µg por unidad de dosificación.

rhGH (mg) 10^3	% referido a la dosis declarada
10,2	107,4
10,9	114,7
10,5	110,5
10,3	108,4
10,3	108,4
10,0	105,3
9,9	104,2
10,0	105,3
10,1	106,3
9,2	96,8
Promedio	106,74
s	4,63
c.v. %	4,34

Tabla 5.10. Resultados del ensayo de uniformidad en contenido para F-1.

rhGH (mg) 10^3	% referido a la dosis declarada
10,0	105,3
10,1	106,3
10,0	105,3
10,0	105,3
9,9	104,2
10,0	105,3
9,9	104,2
9,9	104,2
9,9	104,2
9,9	104,2
9,0	94,7
Promedio	103,89
s	3,29
c.v. %	3,17

Tabla 5.11. Resultados del ensayo de uniformidad en contenido para F-2.

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

rhGH (mg) 10 ³	% referido a la dosis declarada
10,4	109,5
10,9	114,7
10,4	109,5
10,6	111,6
10,3	108,4
10,2	107,4
10,4	109,5
10,6	111,6
10,6	111,6
10,6	111,6
Promedio	110,53
s	2,11
c.v. %	1,90

Tabla 5.12. Resultados del ensayo de uniformidad en contenido para F-3.

Todas las unidades ensayadas se encuentran dentro de los límites establecidos por la USP XXIII ed., y la desviación estándar relativa es inferior al 6%, lo que nos permite afirmar que las tres formulaciones cumplen la uniformidad de las unidades de dosificación, por ello, podemos concluir que los dos procedimientos de deposición de la hormona (por dispersión o por liofilización) permiten una distribución homogénea del principio activo en la lámina. Las unidades ensayadas son de una dosis inferior a la posteriormente ensayada en los ensayos *in vivo*, por una razón técnica, la producción y troquelado en cada lote no permitió la obtención de un número mínimo de dosis para implantar y, a la vez, un número suficiente de unidades de dosificación para el muestreo; sin embargo, no por ello quedan invalidados los resultados obtenidos en este ensayo. El muestreo aleatorio realizado es, en nuestra

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

opinión, igualmente válido a la hora de evaluar la homogeneidad de contenido de las formulaciones.

5.5. Ensayos *in vitro*.

En la tabla 5.13 y en la figura 5.15 se recogen los datos correspondientes a la cesión *in vitro* de la formulación F-1. Es importante resaltar que no se produce liberación inicial del principio activo o efecto “burst”, al contrario que sucede con otras formulaciones de cesión sostenida (Mitchell, 1.991; Ferguson *et alii*, 1.990; Cleland *et alii*, 1.997). Otro hecho significativo a destacar es que la dosis no se liberó totalmente, al final del ensayo únicamente se ha liberado un 40% de la dosis inicial. A partir de las 192 horas se produce un período de estancamiento en la cesión, observándose que a los 15 días el porcentaje remanente de la dosis presente en el implante es del $56,5 \pm 5,5\%$. Si bien este efecto no es deseable, también es cierto, que nos permite comprobar que la rhGH, en presencia de los excipientes, no parece verse alterada por las condiciones del microambiente que se desarrolla en el interior de la matriz polimérica. Este hecho ya ha sido puesto de manifiesto en trabajos publicados (Cleland *et alii*, 1.997; Johnson *et alii*, 1.996), en los que los autores manifiestan que una adecuada selección de excipientes evita la degradación de la hormona en condiciones fisiológicas y, por lo tanto, no se afecta en su actividad biológica y sus características inmunógenas.

El estancamiento en la cesión podría deberse a la existencia de algún tipo de interacción entre la hormona y el polímero cuando ésta se dispersa en la disolución polimérica y/o en la evaporación del disolvente orgánico.

Tiempo (horas)	% rhGH liberada			
	<i>Triplicado 1</i>	<i>Triplicado 2</i>	<i>Triplicado 3</i>	Promedio \pm s
2	0	0	0	0,0 \pm 0,0
24	10,2	11,4	7,8	9,8 \pm 1,8
48	12	14,1	12,9	13,0 \pm 1,1
72	16,1	15,6	13,5	15,1 \pm 1,4
96	21,3	22,2	25,5	23,0 \pm 2,2
120	30,5	26,4	28,3	28,4 \pm 2,1
144	35	32,1	36	34,4 \pm 2,0
168	40,8	41,9	43,7	42,1 \pm 1,5
192	40,8	42,7	48,3	43,9 \pm 3,9
216	40,8	42,7	48,3	43,9 \pm 3,9
240	40,8	42,7	48,3	43,9 \pm 3,9
264	40,8	42,7	48,3	43,9 \pm 3,9
288	40,8	42,7	48,3	43,9 \pm 3,9
312	40,8	42,7	48,3	43,9 \pm 3,9
336	40,8	42,7	48,3	43,9 \pm 3,9
360	40,8	42,7	48,3	43,9 \pm 3,9
Remanente	59,1	60,2	50,2	56,5 \pm 5,9
Total	99,9	102,9	98,5	100,4 \pm 2,2

Tabla 5.13. Cesión *in vitro* de la formulación F-1 ($n=3$). En porcentaje de dosis cedida respecto a la dosis declarada (85 μ g).

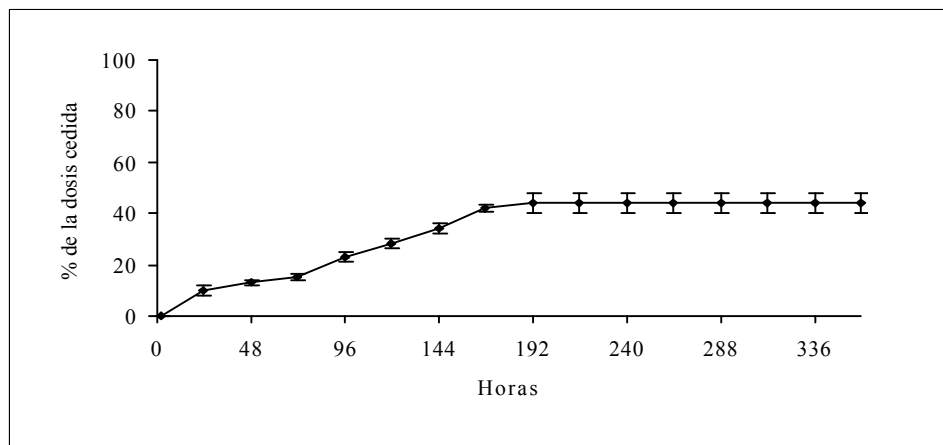


Figura 5.15. Cesión *in vitro* de la formulación F-1 ($n=3$). En porcentaje de dosis cedida respecto a la dosis declarada ($85 \mu\text{g}$).

La cesión vendría definida por una primera fase, primeras 192 horas, en la que se liberan aproximadamente $35 \mu\text{g}$, seguida de un estancamiento de la cesión reflejado en la aparición de una meseta en la figura 5.15, quedando aproximadamente unos $50 \mu\text{g}$ de la dosis que liberar.

Con el objetivo de paliar el estancamiento de la cesión observado en la F-1, se elaboró la formulación F-2 siguiendo un procedimiento (ver *Materiales y métodos*) que permitiera una distribución más homogénea de la hormona y un menor contacto entre la hormona y la disolución polimérica, evitando en lo posible interacciones no deseadas. Por otro lado, el espesor medio del implante también se

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

redujo considerablemente (de 420 μm a 350 μm). En la tabla 5.14 y la figura 5.16 se recogen los datos correspondientes a la cesión de la formulación F-2. En este caso, tampoco se observa efecto “burst” inicial, aunque la cantidad de hormona cedida durante las primeras 48 horas es más del doble (29% de la dosis) en comparación con F-1 (13% de la dosis). El estancamiento de la cesión se produce transcurridas 240 horas, liberándose un porcentaje de dosis superior, un 65% aproximadamente. La determinación del porcentaje remanente de hormona en los implantes tras 15 días de cesión fue del 35%. El balance de masas final ($98,5\pm 2,3\%$) entre la cantidad cedida y la remanente nos demuestra que la hormona tampoco se alteró por el microambiente polimérico. A pesar de que el método de elaboración permitió reducir en parte el estancamiento de la cesión, no se logró la liberación completa de la dosis en el tiempo deseado.

La cesión de F-2 viene representada por dos fases claramente diferenciadas. Durante las primeras 240 horas se ceden aproximadamente 55 μg . Tras esta fase aparece un estancamiento definitivo de la cesión, quedando 30 μg de la dosis total de 85 μg por liberarse.

Tiempo (horas)	% rhGH liberada			
	<i>Triplicado 1</i>	<i>Triplicado 2</i>	<i>Triplicado 3</i>	Promedio \pm s
2	0	0	0	0,0 \pm 0,0
24	28,1	21,5	19,9	23,2 \pm 4,3
48	32,6	25,3	30	29,3 \pm 3,7
72	33,1	35,9	36,2	35,1 \pm 1,7
96	39	35,9	37,1	37,3 \pm 1,6
120	45,2	42,4	48,6	45,4 \pm 3,1
144	49,9	54,3	48,6	50,9 \pm 3,0
168	52,4	59,6	48,6	53,5 \pm 5,6
192	60,1	62,4	53,2	58,6 \pm 4,8
216	63,9	63	59,6	62,2 \pm 2,3
240	63,9	65,2	60,3	63,1 \pm 2,5
264	63,9	65,2	60,3	63,1 \pm 2,5
288	63,9	65,2	60,3	63,1 \pm 2,5
312	63,9	65,2	60,3	63,1 \pm 2,5
336	63,9	65,2	60,3	63,1 \pm 2,5
360	63,9	65,2	60,3	63,1 \pm 2,5
Remanente	32,0	35,2	39,0	35,4 \pm 3,5
Total	95,9	100,4	99,3	98,5 \pm 2,3

Tabla 5.14. *Cesión in vitro de la formulación F-2, (n=3). En porcentaje de dosis cedida respecto a la dosis declarada (85 μ g).*

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

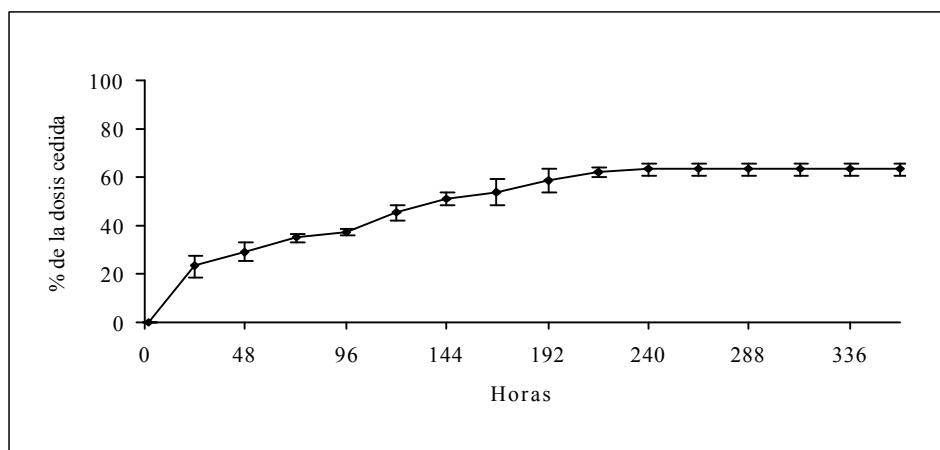


Figura 5.16. Cesión *in vitro* de la formulación F-2, (n=3). En porcentaje de dosis cedida respecto a la dosis declarada (85 μg).

En la tabla 5.15 y la figura 5.17 se presentan los resultados de la cesión *in vitro* de la formulación F-3. Esta formulación se ideó como posible solución al estancamiento de la cesión de las formulaciones anteriores. Con el sellado del reservorio evitamos el contacto de la hormona con la disolución polimérica, y de esta manera, las interacciones que se pudieran dar. En este caso tampoco se observa efecto “burst”, aunque el porcentaje de dosis cedido a las 48 horas se incrementa hasta un 68%. Vemos como el porcentaje de dosis cedida a los 15 días ronda un 90%, superior a los casos anteriores. Cabe destacar que el menor atrapamiento de la hormona está relacionado con la reducción en el espesor medio de la formulación conseguida con la modificación del método de elaboración. En el caso de F-3, el espesor se redujo hasta 266 μm , casi 100 μm menos respecto a F-2.

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

Tiempo (horas)	% rhGH liberada			
	<i>Triplicado 1</i>	<i>Triplicado 2</i>	<i>Triplicado 3</i>	Promedio± s
0	0	0	0	0,0±0,0
2	1,5	0	3,2	1,6±1,6
12	21,4	15,6	23,9	20,3±4,3
24	50,7	45,6	52,7	49,7±3,7
29	56,6	57,1	59,9	57,9±1,8
48	67,9	65,5	69,3	67,6±1,9
72	74,7	72,3	75,8	74,3±1,8
77	75,1	74,3	76,5	75,3±1,1
92	76,3	75	79,5	76,9±2,3
116	77,9	75,6	79,3	77,6±1,9
140	78,9	77,2	82	79,4±2,4
164	79,4	78,2	83,6	80,4±2,8
194	79,9	79	85,3	81,4±3,4
225	80	81,2	86,1	82,4±3,2
256	81,2	81,9	87,5	83,5±3,4
284	85,3	82,3	88	85,2±2,8
315	87,3	84,6	89,2	87,0±2,3
360	89,4	85,4	91,3	88,7±3,0

Tabla 5.15. *Cesión in vitro de la formulación F-3, (n=3). En porcentaje de dosis cedida respecto a la dosis declarada (60 µg).*

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

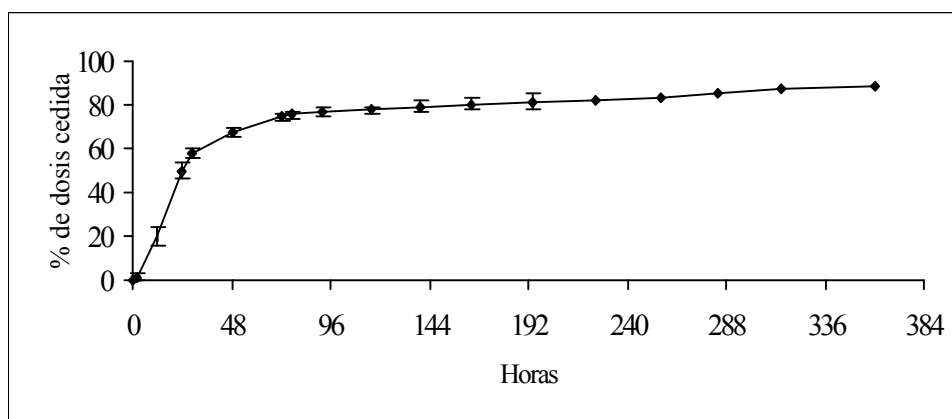


Figura 5.17. Cesión *in vitro* de la formulación F-3, (n=3). En porcentaje de dosis cedida respecto a la dosis declarada (60 μg).

