

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 616 296**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 9/50 (2006.01)

A61K 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.12.2006 PCT/US2006/045887**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.11.2007 WO07130134**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.12.2006 E 06851156 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.11.2016 EP 1959925**

54 Título: **Micropartículas de liberación controlada**

30 Prioridad:

02.12.2005 US 741741 P

09.03.2006 US 780760 P

28.04.2006 US 796071 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.06.2017

73 Titular/es:

**(OSI) EYETECH, INC. (100.0%)
41 PINELAWN ROAD
MELVILLE NY 11747, US**

72 Inventor/es:

**CAMPBELL, KATHLEEN, M.;
CALIAS, PERRY;
COOK, GARY, P. y
GANLEY, MARY, A.**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 616 296 T3

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

DESCRIPCIÓN

Micropartículas de liberación controlada

Campo de la invención

5 La invención se refiere a la administración de fármacos. En particular, la invención se refiere a composiciones y métodos para la administración sostenida de agentes terapéuticos utilizando micropartículas. Más particularmente, la invención se refiere a composiciones de micropartículas de liberación sostenida y a métodos de uso para administración oftálmica.

Antecedentes de la invención

10 A medida que se disponga de nuevas modalidades de tratamiento para enfermedades oftálmicas, se espera que el número de inyecciones intravítreas administradas aumente dramáticamente. Por ejemplo, la inyección intravítrea del inhibidor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), Macugen® ((OSI) Eyetech, Inc. NY, NY), está disponible para el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad. El Macugen se administra actualmente por inyección intravítrea cada seis semanas.

15 Las ventajas de la inyección intravítrea de medicamentos y diagnósticos incluyen el logro de concentraciones vítreas máximas al tiempo que se minimiza la toxicidad atribuida a la administración sistémica. Aunque estas ventajas se están haciendo muy apreciadas, la comunidad oftalmológica se centra en varias complicaciones potencialmente asociadas con la inyección intravítrea. Riesgos de la inyección intravítrea, algunos que amenazan la visión, incluyen endoftalmitis, desprendimiento de retina, iritis/uveítis, inflamación, hemorragia intraocular, hipertensión ocular, hipotonía, retinopexia neumática y catarata (R.D. Jager et al., Retina 24:676-698, 2004 and C.N. Ta, Retina, 24:699-705, 2004). Los métodos para minimizar tales riesgos incluyen el desarrollo de formulaciones oftálmicas de liberación sostenida para minimizar el número de inyecciones intraoculares.

20 Los insertos oftálmicos son dispositivos sólidos destinados a ser colocados en el saco conjuntival y para administrar el fármaco a una velocidad comparativamente lenta. Uno de estos dispositivos es Ocusert® (Alza Corporation, Mountain View, CA), que es una unidad de difusión que consiste en un depósito de fármaco encerrado por dos membranas de control de liberación hechas de un copolímero. M.F. Saettone proporciona una revisión de los esfuerzos continuos dedicados a la administración ocular. ("Progress and Problems in Ophthalmic Drug Delivery", Business Briefing: Pharmatech, Future Drug Delivery, 2002, 167-171). Se han desarrollado otras estrategias de implante para terapias lipofílicas pequeñas, altamente potentes. (G.A. Peyman, et al., "Delivery Systems for Intraocular Routes" Advanced Drug Delivery Reviews, (1995) 16, 107). Si bien estos implantes son eficaces para la administración de esteroides, el tamaño pequeño de los implantes impide el largo plazo (>30 días) de grandes compuestos solubles en agua. Además, las condiciones de formulación para la mayoría de los sistemas de administración de polímeros no son compatibles con proteínas, anticuerpos y otros agentes bioterapéuticos (S.P. Schwendeman et al., "Peptide, protein, and vaccine delivery from implantable polymeric systems: Progress and challenges" Controlled Drug Delivery, (1997) 229). La encapsulación de productos farmacéuticos en micropartículas de polímero biocompatibles y biodegradables puede prolongar el mantenimiento de los niveles terapéuticos de fármacos en relación con la administración del propio fármaco. La liberación sostenida se puede extender hasta varios meses dependiendo de la formulación y de la molécula activa encapsulada. Con el fin de prolongar la existencia en el sitio diana, el fármaco se puede formular dentro de una matriz en una formulación de liberación lenta (véase, por ejemplo, Langer (1998) Nature, 392, Supplement, 5-10). Después de la administración, el fármaco se libera a continuación por difusión o por erosión de la matriz. La encapsulación dentro de poliésteres biodegradables, biocompatibles, por ejemplo, copolímeros de lactida y glicolida, se han utilizado para administrar agentes terapéuticos de moléculas pequeñas que van desde esteroides insolubles hasta péptidos pequeños. En la actualidad hay más de una docena de formulaciones de polímero de lactida/glicolida en el mercado, la mayoría de las cuales están en forma de micropartículas (T. Tice, "Delivery with Depot Formulations" Drug Delivery Technology, (2004) 4(1)).

25 Se han descrito varias técnicas para la producción de micropartículas de polímero de lactida/glicolida que contienen agentes biológicos o químicos mediante una técnica de fabricación basada en emulsión. En general, los métodos incluyen la preparación de una primera fase que consiste en un solvente orgánico, un polímero y un agente biológico o químico disuelto o disperso en el primer solvente. Una segunda fase comprende agua y un estabilizante y, opcionalmente, el primer solvente. La primera y segunda fases se emulsionan y, después de que se forma una emulsión, el primer solvente se elimina de la emulsión, produciendo micropartículas endurecidas.

30 Las micropartículas también se pueden producir utilizando un proceso de agua en aceite en agua (w/o/w). Las emulsiones W/o/w se pueden considerar como una emulsión acuosa de gotitas de aceite que a su vez contienen una fase acuosa dispersa. Ejemplos de procesos de emulsión w/o/w se describen en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,954,298; 5,330,767; 5,851,451 y 5,902,834, cada uno de los cuales se incorpora en este documento como referencia en su totalidad. El proceso w/o/w descrito anteriormente por lo general se utiliza para moléculas solubles en agua.

Además, la Patente de los Estados Unidos No. 6,706,289, incorporada por este medio, en su totalidad como referencia, describe formulaciones de liberación controlada de moléculas biológicamente activas que están acopladas a polímeros hidrófilos tales como polietilenglicol y métodos de su producción. Las formulaciones se basan en micropartículas sólidas formadas por la combinación de polímeros sintéticos, biodegradables tales como poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA) y copolímeros de los mismos. PCT WO 03/092665, que se incorpora en este documento en su totalidad como referencia, describe formulaciones de microesferas para la administración sostenida de un aptámero, por ejemplo, un aptámero del factor de crecimiento endotelial antivascular, a un locus preseleccionado en un mamífero. Tales formulaciones se describen adicionalmente en K.G. Carrasquillo et al., "Controlled Delivery of the Anti-VEGF Aptamer EYE001 with Poly(lactic-co-glycolic) Acid Microspheres," I.O.V.S. (2003) 44(1), 290.

La aceptación y la seguridad del paciente son cuestiones clave que jugarán un papel en el cual se utilizan los tratamientos. Las inyecciones intraoculares frecuentes pueden no ser favorables porque causan incomodidad al paciente y a veces temor, mientras que arriesgan el daño permanente del tejido. Por consiguiente, sigue existiendo la necesidad de desarrollar formulaciones oftálmicas de liberación sostenida para minimizar el número de inyecciones intraoculares.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona composiciones y métodos para la administración sostenida de un agente biológicamente activo utilizando micropartículas. En un aspecto particular, la presente invención proporciona composiciones de micropartículas de liberación sostenida y métodos para administración oftálmica.

En un aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende micropartículas de liberación sostenida que tienen la capacidad para ser administrado mediante una jeringa al ojo. De acuerdo con este aspecto, la presente invención proporciona formulaciones de micropartículas que pueden ser inyectadas a través de una aguja de calibre 27 o más estrechas (más pequeñas).

En una realización, las micropartículas liberan un agente biológicamente activo durante un período de al menos aproximadamente 1-12 meses. En una realización adicional, las micropartículas liberan un agente biológicamente activo durante un periodo de al menos aproximadamente 3-6 meses.

En otra realización, las micropartículas tienen una carga de núcleo de al menos aproximadamente 10% en peso del agente biológicamente activo.

En otra realización, las micropartículas tienen una ráfaga *in vivo* inicial de 24 horas de menos de aproximadamente 10% en peso de la carga de núcleo del agente biológicamente activo.

En otro aspecto, la presente invención proporciona composiciones y métodos para la administración sostenida de un aptámero conjugado a un polímero hidrófilo tal como polietilenglicol. De acuerdo con una realización particular, el aptámero comprende pegaptanib.

