

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 557 298**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/00** (2006.01)

**A61K 9/107** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2007 E 07736693 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.09.2015 EP 1996157**

54 Título: **Una composición farmacéutica oftálmica que contiene copolímeros de poliaspartamida anfífilos**

30 Prioridad:

**17.03.2006 IT MI20060494**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**25.01.2016**

73 Titular/es:

**SIFI S.P.A. (100.0%)  
Via Ercole Patti, 36  
95020 Laviniaio-Aci Sant'Antonio (CT), IT**

72 Inventor/es:

**GIAMMONA, GAETANO;  
CAVALLARO, GENNARA;  
LICCIARDI, MARIANO;  
CIVIALE, CLAUDINE;  
PALADINO, GRAZIA MARIA y  
MAZZONE, MARIA GRAZIA**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**ES 2 557 298 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Una composición farmacéutica oftálmica que contiene copolímeros de poliaspartamida anfífilos

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere al uso de copolímeros de tipo injerto anfífilos de poliaspartamida para la administración oftálmica de fármacos, tales como, por ejemplo, agentes antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos, agentes antimicrobianos tales como aminoglicósidos, macrólidos, cefalosporina, tetraciclina, 10 quinolonas, penicilina, beta-lactamas, agentes antiglaucoma tales como prostaglandinas, prostamidas, bloqueadores alfa y beta, inhibidores de anhidrasa carbónica, cannabinoides, agentes antivirales, agentes de diagnóstico, agentes antiangiogénicos, antioxidantes. A concentraciones apropiadas, en entornos acuosos, dichos copolímeros pueden formar micelas poliméricas capaces de incorporar fármacos.

15 **ESTADO DE LA TÉCNICA**

Las micelas son coloides de asociación obtenidos mediante la autoagregación de moléculas anfífilas (tensioactivos) por encima de una determinada concentración (concentración de micelas crítica, CMC). Las micelas poliméricas representan una clase aparte de micelas, constituida por copolímero anfífilos, es decir, que contienen 20 unidades monoméricas hidrófilas e hidrófobas. Estos dos tipos de unidades monoméricas pueden organizarse de diversas formas dentro de la cadena polimérica, proporcionando copolímeros aleatorios (si la secuencia es enteramente aleatoria), copolímeros de bloques (si todas las unidades de un tipo determinado se unen conjuntamente y se distinguen de aquellos con diferente polaridad) y copolímeros de injerto (si se unen cadenas de polaridad opuesta en orden aleatorio al esqueleto polimérico principal). La naturaleza anfífila de estos copolímeros permite que las macromoléculas individuales se comporten como agentes con actividad superficial (tensioactivos) en solución, o más bien se organicen en agregados de tipo micelar por encima de una determinada concentración (CMC, o concentración de agregación crítica, CAC). En agua, la estructura micelar es de tipo núcleo-coraza, en la que los dominios hidrófobos asociados internamente (núcleo), mientras que los dominios solubles forman una capa exterior (coraza). Al igual que la situación que sucede para tensioactivos de bajo peso molecular, la fuerza motriz 30 para la asociación espontánea es la reducción de la energía libre del sistema resultante de la eliminación de residuos apolares del entorno acuoso, con la formación de un "núcleo" hidrófobo, estabilizado por medio de los residuos hidrófilos expuestos al entorno acuoso.

Las micelas poliméricas tienen una morfología muy variable, y los factores que influyen en dichos aspectos incluyen la composición del copolímero, su concentración y el medio disolvente usado para la preparación; se considera normalmente que son agregados esféricos o elipsoidales con dimensiones comprendidas entre 5 y 100 nm. En cualquier caso, incluso sus dimensiones dependen de varios parámetros que incluyen entre otros el tipo y el peso molecular del copolímero, la relación hidrófoba/hidrófila y el número de macromoléculas (unímeros) por agregado micelar. En general, las micelas formadas por copolímeros de tipo injerto son más pequeñas que las 40 formadas por copolímeros de tipo bloque, dado que pueden estar constituidas incluso por una cadena polimérica sencilla y, por lo tanto, tienen un número de agregación inferior. Además, las micelas poliméricas se caracterizan por una estabilidad termodinámica significativa, expresada mediante el valor de la energía libre estándar asociada con el proceso de micelización (formación de micelas), que depende del valor de CAC, y una estabilidad cinética alta, que depende de la tasa de disociación (Kd) de los unímeros después de dilución; de hecho, incluso después de dilución a concentraciones inferiores al valor de CAC, las micelas preformadas pueden existir durante un periodo de tiempo suficiente, del orden de horas o días, permitiendo al agregado realizar su función.