En este caso, la cesión es bifásica. En las primeras 77 horas se liberan 46 μg de un total declarado de 60 μg , luego se ralentiza la cesión que no llega, en este caso tampoco, a ser completa, quedando 7 μg sin ceder. Estos resultados apuntan a la posible interacción que se daría entre la hormona y el polímero disuelto. Esta interacción se minimiza cuando se reduce el contacto entre la hormona y la disolución polimérica.

Para una mejor comprensión de los resultados *in vitro*, en la figura 5.18 se representan de forma conjunta las cesiones de las tres formulaciones.

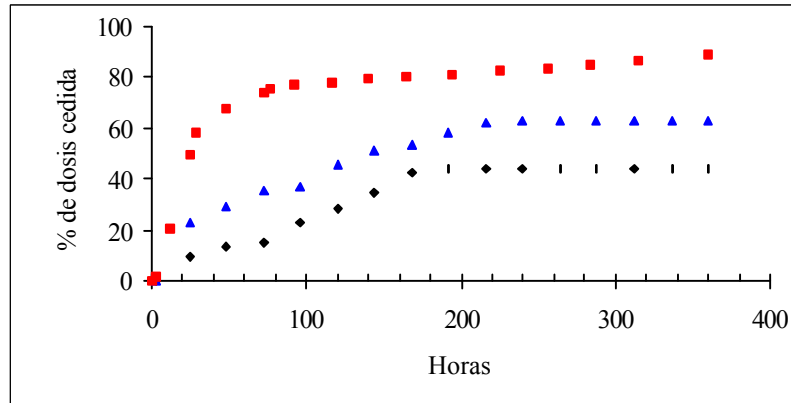


Figura 5.18. Cesión *in vitro* comparada ($n=3$) de las tres formulaciones. Siendo F-1 (negro), F-2 (azul) y F-3 (rojo).

Del ajuste de los distintos perfiles a cinéticas de orden cero y primer orden, y empleando el menor valor de la varianza de las estimadas como el mejor parámetro estadístico para designar la ecuación que mejor se ajusta a los datos recogidos, obtenemos los siguientes resultados. Para el caso de la cesión correspondiente a la formulación F-1, el perfil preasintótico (192 horas) se ajusta a un orden cero ($s^2_{estimadas} = 2,84$). En cambio, en el caso de F-2, el perfil cesión antes del estancamiento (240 horas) se ajusta mejor a un orden uno ($s^2_{estimadas} = 12,1$).

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

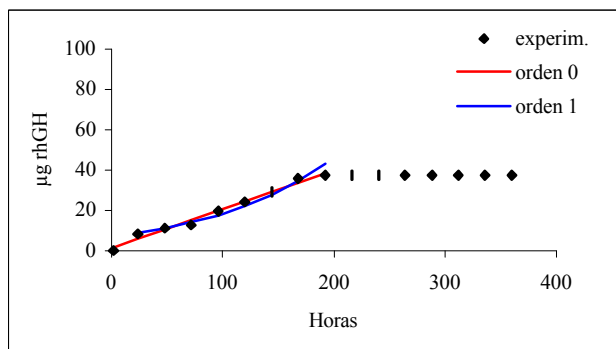


Figura 5.19. Ajuste del perfil de cesión de F-1 a cinéticas de orden cero ($s^2_{estimadas} = 2,84$) y uno ($s^2_{estimadas} = 8,54$).

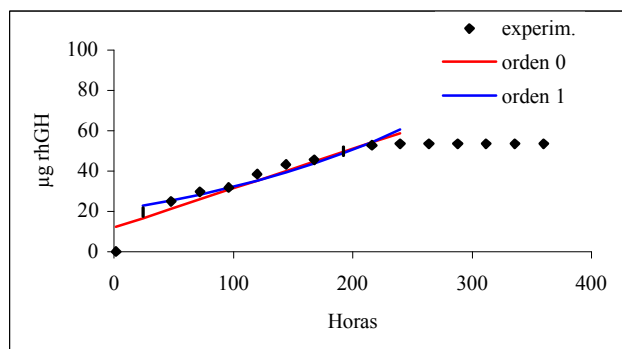


Figura 5.20. Ajuste del perfil de cesión de F-2 a cinéticas de orden cero ($s^2_{estimadas} = 26,60$) y uno ($s^2_{estimadas} = 12,10$).

En la cesión de F-3 se distinguen dos fases. La primera, hasta las 77 horas, con un mejor ajuste a un orden uno ($s^2_{estimadas} = 28,32$) frente a un orden cero ($s^2_{estimadas} = 65,64$). La segunda fase, que en este caso no es un estancamiento, sino

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

una ralentización de la cesión, a partir de las 77 horas, se ajusta mejor a un orden uno ($s^2_{estimadas} = 0,03$) que a un orden cero ($s^2_{estimadas} = 0,05$).

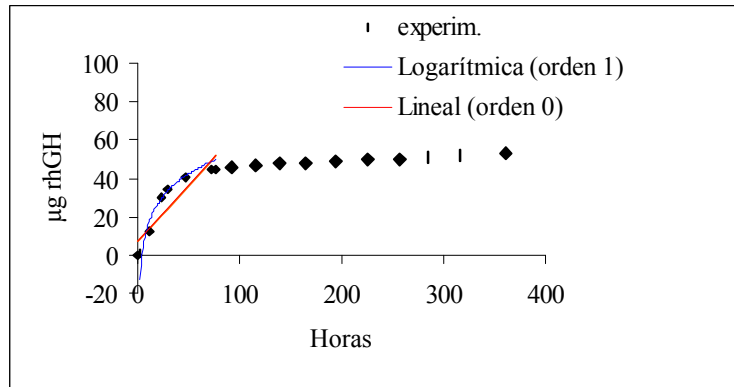


Figura 5.21. Ajuste del perfil de cesión de F-3 a cinéticas de orden cero y uno.

En la tabla 5.16 se recogen los valores del parámetro eficacia de disolución, utilizado por considerarse el más adecuado para la caracterización del perfil completo de liberación. Este concepto fue introducido por Kahn y Rhodes, 1.972, y se define como el área bajo la curva de disolución hasta un tiempo t definido, expresado como porcentaje del área descrito por el rectángulo definido por el 100% disuelto y el tiempo t anteriormente expresado.

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

Formulación	E.D. 360 h
F-1	0,41±0,38
F-2	0,55±0,57
F-3	0,88±0,03

Tabla 5.16. Valores promedios \pm s del parámetro E.D._{360h} correspondientes a las formulaciones elaboradas.

El análisis estadístico del parámetro E.D. _{360 h} demostró la existencia de una diferencia significativa entre las formulaciones ($F_{(2,6)}=318,6$; $\alpha<0,05$). En cualquier caso, se observa un aumento progresivo en la eficacia de disolución con las modificaciones realizadas en la técnica de elaboración. Esto, conjuntamente con la buena correlación encontrada entre el espesor final y la cantidad de hormona retenida (figura 5.22), nos ratifica la validez de los procedimientos empleados.

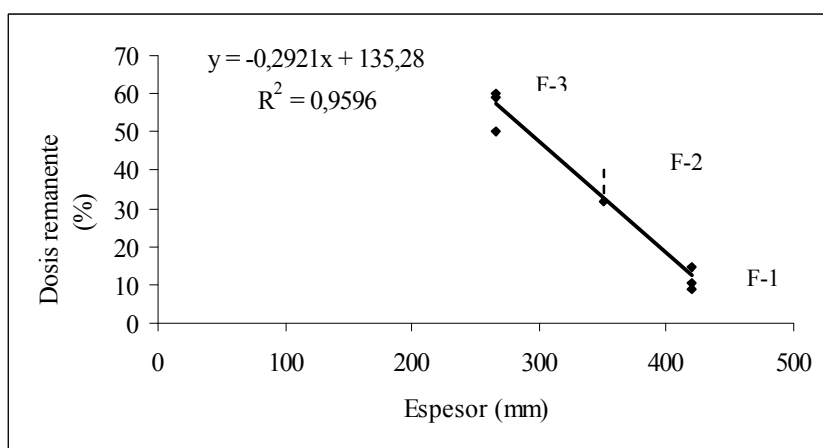


Figura 5.22. Correlación entre la dosis remanente y el espesor de los implantes.

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

5.6. Ensayos *in vivo*.

Se realizaron dos ensayos *in vivo*, denominados ensayo I y ensayo II. En el primero se contrastaron las dos primeras formulaciones elaboradas (F-1 y F-2) con una formulación comercial, utilizando para ello ratas hipofisectomizadas. Posteriormente, en el segundo ensayo se comprobó la evolución de los niveles plasmáticos de rhGH y la degradación *in vivo* de los implantes, empleando ratas normales a las que se les administró la F-3.

5.6.1 Ensayo *in vivo* I.

Una vez recibidas las ratas hipofisectomizadas en el animalario central, éstas se sometieron a período de adaptación al nuevo entorno, alimentándolas a base de una dieta normal, y controlando diariamente su peso durante una semana, con el objeto de descartar los animales que hubieran ganado o perdido más del 10% de la masa corporal, tal y como recomienda la *Farmacopea Europea*. Cualquier incremento de peso superior significaría que la hipofisectomización no fue completa y que en el animal se estarían secretando niveles de hormona de crecimiento que interferirían en la respuesta esperada al administrar la somatotropina humana. Tras la semana de aclimatación, ninguno de los animales incrementó su peso más del valor permitido (ver *Anexo*). Estos animales constituyeron la base para el ensayo *in vivo* I en el que se administraron las dos primeras formulaciones (F-1 y F-2), una formulación comercial basada en inyecciones múltiples subcutáneas (Norditropin®) y un implante placebo con el objetivo de observar y contrastar la respuesta farmacológica producida. Se utilizó como variable respuesta el incremento de peso corporal durante el tiempo de duración del ensayo y, tras el sacrificio de los

animales, el peso del corazón, bazo y timo, además del peso y dimensiones (anchura y largo) de las tibias.

En las fotografías de la figura 5.23 podemos ver dos momentos del proceso de extracción del implante. En el sitio de implantación no parece, a simple vista, haberse dado ningún proceso inflamatorio ni de fibrosis, lo cual supone que ha existido una buena tolerancia del implante por parte del sistema inmune del animal. Esta observación y comentario respecto a la histocompatibilidad de las formulaciones ensayadas debe tomarse como una aproximación, ya que cualquier conclusión definitiva debería apoyarse en estudios histopatológicos.

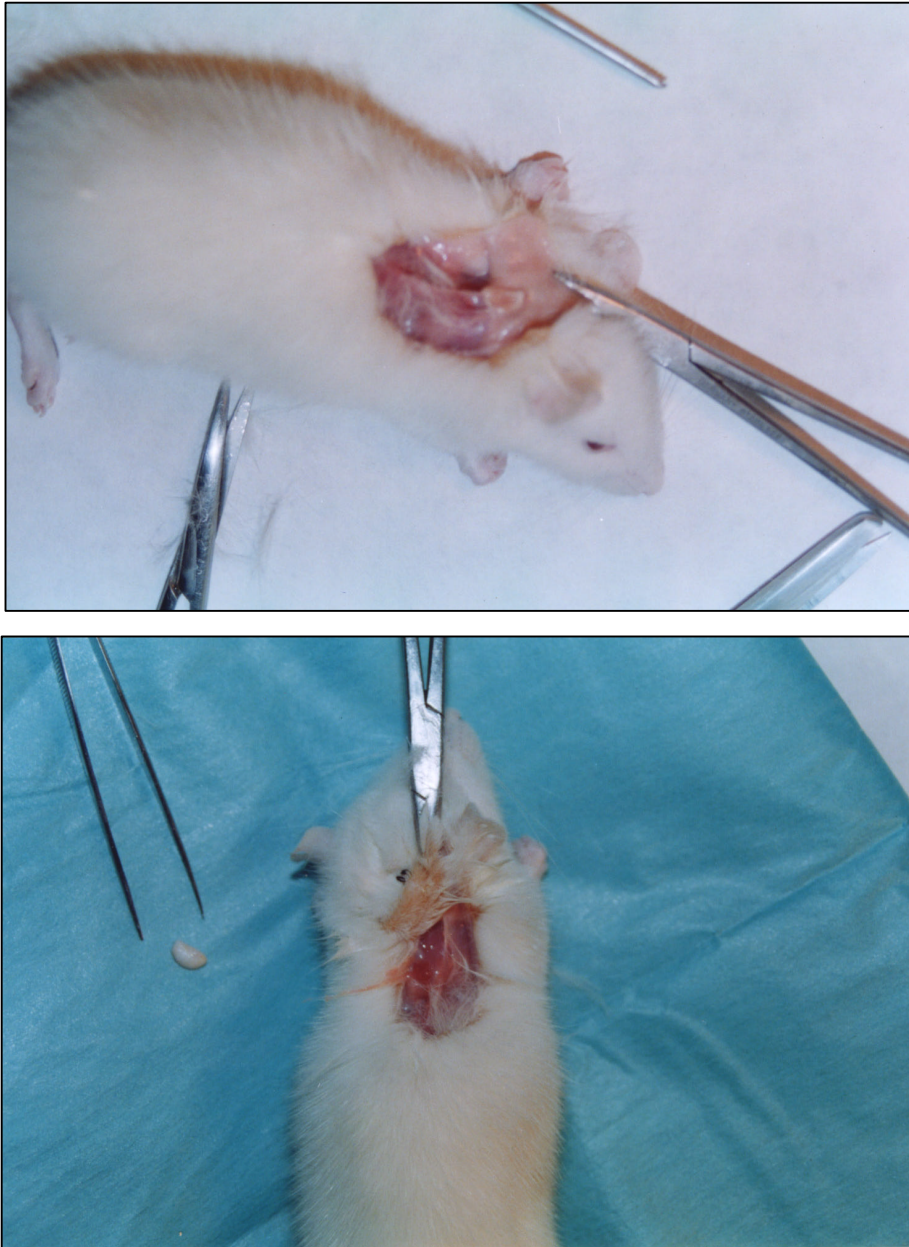


Figura 5.23. *Fotografías de dos momentos en la extracción del implante.*

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

La primera respuesta a analizar y la más utilizada en este tipo de ensayos (*Farmacopea Europea*) es el efecto de incremento de la masa corporal de los animales, pudiendo analizarse el incremento medio final en el peso o el peso máximo alcanzado durante el período que duró el ensayo.