En otro aspecto, la presente invención proporciona composiciones y métodos para la administración sostenida de un agente anti-VEGF. De acuerdo con una realización particular, el agente anti-VEGF comprende un aptámero.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende micropartículas de liberación sostenida que comprenden pegaptanib que tiene la capacidad de administrarse a un sujeto mediante una jeringa a través de una aguja de calibre 27 o menor.

En una realización, las micropartículas liberan pegaptanib durante un periodo de al menos aproximadamente 1-12 meses. En otra realización, las micropartículas liberan pegaptanib durante un periodo de al menos aproximadamente 3-6 meses.

En otra realización, las micropartículas tienen una carga de núcleo de al menos aproximadamente 10% en peso de pegaptanib.

En otra realización, las micropartículas tienen una ráfaga *in vivo* inicial de 24 horas de menos de aproximadamente 10% en peso de la carga de núcleo de pegaptanib.

En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para administrar formulaciones de microesferas de liberación sostenida para conseguir un perfil farmacocinético deseado. De acuerdo con una realización, las micropartículas que comprenden un agente biológicamente activo se suspenden en una solución farmacéuticamente aceptable y se administran mediante jeringa al ojo.

De acuerdo con otra realización, las micropartículas que comprenden un agente biológicamente activo se suspenden en una solución que comprende el agente biológicamente activo y se administran por jeringa al ojo. La utilización del

tiempo de residencia vítreo del agente biológicamente activo como una ventana de liberación de polímero permite que los metabolitos poliméricos se eliminen mientras se mantiene un nivel terapéuticamente relevante dentro del ojo.

- 5 La presente invención tiene varias ventajas. En particular, las micropartículas de la presente invención son fácilmente suspendibles e inyectables, mientras que son capaces de proporcionar una duración incrementada, una estabilidad incrementada, una ráfaga disminuida y una liberación controlada, sostenida o retardada de moléculas biológicamente activas *in vivo*.

Breve descripción de los dibujos

- La figura 1 es una micrografía electrónica de barrido que muestra la morfología externa de una muestra de microesferas de la presente invención.
- 10 La figura 2 es una micrografía electrónica de barrido de microesferas de pegaptanib-PLGA en sección transversal de la presente invención que tiene una liberación de ráfaga baja.
- La figura 3 es una micrografía electrónica de barrido que muestra la morfología externa de una muestra de microesferas de la presente invención formada por un proceso de agua en aceite en agua.
- 15 La figura 4 es una representación esquemática que ilustra un proceso de ejemplo de aceite en agua para formar micropartículas de la presente invención.
- La figura 5 es una representación esquemática que ilustra un proceso de ejemplo de agua en aceite en agua para formar micropartículas de la presente invención.
- La figura 6 es una representación esquemática que ilustra un aparato de lecho compactado de ejemplo con diversos componentes de acuerdo con una realización de la presente invención.
- 20 La figura 7 es un gráfico que representa la distribución del tamaño de partícula de micropartículas típicas antes del tamizado.
- La figura 8 muestra un cromatograma RP-HPLC utilizado para medir la carga del núcleo y la pureza del pegaptanib extraído de microesferas.
- 25 La figura 9 es un gráfico que representa los perfiles de liberación de diversas micropartículas de pegaptanib-PLGA formadas por un proceso de aceite en agua. La fecha de disolución *in vitro* demostrando la cinética de liberación de control a partir de microesferas de pegaptanib-PLGA.
- La figura 10 es un gráfico que representa los perfiles de liberación de diversas micropartículas de pegaptanib-PLGA formadas por un proceso de agua en aceite en agua. La velocidad de disolución *in vitro* que demuestra la cinética de liberación de control a partir de microesferas de pegaptanib-PLGA.
- 30 La figura 11 es un gráfico que representa los resultados de ensayos de proliferación celular de células endoteliales de venas umbilicales humanas (HUVEC) incubadas con formulaciones EYE001 después de la liberación de micropartículas de PLGA.
- La figura 12 es un gráfico que representa los resultados de un estudio de liberación *in vivo* de 28 días. El gráfico muestra la concentración de pegaptanib en muestras de plasma de conejos administradas intravítreas con 5 mg de micropartículas de PLGA que contienen 15% en peso de pegaptanib.
- 35 La figura 13 es un gráfico que representa el perfil de liberación *in vitro* de microesferas de pegaptanib PLGA suspendidas en un vehículo de inyección de PBS que contiene 0.02% de surfactante a una concentración de 100 mg de microesferas por mililitro durante un estudio de 86 días.
- La figura 14 es un gráfico que representa los resultados del estudio de liberación *in vivo* de 86 días en conejos dosificados por vía intravítrea con 5 mg de micropartículas de PLGA que contienen 15% en peso de pegaptanib.
- 40 La figura 15 es un gráfico que representa los resultados del estudio de liberación *in vivo* de 86 días en conejos dosificados por vía intravítrea con 5 mg de micropartículas de PLGA que contienen 15% en peso de pegaptanib en comparación con pegaptanib líquido.
- 45 La figura 16 es un gráfico que representa el perfil de liberación *in vitro* de microesferas de PLGA pegaptanib suspendidas en un vehículo de inyección de PBS que contiene 0.02% de surfactante a una concentración de 100 mg de microesferas por mililitro durante un estudio de 8 meses.

La figura 17 es un gráfico que representa los resultados del estudio de liberación *in vivo* de 8 meses en conejos dosificados por vía intravítrea con 5 mg de micropartículas de PLGA que contienen 15% en peso de pegaptanib.

Descripción detallada de la invención

- 5 La presente invención proporciona composiciones y métodos para la administración sostenida de un agente biológicamente activo. En un aspecto, la presente invención proporciona composiciones y métodos para la administración sostenida ocular de un agente biológicamente activo. De acuerdo con este aspecto, se proporcionan formulaciones de microsferas inyectables para administrar un agente biológicamente activo con una jeringa a través de una aguja de calibre 27 o menor con el fin de proporcionar niveles oculares sostenidos del agente biológicamente activo.
- 10 Las micropartículas pueden variar en tamaño, que varían de diámetros submicrónicos a milimétricos. Para aplicaciones oftálmicas, los diámetros de las micropartículas oscilan entre aproximadamente 1 micrómetro (μm) y aproximadamente 200 μm . En otra realización, las micropartículas tienen una distribución de tamaño de partícula que varía de aproximadamente 1 μm a aproximadamente 100 μm de diámetro. En otra realización, las micropartículas tienen una distribución de tamaño de partícula que varía de aproximadamente 10 μm a
- 15 aproximadamente 50 μm de diámetro.
- En otra realización, las micropartículas tienen un diámetro medio de menos de aproximadamente 45 μm . En otra realización, las micropartículas tienen un diámetro medio de aproximadamente 30 μm . En otra realización, las micropartículas tienen un diámetro medio de aproximadamente 15 μm .
- 20 En una realización, las micropartículas son de un tamaño y morfología apropiadas que permiten el suministro a través de una aguja que tiene un diámetro interior pequeño tal como una aguja estrecha de calibre (pequeño). En una realización particular, las micropartículas son de un tamaño y morfología apropiadas que permiten el suministro a través de una aguja apropiada para la administración oftálmica. Las micropartículas se denominan en este documento como "inyectables" si son capaces de ser suministradas a través de una aguja. En una realización, las micropartículas son inyectables a través de una aguja médicamente aceptable. En otra realización, las micropartículas son inyectables a través de una aguja apropiada para la administración oftálmica. El ejemplo 7 proporciona métodos para analizar la suspensibilidad y la capacidad de inyección.
- 25 En una realización particular particularmente apropiada para aplicaciones oftálmicas, las micropartículas son inyectables a través de una aguja que tiene un calibre de al menos 27 que tiene un diámetro interno nominal de 0.0075 pulgadas o menos. En otra realización particular, las micropartículas son inyectables a través de una aguja que tiene un calibre de al menos 29 que tiene un diámetro interior nominal de 0.0065 pulgadas o menos. En otra realización particular, las micropartículas son inyectables a través de una aguja que tiene un calibre de al menos 30 que tiene un diámetro interno nominal de 0.0055 pulgadas o menos.
- 30 En una realización, las micropartículas tienen un diámetro medio inferior o igual a aproximadamente el 75% del diámetro interior de la aguja utilizada para la inyección. En otra realización, las micropartículas tienen un diámetro medio inferior o igual a aproximadamente el 50% del diámetro interior de la aguja utilizada para la inyección. En otra realización, las micropartículas tienen un diámetro medio inferior o igual a aproximadamente el 25% del diámetro interior de la aguja utilizada para la inyección. En otra realización, las micropartículas tienen un diámetro medio inferior o igual a aproximadamente el 10% del diámetro interior de la aguja utilizada para la inyección.
- 35 En una realización, las micropartículas forman polvos de flujo libre y/o no aglomerados. Los polvos que fluyen libremente y/o no aglomerados son ventajosos porque ruedan sustancialmente sin fricción y pueden colocarse fácilmente en recipientes, suspendidos o incorporados en una solución apropiada para inyección. La capacidad de flujo de micropartículas se puede medir por cualquier medio apropiado tal como un Jenike Shear Tester (Jenike & Johanson, Inc., Westford, MA), que mide la resistencia al cizallamiento directo de polvos y otros materiales sólidos a granel. Utilizando un Jenike Shear Tester, una celda de cizallamiento (base y anillo) se llena de material; se aplica una carga vertical a la celda cubierta, utilizando pesos y el portador de peso; y el anillo de la celda de cizallamiento es empujado horizontalmente a través de la base, con la fuerza requerida medida y registrada. Otros aparatos para medir la fluidez incluyen un reómetro en polvo (Freeman Technology, Worcestershire, UK) que mide la fuerza de una cuchilla retorcida a lo largo de una trayectoria helicoidal a través de una muestra de polvo que establece un caudal y un patrón de flujo requeridos. También se puede medir un orificio crítico y un ángulo de reposo utilizando un proceso de avalancha.
- 40
- 45
- 50
- En la figura 7 se muestra un gráfico que representa la distribución del tamaño de partícula de micropartículas típicas antes del tamizado.
- Las micropartículas de la presente invención tienen una carga de núcleo suficiente para suministrar el agente biológicamente activo para mantener niveles terapéuticamente eficaces del agente biológicamente activo durante
- 55 períodos sostenidos. En una realización, las micropartículas tienen una carga de núcleo superior o igual a