Se han sugerido micelas poliméricas para fabricar sistemas coloidales como vehículos para fármacos y agentes de contraste de diagnóstico administrados por vía parenteral. 50

La patente WO 03082303 (ABBOTT LAB), 9 de octubre de 2003, divulga (véase la página 26, párrafo 2-página 27 línea 2 y reivindicación 23) una composición de micelas con poli(etilenglicol)-bloque-poli(N-hexil-L-aspartamida)-éster de estearato, que es útil para reducir la toxicidad de antibiótico de polieno, particularmente anfotericina B. También para inhibir hongos patógenos. La composición se administra por vía parenteral (por ejemplo, inyección 55 intravenosa o perfusión intravenosa), intradérmica, intratumoral, intramuscular, intraperitoneal, mucosal, oral o tópica. Las micelas secas se reconstituyen en un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como solución salina fisiológica o una solución de dextrosa estéril.

El artículo Biochimica et Biophysica Acta, vol.1528, ediciones 2-3, 3 de octubre de 2001, páginas 177-186, 'Synthesis and biopharmaceutical characterisation of new polyhydroxyethylaspartamide copolymers as drug carriers', por Caliceti P. y col., divulga (véase la página 4, párrafo 2-5 y página 6 párrafo 4-página 8 párrafo 6) que PHEA-PEG(2000-5000)-C16 y PHEA-PEG(2000-5000) se obtuvieron mediante una aminólisis parcial de PSI y se usaron como vehículo farmacológico. 60

El fármaco o agente de diagnóstico puede incorporarse en las micelas por medio de una interacción física sencilla, principalmente con las porciones hidrófobas del "núcleo" micelar o por medio de la unión covalente con grupos 65

funcionales del copolímero constituyente. El mecanismo de liberación del fármaco de las micelas poliméricas depende estrictamente del tipo de unión existente entre el fármaco y el "núcleo" micelar. En otras palabras, para fármacos incorporados por medio de uniones físicas, la liberación estará controlada por la tasa de difusión de dichas moléculas en el "núcleo" micelar, y el equilibrio micela-unímero; en el caso de fármacos unidos al núcleo micelar por medio de enlaces covalentes, la liberación del fármaco dependerá no solo del equilibrio de disociación de las micelas, sino también de la hidrólisis de las uniones fármaco-polímero junto con el proceso de penetración del agua en el núcleo micelar.

Debido a la naturaleza anfífila, los unímeros son también capaces de interactuar con moléculas biológicas anfífilas, tales como los fosfolípidos de membranas celulares, y de modificar, consecuentemente, la permeabilidad de los mismos.

Hasta la fecha, la administración oftálmica de fármacos está limitada exclusivamente a moléculas administradas para que actúen localmente con fines diagnósticos y terapéuticos, que se administran dejándolos caer o en cualquier caso aplicándolos como tales, o por medio de sistemas acuosos o basados en gel o sistemas basados en lípidos, en la zona precorneal. El fármaco puede eliminarse de esta región ocular por medio de diversos mecanismos, incluidos recambio lacrimal, drenaje del líquido instilado, unión a proteínas lacrimales, degradación enzimática del fármaco, absorción no productiva (es decir, pérdida debida predominantemente a la absorción por tejidos no corneales) o se absorbe por vía transcorneal, conjuntival o escleral, y alcanza las estructuras internas del ojo en las que se precisa que ejerza su acción terapéutica o diagnóstica.

No obstante, en general, la biodisponibilidad ocular de fármacos aplicados tópicamente es bastante baja; de hecho, la absorción ocular está muy limitada por, además de los factores mencionados previamente (que causan la eliminación del fármaco), el área limitada disponible para la absorción y por los mecanismos de protección que aseguran la función correcta del ojo (incluido el reflejo corneal).

Dichos factores, tomados conjuntamente, significan, en general, que la cantidad de fármaco que alcanza el humor acuoso y las estructuras internas del ojo es muy baja, generalmente no más del 1-10 % de la dosis instilada. Además, la fracción de fármaco disponible por las diversas rutas (canal naso-lacrimal, conjuntiva, aparato gastrointestinal, etc.) a un nivel sistémico, puede proporcionar efectos secundarios no deseados, la medida de los cuales se correlaciona estrictamente con el porcentaje de fármaco que ha experimentado absorción sistémica que, a su vez, dependen del fármaco, puede variar del 3 al 80 % de la dosis instilada.

Por lo tanto, la idea que subyace en la presente invención surge de la necesidad de desarrollar formulaciones oftálmicas capaces de aumentar la absorción transcorneal y/o transconjuntival de fármacos y, por lo tanto, aumentar la fracción de fármaco capaz de penetrar en la córnea y/o la conjuntiva para alcanzar las estructuras internas del ojo; esto también sucede mientras se mantienen las características estructurales y funcionales del mismo inalteradas.