En la tabla 5.17 y figura 5.24 se observa la evolución del peso corporal del grupo 1 (placebo), al que se le administró un implante sin principio activo. Como puede observarse, lejos de producirse un incremento en el peso, éste disminuyó unos 5 gramos respecto al valor promedio inicial. Este hecho puede estar relacionado con el estrés al que se somete a los animales en la intervención quirúrgica y en la pesada diaria, o quizás, que las condiciones del animalario no fueran las más idóneas para el postoperatorio. No obstante, al ser el grupo control en el ensayo planteado, cumplieron perfectamente con la función encomendada.

Tiempo (días)	Promedio \pm s (g) (n=6)
0	0,00 \pm 0,00
1	-0,72 \pm 1,22
2	-2,87 \pm 1,98
3	-3,18 \pm 1,88
5	-2,38 \pm 1,42
6	-3,40 \pm 1,42
7	-2,68 \pm 1,86
8	-4,58 \pm 1,63
9	-4,27 \pm 1,92
10	-3,90 \pm 1,76
11	-4,44 \pm 2,39
13	-1,94 \pm 2,01
14	-2,93 \pm 1,84
15	-4,26 \pm 3,36
17	-5,65 \pm 4,03

Tabla 5.17. Aumento de peso en el Grupo 1 (placebo) durante el ensayo in vivo I.

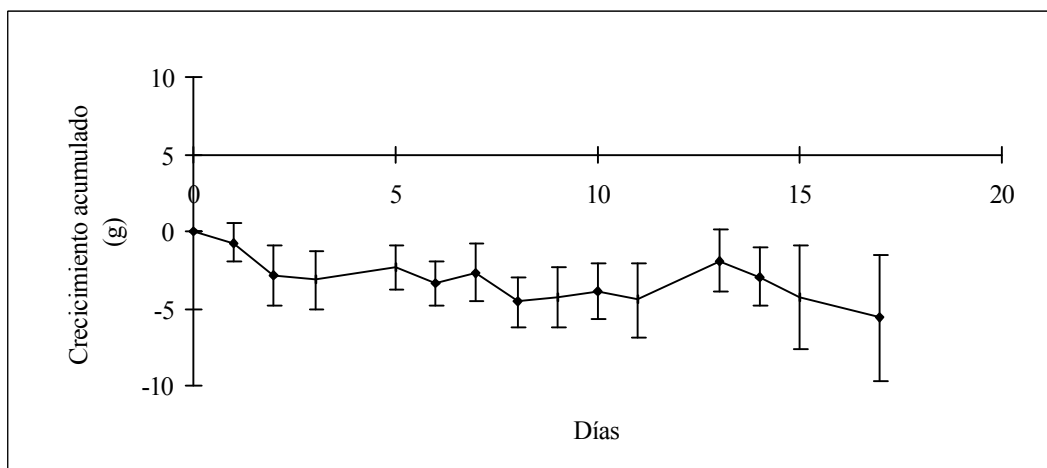


Figura 5.24. Evolución del peso corporal del Grupo 1 (placebo) en el ensayo in vivo I.

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

En la tabla 5.18 y figura 5.25 se recoge la evolución del peso en el grupo 2 (Norditropin[®]) al que se le administró inyecciones subcutáneas de rhGH. Vemos que el aumento de peso se produce a impulsos, coincidiendo con la administración de la dosis que, como se recordará, se realizaba en días alternos. Con esta formulación, se decidió administrar una dosis total (105 μg) superior a la dosis de los implantes (85 μg), con la intención de compensar la no administración diaria, que es la pauta posológica indicada, pues se consideró que el estrés que la inyección diaria producía podía alterar la respuesta de estos animales. El régimen posológico seguido fue similar al de Thakkar *et alii* (1.988), y superior al empleado por Battersby *et alii* (1.996) que administraron la formulación de referencia a una única dosis inicial, concretamente 200 μg , muy por encima de la dosis de las formulaciones por ellos ensayadas, 40 μg .

Tiempo (días)	Promedio \pm s (g) (n=6)
0	0,00 \pm 0,00
2	3,53 \pm 1,68
3	3,89 \pm 1,37
4	2,41 \pm 1,05
6	5,21 \pm 1,84
7	5,84 \pm 1,31
8	5,52 \pm 1,41
9	7,23 \pm 1,77
10	5,22 \pm 2,17
11	7,55 \pm 1,47
12	4,97 \pm 1,51
14	8,27 \pm 1,72
15	10,2 \pm 1,85
16	10,6 \pm 1,74
17	8,55 \pm 2,30

Tabla 5.18. Aumento de peso en el Grupo 2 (Norditropin[®]) durante el ensayo *in vivo I*.

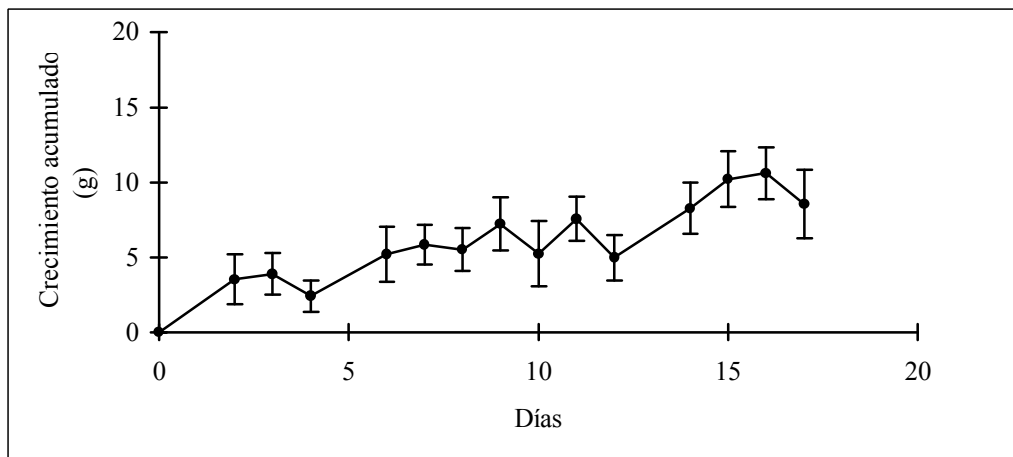


Figura 5.25. Ganancia en peso corporal acumulada del Grupo 2 (Norditropin) en el ensayo *in vivo I*.

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

En la tabla 5.19 y en la figura 5.26 se presentan los datos correspondientes a la ganancia de peso correspondiente al grupo 3 (F-1), al que se le suministró rhGH empleando la formulación denominada F-1. Vemos como el incremento medio en peso del grupo nos hace intuir que se estuvo produciendo un aporte continuo de hormona del crecimiento, como consecuencia de la cesión sostenida desde la formulación implantada.

Tiempo (días)	Promedio \pm s (g) (n=6)
0	0,00 \pm 0,00
1	1,15 \pm 0,00
2	6,67 \pm 3,47
3	5,03 \pm 2,83
4	6,79 \pm 2,23
5	5,83 \pm 0,60
6	10,0 \pm 2,70
7	9,25 \pm 2,13
8	9,66 \pm 2,95
9	8,73 \pm 2,20
10	8,24 \pm 3,52
11	8,71 \pm 3,20
12	9,56 \pm 1,93
13	5,51 \pm 0,00
14	10,9 \pm 3,02
15	10,5 \pm 2,02
16	10,9 \pm 2,89
17	10,6 \pm 2,72

Tabla 5.19. Aumento de peso en el Grupo 3 (F-1) durante el ensayo in vivo I.

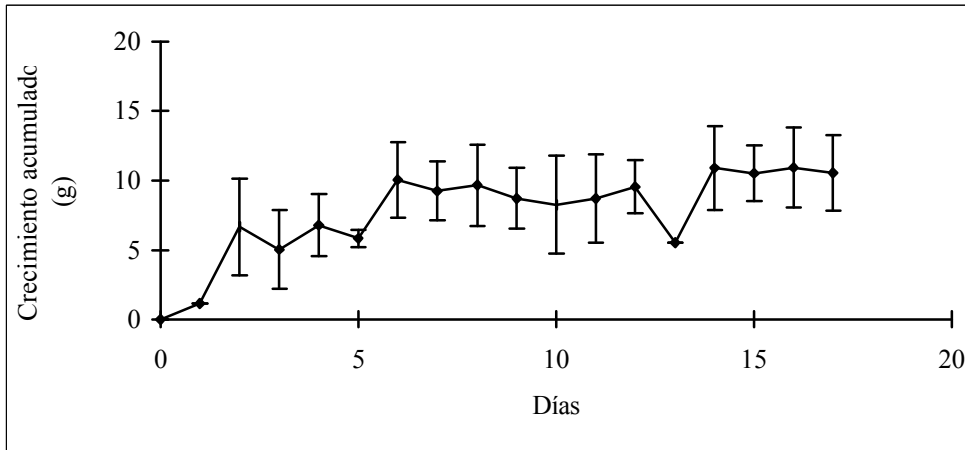


Figura 5.26. *Ganancia en peso corporal acumulada del Grupo 3 (F-1) en el ensayo in vivo I*

En la tabla 5.20 y la figura 5.27 se muestran los resultados correspondientes al incremento medio en peso alcanzado por los animales del grupo 4 (F-2). Este grupo es el que presentó un comportamiento más errático durante el ensayo.

Tiempo (días)	Promedio \pm s (g) (n=6)
0	0,00 \pm 0,00
1	1,75 \pm 1,17
2	0,15 \pm 3,17
3	1,11 \pm 3,36
4	0,75 \pm 3,79
5	5,30 \pm 0,00
6	5,27 \pm 3,52
7	4,51 \pm 3,09
8	5,49 \pm 3,45
9	3,73 \pm 4,12
10	4,79 \pm 2,30
11	5,44 \pm 2,26
12	5,66 \pm 3,18
14	7,43 \pm 3,55
15	6,23 \pm 3,65
16	2,71 \pm 4,15
17	1,98 \pm 5,53

Tabla 5.20. Aumento de peso en el Grupo 4 (F-2) durante el ensayo in vivo I.

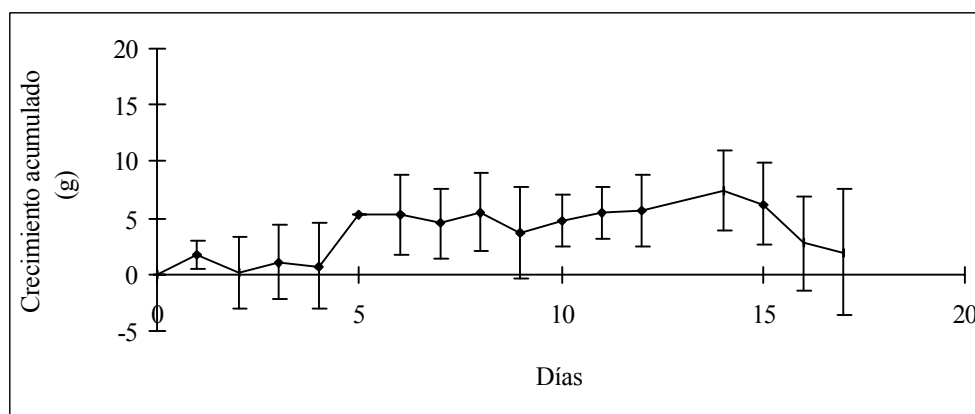


Figura 5.27. Ganancia en peso corporal acumulada del Grupo 4 (F-2) en el ensayo in vivo I.

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

En la figura 5.28 se muestran los resultados del ensayo *in vivo* I, pero planteando la ganancia de peso de cada uno de los grupos como la diferencia entre el peso máximo alcanzado durante el ensayo y el inicial.

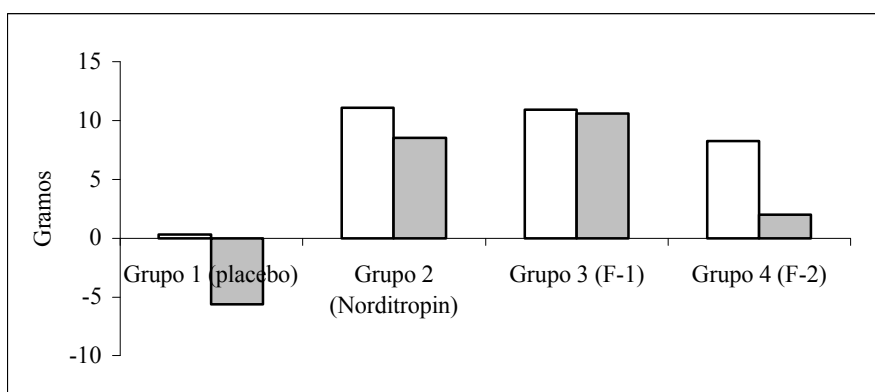


Figura 5.28. Incremento de peso durante el ensayo *in vivo* I, peso máximo alcanzado (blanco) y peso medio al final del ensayo (fondo gris).

Tal y como puede observarse en la figura 5.28, todas las formulaciones produjeron un incremento en el peso de los animales muy superior al alcanzado en el grupo placebo, apenas 320 mg. La máxima ganancia fue de 11,1 gramos, alcanzada en el grupo 2 (Norditropin[®]), incremento equiparable al alcanzado en el grupo 3 (F-1), 10,9 gramos, y ligeramente superior al obtenido en el grupo 4 (F-2), 8,29 gramos. Sin embargo, si se toma el peso medio alcanzado al final del ensayo, vemos como la

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

mayor ganancia se alcanza en el grupo 3 (F-1), con 10,6 gramos frente a los 8,55 conseguidos en el grupo 2 (Norditropin®). Esto significa que en el grupo con la formulación F-1 el incremento de peso es mucho más regular.

En la figura 5.29 se muestra de forma conjunta la ganancia acumulada de peso de cada uno de los grupos ensayados durante el ensayo *in vivo* I. Del análisis de los resultados se desprende que la mejor curva de crecimiento es la obtenida en el grupo 3 (F-1), seguida de la de los grupo 2 (Norditropin®), 4 (F-2) y 1 (placebo), respectivamente.