- aproximadamente 5% en peso del agente biológicamente activo. En una realización, las micropartículas tienen una carga de núcleo superior o igual a aproximadamente 10% en peso del agente biológicamente activo. En una realización, las micropartículas tienen una carga de núcleo superior o igual a aproximadamente 15% en peso del agente biológicamente activo. En otra realización, las micropartículas tienen una carga de núcleo superior o igual a aproximadamente 20% en peso del agente biológicamente activo. En otra realización, las micropartículas tienen una carga de núcleo superior o igual a aproximadamente 30% en peso del agente biológicamente activo.
- En una realización, las micropartículas que comprenden pegaptanib tienen una carga de núcleo superior o igual a aproximadamente 10% en peso de pegaptanib (2% en peso sobre una base de aptámero). En una realización, las micropartículas tienen una carga de núcleo superior o igual a aproximadamente 15% en peso de pegaptanib (aproximadamente 3% en peso sobre una base de aptámero).
- Las micropartículas de la presente invención presentan una ráfaga inicial baja. En una realización, las micropartículas presentan una ráfaga *in vitro* inicial de 24 horas inferior o igual a aproximadamente 10% en peso de la carga de núcleo inicial del agente biológicamente activo. En una realización, las micropartículas presentan una ráfaga *in vitro* inicial de 24 horas inferior o igual a aproximadamente 5% en peso de la carga de núcleo inicial del agente biológicamente activo.
- Las micropartículas de la presente invención proporcionan una liberación sostenida de un agente biológicamente activo. En una realización, las micropartículas tienen un perfil de liberación sostenida *in vivo* de al menos 28 días (4 semanas/1 mes). En otra realización, las micropartículas tienen un perfil de liberación sostenida *in vivo* de al menos aproximadamente 20, 40, 60 (2 meses), 90 (3 meses), 180 días (6 meses) o 365 días (12 meses).
- En una realización, las micropartículas encapsulan pegaptanib como el agente biológicamente activo y están adaptadas para liberar pegaptanib a una velocidad que varía de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 10 microgramos (μg) por día. En otra realización, las micropartículas encapsulan pegaptanib como el agente biológicamente activo y están adaptadas para liberar pegaptanib a una velocidad que varía de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 6 μg por día. En una realización particular, las micropartículas de pegaptanib liberan pegaptanib a una velocidad de aproximadamente 0.025 μg , 0.25 μg , 0.5 μg , 0.75 μg , 1 μg , o 2 μg por día.
- Las micropartículas de la presente invención tienen un elevado rendimiento de encapsulación. En una realización, las micropartículas tienen un rendimiento de encapsulación superior o igual a aproximadamente 80%. En otra realización, las micropartículas tienen un rendimiento de encapsulación superior o igual a aproximadamente 90%. En otra realización, las micropartículas tienen un rendimiento de encapsulación superior o igual a aproximadamente 95%. En otra realización, las micropartículas tienen un rendimiento de encapsulación de aproximadamente el 100%.
- Las micropartículas de la presente invención tienen cualquier morfología apropiada. En una realización, las micropartículas son sólidas. En otra realización, las micropartículas son lisas o no picadas. En otra realización, las micropartículas son homogéneas o monolíticas. En otra realización, las micropartículas tienen una morfología que permite una alta carga de núcleo, un elevado rendimiento de encapsulación, una ráfaga baja, una liberación sostenida y una capacidad de inyección.
- Las figuras 1 y 2 muestran imágenes de ejemplos de micropartículas de la presente invención. Exámenes morfológicos externos de las micropartículas en la figura 1 indican que las micropartículas son lisas y no picadas. El examen morfológico interno de las micropartículas en la figura 2 indica que las micropartículas tienen un interior monolítico. Las micropartículas monolíticas proporcionan una cinética de liberación constante.
- El ejemplo 7 describe un ensayo experimental para el análisis de la liberación *in vitro* de formulaciones de micropartículas de la presente invención formadas por el proceso como se describe en los ejemplos 1 y 2. Los resultados del análisis de la liberación *in vitro* se representan en las figuras 9, 10, 13 y 16. Los resultados mostrados en las figuras demuestran las propiedades de liberación sostenidas de las micropartículas de la presente invención. Los resultados mostrados en las figuras también muestran que las micropartículas de la presente pueden ser diseñadas selectivamente para controlar la liberación de un agente biológicamente activo durante un período de tiempo deseado.
- En otro aspecto, la presente invención ofrece métodos para administrar formulaciones de micropartículas de liberación sostenida para obtener un perfil farmacocinético deseado. De acuerdo con una realización, las micropartículas que comprenden un agente biológicamente activo se suspenden en una solución farmacéuticamente aceptable y se administran mediante jeringa al ojo.
- En otro aspecto, la presente invención proporciona la liberación controlada de un agente biológicamente activo de acuerdo con un perfil farmacocinético deseado. Las micropartículas de la presente invención pueden ser suspendidas en una solución que contiene una cantidad adicional del mismo agente biológicamente activo o un segundo agente biológicamente activo. Esta solución que contiene el agente biológicamente activo disuelto puede proporcionar un bolo deseado del agente para conseguir un nivel terapéuticamente eficaz, que se mantiene posteriormente durante un período prolongado por las micropartículas de liberación sostenida