En particular, el enfoque usado en la presente invención ha sido aquel que usa micelas poliméricas basadas en poliaspartamida para obtener formulaciones capaces de aumentar la biodisponibilidad ocular de fármacos para su uso ocular (tales como, por ejemplo, agentes antiinflamatorios esteroideos, fármacos antimicrobianos, agentes antiglaucoma, antihipertensivos, agentes de diagnóstico, agentes antivirales, agentes antiangiogénicos, antioxidantes). Se ha demostrado que dichas micelas son capaces de aumentar la biodisponibilidad ocular de fármacos en un 60 % con respecto al fármaco que se administra como tal, gracias a la permeabilidad transcorneal aumentada; por lo tanto, dichos vehículos han mostrado una tolerabilidad ocular óptima *in vivo* y una toxicidad celular baja en los sistemas de modelos *in vitro* e *in vivo* usados.

Por lo tanto, el uso de dichos vehículos permite una biodisponibilidad ocular aumentada de fármacos, mientras que se reducen consecuentemente los efectos secundarios debidos a la absorción sistémica de los mismos.

#### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

La invención se ejemplificará claramente con referencia a las figuras adjuntas, en las que:

- La figura 1 representa fotomicrografías de células SIRC (células derivadas de córnea de conejo), en comparación con la morfología de células no tratadas con aquellas tratadas según la invención;
- La figura 2 representa un gráfico de recuperación celular (y, por lo tanto, de la actividad) después de la inclusión del vehículo farmacológico de la invención;
- La figura 3 representa un gráfico de concentración de dexametasona en humor acuoso después de la administración en ojos de conejos.

**SUMARIO DE LA INVENCION**

El objeto de la presente invención es el de crear formulaciones oftálmicas novedosas de fármacos antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos, agentes antimicrobianos, agentes antiglaucoma, agentes antivirales, agentes antiangiogénicos, antioxidantes y agentes de diagnóstico incorporados físicamente en el interior de los sistemas de micelas constituidos por copolímeros de poliaspartamo anfífilos con el fin de aumentar la cantidad de fármaco biodisponible en el nivel ocular con respecto al que puede obtenerse administrando los fármacos libres; esto se produce con el objetivo de reducir la dosis que se va administrar y el número de administraciones, y obtener, de este modo, una ventaja terapéutica. Otro objeto de la presente invención es el de proporcionar sistemas que permitirán una absorción menos improductiva de los fármacos, con la reducción consecuente de los efectos secundarios sistémicos no deseados que están correlacionados con el uso de los fármacos mencionados anteriormente cuando se administran en sus estados nativos.

Otro objeto de la presente invención es el de usar una familia de tensioactivos poliméricos basados en poliaspartamida que presentan una compatibilidad alta, facilidad de fabricación reproducible con rendimientos elevados y bajo coste, y modulabilidad en términos de contenido de cadenas hidrófobas e hidrófilas en la producción de formulaciones oftálmicas.

**DESCRIPCION DE LA INVENCION**

El objeto principal de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica oftálmica según la reivindicación 1, y esta formulación oftálmica es capaz de aumentar la biodisponibilidad ocular de fármacos (agentes antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos, agentes antimicrobianos, agentes antiglaucoma, agentes antivirales, agentes antiangiogénicos, antioxidantes y agentes de diagnóstico) usando una familia de tensioactivos poliméricos constituida por copolímeros de poliaspartamo anfífilos de tipo injerto de ( $\alpha,\beta$ -poli(N-2-hidroxietyl-DL-aspartamida)) (PHEA).

Se han preparado copolímeros de injerto de poliaspartamida (PHEA) que contienen diferentes porcentajes de la cadena hidrófila (polietilenglicol, PEG, con un peso molecular medio comprendido entre 750 y 20.000 Da) y/o la cadena hidrófoba ( $C_n$ , con  $4 \leq n \leq 20$ ), respectivamente (PHEA-PEG $_x$ - $C_n$  y PHEA- $C_n$  en las que  $x$  = peso molecular medio del PEG y  $n$  = el número de átomos de carbono en la cadena de alquilamina introducida), caracterizado y evaluado desde el punto de vista de tolerabilidad ocular *in vivo*, citotoxicidad y permeabilidad celular *in vitro* e *in vivo* después de la administración ocular. Preferentemente, el peso molecular medio de la cadena de PEG está comprendido entre 2000 y 10.000 Da, más preferentemente es de 5000 Da, mientras que el número de átomos de carbono en las cadenas de alquilamina es  $12 \leq n \leq 18$ , más preferentemente  $n = 16$ . La preparación de los copolímeros mencionados anteriormente se ha llevado a cabo por medio de reacciones secuenciales previendo la inserción de una cadena de PEG (peso molecular medio comprendido entre 750 y 20.000 Da y/o una cadena de alquilo  $C_n$  con  $4 \leq n \leq 20$ ) en la estructura de poliaspartamida usando reacciones de aminólisis parciales con aminas orgánicas.