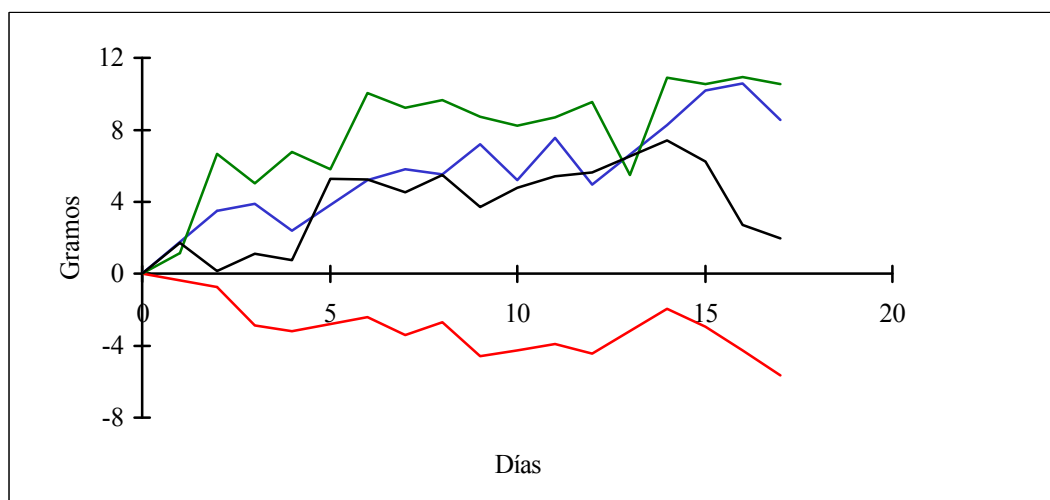


Figura 5.29. Ganancia de peso en cada uno de los grupos implicados en el ensayo *in vivo* I. Siendo: Grupo 1 (placebo) (rojo), Grupo 2 (Norditropin[®]) (azul), Grupo 3 (F-1) (verde) y Grupo 4 (F-2) (negro).

En la tabla 5.21 se recogen los resultados de la prueba de comparaciones múltiples para la respuesta del incremento en peso corporal de los distintos grupos. Para dicho análisis, se empleó el estadístico de Bonferroni, que utiliza las pruebas *t* para realizar comparaciones por pares entre las medias de los grupos, pero controla la tasa de error global estableciendo que la tasa de error de cada prueba sea igual a la tasa de error por experimento dividida entre el número total de contrastes. Así se corrige el nivel crítico, debido a que se están realizando múltiples comparaciones. De los resultados obtenidos podemos extraer lo siguiente; primero, existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos con tratamiento y el grupo placebo. Segundo, el grupo tratado con inyecciones de rhGH, grupo 2, presenta diferencias con el grupo 3 (F-1) y no presenta diferencias significativas con el grupo 4 (F-2). Tercero, vemos que es el grupo 3 (F-1) el único que presenta diferencias significativas con todos los demás grupos, y en todo los casos, diferencias entre las medias positivas, lo que confirma que la mejor respuesta se obtiene con esta formulación .

Formulación	Formulación	Diferencia entre medias	Error típ.	Sig. ^a	Intervalo de confianza al 95 % para diferencia	
					Límite inferior	Límite superior
Grupo 1 (placebo)	Grupo 3 (F-1)	-9,835	1,307	0,000	-13,59	-6,077
	Grupo 4 (F-2)	-3,770	1,307	0,049	-7,528	-0,012
	Grupo 2 (Norditropin [®])	-4,266	1,307	0,020	-8,024	-0,508
Grupo 3 (F-1)	Grupo 1 (placebo)	9,835	1,307	0,000	6,077	13,59
	Grupo 4 (F-2)	6,065	1,307	0,001	2,307	9,822
	Grupo 2 (Norditropin [®])	5,569	1,307	0,002	1,811	9,326
Grupo 4 (F-2)	Grupo 1 (placebo)	3,770	1,307	0,049	0,012	7,528
	Grupo 3 (F-1)	-6,065	1,307	0,001	-9,822	-2,307
	Grupo 2 (Norditropin [®])	-0,496	1,307	1,000	-4,254	3,262
Grupo 2 (Norditropin [®])	Grupo 1 (placebo)	4,266	1,307	0,020	0,508	8,024
	Grupo 3 (F-1)	-5,569	1,307	0,002	-9,326	-1,811
	Grupo 4 (F-2)	0,496	1,307	1,000	-3,262	4,254

Tabla 5.21. Comparaciones por pares de formulaciones y sus diferencias medias significativas. Basadas en las medias marginales estimadas. ^a Ajuste para comparaciones múltiples: Bonferroni. La diferencia de las medias es significativa al nivel 0,05.

Se procedió a comprobar la existencia de correlación entre las respuestas estudiadas y el peso corporal, y para ello se realizó una prueba de correlación de Pearson (ver tabla 5.22). De los resultados obtenidos se desprende la existencia de una fuerte correlación entre la variable "peso máximo alcanzado" con el resto de las respuestas y, en el caso del "peso final del animal", también se correlaciona con todas las respuestas, excepto con la anchura de la tibia izquierda. El peso del corazón no está correlacionada con el peso del timo y del bazo. Vemos, también, cómo el peso de los órganos se encuentran muy poco correlacionados con las dimensiones de las tibias; sin embargo, son estas respuestas entre sí las que presentan una correlación más significativa. Comprobadas las correlaciones existentes, se procedió a analizar por separado las distintas respuestas obtenidas en cada grupo con la intención de determinar las diferencias estadísticas presentes entre cada una de las formulaciones.

En el caso de las tibias, y para simplificar, obviamos el estudio de las epífisis tibiales y nos centramos en el análisis del incremento en la anchura, en el largo y en el peso de las tibias de los animales de experimentación, respuestas ya estudiadas por otros autores (Battersby *et alii*, 1.996).

		Peso final	Peso máx.	Bazo (g)	Corazón (g)	Timo (g)	Tibia ^d (g)	Tibia ^d (mm)	Tibia ^d a (mm)	Tibia ^l (g)	Tibia ^l (mm)	Tibia ^l a (mm)
Peso final	Pearson Sig.*											
Peso máx.	Pearson Sig.	0,795	0,000									
Bazo (g)	Pearson Sig.	0,553	0,555									
Corazón (g)	Pearson Sig.	0,002	0,002									
Corazón (g)	Pearson Sig.	0,433	0,475	0,428								
Timo (g)	Pearson Sig.	0,021	0,011	0,023								
Timo (g)	Pearson Sig.	0,468	0,562	0,480	0,325							
Tibia ^d (g)	Pearson Sig.	0,012	0,002	0,010	0,091							
Tibia ^d (g)	Pearson Sig.	0,401	0,541	0,436	0,255	0,256						
Tibia ^d l (mm)	Pearson Sig.	0,034	0,003	0,021	0,191	0,188						
Tibia ^d a (mm)	Pearson Sig.	0,625	0,641	0,448	0,348	0,295	0,634					
Tibia ^d a (mm)	Pearson Sig.	0,000	0,000	0,017	0,070	0,127	0,000					
Tibia ^l (mm)	Pearson Sig.	0,278	0,490	0,175	0,297	0,184	0,518	0,374				
Tibia ^l (g)	Pearson Sig.	0,152	0,008	0,374	0,125	0,348	0,005	0,050				
Tibia ^l (g)	Pearson Sig.	0,473	0,645	0,313	0,255	0,236	0,854	0,688	0,641			
Tibia ^l (mm)	Pearson Sig.	0,011	0,000	0,105	0,190	0,227	0,000	0,000	0,000			
Tibia ^l a (mm)	Pearson Sig.	0,725	0,765	0,382	0,332	0,332	0,603	0,873	0,519	0,736		
Tibia ^l a (mm)	Pearson Sig.	0,000	0,000	0,045	0,084	0,084	0,001	0,000	0,005	0,000		
Tibia ^l a (mm)	Pearson Sig.	0,368	0,609	0,133	0,258	0,197	0,523	0,473	0,850	0,672	0,620	
Tibia ^l a (mm)	Pearson Sig.	0,054	0,001	0,501	0,186	0,315	0,004	0,011	0,000	0,000	0,000	

Tabla 5.22. Correlación de Pearson, entre todas las respuestas estudiadas en el ensayo I.* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral). ^a Ancura. ^l Largo. ^l Izquierda. ^d Derecha.

En la tabla 5.23 se muestra un resumen de los valores medios de estas respuestas para cada uno de los grupos.

La tabla 5.24 presenta los resultados del análisis multivariante de varianza. Vemos que de las tres respuestas analizadas, relacionadas con las tibias, únicamente el largo de ambas tibias presenta diferencias estadísticamente significativas entre formulaciones. Recordar aquí el resultado mostrado en la tabla 5.22, en el que el largo tibial es de las respuestas más fuertemente correlacionadas con el peso máximo y final alcanzado.

Y en la tabla 5.25 se muestran los resultados de la prueba de comparaciones múltiples empleando la diferencia menos significativa (equivalente a la ausencia de ajuste). De los resultados se desprende que las tres formulaciones se diferencian del grupo placebo, pero no existen diferencias significativas cuando se comparan las formulaciones F-1, F-2 e inyectable comercial. Por lo tanto, aunque la respuesta "largo tibial" está fuertemente correlacionada con el peso corporal, únicamente permite distinguir entre formulaciones y placebo, pero no es tan sensible como para detectar diferencias entre las tres formulaciones.

	Formulación	Media	Desv. típ.	N
Tibia ^d peso(g)	Grupo 1 (placebo)	0,215	0,016	7
	Grupo 3 (F-1)	0,238	0,012	7
	Grupo 4 (F-2)	0,232	0,015	7
	Grupo 2 (Norditropin ^â)	0,226	0,023	7
Tibia ^d largo (mm)	Grupo 1 (placebo)	27,24	0,487	7
	Grupo 3 (F-1)	28,29	0,107	7
	Grupo 4 (F-2)	28,00	0,577	7
	Grupo 2 (Norditropin ^â)	28,09	0,297	7
Tibia ^d ancho (mm)	Grupo 1 (placebo)	1,971	0,189	7
	Grupo 3 (F-1)	2,136	0,138	7
	Grupo 4 (F-2)	2,114	0,135	7
	Grupo 2 (Norditropin ^â)	2,100	0,100	7
Tibia ⁱ peso(g)	Grupo 1 (placebo)	0,206	0,024	7
	Grupo 3 (F-1)	0,236	0,023	7
	Grupo 4 (F-2)	0,226	0,013	7
	Grupo 2 (Norditropin ^â)	0,223	0,019	7
Tibia ⁱ largo (mm)	Grupo 1 (placebo)	27,25	0,405	7
	Grupo 3 (F-1)	28,27	0,189	7
	Grupo 4 (F-2)	27,93	0,275	7
	Grupo 2 (Norditropin)	28,23	0,269	7
Tibia ⁱ ancho (mm)	Grupo 1 (placebo)	1,971	0,189	7
	Grupo 3 (F-1)	2,171	0,125	7
	Grupo 4 (F-2)	2,114	0,107	7
	Grupo 2 (Norditropin ^â)	2,114	0,135	7

Tabla 5.23. Resumen de medidas y peso de las tibias de los grupos en el ensayo in vivo I. ^d Derecha. ⁱ Izquierda

Fuente	Variable Dependiente	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	F	Sig.
Modelo corregido	Tibia ^d peso (g)	0,0020	3	0,0007	2,27100	0,106
	Tibia ^d largo (mm)	4,3750	3	1,4580	8,70900	0,000
	Tibia ^d ancho (mm)	0,1150	3	0,0384	1,85800	0,164
	Tibia ⁱ peso (g)	0,0033	3	0,0011	2,67200	0,070
	Tibia ⁱ largo (mm)	4,6740	3	1,5580	17,9090	0,000
	Tibia ⁱ ancho (mm)	0,1530	3	0,0510	2,51800	0,082
Intercept	Tibia ^d peso (g)	1,4530	1	1,4530	5,028,81	0,000
	Tibia ^d largo (mm)	21,801	1	21,801	130,179	0,000
	Tibia ^d ancho (mm)	121,18	1	121,18	5,858,52	0,000
	Tibia ⁱ peso (g)	1,3890	1	1,3890	3,386,12	0,000
	Tibia ⁱ largo (mm)	21,826	1	21,826	250,893	0,000
	Tibia ⁱ ancho (mm)	122,64	1	122,64	6059,92	0,000
Formulación	Tibia ^d peso (g)	0,0020	3	0,0007	2,27100	0,106
	Tibia ^d largo (mm)	4,3750	3	1,4580	8,70900	0,000
	Tibia ^d ancho (mm)	0,1150	3	0,0384	1,85800	0,164
	Tibia ⁱ peso (g)	0,0033	3	0,0011	2,67200	0,070
	Tibia ⁱ largo (mm)	4,6740	3	1,5580	17,9090	0,000
	Tibia ⁱ ancho (mm)	0,1530	3	0,0510	2,51800	0,082
Error	Tibia ^d peso (g)	0,0069	24	0,0003		
	Tibia ^d largo (mm)	4,0190	24	0,1670		
	Tibia ^d ancho (mm)	0,4960	24	0,0207		
	Tibia ⁱ peso (g)	0,0098	24	0,0004		
	Tibia ⁱ largo (mm)	2,0880	24	0,0870		
	Tibia ⁱ ancho (mm)	0,4860	24	0,0202		
Total	Tibia ^d peso (g)	1,4610	28			
	Tibia ^d largo (mm)	21,809	28			
	Tibia ^d ancho (mm)	121,79	28			
	Tibia ⁱ peso (g)	1,4020	28			
	Tibia ⁱ largo (mm)	21,833	28			
	Tibia ⁱ ancho (mm)	123,28	28			
Total corregido	Tibia ^d peso (g)	0,0089	27			
	Tibia ^d largo (mm)	8,3950	27			
	Tibia ^d ancho (mm)	0,6120	27			
	Tibia ⁱ peso (g)	0,0131	27			
	Tibia ⁱ largo (mm)	6,7620	27			
	Tibia ⁱ ancho (mm)	0,6390	27			

Tabla 5.24. Análisis multivariante de varianza para la respuesta de las tibias. ^d Derecha.
ⁱ Izquierda