- De acuerdo con una realización, las micropartículas que comprenden un agente biológicamente activo se suspenden en una solución que comprende el agente biológicamente activo y se administran por jeringuilla al ojo. En una realización, las micropartículas son micropartículas de liberación sostenida. En otra realización, las micropartículas son micropartículas de liberación retardada. La utilización del tiempo de residencia vítreo del agente biológicamente activo como ventana de liberación del polímero permite que los metabolitos poliméricos se eliminen mientras se mantiene un nivel terapéuticamente relevante dentro del ojo. La utilización del tiempo de residencia vítreo del agente biológicamente activo como una ventana de liberación del polímero también se permite un bolo múltiple escalonado de un agente biológicamente activo utilizando una sola administración. Dicho régimen de dosificación puede ser útil para los agentes biológicamente activos microencapsulados que tienen algún tiempo de residencia en el vítreo.
- 5 Ejemplos de formulaciones oculares que comprenden una suspensión de una partícula que incluye un fármaco oftálmico y un portador líquido que contiene al menos el mismo fármaco oftálmico se describen en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,882,150 y 4,865,846, los contenidos de cada una se incorporan en este documento como referencia en su totalidad.
- 10 En una realización, el régimen comprende la etapa de administración de una formulación farmacéutica que comprende un primer bolo de un primer agente biológicamente activo y una formulación de micropartículas de liberación retardada que encapsula un segundo bolo del primer agente biológicamente activo.
- 15 En una realización particular, el régimen comprende la etapa de administración de aproximadamente 100 μ L de una formulación farmacéutica que comprende un bolo de aproximadamente 0.3 mg de pegaptanib libre en solución y micropartículas de PLGA de liberación retardada que envuelve aproximadamente 35 mg de pegaptanib. Las micropartículas tienen una ráfaga inicial de aproximadamente 5-30% de pegaptanib y luego se liberan a una velocidad constante durante aproximadamente un período de tiempo de 1 mes. Al final del perfil de liberación de micropartículas, se produce una segunda ráfaga y un segundo bolo de pegaptanib que lleva la concentración de aproximadamente 0.3 mg. En otra realización particular, el régimen comprende además la etapa de administración de una segunda formulación farmacéutica que comprende pegaptanib en un momento de cuatro semanas después de la segunda ráfaga, tiempo durante el cual se eliminan los metabolitos poliméricos. En esta realización, la administración gana esencialmente un mes adicional de eficacia.
- 20 Una ventaja de dicho régimen incluye la reducción de inyecciones intravítreas múltiples de agentes biológicamente activos encapsulados en polímero. Otra ventaja incluye limitar cualquier posible riesgo de que las vías de liberación del ojo se vean obstaculizadas por una acumulación de productos de descomposición poliméricos que produzcan efectos perjudiciales sobre la función ocular.
- 25 Las micropartículas de la presente invención se pueden utilizar para cualquier propósito. En una realización particular, se administran a un paciente. Se pueden administrar a los pacientes en una dosis única o múltiple. Las micropartículas también se pueden administrar en una forma de dosis única que funciona para liberar un agente biológicamente activo durante un período prolongado de tiempo, eliminando la necesidad de múltiples administraciones.
- 30 En un aspecto, la invención proporciona un método para tratar o inhibir una patología ocular en un mamífero que lo necesite utilizando cualquiera de las composiciones de microesferas descritas en este documento. El método incluye administrar las micropartículas a un mamífero en cantidades suficientes para tratar o inhibir la enfermedad. En una realización, con el fin de tratar un trastorno ocular, las micropartículas se inyectan en el vítreo del ojo (inyección intravítrea). En otra realización, con el fin de tratar un trastorno ocular, las micropartículas están dispuestas sobre la superficie exterior de la esclerótica (inyección subconjuntival). En dicho sistema, una vez que el agente biológicamente activo se libera de la micropartícula, el agente biológicamente activo atraviesa la esclerótica para ejercer su efecto, por ejemplo, reducir o inhibir la actividad de un receptor de VEGF, dentro del ojo.
- 35 Las micropartículas se pueden utilizar para tratar una variedad de trastornos oculares que incluyen, por ejemplo, neovascularización del disco óptico, neovascularización del iris, neovascularización retinal, neovascularización coroidea, neovascularización corneal, neovascularización vítrea, glaucoma, catarata, pterigión, edema macular, retinopatía vascular, degeneración retiniana, uveítis, enfermedades inflamatorias de la retina y vitreoretinopatía proliferativa. La neovascularización corneal a ser tratada o inhibida puede ser causada por traumatismos, quemaduras químicas y trasplante de córnea. La neovascularización del iris que se va a tratar o inhibir puede estar asociada con retinopatía diabética, oclusión de vena, tumor ocular y desprendimiento de retina. La neovascularización retiniana que se va a tratar o inhibir puede estar asociada con retinopatía diabética, oclusión de vena, retinopatía de células falciformes, retinopatía de prematuridad, desprendimiento de retina, isquemia ocular y trauma. La neovascularización intravítrea que se va a tratar o inhibir puede estar asociada con retinopatía diabética, oclusión de vena, retinopatía de células falciformes, retinopatía de prematuridad, desprendimiento de retina, isquemia ocular y trauma. La neovascularización coroidea que se va a tratar o inhibir puede estar asociada con trastornos retinales o subretinianos, tales como degeneración macular relacionada con la edad, síndrome de histoplasmosis ocular presumida, degeneración miópica, estrías angioides y trauma ocular.
- 40
- 45
- 50
- 55

Las soluciones oftálmicas son soluciones estériles, esencialmente libres de partículas extrañas, convenientemente compuestas y envasadas para instilación o inyección en el ojo. La preparación de una solución oftálmica requiere una cuidadosa consideración de factores tales como la toxicidad inherente del propio fármaco, el valor de isotonicidad, la necesidad de agentes reguladores, la necesidad de un conservante (y, si es necesario, su selección), la esterilización y el envasado apropiado.

Aunque se ha hecho referencia específica al uso de las formulaciones de la presente invención para administrar agente biológicamente activo en el ojo, se debe entender que la presente invención se puede utilizar para administrar un agente biológicamente activo a cualquier sitio deseado, incluyendo, pero sin limitarse a, intraorbital, intraocular, intraaural, intratimpánico, intratecal, intracavitaria, peritumoral, intratumoral, intraespinal, epidural, intracraneal e intracardial. Aunque se hace referencia al ojo, las formulaciones de la presente invención se pueden administrar por vía intravítrea o periocular (por vía retrobulbar, subtenoniana, subconjuntival).

De acuerdo con una realización, las formulaciones de microesferas de la presente invención son apropiadas para la aplicación local para el tratamiento de diversos cánceres. De acuerdo con esta realización, las formulaciones de microesferas se inyectan localmente en el sitio del tumor o postoperatoriamente en el sitio del tumor después de la resección del tumor. De acuerdo con esta realización, se proporcionan formulaciones de microesferas y métodos de uso relacionados para tratar diversos cánceres difíciles de tratar tales como glioblastoma multiforme, cáncer de ovario y cáncer de cabeza o cuello, por ejemplo.

Una formulación de la invención se puede utilizar en el tratamiento de cualquier enfermedad ocular. También se puede utilizar una formulación de la invención para dirigir un agente biológicamente activo a un tejido ocular particular, por ejemplo, la retina o la coroides. El agente biológicamente activo o la combinación de agentes se escogerán basándose en la enfermedad, trastorno o afección que se está tratando. Además de un agente biológicamente activo para una condición particular, se pueden incluir otros compuestos para efectos secundarios, por ejemplo, un antibiótico para prevenir el crecimiento microbiano. La cantidad y frecuencia de la dosificación dependerá de la enfermedad, trastorno o afección que se esté tratando y del agente biológicamente activo empleado. Un experto en la técnica puede realizar esta determinación.

Por "tratamiento" se entiende el tratamiento médico de un paciente con la intención de que se produzca una curación, mejoría, estasis o prevención de una enfermedad, patología o trastorno. Este término incluye el tratamiento activo, es decir, el tratamiento dirigido específicamente hacia el mejoramiento de una enfermedad, patología o trastorno, e incluye también el tratamiento causal, es decir, el tratamiento dirigido a la eliminación de la causa de la enfermedad, patología o trastorno. Además, este término incluye el tratamiento paliativo, es decir, el tratamiento diseñado para el alivio de los síntomas más que el curado de la enfermedad, patología o trastorno; tratamiento preventivo, es decir, tratamiento dirigido a la prevención de la enfermedad, patología o trastorno; y tratamiento de apoyo, es decir, tratamiento empleado para complementar otra terapia específica dirigida hacia la mejora de la enfermedad, patología o trastorno. El término "tratar" también incluye tratamiento sintomático, es decir, tratamiento dirigido hacia síntomas constitucionales de la enfermedad, patología o trastorno.

En una realización, el método de la invención proporciona un medio para suprimir o tratar un trastorno neovascular ocular. En algunas realizaciones, los trastornos neovasculares oculares susceptibles de tratamiento o supresión mediante el método de la invención incluyen la retinopatía isquémica, la neovascularización del iris, la neovascularización intraocular, la degeneración macular relacionada con la edad, la neovascularización corneal, la neovascularización retinal, la neovascularización coroidea, la retinopatía de la prematuridad, la oclusión de la vena retiniana, la isquemia retiniana diabética, el edema macular diabético o la retinopatía diabética proliferativa. En una otra realización, el método de la invención proporciona un medio para suprimir o tratar la psoriasis o la artritis reumatoide en un paciente que lo necesite o un paciente diagnosticado con o en riesgo de desarrollar dicho trastorno.

Como se utiliza en este documento, los términos "neovascularización" y "angiogénesis" se utilizan indistintamente. La neovascularización y la angiogénesis se refieren a la generación de nuevos vasos sanguíneos en células, tejidos u órganos. El control de la angiogénesis por lo general se altera en ciertas patologías y, en muchos casos, el daño patológico asociado con la enfermedad está relacionado con la angiogénesis alterada, no regulada o no controlada. La angiogénesis persistente y no regulada se produce en una multiplicidad de patologías, incluyendo aquellos caracterizados por el crecimiento anormal de las células endoteliales, y apoya el daño patológico visto en estas condiciones, incluyendo la filtración y permeabilidad de los vasos sanguíneos.

Por "trastorno neovascular ocular" se entiende un trastorno caracterizado por angiogénesis alterada o no regulada en el ojo de un paciente. Los trastornos neovasculares oculares de ejemplo incluyen neovascularización del disco óptico, neovascularización del iris, neovascularización retinal, neovascularización coroidea, neovascularización corneal, neovascularización vítrea, glaucoma, catarata, pterigión, edema macular, retinopatía diabética, edema macular diabético, retinopatía vascular, degeneración de la retina, uveítis, enfermedades inflamatorias de la retina, y vitreoretinopatía proliferativa.

Además del tratamiento de trastornos neovasculares preexistentes, la terapia que incluye un agente biológicamente activo se puede administrar profilácticamente con el fin de prevenir o retardar el inicio de estos trastornos. En aplicaciones profilácticas, el agente biológicamente activo se administra a un paciente susceptible o de otra manera en riesgo de un trastorno neovascular particular. El momento preciso de la administración y las cantidades que se administran dependen de diversos factores, tales como el estado de salud del paciente, su peso, etc.