Para los copolímeros de  $\alpha,\beta$ -poli(N-2-hidroxietyl-DL-aspartamida-alquilaminamina) (PHEA- $C_n$ ) se han usado las siguientes reacciones en secuencia:

- aminólisis parcial de polisuccinimida (PSI) (obtenida mediante condensación térmica de ácido D,L-aspartico, a una temperatura de entre 100-320 °C, preferentemente entre 150 y 250 °C, más preferentemente entre 180-210 °C, a una presión de entre  $1 \cdot 10^{-2}$  mm de Hg y en presencia de ácido fosfórico como catalizador) con alquilamina ( $C_n$ , con  $4 \leq n \leq 20$ , preferentemente con  $12 \leq n \leq 18$ , más preferentemente  $n = 16$ ) en solución de dimetilformamida (DMF), a una temperatura constante de entre 20 y 100 °C, preferentemente entre 40 y 80 °C, más preferentemente 60 °C, usando una relación molar entre los moles  $C_n$  y unidades de PSI repetitivas de entre 0,01-0,6 durante un periodo de tiempo apropiado (entre 1 y 15 horas) para obtener copolímeros de PSI- $C_n$ ;

- aminólisis completa subsiguiente de los copolímeros de PSI- $C_n$  obtenidos con un exceso de etanolamina en solución de DMF durante un periodo de tiempo adecuado (entre 0,5 y 10 horas). Después de completar el tiempo de reacción, los productos se recuperaron por precipitación en etiléter, se centrifugaron, se lavaron varias veces (por ejemplo entre 3 y 5 veces) con acetona, se secaron al vacío y se purificaron mediante diálisis exhaustiva frente a agua bidestilada.

Los rendimientos se encontraron en el intervalo del 94-100 % p/p con respecto a la cantidad de partida de PSI. Cada producto obtenido caracterizó espectrofotométricamente. El porcentaje molar de cadenas de alquilamina presentes en los copolímeros de PHEA- $C_n$ , determinado por RMN, está comprendido entre el 0,5 y el 20 %. Los copolímeros obtenidos son fácilmente solubles en agua.

Para los copolímeros de  $\alpha,\beta$ -poli(N-2-hidroxietyl-DL-aspartamida-poli(etilenglicol)-alquilaminamina) (PHEA-PEG $_x$ - $C_n$ ) se llevaron a cabo 3 reacciones en secuencia:

- aminólisis parcial de (PSI) (obtenida como se ha especificado anteriormente) con O-(2-aminoetyl)-O'-

metilpolietileno ( $\text{NH}_2\text{-PEG}_x\text{-OCH}_3$ ) (indicando  $x$  el peso molecular medio, comprendido entre 750 y 20.000 Da, estando el peso molecular preferente comprendido entre 2000 y 10.000 Da, siendo de modo particularmente preferente el peso molecular medio de 5000 Da) en solución de dimetilformamida (DMF), a una temperatura constante de entre 20 y 100 °C, preferentemente entre 40 y 80 °C, más preferentemente de 60 °C, usando una relación molar entre los moles de  $\text{NH}_2\text{-PEG}_x\text{-OCH}_3$  y unidades de PSI repetitivas de entre 0,01 y 1 durante un periodo de tiempo apropiado (entre 1 y 40 horas) para obtener copolímeros de  $\text{PSI-PEG}_x$ ;

- aminólisis parcial subsiguiente de los copolímeros de polisuccinimida-poli(etilglicol) ( $\text{PSI-PEG}_x$ ) (obtenidos tal como se ha especificado anteriormente) con alquilamina ( $\text{C}_n$ , con  $4 \leq n \leq 20$ , preferentemente con  $12 \leq n \leq 18$ , de modo particularmente preferente  $n = 16$ ) en solución de dimetilformamida (DMF) a una temperatura constante de entre 20 y 100 °C, preferentemente entre 40 y 80 °C, más preferentemente de 60 °C, usando una relación molar entre los moles  $\text{C}_n$  y unidades de PSI repetitivas de entre 0,01 y 0,80 durante un periodo de tiempo apropiado de entre 1 y 40 horas para proporcionar copolímeros de  $\text{PSI-PEG}_x\text{-C}_n$ ;
- aminólisis completa subsiguiente de los copolímeros de  $\text{PSI-PEG}_x\text{-C}_n$  obtenidos con un exceso de etanolamina en solución de DMF durante un periodo de tiempo adecuado comprendido entre 1 y 5 horas.

Después de completar el tiempo de reacción, los productos se recuperaron por precipitación en etiléter, se centrifugaron, se lavaron varias veces con acetona, se secaron al vacío y se purificaron mediante diálisis exhaustiva frente a agua bidestilada.

Los rendimientos se encontraron en el intervalo del 94-100 % p/p con respecto a la cantidad de partida de PSI. Cada producto obtenido se caracterizó espectrofotométricamente. El porcentaje molar de cadena de poli(etilenglicol) (PEG) y alquilamina presente en los copolímeros de  $\text{PHEA-PEG}_x\text{-C}_n$ , determinado por RMN, está comprendido entre el 0,5 y el 30 % y el 0,5 y el 20 % respectivamente. Los copolímeros obtenidos son fácilmente solubles en agua.