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

Variable dependiente	Formulación	Formulación	Diferencia entre medias	Error típ.	Sig. ^a	Intervalo de confianza al 95 % para diferencia	
						Límite inf.	Límite sup.
Tibia ^d largo (mm)	Grupo 1 (placebo)	Grupo 3 (F-1)	-1,043	0,219	0,000	-1,494	-0,591
		Grupo 4 (F-2)	-0,757	0,219	0,002	-1,209	-0,306
		Grupo 2 (Norditropin [®])	-0,843	0,219	0,001	-1,294	-0,391
	Grupo 3(F-1)	Grupo 1 placebo)	1,043	0,219	0,000	0,591	1,494
		Grupo 4 (F-2)	0,286	0,219	0,204	-0,166	0,737
		Grupo 2 (Norditropin [®])	0,200	0,219	0,370	-0,251	0,651
	Grupo 4 (F-2)	Grupo 1 (placebo)	0,757	0,219	0,002	0,306	1,209
		Grupo 3(F-1)	-0,286	0,219	0,204	-0,737	0,166
		Grupo 2 (Norditropin [®])	-0,086	0,219	0,699	-0,537	0,366
	Grupo 2 (Norditropin [®])	Grupo 1 (placebo)	0,843	0,219	0,001	0,391	1,294
		Grupo 3(F-1)	-0,200	0,219	0,370	-0,651	0,251
		Grupo 4 (F-2)	0,086	0,219	0,699	-0,366	0,537
Tibia ⁱ largo (mm)	Grupo 1 (placebo)	Grupo 3(F-1)	-1,021	0,158	0,000	-1,347	-0,696
		Grupo 4 (F-2)	-0,679	0,158	0,000	-1,004	-0,353
		Grupo 2 (Norditropin [®])	-0,979	0,158	0,000	-1,304	-0,653
	Grupo 3(F-1)	Grupo 1 (placebo)	1,021	0,158	0,000	0,696	1,347
		Grupo 4 (F-2)	0,343	0,158	0,040	0,017	0,668
		Grupo 2 (Norditropin [®])	0,043	0,158	0,788	-0,283	0,368
	Grupo 4 (F-2)	Grupo 1 (placebo)	0,679	0,158	0,000	0,353	1,004
		Grupo 3 (F-1)	-0,343	0,158	0,040	-0,668	-0,017
		Grupo 2 (Norditropin [®])	-0,300	0,158	0,069	-0,625	0,025
	Grupo 2 (Norditropin [®])	Grupo 1 (placebo)	0,979	0,158	0,000	0,653	1,304
		Grupo 3(F-1)	-0,043	0,158	0,788	-0,368	0,283
		Grupo 4 (F-2)	0,300	0,158	0,069	-0,025	0,625

Tabla 5.25. Comparaciones múltiples. ^a La diferencia de medias es significativa al nivel 0,05. ^d Derecha. ⁱ Izquierda.

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

En el tercer análisis estudiamos la respuesta correspondiente al peso del timo, corazón y bazo. El peso de estos órganos corporales puede ser un buen indicador de unos niveles séricos de rhGH prolongados en el tiempo (Van Buul-Offers y Van den Brande, 1.985). En la tabla 5.26 se muestran los pesos medios de los órganos mencionados para cada uno de los grupos estudiados. De los resultados del análisis multivariante de varianza (ver tabla 5.27) se desprende que existen diferencias estadísticamente significativas entre las formulaciones, independientemente de la variable estudiada, peso del bazo, del corazón o del timo.

	Formulación	Media	Desv. típ.	N
Peso bazo (g)	Grupo 1 (placebo)	0,117	0,023	7
	Grupo 3 (F-1)	0,151	0,020	7
	Grupo 4 (F-2)	0,138	0,023	7
	Grupo 2 (Norditropin ^â)	0,125	0,012	7
Peso Corazón (g)	Grupo 1 (placebo)	0,246	0,034	7
	Grupo 3 (F-1)	0,352	0,045	7
	Grupo 4 (F-2)	0,328	0,049	7
	Grupo 2 (Norditropin ^â)	0,256	0,070	7
Peso timo (g)	Grupo 1 (placebo)	0,109	0,027	7
	Grupo 3 (F-1)	0,174	0,052	7
	Grupo 4 (F-2)	0,152	0,046	7
	Grupo 2 (Norditropin ^â)	0,155	0,035	7

Tabla 5.26. *Valores medios de los pesos de los órganos para cada grupo en el ensayo in vivo I.*

Fuente	Variable dependiente	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	F	Sig.	Potencia observada ^a
Modelo corregido	Bazo (g)	0,005	3	0,002	4,029	0,019	0,773
	Corazón (g)	0,058	3	0,019	7,401	0,001	0,966
	Timo (g)	0,016	3	0,005	3,127	0,044	0,652
Intercept	Bazo (g)	0,492	1	0,492	1.251	0,000	1,000
	Corazón (g)	2,443	1	2,443	935,6	0,000	1,000
	Timo (g)	0,611	1	0,611	365,4	0,000	1,000
Formulación	Bazo (g)	0,005	3	0,002	4,029	0,019	0,773
	Corazón (g)	0,058	3	0,019	7,401	0,001	0,966
	Timo (g)	0,016	3	0,005	3,127	0,044	0,652
Error	Bazo (g)	0,009	24	0,000			
	Corazón (g)	0,063	24	0,003			
	Timo (g)	0,040	24	0,002			
Total	Bazo (g)	0,507	28				
	Corazón (g)	2,564	28				
	Timo (g)	0,667	28				
Total corregido	Bazo (g)	0,014	27				
	Corazón (g)	0,121	27				
	Timo (g)	0,056	27				

Tabla 5.27. Resultados del análisis multivariante de varianza para el peso de los órganos. ^a Calculado con $\alpha = 0,05$.

La tabla 5.28 muestra los resultados del test para las diferencias mínimas significativas entre pares de grupos. En lo que se refiere al peso del bazo y del timo, únicamente existen diferencias significativas entre placebo y la formulación F-1. En el caso del peso del corazón, se observaron diferencias significativas entre F-1, F-2 y el placebo y entre F-1 y F-2. Aunque ligera, -0,09, existe diferencia entre la F-1 y el Norditropin[®]. Por lo tanto, la respuesta “peso del corazón” es la más sensible para la detección de diferencias entre formulaciones y nos permite inferir que es la formulación F-1 la que aportaría niveles séricos de rhGH más prolongados.

Es pues, la formulación F-1 la que mejores resultados aporta *in vivo*, mejorando incluso la respuesta obtenida con el inyectable comercial utilizado en la pauta posológica indicada; todo esto, a pesar de que no fue la mejor en su comportamiento *in vitro*.

Variable dependiente	Formulación	Formulación	Diferencia entre medias 10 ²	Error típ.	Sig. ^a	Intervalo de confianza al 95%.	
						Lím. inf.	Lím. sup.
Bazo (g)	Grupo 1 (placebo)	Grupo 3 (F-1)	-3,450	0,010	0,020	-0,065	-0,004
		Grupo 4 (F-2)	-2,100	0,010	0,355	-0,051	0,009
		Grupo 2 (Norditropin®)	-8,520	0,010	1,000	-0,039	0,021
	Grupo 3 (F-1)	Grupo 1 (placebo)	3,450	0,010	0,020	0,004	0,065
		Grupo 4 (F-2)	1,350	0,010	1,000	-0,016	0,043
		Grupo 2 (Norditropin®)	2,590	0,010	0,132	-0,005	0,056
	Grupo 4 (F-2)	Grupo 1 (placebo)	2,100	0,010	0,355	-0,009	0,051
		Grupo 3 (F-1)	-1,350	0,010	1,000	-0,043	0,016
		Grupo 2 (Norditropin®)	1,240	0,010	1,000	-0,018	0,042
	Grupo 2 (Norditropin®)	Grupo 1 (placebo)	0,850	0,010	1,000	-0,021	0,039
		Grupo 3 (F-1)	-2,590	0,010	0,132	-0,056	0,005
		Grupo 4 (F-2)	-1,240	0,010	1,000	-0,042	0,018
Corazón (g)	Grupo 1 (placebo)	Grupo 3 (F-1)	-10,60	0,030	0,004	-0,185	-0,027
		Grupo 4 (F-2)	-8,140	0,030	0,039	-0,160	-0,003
		Grupo 2 (Norditropin®)	-0,950	0,030	1,000	-0,087	0,069
	Grupo 3 (F-1)	Grupo 1 (placebo)	10,60	0,030	0,004	0,027	0,185
		Grupo 4 (F-2)	2,460	0,030	1,000	-0,053	0,103
		Grupo 2 (Norditropin®)	9,660	0,030	0,010	0,018	0,175
	Grupo 4 (F-2)	Grupo 1 (placebo)	8,140	0,030	0,039	0,003	0,160
		Grupo 3 (F-1)	-2,460	0,030	1,000	-0,103	0,053
		Grupo 2 (Norditropin®)	7,200	0,030	0,087	-0,007	0,151
	Grupo 2 (Norditropin®)	Grupo 1 (placebo)	0,950	0,030	1,000	-0,069	0,088
		Grupo 3 (F-1)	-9,660	0,030	0,010	-0,175	-0,018
		Grupo 4 (F-2)	-7,200	0,030	0,087	-0,151	0,007
Timo (g)	Grupo 1 (placebo)	Grupo 3 (F-1)	-6,460	0,020	0,041	-0,127	-0,002
		Grupo 4 (F-2)	-4,270	0,020	0,373	-0,106	0,020
		Grupo 2 (Norditropin®)	-4,610	0,020	0,273	-0,109	0,016
	Grupo 3 (F-1)	Grupo 1 (placebo)	6,460	0,020	0,041	0,002	0,127
		Grupo 4 (F-2)	2,180	0,020	1,000	-0,040	0,084
		Grupo 2 (Norditropin®)	1,840	0,020	1,000	-0,044	0,081
	Grupo 4 (F-2)	Grupo 1 (placebo)	4,270	0,020	0,373	-0,020	0,106
		Grupo 3 (F-1)	-2,180	0,020	1,000	-0,084	0,040
		Grupo 2 (Norditropin®)	-0,330	0,020	1,000	-0,066	0,059
	Grupo 2 (Norditropin®)	Grupo 1 (placebo)	4,610	0,020	0,273	-0,016	0,109
		Grupo 3 (F-1)	-1,840	0,020	1,000	-0,081	0,044
		Grupo 4 (F-2)	0,330	0,020	1,000	-0,059	0,066

Tabla 5.28. Comparaciones múltiples. ^a La diferencia de medias es significativa al nivel 0,05.

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

5.6.2. Ensayo *in vivo* II.

Este segundo ensayo se realizó con el objetivo de valorar los niveles séricos obtenidos administrando la tercera formulación elaborada, F-3. Esta formulación fue la que mayor cantidad de dosis cedió durante su ensayo *in vitro*. En el ensayo se sacrifican diariamente dos ratas normales (ver *Materiales y métodos*) durante 15 días, en los que se obtuvieron valores por duplicado del nivel sérico de rhGH, de la cantidad de hormona remanente presente en los implantes extraídos y del peso molecular del polímero. De esta manera, podemos plantearnos estudiar las correlaciones existentes entre estas variables.

En la tabla 5.29 se muestran los resultados de las cantidades remanentes contenidas en los implantes a diferentes tiempos. Por diferencia entre la dosis teórica contenida y la remanente, obtendremos la dosis cedida (ver figura 5.30).

En la figura 5.31 y la tabla 5.30 se muestran los niveles de rhGH detectados en los animales durante el ensayo. Vemos cómo a partir del 8º día se comienzan a detectar niveles de hormona, momento que coincide con la disminución de las cantidades remanentes; la concentración plasmática máxima se alcanzó a los 13 días.

Tiempo (días)	Promedio (μg)
1	59,6
2	59,2
3	48,6
4	49,7
5	47,2
6	46,7
7	31,0
8	26,8
9	26,1
10	23,0
11	21,0
12	21,4
13	12,1
15	19,9

Tabla 5.29. Cantidad remanente, en μg , en F-3, al finalizar el ensayo in vivo II.

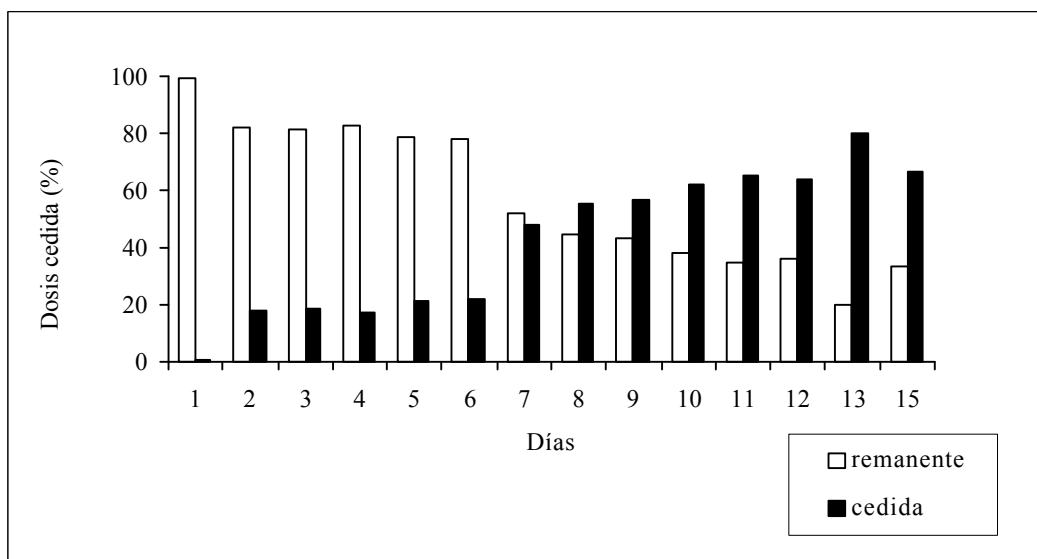


Figura 5.30. Porcentaje de dosis remanente y cedida (entendida como la diferencia entre la declarada y la remanente).