Un "agente biológicamente activo", "unidad estructural biológicamente activa" o "molécula biológicamente activa" puede ser cualquier sustancia que puede afectar cualquier propiedad física o bioquímica de un organismo biológico, incluyendo, pero no limitado a, virus, bacterias, hongos, plantas, animales y seres humanos. Las moléculas biológicamente activas pueden incluir cualquier sustancia destinada al diagnóstico, curación, mitigación, tratamiento o prevención de enfermedades en seres humanos u otros animales, o para mejorar de otro modo el bienestar físico o mental de seres humanos o animales.

Ejemplos de agentes biológicamente activos incluyen, pero no se limitan a, ácidos nucleicos, nucleósidos, oligonucleótidos, oligonucleótidos antisentido, ARN, ADN, ARNsi, ARNi, aptámeros, anticuerpos, péptidos, proteínas, enzimas, proteínas de fusión, porfirinas, y moléculas pequeñas. Otros agentes biológicamente activos incluyen, pero no se limitan a, colorantes, lípidos, células, virus, liposomas, micropartículas y micelas. Los ejemplos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos anti-VEGF bevacizumab (Avastin™) y ranizumab (Lucentis™). Ejemplos de aptámeros incluyen, pero no se limitan a, pegaptanib (Macugen®). Ejemplos de porfirinas incluyen, pero no se limitan a, verteporfina (Visudine®). Ejemplos de esteroides incluyen, pero no se limitan a, acetato de anecortave (Retaane®). Ejemplos de proteínas de fusión incluyen, pero no se limitan a, VEGF Trap™ (Regeneron Pharmaceuticals, Inc. Tarrytown, NY). Ejemplos de ARNi incluyen, pero no se limitan a, Direct ARNi™ (Alnylam Pharmaceuticals, Cambridge, MA).

Las clases de agentes biológicamente activos que son apropiados para uso con la invención incluyen, pero no se limitan a, antibióticos, fungicidas, agentes antivirales, agentes antiinfecciosos, agentes antiinflamatorios, agentes antitumorales, agentes antitubulínicos, agentes cardiovasculares, agentes anti ansiedad, hormonas, factores de crecimiento, agentes esteroideos y similares.

El término "agente anti-VEGF" se refiere a cualquier agente biológicamente activo, donde el principal modo de acción consiste en (a) deteriorar la unión de cualquier isoforma VEGF con su receptor, o (b) bloquear la señalización de receptores R1 y R2.

Se entenderá que las sales farmacéuticamente aceptables de la molécula biológicamente activa descrita en este documento también se incluyen en la presente invención y se pueden utilizar en las composiciones y métodos descritos en este documento.

El término "oligonucleótido" se refiere a un oligómero o polímero de monómeros de nucleótidos o nucleósidos que consisten en bases naturales, azúcares y enlaces entre azúcares (esqueleto). El término incluye también oligómeros modificados o sustituidos que comprenden monómeros no naturales o porciones de los mismos, que funcionan de manera similar. La incorporación de oligómeros sustituidos se basa en factores que incluyen una absorción celular mejorada, o una mayor resistencia a la nucleasa y se eligen como se conoce en la técnica. El oligonucleótido entero o sólo partes de los mismos pueden contener los oligómeros sustituidos.

Como se utiliza en este documento, el término "aptámero" significa cualquier polinucleótido, o sal del mismo, que tiene afinidad de unión selectiva para una molécula no polinucleótido a través de interacciones físicas no covalentes. Un aptámero puede ser un polinucleótido que se une a un ligando de una manera análoga a la unión de un anticuerpo con su epítipo. La molécula diana puede ser cualquier molécula de interés. Un ejemplo de una molécula no polinucleotídica es una proteína. Se puede utilizar un aptámero para unirse a un dominio de unión al ligando de una proteína, evitando de ese modo la interacción del ligando de origen natural con la proteína.

Se entiende que "aptámeros anti-VEGF" o "aptámeros VEGF" abarcan los aptámeros polinucleotídicos que se unen e inhiben la actividad del VEGF. Tales aptámeros anti-VEGF pueden ser aptámeros de ARN, aptámeros de ADN o aptámeros que tienen una composición mixta (esto es, tanto ARN como ADN). Tales aptámeros se pueden identificar utilizando métodos conocidos. Por ejemplo, se pueden utilizar los métodos de Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial, o SELEX, como se describe en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,475,096 y 5,270,163, cada una de las cuales se incorpora en este documento como referencia en su totalidad. Los aptámeros anti-VEGF incluyen las secuencias descritas en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,168,778, 6,051,698, 5,859,228, y 6,426,335, cada una de las cuales se incorpora en este documento como referencia en su totalidad. Las secuencias se pueden modificar para incluir caperuzas invertidas 5'-5' y/o 3'-3'. (Véase Adams, A.P. et al., Solicitud publicada No. WO 2005/014814, que se incorpora en este documento como referencia en su totalidad).

Para aplicaciones de administración de fármacos oftálmicos, los patologías de ejemplo incluyen degeneración macular (seca y húmeda), retinopatía diabética, glaucoma, neovascularización del disco óptico, neovascularización del iris, neovascularización retinal, neovascularización coroidea, catarata, pterigión, edema macular, retinopatía vascular, oclusión venosa de la retina, histoplasmosis, enfermedad isquémica de la retina, degeneración retiniana,

uveítis, enfermedades inflamatorias de la retina, queratitis, retinitis por citomegalovirus, una infección, conjuntivitis, edema macular cistoide, cáncer y vitreorretinopatía proliferativa.

5 Las clases de agentes biológicamente activos incluyen antiinfecciosos que incluyen, sin limitación, antibióticos, antivirales y antifúngicos; analgésicos; agentes antialérgicos; estabilizadores de mastocitos; agentes antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos; descongestionantes; agentes antiglaucoma incluyendo, sin limitación, adrenérgicos, agentes bloqueadores beta-adrenérgicos, agonistas bloqueadores alfa-adrenérgicos, agentes parasimpatomiméticos, inhibidores de la colinesterasa, inhibidores de la anhidrasa carbónica y prostaglandinas; antioxidantes; suplementos nutricionales; inhibidores de la angiogénesis; antimetabolitos; fibrinolíticos; agentes moduladores de heridas; fármacos neuroprotectores; esteroides angiostáticos; midriáticos; midriáticos ciclopélicos; 10 mióticos; vasoconstrictores; vasodilatadores; agentes anticlotantes; agentes anticancerosos; agentes inmunomoduladores; antagonistas de VEGF; agentes inmunosupresores; y combinaciones y profármacos de los mismos.

15 El agente biológicamente activo se puede conjugar con polímeros de cadena larga no tóxicos tales como poli (etilenglicol) (PEG). Tales polímeros pueden aumentar la vida útil de la circulación sanguínea, mejorar la eficacia y seguridad, y aumentar la estabilidad. Los estudios de unión competitiva de aptámeros que utilizan esta estrategia revelaron que la unidad de PEG ayuda activamente en la potencia inhibidora de Macugen, específicamente con su capacidad para prevenir la unión de VEGF al receptor Flt-1. (Publicación de la Solicitud de la Patente de los Estados Unidos No. US 2005/0260651, que se incorpora en este documento como referencia en su totalidad) Aunque la relevancia clínica es incierta, evidencia fuerte indica que la inhibición de la unión de Flt-1 es un contribuyente 20 principal a las propiedades antiinflamatorias de Macugen (Usui, T. y et al (2004) "VEGF164 (165) as the Pathological Isoform: Differential Leukocyte and Endothelial Responses through VEGFR1 and VEGFR2." I.O.V.S. 45(2), 368).

Los agentes biológicamente activos específicos incluyen MACUGEN® (inyección de pegaptanib de sodio) como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 6,051,698, incorporada en este documento en su totalidad como referencia. El pegaptanib también se conoce como EYE001 (anteriormente denominado NX1838).

25 El pegaptanib es un conjugado covalente de un oligonucleótido de veintiocho nucleótidos de longitud que termina en un enlazador pentilamino, al que dos unidades de monometoxipolietilenglicol (PEG) de 20 kilodaltons (kDa) están unidas covalentemente a través de los dos grupos amino en un residuo de lisina. El pegaptanib se proporciona opcionalmente en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. En una realización, el pegaptanib se proporciona como pegaptanib de sodio. La fórmula molecular del pegaptanib de sodio es $C_{294}H_{342}F_{13}N_{107}Na_{28}O_{188}P_{28}(C_2H_4O)_n$ 30 (donde n es aproximadamente 900) y el peso molecular es aproximadamente 50 kDa.