Los copolímeros obtenidos por medio de la presente invención se caracterizaron en términos de peso molecular e índice de polidispersidad por medio de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Los pesos moleculares medios medidos determinados en agua están comprendidos entre: 10 KDa y 150 KDa; se determinó que los índices de polidispersidad se encuentran entre 1,1 y 2.

Meramente a modo de ejemplo, las presente descripción informa de los resultados relacionados con los copolímeros que contienen PEG con un peso molecular medio de 5000 Da y cadenas  $\text{C}_n$  hidrófobas  $\text{C}_{16}$  (hexadecilamina), con moléculas lipófilas tales como esteroides y moléculas hidrófilas tales como aminoglicósidos. Los estudios llevados a cabo apoyan y sugieren el uso de todos los copolímeros analizados para que actúen como vehículos de fármacos (tales como, por ejemplo, agentes antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos, agentes antimicrobianos, agentes antiglaucoma, agentes antivirales, agentes antiangiogénicos, antioxidantes y agentes de diagnóstico) para su administración oftálmica.

Los copolímeros descritos en el presente documento se han sometido a estudios de artesa de Langmuir (LT), para obtener información de la capacidad acomplejante para fármacos (por ejemplo, alcohol de dexametasona) de las micelas poliméricas formadas por los mismos y a electroforesis capilar de afinidad micelar (MACE) con el objetivo de obtener información sobre la interacción de una fase acuosa que contiene los copolímeros en cuestión y una monocapa de lípidos como un modelo de membrana.

Los estudios de LT han puesto en relieve que, a diferencia del polímero parental (PHEA), existe una interacción entre dichos copolímeros y monocapas lipídicas de dipalmitoilfosfatidilcolina, y que esta tiene lugar predominantemente entre las cadenas de hexadecilamina de los copolímeros y la porción no polar de la monocapa lipídica.

Los estudios de MACE han mostrado por ejemplo que, a diferencia de PHEA, los copolímeros que contienen cadenas de hexadecilamina ( $\text{PHEA-C}_{16}$  y  $\text{PHEA-PEG5000-C}_{16}$ ) tienen la capacidad de acomplejar fármacos, tales como, por ejemplo, dexametasona, y que dicha capacidad también depende de la temperatura.

Los sistemas micelares descritos en el presente documento se han sometido a estudios de permeabilidad en capas de células epiteliales de conjuntiva bovina (capas de BCEC). El efecto de los sistemas mencionados anteriormente sobre el transporte paracelular se ha evaluado usando carboxifluoresceína, y la permeabilidad conjuntival de fármacos antiinflamatorios esteroideos y agentes antimicrobianos de aminoglicósidos se ha evaluado usando el mismo modelo, meramente a modo de ejemplo, para comparar una clase de moléculas lipófilas con respecto a una clase de moléculas hidrófilas.

A modo de ejemplo, informamos que los copolímeros de  $\text{PHEA-PEG5000-C}_{16}$  y  $\text{PHEA-C}_{16}$  no influyen en el transporte paracelular de carboxifluoresceína y, en particular, el derivado de  $\text{PHEA-PEG5000-C}_{16}$  aumenta significativamente la permeabilidad de fármacos antiinflamatorios esteroideos, tal como, por ejemplo, los agentes antimicrobianos dexametasona y aminoglicósido tales como, por ejemplo, netilmicina, en el modelo usado.

Estudios *in vitro* de permeabilidad a través de capas de células epiteliales de córnea bovina han demostrado que todos los copolímeros analizados aumentan la permeabilidad transcorneal de fármacos antiinflamatorios esteroideos tales como, por ejemplo, alcohol de dexametasona y éster de fosfato de dexametasona. Los copolímeros que forman el objeto de la presente invención se han sometido a estudios de compatibilidad *in vitro* con células de córnea de conejo (SIRC), para evaluar cualquier potencial de citotoxicidad de dichos sistemas usando microscopía de luz (evaluación morfológica de la monocapa celular) o microscopía electrónica de transmisión (TEM). Las células incubadas en medio de crecimiento que contenía PHEA-C<sub>16</sub> y PHEA-PEG5000-C<sub>16</sub> observadas por TEM, muestran gránulos intracitoplásmicos amorfos rodeados por la membrana plasmática, lo que puede atribuirse a invaginaciones que contienen los polímeros (fig. 1). No obstante, las células no muestran ningún signo de daño celular o nuclear; el citoplasma celular muestra características ultraestructurales similares a controles y mitocondrias que funciona bien. La presencia de los copolímeros ralentiza el metabolismo celular, como se demuestra mediante ensayos de viabilidad metabólica (ensayos MTT), pero las células que incorporan dichas sustancias en sus citoplasmas son capaces de metabolizarlas y de restaurar la actividad metabólica normal después de la "recuperación" con medio de cultivo normal desprovisto de los sistemas poliméricos (fig. 2).