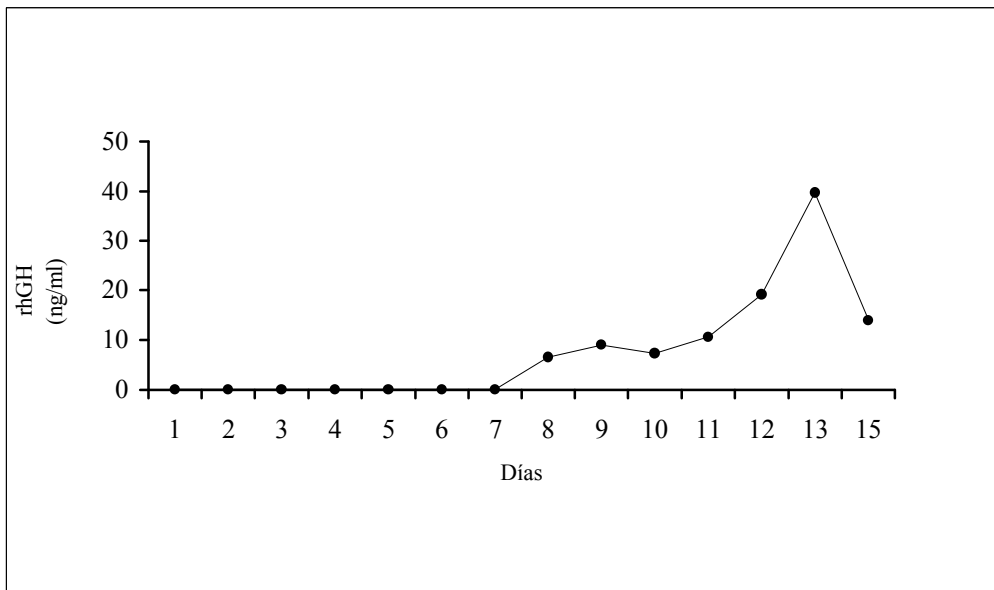


Figura 5.31. Evolución de la concentración de rhGH en ratas normales tras la administración de F-3.

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

Tiempo (días)	Duplicado 1 (ng/ml)	Duplicado 2 (ng/ml)	Promedio (ng/ml)
1	0,0	0,0	0,0
2	0,0	0,0	0,0
3	0,0	0,0	0,0
4	0,0	0,0	0,0
5	0,0	0,0	0,0
6	0,0	0,0	0,0
7	<1	< 1	< 1
8	3,0	10,2	6,6
9	11	7,0	9,0
10	6,1	8,5	7,3
11	10,7	10,7	10,7
12	28	10,4	19,2
13	> 30	> 30	> 30
15	21	7,0	14

Tabla 5.30. Niveles de hormona alcanzados en el ensayo *in vivo* II.

5.7. Degradación *in vivo* del polímero.

En cuanto a la degradación *in vivo* del polímero, la tabla 5.31 y la figura 5.32 muestra la evolución del peso molecular medio en peso (M_w) y del peso molecular medio en número (M_n) con el tiempo. En la figura 5.33 se representa el índice de degradación (I.D.) (Glynn *et alii*, 1.976), que representa la proporción de enlaces rotos en cada momento respecto a los inicialmente presentes. De esta manera, tendremos una mejor visión del avance cinético de la reacción de degradación y una mejor interpretación de los procesos de rotura de los enlaces ésteres en la matriz

polimérica. Se calcula a partir del peso molecular medio en número inicial $Mn(0)$ y el que posee el polímero a un tiempo t , $Mn(t)$, empleando la expresión:

$$I.D. = \frac{Mn(0)}{Mn(t)} - 1$$

Tiempo (días)	Mw (promedio)	Mn (promedio)	I.D.
0	40.500	22.196	0,00
1	37.400	21.334	0,04
2	30.750	17.428	0,27
3	27.600	15.958	0,39
4	26.950	15.700	0,41
5	24.350	13.968	0,59
6	23.150	13.181	0,68
7	19.400	10.699	1,07
8	18.900	11.342	0,96
9	17.100	9.793	1,27
10	15.300	9.398	1,36
11	14.800	8.724	1,54
12	12.500	7.580	1,93
13	12.100	7.369	2,01
15	11.300	6.532	2,40

Tabla 5.31. Evolución del Mw, del Mn y del I.D. en polímero en F-3 durante el ensayo in vivo II.

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

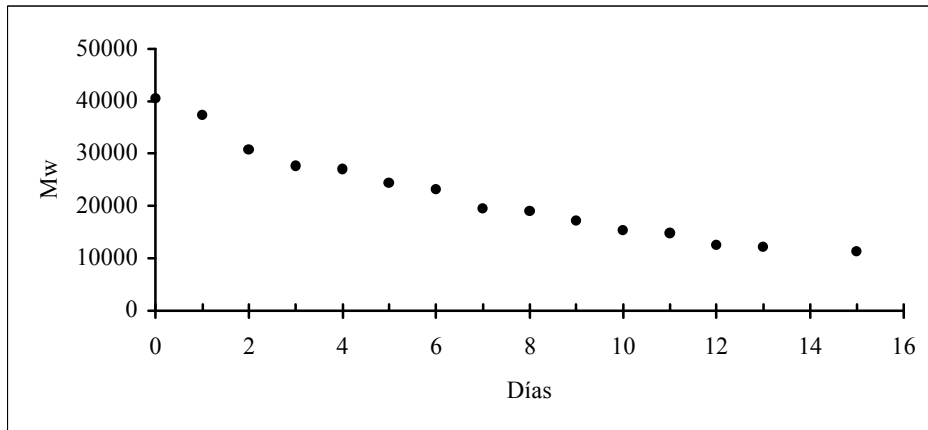


Figura 5.32. Evolución del Mw del polímero de F-3 durante el tiempo de ensayo.

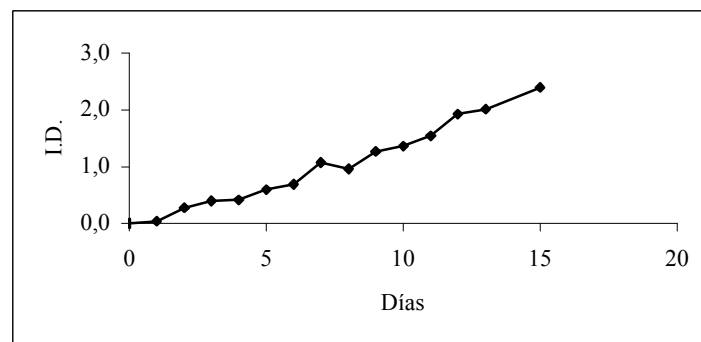


Figura 5.33. Índice de degradación de la formulación F-3 durante el ensayo *in vivo* II.

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

En la figura 5.34 se muestra la correlación entre el proceso degradativo del polímero, representado por el I.D., con la cesión in vivo de la hormona, representado por el porcentaje de dosis remanente en los implantes a cada tiempo. Vemos cómo a medida que aumenta la degradación del polímero disminuye la cantidad de hormona remanente en la formulación, hecho este ya puesto de manifiesto por otros autores (Bodmeier *et alii*, 1.992; Park *et alii*, 1.995).

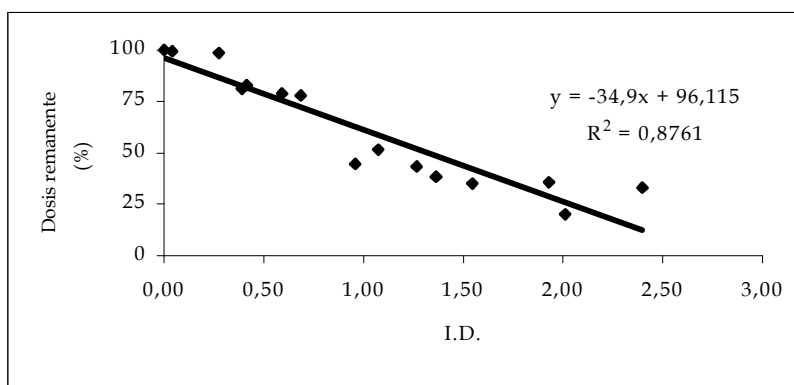


Figura 5.34. Correlación entre el I.D y el porcentaje de dosis remanente en el implante F-3.

En la figura 5.35 se relacionan los niveles de rhGH detectados en plasma con el I.D. Se observa que hasta que el valor del I.D. no alcanza la unidad, no se alcanzan niveles de hormona detectables con la técnica de RIA empleada. Esto sugiere que la cesión de la hormona se ha acelerado por el avance, lo suficientemente rápido, de la degradación del polímero.

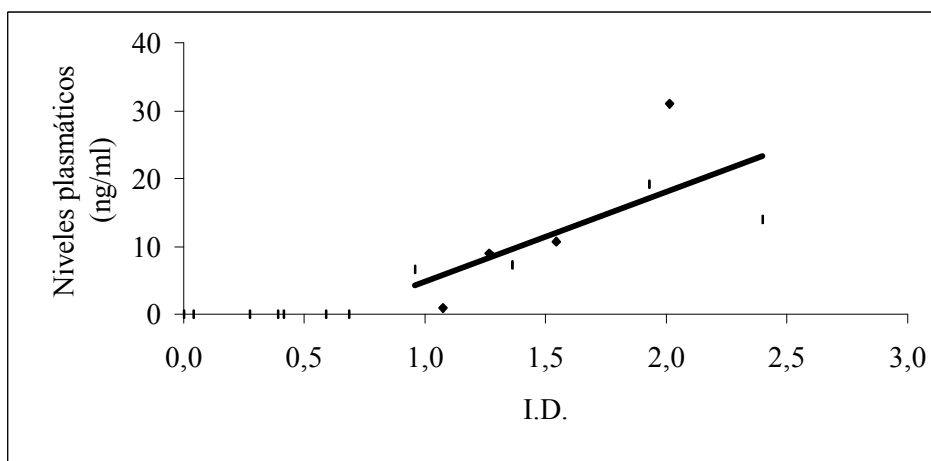


Figura 5.35. Correlación entre el I.D. y los niveles plasmáticos de rhGH detectados con el implante F-3.

6. CONCLUSIONES.

De este trabajo experimental podemos extraer las siguientes conclusiones:

- I. De los polímeros estudiados fue el PLGA 75:25 (Mw: 40000) el que presentaba mejores condiciones para obtener películas transparentes, maleables y de fácil moldeado y, el Teflon[®], el material seleccionado para constituir los moldes.
- II. El liofilizado de rhGH fue estable durante 24 horas en los disolventes orgánicos, diclorometano y tetrahidrofurano, utilizados en la elaboración de la película y en la extracción del principio activo, sin embargo, se observa una reducción de la concentración del 20% en 48 horas cuando se estudia a temperatura ambiente la estabilidad en tampón fosfato, mientras que en fase móvil cromatográfica la reducción fue del 23% en 48 horas, por lo que el contacto de la hormona con estos medios no debe alargarse más de 24 horas.
- III. Las técnicas de elaboración empleadas permiten obtener implantes con diferentes espesores, con distinta capacidad de retención de la hormona y con distribución homogénea del principio activo tal y como lo demuestran los ensayos de uniformidad en contenido realizados.
- IV. La microscopía electrónica no aporta suficiente información que permita justificar *a priori* posibles diferencias en la césion del principio activo.

- V. En ninguno de los tres perfiles obtenidos durante los ensayos de cesión *in vitro* se observa efecto “burst” inicial, sin embargo, en las formulaciones F-1 y F-2 se produce un estancamiento de la cesión a partir de las 190 y 240 horas, reteniéndose un 60% y un 40% de la dosis, respectivamente. La hormona remanente permaneció inalterada en el interior de la matriz polimérica.
- VI. En la formulación F-3 se produjo una ralentización de la cesión pero ésta no se llegó a estancar, por lo que cabe deducir que las modificaciones en la técnica de elaboración permiten minimizar la retención de hormona en el implante, mejorando así la eficacia de disolución.
- VII. El análisis de varianza de la eficacia de disolución mostró la existencia de diferencias significativas entre las tres formulaciones. El valor máximo de este parámetro se obtuvo para la formulación en la que la hormona se incorporó en un reservorio, F-3.
- VIII. Se observó una buena correlación entre el espesor de los implantes y la hormona retenida al final del ensayo de cesión ($R= 0,978$).
- IX. El perfil de cesión de F-1 hasta las 192 horas se ajustó a una cinética de orden 0, mientras que las primeras 240 horas de la cesión de F-2 se ajustó mejor a una cinética de orden 1. La cesión de F-3 durante las primeras 77 horas se

ajustó a una cinética de orden 1, y a partir de este tiempo, se ajustó a un orden 1.

- X.** De las variables dependientes utilizadas para contrastar las formulaciones F-1, F-2, placebo e inyectable comercial en el ensayo *in vivo* con ratas hipofisectomizadas, los pesos finales y máximos alcanzados por los animales presentaron una fuerte correlación cuando se contrastaron, a través de la prueba de Pearson, con los pesos de los órganos y las dimensiones tibiales.
- XI.** Del análisis multivariante de la varianza, utilizando el programa SPSS® para la variable peso corporal final, se infiere que existen diferencias significativas entre las cuatro formulaciones ensayadas. Del contraste entre pares de formulaciones, a través del estadístico Bonferroni, se observan diferencias significativas entre ellas, salvo en el caso de F-2 con el inyectable.
- XII.** Las medidas tibiales están muy correlacionadas entre sí. Sin embargo, no fueron lo suficientemente sensibles para detectar diferencias existentes entre las formulaciones F-1, F-2 e inyectable, aunque si permitieron detectarlas entre estas formulaciones con el placebo.
- XIII.** Los pesos del timo, del bazo y del corazón se pueden utilizar como indicadores de un nivel sérico prolongado de rhGH, encontrándose además correlacionado con el peso corporal de los animales. No obstante, la variable peso del corazón es la respuesta que mejor nos permitió detectar las

diferencias entre formulaciones, así como inferir que la F-1 es la formulación que proporciona niveles séricos más prolongados.

- XIV.** El segundo ensayo *in vivo* con ratas normales nos permitió valorar los niveles séricos obtenidos con la formulación F-3, así como la evolución de la degradación *in vivo* del polímero. Solamente cuando el valor del índice de degradación superó la unidad se pudieron detectar niveles de rhGH, hecho este que se produjo al 8º día de la administración, obteniéndose a partir de este momento una buena correlación entre el índice de degradación y la concentración sérica de hormona

7. EPÍLOGO.

De los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral se desprende la necesidad de profundizar en el estudio de la interacción polímero biodegradable y hormona, para ello, la calorimetría de barrido diferencial en sus diferentes modalidades podría suministrarnos información de gran utilidad.