El nombre químico del pegaptanib de sodio es el siguiente: ARN, ((2'-desoxi-2'-fluoro)C-G_m-G_m-AA-(2'-desoxi-2'-fluoro)U-(2'-desoxi-2'-fluoro)C-A_m-G_m-(2'-desoxi-2'-fluoro)U-G_mA_mA_m(2'-desoxi-2'-fluoro)U-G_m-(2'-desoxi-2'-fluoro)C-(2'-desoxi-2'-fluoro)U-(2'-desoxi-2'-fluoro)U-A_m-(2'-desoxi-2'-fluoro)U-A_m-(2'-desoxi-2'-fluoro)C-A_m(2'-desoxi-2'-fluoro)U-(2'-desoxi-2'-fluoro)C-(2'-desoxi-2'-fluoro)C-G_m(3'→3')-dT), 5'-éster con α, α'-[4,12-dioxo-6-[[[5-(fosfooxi-oxi) 35 pentil]amino]carbonil]-3,13-dioxa-5,11-diaza-1,15-pentadecanedil]bis[ω-metoxipoli(oxi-1,2-etanodil)], sal de sodio.

Los niveles de dosificación de pegaptanib de sodio del orden de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg de peso corporal por administración son útiles en el tratamiento de trastornos neovasculares. Ejemplos de formulaciones se encuentran en WO 03/039404, que se incorpora en este documento como referencia en su totalidad. En algunas realizaciones, el pegaptanib de sodio se administra a una dosis de aproximadamente 0.1 mg a aproximadamente 1.0 40 mg localmente en el ojo, en donde el tratamiento es eficaz para tratar formas ocultas, mínimamente clásicas y predominantemente clásicas de degeneración macular húmeda. Cuando se administra directamente al ojo, el intervalo de dosificación es de aproximadamente 0.3 mg a aproximadamente 3 mg por ojo, en algunas realizaciones el intervalo de dosificación es de aproximadamente 0.1 mg a aproximadamente 1.0 mg por ojo. En una realización, el pegaptanib de sodio se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz de aproximadamente 0.1-3.0 mg, 0.1-1.0 mg, o aproximadamente 0.3 mg. En una realización, el pegaptanib de sodio está presente en una formulación en solución de inyección oftálmica a una concentración que varía de 0.1 a 3.0 mg/mL. De acuerdo con una realización, el portador comprende fosfato de sodio y cloruro de sodio. De acuerdo con una realización específica, el portador comprende fosfato de sodio 10 mM y cloruro de sodio al 0.9%.

De acuerdo con una realización, la dosis es eficaz para conseguir una concentración vítrea del aptámero anti-VEGF de aproximadamente 10-30 ng/mL. De acuerdo con otra realización, la dosis es eficaz para mantener una concentración vítrea del aptámero anti-VEGF de aproximadamente 10-30 ng/mL durante todo el período de administración.

En realizaciones alternativas, el agente anti-VEGF es un aptámero anti-VEGF y se administra a una dosis de menos de 0.3 mg a aproximadamente 0.003 mg localmente en el ojo. En algunas realizaciones, el aptámero anti-VEGF se administra a una dosis menor que aproximadamente 0.30 mg. Ejemplos de tales formulaciones se encuentran en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Serie No. 60/692,727; que se incorpora en este documento como referencia en su totalidad.

Como se utiliza en este documento, las "micropartículas" se refieren a partículas que tienen un diámetro por lo general menor de 1.0 mm, y más normalmente entre 1.0 y 250 micras.

5 Las micropartículas de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, microesferas, microcápsulas, microesponjas, microgránulos y partículas en general, con una estructura interna que comprende una matriz de agente y excipiente.

Las micropartículas también pueden incluir nanopartículas.

Las microesferas son por lo general micropartículas esféricas sólidas.

Las microcápsulas son por lo general micropartículas esféricas que por lo general tienen un núcleo de un polímero, fármaco o composición diferente.

10 Como se utiliza en este documento, el término "nanopartículas" se refiere a partículas que tienen un diámetro por lo general entre aproximadamente 20 nanómetros (nm) y aproximadamente 2.0 micras (μm), por lo general entre aproximadamente 100 nm y aproximadamente 1.0 μm .

Una "inyección" es una preparación destinada a la administración parenteral. Las inyecciones incluyen, pero no se limitan a, preparaciones líquidas que son sustancias farmacéuticas o soluciones o suspensiones de las mismas.

15 El término gramaticalmente correcto y preferido "intravítreo" se utiliza en este documento y en la técnica. El término "intravítrea" se utiliza coloquialmente como una alternativa al término "intravítreo" para inyecciones en el humor vítreo del ojo entre la lente y la retina.

20 El término "liberación controlada" se refiere al control de la velocidad y/o cantidad de moléculas biológicamente activas suministradas de acuerdo con las formulaciones de suministro de fármacos de la invención. La cinética de liberación controlada puede ser continua, discontinua, variable, lineal o no lineal. Esto se puede lograr utilizando uno o más tipos de composiciones poliméricas, cargas de fármacos, inclusión de excipientes o potenciadores de degradación, u otros modificadores, administrados solos, en combinación o secuencialmente para producir el efecto deseado. Las micropartículas de "liberación controlada" incluyen, pero no se limitan a, micropartículas de "liberación sostenida" y micropartículas de "liberación retardada".

25 El término "liberación sostenida" se refiere a la liberación de un agente biológicamente activo en el cuerpo de manera constante, durante un período de tiempo prolongado. Las formulaciones de liberación sostenida ofrecen la capacidad de proporcionar a un sujeto con un agente biológicamente activo durante un período de tiempo mayor que el conseguido mediante una administración típica en bolo del agente biológicamente activo. Las micropartículas de liberación sostenida pueden reducir ventajosamente la frecuencia de dosificación de un agente biológicamente activo.

30 Por "orden cero" o "liberación lineal" se entiende generalmente que significa que la cantidad de la molécula biológicamente activa liberada con el tiempo permanece relativamente constante en función de la cantidad/unidad de tiempo durante el periodo de tiempo deseado. En general, se entiende que el multifásico significa que la liberación se produce en más de una "ráfaga".

35 El término "aparato de lecho relleno" se refiere a cualquier recipiente que contenga material de relleno capaz de crear una emulsión al contacto con dos fluidos inmiscibles.

40 El término "biodegradable" o "bioerosionable", como se utiliza en este documento, se refiere a polímeros que se disuelven o degradan dentro de un período que es aceptable en la aplicación deseada (habitualmente terapia *in vivo*), por lo general menos de aproximadamente cinco años y más preferiblemente menos de aproximadamente un año, una vez expuesto a una solución fisiológica de pH que varía de aproximadamente 6 a aproximadamente 9 y a una temperatura que varía de aproximadamente 25°C a aproximadamente 38°C.

45 Una variedad de polímeros biodegradables utilizados para formulaciones de liberación controlada son bien conocidos en la técnica. Los polímeros apropiados incluyen, pero no se limitan a, poli(hidroxiácidos), poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico-ácido co-glicólico), policaprolactonas, polianhídridos, policarbonatos, poliamidas, poliésteres, poliorioésteres, polihidroxibutirato, ciertos tipos de proteínas y polímeros de polisacáridos, y mezclas, copolímeros o mezclas de los mismos.

50 Los polímeros biodegradables están opcionalmente recubiertos o sin recubrir. Los polímeros recubiertos incluyen, pero no se limitan a, aquellos que tienen grupos terminales esterificados o amidados. Los polímeros no recubiertos incluyen grupos terminales hidroxilo o carboxilo libres. En otra realización, las micropartículas comprenden poli(ácido láctico-ácido co-glicólico) de ácido libre. En otra realización, las micropartículas comprenden lauril o poli(ácido láctico-ácido co-glicólico) *N*-recubierto.