Los sistemas descritos en la presente invención se han sometido a estudios *in vivo* en conejos con el objetivo de evaluar la tolerabilidad ocular de las micelas poliméricas con respecto al control (BSS, solución salina tamponada) cuando se administran en el saco ocular del animal (ensayo de Draize); los estudios han mostrado una buena tolerabilidad ocular en todos los animales. Además, dichos estudios no destacan ningún signo clínico (curvas de aumento de peso y consumo de alimento y agua normal), lo que indica una absorción sistémica potencial para cualquiera de los sistemas analizados con respecto al control.

Estudios de la influencia sobre el transporte transcorneal *in vivo* de fármacos, tal como por ejemplo agentes antiinflamatorios esteroidales, han mostrado que las micelas PHEA-PEGx-C<sub>n</sub> dan como resultado un aumento significativo en la concentración del fármaco en el humor acuoso con respecto a la formulación comercial con una cantidad de fármaco igual.

#### EJEMPLO 1

Los experimentos de transporte transcorneal *in vivo* se han realizado en conejos albinos macho (Charles River) que pesaban 1,8-2,5 kg. Antes del experimento, los animales se mantuvieron en jaulas estándar con acceso libre a alimento y agua. Los conejos se han tratado según las instrucciones publicadas en "Guiding Principles in the Care and Use of Animals" (DHEW Publication, NIH 80-23) y ARCO Resolution on the Use of Animals in Research.

Se usaron dos formulaciones de alcohol de dexametasona:

- Visumetazona<sup>®</sup> (una formulación comercial del fármaco, en una suspensión del 0,1 % p/v);
- Formulación de micelas (fármaco, a una concentración final del 0,1 % p/v, incorporado dentro de micelas PHEA-PEG5000-C<sub>16</sub> en tampón de fosfato isotónico a pH de 7,3).

La formulación de micelas de PHEA-PEG<sub>5000</sub>-C<sub>16</sub> que contienen dexametasona se prepararon inmediatamente antes del análisis mezclando conjuntamente la cantidad apropiada de copolímero y fármaco en una pasta homogénea usando solución de Ringer como dispersante y añadiendo subsiguientemente un volumen adecuado de solución de Ringer modificada para dar una concentración final de dexametasona igual al 0,1 % p/v, y una concentración polimérica igual al 0,2 % p/v.

Los ensayos se realizaron administrando 50 µl de una de las formulaciones descritas previamente en el saco conjuntival de conejos.

En varios momentos dentro del intervalo de 30 a 180 minutos, se tomaron de los animales muestras de humor acuoso después de eutanasia. Dichas muestras se añadieron a una cantidad adecuada de metanol para precipitar los componentes proteicos del humor acuoso, a continuación, después de centrifugación, el sobrenadante se analizó mediante HPLC usando una columna de 4,6/125 mm Hypersil ODS 5 µm como fase estacionaria, con una precolumna H5ODS-120CS y un gradiente del 53 %/47 % de CH<sub>3</sub>OH/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,05 M (6,8 g/l), pH 6 como fase móvil, a un caudal de 1 ml/min, volumen de inyección de 100 µl, y se realizó un seguimiento de eluato a 242 nm.

Los resultados de dicho estudio, comunicados en la figura 3, muestran un aumento del área bajo la curva (AUC) de aproximadamente el 60 % usando la formulación de micelas de PHEA-PEG<sub>5000</sub>-C<sub>16</sub> (0,02 %) que contienen alcohol de dexametasona (0,1 %), con respecto a la formulación comercial (0,1 % de suspensión de visumetazona).

#### EJEMPLO 2

Los estudios de permeabilidad *in vitro* se realizaron usando una multicapa celular epitelial de conjuntiva bovina (BCEC) que reproduce la organización del tejido original, como modelo.

Se usaron dos formulaciones para los estudios con sulfato de netilmicina:

- 5 - Formulación de sulfato de netilmicina en solución de Ringer modificada, con una concentración base de netilmicina del 0,3 % p/v;
- Formulación de micelas (sulfato de netilmicina incorporado en micelas de PHEA-PEG<sub>5000</sub>-C<sub>16</sub> en solución de Ringer modificada, con una concentración base de netilmicina del 0,3 % p/v;

10 La formulación que contiene netilmicina se preparó inmediatamente antes del análisis mezclando conjuntamente la cantidad apropiada de copolímero y fármaco en una pasta homogénea usando solución de Ringer como dispersante y añadiendo subsiguientemente un volumen adecuado de solución de Ringer modificada para dar una concentración base de netilmicina igual al 0,3 % p/v.