Asimismo, aunque los resultados de los ensayos *in vitro* no se corresponden con los resultados *in vivo*, en posteriores estudios sería conveniente ensayar la formulación F-3 en ratas hipofisectomizadas, a pesar de los inconvenientes que presenta este modelo animal.

8. BIBLIOGRAFÍA.

Agrawal, C. M., Pennick, A., Wang, X. y Schenck, R. C. "Porous-coated titanium implant impregnated with a biodegradable protein delivery system". *J. Biomed. Mater. Res.* 15, 36(4): 516-521 (1.997).

Aston, R., Bomford, R. y Holder, A. T. "Physiologically active compositions of growth hormone and serum albumin or IgG". *US Patent 5,045,312 (Burroughs Wellcome Co.)* (1.991).

Athanasίου, K. A., Niederauer, G. G. y Agrawal, C. M. "Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers". *Biomaterials* 17(2): 93-102 (1.996).

Auer, H., Khan, M. A. y Bernstein, H. "Controlled release growth hormone containing microspheres". *WO 94/12158 (Alkermes Controlled Therapeutics, Inc.)* (1.994).

Azain, M. J., Eigenberg, E., Kasser, T. R. y Sabacky, M. J. "Compositions for controlled release of polypeptides". *European Patent Application 374120A2 (Monsanto Company)* (1.989).

Battersby, J., Clark, R., Hancock, W., Puchulu-Campanella, E., Haggart, N., Poll, D. y Harding, D. "Sustained release of recombinant human growth hormone from dextran via hydrolysis of an imine bond". *J. Contr. Release* 42: 143-156 (1.996).

Bendix, D. "Analytical studies on the solubility problem of poly(DL-lactide-co-glycolide) 50:50". *Proc. Int. Symp. Controlled Bioact. Mater.* 17: 248-249 (1.990).

Benoit, M. A., Mousset, B., Delloye, C., Bouillet, R. y Gillard, J. "Antibiotic-loaded plaster of Paris implants coated with poly lactide-co-glycolide as a controlled

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

release delivery system for the treatment of bone infections". *Int. Orthop.* 21(6): 403-408 (1.997).

Bodmeier, D., Kissel, T. y Traechslin, E. "Factors influencing the release of peptides and proteins from biodegradable parenteral depot systems". *J. Contr. Rel.* 21: 129-138 (1.992).

Bodmeier, R. y Chen, H. "Evaluation of biodegradable poly(lactide) pellets prepared by direct compression". *J. Pharm. Sci.* 78, 10: 819-822 (1.989).

Bodmeier, R., Oh, K. H. y Chen, H. "The effect of the addition of low molecular weight poly(D,L-lactide) on drug release from biodegradable poly(D,L-lactide) drug delivery systems". *Int. J. Pharm.* 51:1-8 (1.989).

Borhani, H., Rahimy, M. H. y Peyman, G.A. "Sustained release of 5-FU from bioerodible-matrix delivery for intraocular application *in vitro* and *in vivo* evaluations". *ARVO Abstracts. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 34 (Suppl): 1.488 (1.993).

Cady, S. M., Fishbein, R., Schorder, U., Eriksson, H. y Probasco, B. L. "Water dispersable and water soluble carbohydrate polymer compositions for parenteral administration of growth hormone". *US Patent 5,266,333 (American Cyanamid Co.)* (1.993).

Calhoun, J. H. y Mader, J. T. "Treatment of osteomyelitis with a biodegradable antibiotic implant". *Clin. Orthop.* 341: 206-214 (1.997).

Castillo, E. J., Eigenberg, K. E., Patel, K. R. y Sabacky, M. J. "Coated veterinary implants". *European Patent Application 462,959A1 (Monsanto Company)* (1.991).

Cavallo, L., De Luca, F., Bernasconi, S., Arrigo, T., Gurrado, R. y Zecchino, C. "The effect of different growth hormone administration frequencies on growth in growth hormone-deficient patients". *Horm. Res.* 49 (2):7.377 (1.998).

Clark, M. T., Gyurik, R. J., Lewis, S. K., Murray, M. C. y Raymond, M. J. "Stabilised somatotropin for parenteral administration". *US Patent 5,198,422 (SmithKline Beecham Corporation)* (1.993).

Cleland, J.L., Mac, A., Boyd, B., Yang, J., Duenas, E.T., Yeung, D., Brooks, D., Hsu, C., Chu, H., Mukku, V. y Jones, A.J. "The stability of recombinant human growth hormone in poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres". *Pharm. Res.* 14(4):420-425 (1.997).

Cutright, D.E., Pérez, E., Beasley, J.D., Larson, W.J. y Posey, W.R. "Degradation of poly(lactic acid) polymer and co-polymers of poly(glycolic acid)". *J. Oral. Surg.* 37: 142-152 (1.974).

Downes, S., DiSilvio, L., Klein, C. P. A. y Kayser, M. V. "Growth hormone loaded bioactive ceramics". *J. Mater. Sci.. Mater. Med.* 2: 176-180 (1.991).

Eckenhoff, J. B., Magruder, J. A., Cortese, R., Peery, J. R. y Wright, J. C. "Method for delivering somatotropin to an animal". *US Patent 4,959,218 (Alza Corp.)* (1.990).

Farmacopea Europea 2ª edición. Parte II, Vol 7. Consejo de Europa.

Ferguson, T. H., Harrison, R. G. y Moore, D. L. "Injectable sustained release formulation". *US Patent 4,977,140 (Eli Lilly and Co.)* (1.990).

García, J. T., Munguía, O., Fariña, J. y Llabrés, M. "Comparative Degradation Study of Biodegradable microspheres of poly(DL-lactide-co-glycolide) with Poly(ethylenglycol) derivates". *Journal of Microencapsulation* 16 (1): 83-94 (1.999).

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

Gilding, D. K. y Reed, A. M. "Biodegradable polymers for use in surgery polyglycolic/polylactic homo and copolymers: 1". *Polymer* 20: 1.459-1.464 (1.979).

Gilding, D. K. y Reed, A. M. "Biodegradable polymers for use in surgery polyglycolic/polylactic homo and copolymers: 2. *In vitro* degradation". *Polymer* 22: 467-479 (1.981).

Glynn, P.A.R., Van de Hoff, B.M.E y Relly, P.M. "A general model for prediction of molecular weight distributions of degraded polymers. Development and comparision with ultrasonic degradation experiments". *J. Macromol. Sci. Chem.* A6: 1.653-1.664 (1.976).

Gould, L., Trope, G., Cheng, Y. L., Heathcote, J. G., Sheardown, H., Rootman, D., Liu, G. S. y Menon, A. "Fifty: fifty poly(DL glycolic acid-lactic acid) copolymer as a drug delivery system for 5-fluorouracil: a histopatological evaluation". *Can. J. Ophthalmol.* 26 (4): 168-171 (1.994).

Gref, R., Domb, A., Quellec, P., Blunk, T., Müller, R. H., Verbavatz, J. M. y Langer, R. "The controlled intravenous delivery of drug using PEG-coating sterically stabilized nanospheres". *Advanced Drug Delivery Reviews* 16: 215-233 (1.995).

Hoelgaard, A. "Pharmaceutical preparation". *WO 91/19480 (Novo Nordisk)* (1.991)

Hunter, W. G. y Lamboy, W. F. "Bayesian analysis of linear calibration problem". *Tecnometrics* 23: 323-328 (1.981).

Illum, L. "The nasal delivery of peptides and proteins". *Trends Biotechnol.* 9(8): 234-289 (1.991).

International conference on harmonization ((ICH) of technical requirements for the registration of pharmaceuticals for human use, validation of analytical procedures (ICH-Q2A) (ICH-Q2B) (1.995, 1.996).

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

Janoff, A. S., Bolcsak, L. E., Weiner, A. L., Trembley, P. A., Bergamini, M. V. W. y Suddith, R. L. "Composition using salt form organic acid derivate of alpha tocopherol". *US Patent 4,861,580 (The Liposome Co., Inc.)* (1.989).

Johnson, O.L., Cleand, J.L., Lee, H.J., Charnis, M., Duenas, E., Jaworowicz, W., Shepard, D., Shahzamani, A., Jones, A.J.S. y Putney, S.D. "A month-long effect from a single injection of microencapsulated human growth hormone". *Nature Medicine*, 2 (7): 795-799 (1.996).

Kim, N. J., Rhee, B. G. y Cho, H. S. "A composition durably releasing bioactive polypeptides". *Australian Patent 9,170,937 (Lucky Ltd.)* (1.991).

Kulkarni, R. K., Pani, K. C., Neuman, C. y Leonard, F. "Polylactic acid for surgical implants". *Archives of Surgery* 93: 839-843 (1.966).

Langer, R.S. y Peppas, N.A. "Present and future applications of biomaterials in controlled drug delivery systems". *Biomaterials* 2: 201-214 (1.981).

Lindsey, T. O. y Clark, M. T. "Stabilised somatotropin for parenteral administration". *US Patent 5,015,627 (SmithKline Beecham Corp.)* (1.991).

Magruder, J. A., Eckenhoff, J. B., Cortese, R., Wright, J. C. y Peery, J. R. "Delivery system comprising means for delivering agent to livestock". *US Patent 5,110,596 (Alza Corp.)* (1.992).

Magruder, J. A., Peery, J. R. y Eckenhoff, J. B. "Delivery device with a protective sleeve". *US Patent 5,238,687 (Alza Corp.)* (1.993).

Mansonn N., Thies, C. Cicero, T.J. "*In vivo* and *in vitro* evaluation of a microencapsulated narcotic antagonist". *J. Pharm. Sci.* 65: 947-950 (1.976).

McLean, E., Donaldson, E. M., Mayer, I., Teskeredzic, E., Teskeredzic, Z., Pitt, C. y Souza, L. M. "Evaluation of a sustained release polymer encapsulated form

recombinant porcine somatotropin upon long-term growth performance of Coho salmon". *Oncorhynchus kisutch, Aquaculture* 122: 359-368 (1.994).

Mitchell, J. W. "Prolonged release of biologically active somatotropin". *US Patent 5,013,713 (Monsanto Co.)* (1.991).

Ogawa, Y., Okada, H., Yamamoto, M. y Shimamoto, T. "In vivo release profiles of leuprolide acetate from microcapsules prepared with polylactics acids or copoly(lactic/glycolic) acids and in vivo degradation of these parameters". *Chem. Pharm. Bull.* 38 :2.576-2.581 (1.988).

Park, T., Lu, W. y Crotts, G. "Importance of in vitro experimental conditions on protein release, kinetics, stability and polymer degradation in protein encapsulated poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres". *J. Contr. Rel.* 33: 211-22 (1.995).

Pitt, C. G., Cha, Y., Donaldson, E. M. y McLean, E. "Polyvinyl alcohol coated pellet of growth hormone". *WO 92/07556 (Amgen Inc.)* (1.992).

Price, J. S., Tencer, A. F., Arm, D. M. y Bohach, G. A. "Controlled release of antibiotics from coated orthopaedic implants". *J. Biomed. Mater. Res.* 30 (3): 281-286 (1.996).

Raman, S. N. y Gray, M. W. "Compositions and processes for the sustained release of drugs". *US Patent 5,328,697 (Mallickrodt Veterinary Inc.)* (1.994).

Sanders, L. M. y Domb, A. "Delayed release of macromolecules". *US Patent 4,959,217 (Syntex USA Inc.)* (1.990).

Sanders, L.M., McRae, G.I., Vitale, K.M. y Kell, B.A. "Controlled delivery of an LHRH analogue from biodegradable inject able microspheres". *J. Contr. Rel.* 2: 187-195 (1.985).

Shah, S. S., Cha, Y. y Pitt, C. G. "Poly(glycolic-acid-co-DL-lactic acid): diffusion or degradation controlled drug delivery?". *J. Contr. Rel.* 18: 261-270 (1.992).

Sivaramakrishnan, K. N. "Sustained release composition for macromolecular proteins". *WO 91/05548 (Pitman-Moore Inc.)* (1.991).

Sivaramakrishnan, K. N. y Miller, L. F., "Controlled release delivery device for macromolecular proteins". *WO 90/11070 (Pitman-Moore Inc.)* (1.990).

Sivaramakrishnan, K. N., Rahn, B. M., Moore, B. M. y O'Neil, J. "Sustained release of bovine somatotropin from implants". *Proc. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 16: 14-15 (1.989).

SPSS[®] 9.0. SPSS Inc. 1.998.

Steber, W. D., Fishbein, R. y Cady, S. M. "Compositions for parenteral administration and their use". *US Patent 4,837,381 (American Cyanamid Co.)* (1.989).

Steber, W., Candy, S. M., Johnson, D.F. y Rice, T. "Implant compositions containing a biologically active protein, peptide or polypeptide". *European Patent Application 523,330A1 (American Cyanamid Co.)* (1.993).

Thakkar, A. L., Harrison, R. G. y Moore, D. L. "Injectable sustained release formulation". *US Patent 4,977,659 (Eli Lilly and Co.)* (1.988).

Tyle, P. "Sustained release growth hormone compositions for parenteral administration and their use". *US Patent 4,857,506 (American Cyanamid Co.)* (1.989).

Tyle, P. y Cady, S. M. "Sustained release multiple emulsions for bovine somatotropin delivery". *Proc. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 17: 49-50 (1.990).

Desarrollo y aplicaciones de implantes biodegradables de hormona humana del crecimiento (hGH).

Underwood, L. E. y Van Wyk, J. J. "Normal and aberrant growth". En: *Wilson, J. D. y Foster, D. W. (eds.), Willians textbook of endocrinology. Saunders. Philadelphia: 1.079-1.138 (1.992).*

United States Pharmacopeia/The National Formulary, 23ª Edición (1.995).

Van Buul-Offers, S. y Van den Brande, J. L. "Biosynthetic Human Growth Hormone: Effects on Growth of Snell Dwarf Mice". *Horm. Metabol. Res.* 17: 20-24 (1.985).

Wayiyama, N., Juni, K. y Nakano, M. "Preparation and evaluation *in vitro* and *in vivo* of polylactic acid microspheres containing dibucaine". *Chem. Phar. Bull.* 30: 3.719-3.727 (1.982).

Wearley, L. L. "Recent progress in protein and peptide delivery by non-invasive routes". *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 8(4): 371-375 (1.991).

Wong, P. S. L., Theeuwes, F., Eckenhoff, J. B., Larson, S. D. y Huynh, H. T. "Multi-unit delivery system". *US Patent 5,023,088 (Alza Corp.)* (1.991).