- Los polímeros preferidos incluyen poli (hidroxiácidos). En una realización, el polímero es poli (ácido láctico-ácido glicólico) ("PLGA") que se degrada por hidrólisis después de la exposición al medio acuoso del cuerpo. El polímero se hidroliza a continuación para producir monómeros de ácido láctico y glicólico, que son subproductos normales del metabolismo celular. La velocidad de desintegración del polímero puede variar de varias semanas a períodos de más de un año, dependiendo de varios factores incluyendo el peso molecular del polímero, la proporción de lactida a monómeros de glicólido en la cadena polimérica y la estereorregularidad de las subunidades de monómero (mezclas de éstercoisómeros L y D interrumpen el rompimiento del polímero que mejora la cristalinidad del polímero). Las micropartículas pueden contener mezclas de dos y más polímeros biodegradables, de diferente peso molecular y/o proporción de monómeros.
- 5 El PLGA puede tener cualquier proporción de monómero apropiada de lactida: glicolida. En una realización, la cantidad de lactida varía entre 40-100%. En otra realización, la cantidad de glicolida varía entre 0-60%. En una realización, el PLGA tiene una proporción de monómero de lactida: glicolida en el intervalo de aproximadamente 40:60 a 100:0. En otra realización, el PLGA tiene una proporción de monómero de lactida: glicolida en el intervalo de aproximadamente 45:55 a 100:0. En una realización particular, el PLGA tiene una proporción de monómero de lactida: glicolida de aproximadamente 50:50. En otra realización particular, el PLGA tiene una proporción de monómero de lactida: glicolida de aproximadamente 65:35. En otra realización particular, el PLGA tiene una proporción de monómero de lactida: glicolida de aproximadamente 75:25. La proporción particular de los polímeros se puede determinar basándose en evaluaciones farmacocinéticas.
- 10 Las micropartículas pueden liberar un agente biológicamente activo por cualquier medio apropiado para permitir una liberación controlada del agente biológicamente activo. Aunque no desean estar limitados por la teoría, las micropartículas pueden liberar el agente biológicamente activo mediante erosión en masa, difusión o una combinación de ambos.
- 20 Se utiliza un surfactante con el fin de proporcionar formulaciones que tienen la capacidad de inyección requerida. Se utiliza un surfactante para proporcionar una emulsión estable durante el proceso de formación de las micropartículas de la presente invención. Se utiliza un surfactante para prevenir la aglomeración durante la liofilización durante el proceso de formación de las micropartículas. Se utiliza un surfactante para prevenir la aglomeración dentro del vehículo de inyección durante el proceso de administración de las micropartículas. Sin pretender limitarse a la teoría, los surfactantes pueden proporcionar una consistencia de lote a lote de micropartículas formando una fina capa de material alrededor de las micropartículas que ayuda a prevenir el aglomerado. Se puede utilizar cualquier surfactante apropiado. Los surfactantes apropiados incluyen, pero no se limitan a, compuestos catiónicos, aniónicos y no iónicos tales como poli(alcohol vinílico), carboximetilcelulosa, lecitina, gelatina, poli(vinilpirrolidona), éster de ácido graso de polioxietilenoorbitano (Tween 80, Tween 60, Tween 20), dodecil sulfato de sodio (SDS), manitol y similares.
- 25 En una realización, las micropartículas se forman utilizando una emulsión que comprende poli(alcohol vinílico). En una realización particular, las micropartículas se forman utilizando una emulsión que comprende 1.0% de poli(alcohol vinílico). La concentración de surfactante en el medio de proceso se establece que es una cantidad suficiente para estabilizar la emulsión.
- 30 En una realización, las micropartículas se liofilizan en una solución que comprende SDS, Tween 20 o manitol. En una realización particular, las micropartículas se liofilizan en una solución que comprende 7.8% de SDS.
- 35 En una realización, las micropartículas se suspenden en una solución de inyección que comprende SDS, Tween 20 o manitol. En una realización particular, las micropartículas se suspenden en una solución de inyección que comprende SDS al 0.5%.
- 40 En una realización, la viscosidad inherente del polímero biodegradable puede estar en el intervalo de 0.1 a 2.0 dL/g. En otra realización, la viscosidad inherente del polímero biodegradable varía de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 1,0 dL/g. En otra realización, la viscosidad inherente del polímero biodegradable es de aproximadamente 0.16 dL/g, 0.35 dL/g o 0.61 dL/g.
- 45 Los polímeros biodegradables derivados también son apropiados para uso en la presente invención, incluyendo polímeros hidrófilos unidos a PLGA y similares. Para formar micropartículas, en particular, se puede utilizar una diversidad de técnicas conocidas en la técnica. Estos incluyen, por ejemplo, etapas de emulsión sencilla o doble seguidas por eliminación de solvente. La eliminación del solvente se puede conseguir por extracción, evaporación o seco por aspersión entre otros métodos.
- 50 En un método típico de extracción con solvente, se disuelve un polímero en una fase continua (por ejemplo, un solvente orgánico) que es al menos parcialmente soluble en una fase discontinua (por ejemplo, un solvente de extracción tal como agua). Una molécula biológicamente activa, ya sea en forma soluble o dispersa como partículas finas, a continuación, se adiciona a la solución polimérica, y la mezcla se dispersa en una fase acuosa que contiene un agente surfactante tal como poli(alcohol vinílico). La emulsión resultante se adiciona a un volumen mayor de agua donde el solvente orgánico se elimina por extracción o evaporación del polímero/agente biológicamente activo para formar micropartículas endurecidas.
- 55

- Las micropartículas de la presente invención se pueden preparar utilizando cualquier método apropiado. En una realización, las micropartículas se preparan utilizando un proceso de emulsión. En la figura 8 se muestra un esquema general que ilustra el proceso. En general, los métodos combinan una primera fase y una segunda fase y pasan la combinación a través de un emulsionante. Después de que se forma una emulsión, el solvente de la primera fase se elimina de la emulsión en un extractor, produciendo micropartículas endurecidas. Las micropartículas se tamizan a continuación y se secan.
- En una realización, los métodos tienen una primera fase que consiste en un solvente orgánico, un polímero y un agente biológico o químico disueltos o dispersos en el primer solvente. La segunda fase comprende agua y un estabilizante y, opcionalmente, el primer solvente. La primera y la segunda fases se emulsionan y, después de que se forma una emulsión, el primer solvente se elimina de la emulsión, produciendo micropartículas endurecidas.
- En otra realización, los métodos utilizan un proceso de aceite en aceite (o/o) no acuoso para fabricar micropartículas. En general, un método o/o incluye las etapas de: a) disolver un polímero biocompatible en un solvente para formar una solución; b) combinar un agente biológicamente activo con la solución para producir una mezcla; c) opcionalmente combinar la mezcla de la etapa (b) con un agente coacervante (opcionalmente, mientras se homogeneiza la solución); y d) permitir que el polímero biocompatible forme micropartículas que contienen el agente biológicamente activo. (Véase la Publicación PCT No. WO 03/092665 y K.G. Carrasquillo et al., "Controlled Delivery of the Anti-VEGF Aptamer EYE001 with Poly (lactic-co-glycolic) Acid Microspheres," I.O.V.S. (2003) 44(1), 290, cada uno de los cuales se incorpora en este documento como referencia en su totalidad.)
- En otra realización, los métodos utilizan un proceso de agua en aceite en agua (w/o/w) para fabricar micropartículas. Tales micropartículas se pueden preparar formando una emulsión agua-en-aceite primaria que comprende una solución acuosa soluble en agua que contiene la fase acuosa interna y una solución que contiene polímero como la fase oleosa. Esta emulsión primaria puede entonces dispersarse en una fase acuosa externa para formar la emulsión final de agua en aceite en agua. La emulsión trifásica w/o/w se puede dejar agitar durante un periodo de tiempo establecido para promover la extracción y evaporación del solvente orgánico en el cual se elimina el solvente de la fase oleosa y da lugar a la formación de micropartículas endurecidas. Ejemplos de procesos de emulsión w/o/w se describen en las Patentes de los Estados Unidos No. 4,954,298; 5,330,767; 5,851,451 y 5,902,834, cada uno de los cuales se incorpora en este documento como referencia en su totalidad. La figura 5 ilustra un proceso de ejemplo w/o/w para formar micropartículas de la presente invención. Las micropartículas de la presente invención, formadas por un proceso w/o/w, se describen en el ejemplo 2.
- Las emulsiones se pueden formar por cualquier método apropiado. En una realización, un dispositivo discontinuo para mezclar la primera y segunda fases en condiciones turbulentas tales como con un agitador como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 5,407,609, que se incorpora en este documento como referencia en su totalidad. Otros procesos discontinuos pueden emplear un homogeneizador o un sonicador. En otra realización, se forma una emulsión mezclando continuamente la primera fase y la segunda fase, en línea, utilizando condiciones de flujo turbulento, como en el uso de un mezclador dinámico en línea o un mezclador estático en línea tal como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 5,654,008, que se incorpora en este documento como referencia en su totalidad.
- En una realización, las micropartículas se preparan de acuerdo con el proceso descrito en la publicación PCT No. WO 2005/003180, que se incorpora en este documento como referencia en su totalidad, que describe una técnica basada en emulsión que emplea un sistema de lecho empaquetado que utiliza condiciones de flujo laminar para producir una emulsión que da como resultado micropartículas que contienen agentes biológicos o químicos después de la eliminación del solvente.
- El aparato de lecho empaquetado para la producción de micropartículas a través de una técnica basada en emulsión puede ser un recipiente de cualquier forma capaz de ser llenado con material de relleno que permita que fluya líquido a través de él (Véase la figura 6). El aparato de la presente invención puede proporcionar además un material capaz de insertarse en ambos extremos para el envase de materiales en tal aparato. La figura 6 ilustra un aparato de ejemplo de acuerdo con una realización de la presente invención. En esta realización, un tubo (1) se llena con perlas como material (2) de relleno.
- La morfología de las micropartículas se observa mediante análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM). Las micropartículas se recubren con oro utilizando un sistema Anatech LTD Hummer 6.2. Las imágenes microscópicas electrónicas de barrido se tomaron utilizando un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-5600 y el software que lo acompaña a una tensión de aceleración de 5-10 keV. Para muestras seleccionadas, se realizó un análisis SEM de la estructura de microesferas internas después de incorporar micropartículas en L.R. White Resin y luego dividir la preparación después la resina endurecida. Las imágenes de muestra se muestran en las figuras 1 y 2.
- Las micropartículas de la presente invención se pueden almacenar como un material seco tal como un polvo estéril liofilizado (o liofilizado). En el caso de la administración a un paciente, antes de tal uso, las micropartículas secas se pueden suspender en cualquier vehículo farmacéuticamente aceptable. Tras la suspensión, las micropartículas se pueden inyectar en el paciente o utilizarse de otra manera. Los vehículos farmacéuticamente aceptables apropiados

incluyen, pero no se limitan a, un vehículo líquido, un vehículo de suspensión o un vehículo de inyección. El vehículo puede incluir un surfactante, tal como SDS, Tween 20 o manitol.