15 Los ensayos se realizaron introduciendo 0.5 ml de una de las formulaciones mencionadas en el compartimiento del donante y 1,5 ml de solución de Ringer modificada en el compartimiento del receptor; la incubación dura 120 minutos a 37 °C, con agitación orbital a 50 rpm. A tiempos subsiguientes iguales a 30, 60, 90 y 120 minutos, se tomaron muestras de 500 µl del compartimiento del receptor y se reemplazaron subsiguientemente con solución de Ringer reciente. Las muestras tomadas se analizaron por HPLC, siguiendo con la derivatización de la netilmicina con ortoftalaldehído (OPA) para llevar a cabo la determinación analítica. El procedimiento de derivatización se realizó como se indica a continuación. A una parte de la solución estándar de netilmicina (o solución extraída del compartimiento del receptor) se añaden tres partes de solución de OPA (preparada disolviendo 20 mg de OPA en 5 ml de metanol, diluyendo dicha solución en 90 ml de tampón de borato, pH 10,4, y añadiendo 0,2 ml de ácido tioglicólico) y una parte de metanol. La solución obtenida de este modo se mantiene a 60 °C durante 15 minutos, alejada de la luz. Cada solución se enfría después rápidamente disponiéndola en un baño de hielo durante 5 minutos y disponiéndola después en un aparato automuestreador a 4 °C antes de analizarla por HPLC. En dichas condiciones, la fluorescencia del derivado de netilmicina-OPA es estable durante al menos 3 horas, periodo dentro del cual se analizó la muestra. El análisis por HPLC se realizó usando una columna de 4,6/250 mm LUNA C<sub>18</sub> 5 µm como fase estacionaria, con una precolumna de H<sub>5</sub>ODS-C<sub>5</sub>, y un gradiente del 30 %/70 % de CH<sub>3</sub>CN/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,05 M (pH 7,3) como fase móvil, a un caudal de 1 ml/min, un volumen de inyección de 100 µl y se realizó un seguimiento del eluato a 330 nm.

Cada formulación se analizó diez veces sobre un número similar de muestras de multicapas de BCEC.

35 La integridad de las multicapas se analizó mediante mediciones de TEER al comienzo de cada experimento, después de 30 y de 60 minutos, y al final de cada experimento.

Se usaron dos tipos de ensayos estadísticos para determinar el nivel de significancia de los datos: análisis de varianza y ensayo t de Student.

40 Se ha mostrado que el coeficiente de permeabilidad del fármaco vehiculizado en micelas de PHEA-PEG<sub>5000</sub>-C<sub>16</sub> es igual a aproximadamente dos veces el obtenido con el fármaco libre.

**Bibliografía**

45 1) Caliceti P., Quarta S. M., Veronese F. M., Cavallaro G., Pedone E. Giammona G. Biochim. Biophys. Acta, 1528 (2001) 177-186.

50 2) Cavallaro G., Licciardi M., Giammona G. , Caliceti P., Semenzato A., Salmaso S. J. Controlled Release, 89 (2003) 285-295.