Wong, P. S. L., Theeuwes, F., Eckenhoff, J. B., Larson, S. D. y Huynh, H. T. "Multi-unit delivery system". *US Patent 5,110,597 (Alza Corp.)* (1.992).

Yamaguchi, K. y Anderson, J.M. "*in vivo* biocompatibility studies of medisorb 65/36 DL-lactide/glycolide copolymer microspheres". *J. Contr. Rel.* 24: 61-71 (1.993).

Zhang, X., Wyss, U. P., Pichora, D. y Goosen, M. F. "Biodegradable controlled antibiotic release devices for osteomyelitis: optimization of release properties". *J. Pharm. Pharmacol.* 46(9): 718-724 (1.994).

9. ANEXO.

1º día	2º día	3º día	4º día	5º día
81,4	83,15	83,15	82,16	82,17
84,51	81,84	81,86	82,76	82,77
84,71	80,58	80,57	80,50	80,51
87,7	87,24	87,25	88,30	88,33
85,43	84,12	84,14	85,00	84,99
87,63	85,02	85,04	82,30	82,28
89,85	87,19	87,20	87,00	87,00

Tabla A.1. *Evolución del peso en la 1ª semana de aclimatación para el Grupo 1 (palcebo).*

1º día	2º día	3º día	4º día	5º día
81,03	83,11	82,57	83,10	83,62
83,2	80,89	81,43	80,23	79,89
80,86	81,31	79,49	80,51	78,17
82,87	83,39	81,73	82,16	80,67
84,85	80,92	82,01	81,45	80,69
80,97	83,45	80,97	80,02	79,07
81,83	80,94	80,66	80,23	79,26

Tabla A.2. *Evolución del peso en la 1ª semana de aclimatación para el Grupo 2 (Norditropin[®]).*

1º día	2º día	3º día	4º día	5º día
86,75	86,91	86,90	83,20	83,19
85,5	86,82	86,79	82,22	82,23
82,25	81,39	80,91	82,30	81,65
87,8	88,07	88,10	84,68	84,66
84,37	86,51	86,50	85,00	84,99
83,75	85,49	85,50	83,48	83,46
80,18	81,42	85,24	85,29	84,70

Tabla A.3. Evolución del peso en la 1ª semana de aclimatación para el Grupo 3 (F-1).

1º día	2º día	3º día	4º día	5º día
86,64	85,76	85,78	85,39	85,41
83,25	83,46	83,46	83,16	83,17
89,68	89,61	89,65	87,30	87,29
88,81	86,17	86,17	85,51	85,47
84,75	84,03	84,04	82,94	82,91
81,52	83,27	84,69	80,54	82,43
77,91	78,36	81,39	84,80	82,83

Tabla A.4. Evolución del peso en la 1ª semana de aclimatación para el Grupo 4 (F-2).

1° día	2° día	3° día	4° día	5° día	6° día	7° día	8° día	9° día	10° día	11° día	12° día	13° día	14° día	15° día
81,02	79,96	77,31	76,54	77,36	78,25	78,85	77,19	77,98	77,56	77,94	79,94	76,97	75,61	78,16
84,56	83,20	81,32	81,52	82,72	80,59	82,22	80,89	80,50	81,42	81,93	84,05	82,24	84,53	71,22
81,77	81,67	82,08	82,14	81,35	79,92	81,30	79,40	80,07	80,48	79,83	82,40	82,21	78,66	80,96
83,56	83,79	82,63	80,95	82,33	79,83	80,76	80,03	80,88	80,72	79,89	82,61	80,34	80,54	77,09
86,50	83,75	82,81	83,58	83,78	80,56	81,89	80,29	79,74	80,02	78,22	81,35	81,42	81,37	80,19
83,64	84,64	77,94	78,06	81,39	81,75	82,83	76,96	77,39	78,06	76,47	80,09	79,39	72,94	80,31
85,96	84,99	82,86	81,96	81,39	82,31	80,41	80,19	80,53	81,42	81,61	83,03	83,94	83,57	79,55

Tabla A.5. Registro diario de la evolución del peso de los animales del Grupo 1 (placebo).

1° día	2° día	3° día	4° día	5° día	6° día	7° día	8° día	9° día	10° día	11° día	12° día	13° día	14° día	15° día
83,62	87,57	88,09	87,39	92,05	90,94	90,93	93,59	92,25	92,41	88,96	92,20	96,34	97,00	94,87
79,89	82,30	83,02	82,37	84,33	86,915	87,21	89,52	87,36	87,78	87,08	89,50	91,74	92,06	88,60
78,17	84,68	85,05	81,4	85,66	85,14	83,68	85,99	84,84	88,05	85,03	89,81	90,35	90,12	90,00
80,67	83,64	83,76	81,44	84,71	85,54	83,17	86,51	84,08	86,80	83,70	88,20	90,18	89,95	89,06
80,69	85,76	84,70	83,37	85,77	84,78	84,96	86,58	84,54	88,57	85,72	88,21	89,41	90,23	86,94
79,07	80,18	81,50	80,01	82,435	83,21	81,74	84,66	81,54	84,20	82,86	85,53	87,49	88,64	83,95
79,26	81,88	82,43	82,19	82,83	85,65	83,21	85,08	83,24	86,39	82,73	85,75	87,21	87,56	87,74

Tabla A.6. Registro diario de la evolución del peso de los animales del Grupo 2(Norditropin^â).

1° día	2° día	3° día	4° día	5° día	6° día	7° día	8° día	9° día	10° día	11° día	12° día	13° día	14° día	15° día
92,53	90,20	90,54	94,52	92,92	93,88	91,81	92,73	93,30	92,52	95,81	94,28	94,29	94,52	95,95
89,00	87,29	90,15	93,68	92,67	92,97	92,57	93,91	93,33	93,54	95,04	93,65	93,64	96,69	95,71
86,59	85,43	88,96	89,14	91,02	90,43	88,66	88,65	88,28	89,54	88,22	89,87	89,13	87,96	89,78
91,49	89,85	89,96	94,18	93,83	94,46	92,22	92,52	92,24	90,44	92,53	94,24	94,30	93,27	93,02
93,16	89,93	91,93	94,45	94,86	95,78	94,92	94,30	94,57	96,40	98,26	98,04	98,00	96,72	96,20
93,89	91,95	92,96	95,99	95,26	96,91	95,77	95,50	96,19	93,93	96,32	94,78	94,79	97,04	94,36
84,84	85,43	85,94	87,90	89,11	89,62	88,60	90,58	85,87	87,22	88,58	87,06	89,45	89,18	89,18

Tabla A.7. Registro diario de la evolución del peso de los animales del Grupo 3 (F-1).

1° día	2° día	3° día	4° día	5° día	6° día	7° día	8° día	9° día	10° día	11° día	12° día	13° día	14° día	15° día
80,72	79,96	83,20	75,50	89,06	89,38	88,50	77,08	85,32	88,12	87,09	89,94	89,59	76,97	72,46
81,73	84,92	86,39	87,11	90,76	89,60	92,00	92,15	91,48	91,12	93,36	94,79	93,72	89,07	89,07
82,24	76,60	79,47	80,25	87,06	85,36	88,54	85,64	86,08	86,08	85,25	85,59	83,87	86,83	82,94
84,40	87,46	88,17	89,30	91,16	89,23	91,29	90,42	88,98	88,58	89,85	92,42	89,92	83,51	86,73
79,21	77,28	75,79	77,98	83,10	83,00	82,29	81,11	84,12	82,72	83,30	85,95	84,09	83,78	83,33
82,43	80,81	80,11	80,78	80,89	80,96	81,07	83,93	83,86	86,14	85,85	86,60	86,93	86,85	88,06
82,70	85,27	84,43	86,69	85,61	88,00	87,55	88,22	88,97	87,07	88,78	75,50	75,58	74,53	72,81

Tabla A.8. Registro diario de la evolución del peso de los animales del Grupo 4 (F-2).

Peso animal ^f (g)	Peso bazo (g)	Peso corazón (g)	Peso timo (g)	Peso tibia ^d (g)	Largo tibia ^d (mm)	Ancho tibia ^d (mm)	Peso tibia ⁱ (g)	Largo tibia ⁱ (mm)	Ancho tibia ⁱ (mm)
78,16	0,133	0,210	0,166	0,213	26,9	1,6	0,182	26,9	1,6
71,22	0,102	0,213	0,099	0,210	26,9	2,1	0,210	27,3	2,1
80,96	0,113	0,291	0,093	0,207	27,5	1,9	0,196	27,1	1,9
77,09	0,084	0,277	0,091	0,195	26,6	2,0	0,185	26,9	2,0
80,19	0,145	0,278	0,121	0,213	27,3	2,0	0,211	27,1	2,0
80,31	0,100	0,231	0,092	0,226	27,4	2,0	0,203	27,3	2,0
79,55	0,139	0,223	0,103	0,244	28,1	2,2	0,253	28,1	2,2

Tabla A.9. Resumen de las respuestas estudiadas en el Grupo 1 (placebo).

^f Al final del ensayo. ^d Derecha. ⁱ Izquierda.

Peso animal ^f (g)	Peso bazo (g)	Peso corazón (g)	Peso timo (g)	Peso tibia ^d (g)	Largo tibia ^d (mm)	Ancho tibia ^d (mm)	Peso tibia ⁱ (g)	Largo tibia ⁱ (mm)	Ancho tibia ⁱ (mm)
94,87	0,123	0,354	0,142	0,24	27,9	2,2	0,24	28,6	2,3
88,61	0,117	0,167	0,185	0,21	27,9	2,0	0,21	28,0	2,1
90,01	0,131	0,208	0,142	0,24	28,2	2,2	0,23	28,3	2,3
89,06	0,145	0,193	0,115	0,27	28,7	2,2	0,25	28,5	2,1
86,95	0,111	0,256	0,203	0,21	28,1	2,0	0,20	28,3	2,0
83,95	0,117	0,290	0,181	0,20	27,9	2,0	0,21	28,0	2,0
87,75	0,133	0,322	0,119	0,21	27,9	2,1	0,21	27,9	2,0

Tabla A.10. Resumen de las respuestas estudiadas en el Grupo 2 (Norditropin^â).

^f Al final del ensayo. ^d Derecha. ⁱ Izquierda.

Peso animal ^f (g)	Peso bazo (g)	Peso corazón (g)	Peso timo (g)	Peso tibia ^d (g)	Largo tibia ^d (mm)	Ancho tibia ^d (mm)	Peso tibia ⁱ (g)	Largo tibia ⁱ (mm)	Ancho tibia ⁱ (mm)
95,95	0,141	0,379	0,182	0,24	28,3	2,4	0,25	28,5	2,4
95,71	0,193	0,441	0,251	0,25	28,2	2,1	0,22	28,1	2,1
89,78	0,144	0,331	0,103	0,23	28,2	2,0	0,21	28,3	2,2
93,02	0,159	0,344	0,155	0,23	28,2	2,0	0,22	28,0	2,0
96,20	0,138	0,336	0,230	0,26	28,5	2,1	0,28	28,5	2,2
94,36	0,145	0,326	0,158	0,23	28,3	2,3	0,24	28,2	2,2
89,18	0,139	0,309	0,139	0,23	28,3	2,1	0,23	28,3	2,1

Tabla A.11. Resumen de las respuestas estudiadas en el Grupo 3 (F-1).

^f Al final del ensayo. ^d Derecha. ⁱ Izquierda.

Peso animal ^f (g)	Peso bazo (g)	Peso corazón (g)	Peso timo (g)	Peso tibia ^d (g)	Largo tibia ^d (mm)	Ancho tibia ^d (mm)	Peso tibia ⁱ (g)	Largo tibia ⁱ (mm)	Ancho tibia ⁱ (mm)
72,46	0,141	0,314	0,197	0,23	27,8	2,3	0,22	27,7	2,2
89,07	0,165	0,347	0,125	0,24	28,4	2,0	0,24	28,3	2,0
82,94	0,147	0,278	0,134	0,21	26,9	2,1	0,21	27,6	2,0
86,73	0,157	0,269	0,188	0,22	28,3	2,0	0,21	27,9	2,2
83,33	0,117	0,385	0,099	0,22	28,7	2,0	0,22	28,3	2,0
88,06	0,140	0,391	0,212	0,25	27,9	2,3	0,24	27,9	2,2
72,81	0,098	0,309	0,110	0,25	28,0	2,1	0,24	27,8	2,2

Tabla A.12. Resumen de las respuestas estudiadas en el Grupo 4 (F-2).

^f Al final del ensayo. ^d Derecha. ⁱ Izquierda.

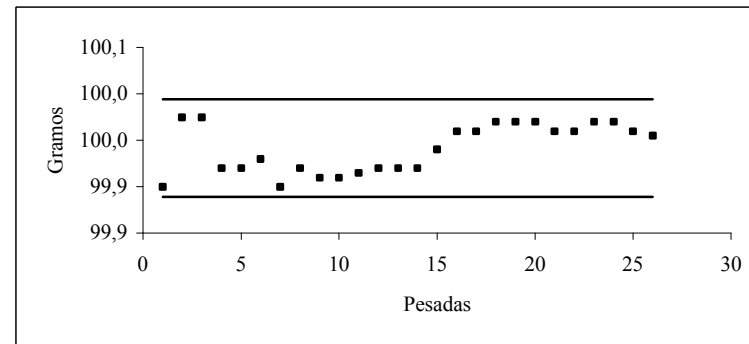
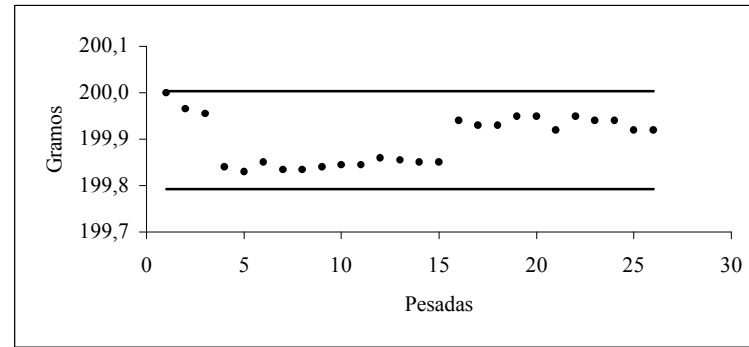


Figura A.1. *Patrones, de 200 y 100 g, empleados en la calibración de la balanza utilizada en el ensayo in vivo I. Se representan los límites de prevención (promedio \pm 2 s).*