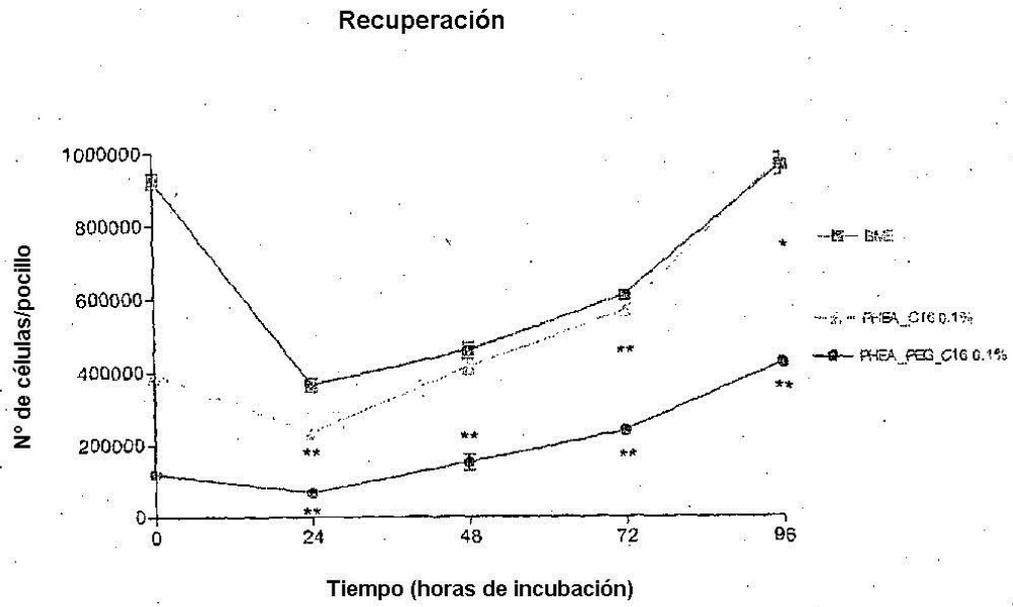
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de enfermedades oftálmicas mediante administración local que comprende uno o más ingredientes activos seleccionados de agentes antimicrobianos, agentes antiinflamatorios, agentes antiglaucoma, agentes antivirales, agentes antiangiogénicos y antioxidantes, estando incluido dicho agente activo en un vector farmacéutico constituido por micelas poliméricas que comprenden copolímeros de tipo "injerto" de poliaspartamida (PHEA) que contienen cadenas de polietilenglicol (PEG) hidrófilas con un peso molecular medio comprendido entre 750 y 20.000 Da y/o cadenas de alquilo  $C_n$  hidrófobas, en las que  $4 \leq n \leq 20$ .
- 10 2. Composiciones farmacéuticas según la reivindicación 1, que además comprenden uno o más de excipientes farmacéuticamente aceptables para su administración oftalmológica.
- 15 3. Composiciones farmacéuticas según la reivindicación 2, en las que los excipientes se seleccionan de: bioadhesivos, electrolitos (fosfatos, cloruros), agentes isotonzantes no iónicos, tensioactivos, antioxidantes, sistemas tampón.
- 20 4. Las composiciones farmacéuticas según la reivindicación 1, en las que el peso molecular medio de las cadenas de polietilenglicol es igual a, o están comprendidos entre, 2000 y 10.000 Da, y el número de átomos de carbono en las cadenas hidrófobas es  $12 \leq n \leq 18$ .
- 25 5. Composiciones farmacéuticas según la reivindicación 1 o 4, en las que las cadenas hidrófilas están constituidas por polietilenglicol PEG con un peso molecular medio comprendido entre 750 y 20.000 Da y las cadenas lipófilas por cadenas alifáticas seleccionadas del grupo que consiste en: butilamina, pentilamina, hexilamina, heptilamina, octilamina, decilamina, undecilamina, dodecilamina, tridecilamina, tetradecilamina, hexadecilamina, octadecilamina, dodecilamina.
- 30 6. Composiciones farmacéuticas según la reivindicación 1 o 5, en las que los copolímeros comprenden PEG con un peso molecular medio de 5000 Da y cadenas hidrófobas  $C_n$  en las que n es 16.
- 35 7. Una composición farmacéutica para administración local para su uso en el diagnóstico de enfermedades oftálmicas que comprende un agente de diagnóstico, estando incluido dicho agente activo en un vector farmacéutico constituido por micelas poliméricas que comprenden copolímeros de tipo "injerto" de poliaspartamida (PHEA) que contienen cadenas de polietilenglicol (PEG) hidrófilas con un peso molecular medio comprendido entre 750 y 20000 Da y/o cadenas de alquilo  $C_n$  hidrófobas, en las que  $4 \leq n \leq 20$ .



SIRC incubado durante 72 horas en medio de cultivo (control), PHEA C16 o PHEA PEG 500 C16 al 0,1 % en medio de cultivo. Las flechas indican granos intracitoplásmicos rodeando la membrana.

Fig. 1



Indicación: T0 = 24 horas después de finalizar los tratamientos con PC16 y PPC16

\* =  $p < 0,05$

\*\* =  $p < 0,001$

Fig. 2

Concentración de dexametasona (0,1 %) después de monoadministración en ojos de conejo

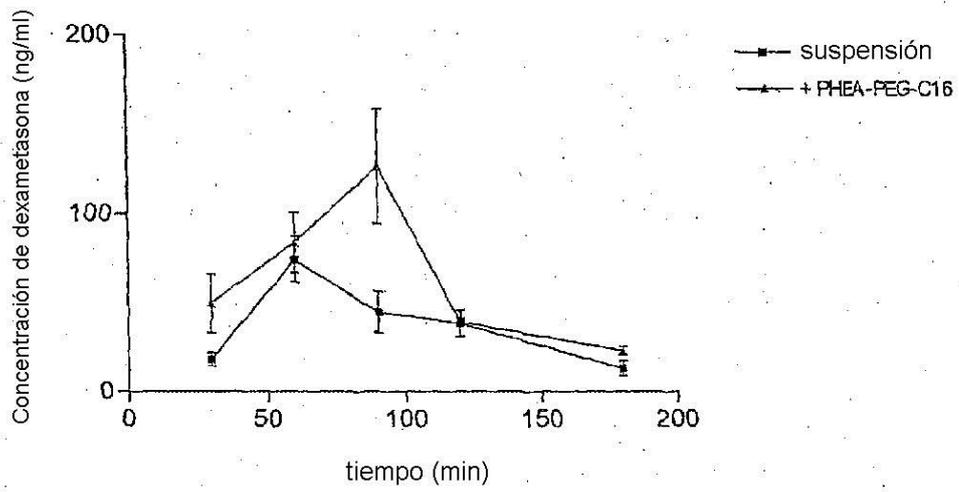


Fig. 3