Las micropartículas pueden estar presentes en cualquier formulación apropiada. Métodos bien conocidos en la técnica para preparar formulaciones se encuentran, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20th ed., A.R. Gennaro ed., Lippincott: Philadelphia, 2000). Las micropartículas se pueden administrar a seres humanos, animales de compañía domésticos, ganado u otros animales con un diluyente, portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. En una realización, las micropartículas pueden estar presentes en cualquier formulación apropiada para su administración al ojo.

La práctica farmacéutica convencional se puede emplear para proporcionar formulaciones o composiciones apropiadas para administrar el compuesto identificado a pacientes que sufren de una enfermedad, trastorno o condición del ojo. La administración puede comenzar antes, durante o después de que el paciente sea sintomático.

En una realización, las micropartículas se suspenden en un vehículo líquido farmacéuticamente aceptable, tal como una solución al 2.5% en peso de carboximetilcelulosa en agua. En otra realización, las micropartículas de pegaptanib se suspenden en una solución acuosa que comprende fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 136.9 mM, cloruro de potasio 2.7 mM, Tween 20 al 0.05% y pH 7.4 (filtrado 0.2 μ m). En otra realización, las micropartículas de pegaptanib se formulan para una dosis de 1 mg de pegaptanib por 100 μ L de solución de micropartículas. En otra realización, las micropartículas de pegaptanib se suspenden en una solución que comprende pegaptanib. En una realización particular, las micropartículas de pegaptanib se suspenden en una solución que comprende pegaptanib formulado a 3.47 mg/mL, medido como la forma de ácido libre del oligonucleótido, cloruro de sodio, monohidrato de fosfato de sodio monobásico, fosfato dibásico de sodio heptahidrato, ácido clorhídrico y/o hidróxido de sodio para ajustar el pH y agua para inyección.

El volumen de inyección dependerá de la ruta de administración. Una inyección intravítrea típica requiere una aguja de calibre 27 o más estrecha y un volumen suministrado menor o igual a aproximadamente 150 μ L. Una inyección subconjuntival típica puede acomodar una aguja de calibre 23 y un volumen de hasta 750 μ L.

Las formulaciones de liberación sostenida pueden ser ventajosas reduciendo las frecuencias de dosificación intravítreas (IVT) de terapia que implican agentes biológicamente activos. Los solicitantes evaluaron las propiedades de liberación *in vivo* de micropartículas cargadas con pegaptanib como se indica en el ejemplo 9 y demostraron así la viabilidad de suministrar pegaptanib durante un periodo de aproximadamente un mes o más de un polímero de formulación de liberación sostenida de poli(lactida-co-glicolida) (PLGA).

Se considera que la eliminación del pegaptanib desde el ojo hacia la circulación sistémica es el paso limitante de la velocidad de la farmacocinética plasmática de pegaptanib. Por consiguiente, la farmacocinética plasmática de pegaptanib debe reflejar la liberación *in vivo* de pegaptanib de la formulación de liberación sostenida. Tras la administración intravítrea (IVT) bilateral de pegaptanib líquido (pegaptanib de sodio en solución salina estandarizada con fosfato), las concentraciones en plasma disminuyeron lentamente en el tiempo. La constante de velocidad de fase terminal, en plasma, reflejó la absorción lenta de pegaptanib desde el ojo hacia la circulación sistémica después de una inyección IVT (véase la figura 12). Dado que se espera que el pegaptanib se libere de forma sostenida de las formulaciones de PLGA en el vítreo, se espera que el pegaptanib liberado en el vítreo tenga propiedades de distribución y eliminación similares a las del pegaptanib administrado por una solución salina estandarizada con fosfato.

Las concentraciones en plasma resultantes de un estudio de distribución ocular *in vivo* de 28 días en conejos dosificados por vía intravítrea con 5 mg de micropartículas de PLGA que contienen 15% en peso de pegaptanib se muestran en la figura 12. Los resultados muestran que las micropartículas tienen una liberación de ráfaga baja. No existe una liberación de ráfaga grande, común a las formulaciones de PLGA que contienen compuestos solubles en agua o hidrófilos. Además, los niveles de concentración en plasma de pegaptanib se midieron a un nivel relativamente constante entre 0.05-0.4 nM durante el periodo de estudio de 28 días con respecto a una dosis equivalente de pegaptanib líquido IVT, lo que indica que se logra una liberación sostenida de pegaptanib en el vítreo.

Se sabe en la técnica que la modificación de la composición de polímeros de una formulación de micropartículas de liberación sostenida afecta la velocidad de descomposición del polímero *in vivo* y, por lo tanto, afecta las características de liberación de la formulación de micropartículas. Demostrando por lo tanto una duración de liberación de un mes a partir de una formulación de micropartículas *in vivo* indica que es factible una duración de liberación de más de un mes de una formulación de micropartículas *in vivo*.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar ciertas realizaciones y aspectos útiles de la presente invención y no se deben interpretar como limitativos del alcance de la misma. Se pueden utilizar materiales y métodos alternativos para obtener resultados similares.

Ejemplo 1

Preparación de micropartículas (aceite en agua)

5 Las formulaciones se prepararon mediante un método de extracción/evaporación con solvente aceite-en-agua. Macugen®; Se disolvieron pegaptanib de sodio (OSI) Eyetech, Inc., NY, NY) y PLGA en diclorometano y se formó una emulsión de acuerdo con el proceso descrito en la publicación PCT No. WO 2005/003180, que se incorpora en este documento como referencia en su totalidad. Después de la extracción con solvente de las partículas de emulsión, las micropartículas endurecidas se tamizaron a través de un tamiz de 45 µm. Se recogieron micropartículas ≤45 µm por centrifugación y se secaron mediante liofilización.

Ejemplo 2

10 Preparación de micropartículas de pegaptanib (agua en aceite en agua).

Se preparó un tamaño de lote de 200 miligramos de microesferas secas que contenían pegaptanib de acuerdo con el siguiente procedimiento:

Etapa 1. Preparación de la fase acuosa primaria

- a. 30 mg de pegaptanib
- 15 b. 300 µL de agua
- c. La mezcla se agitó en vórtex para disolver los componentes

Etapa 2. Preparación de la fase orgánica

- a. 200 mg de PLGA (esto es 50:50 de lactida: glicolida, IV = 0.37 dL/g)
- b. 7 mL de diclorometano (CH₂Cl₂)
- 20 c. La mezcla se agitó en vórtex para disolver los componentes

Etapa 3. Preparación de una fase acuosa secundaria/solución de apagado

- b. 10.2 g de alcohol polivinílico
- c. 104 g de sacarosa
- d. 1.25 mL de Tris 1M, pH 8.0
- 25 e. 1 mL de EDTA 0.5 M, pH 8.0
- f. Todos los componentes se disolvieron en ~800 mL de agua. El pH se ajustó a 7.4 y el volumen final se llevó a 1 L.

30 Etapa 4. La solución orgánica se homogeneizó a 20000 RPM durante un total de 2 minutos utilizando un homogeneizador de Virtis. Mientras se homogeneizaba, la solución acuosa primaria (que contenía fármaco) se inyectó lentamente a través de una aguja de 21G, durante 20 segundos para formar una emulsión de agua-aceite primaria.

Etapa 5. La fase acuosa secundaria (35 mL) se homogeneizó a 20000 RPM, durante 1 minuto. La emulsión primaria se transfirió inmediatamente en un vaso de precipitados que contenía una fase acuosa secundaria homogeneizada para formar una emulsión agua-aceite-agua secundaria.

35 Etapa 6. La emulsión secundaria se vertió en un vaso de precipitados de 250 mL que contenía 100 mL de solución de apagado (velocidad de agitación = 4) para extraer CH₂Cl₂. Se dejó agitar a temperatura ambiente durante 3.5 horas.

Etapa 7. El material se transfirió a un recipiente de recogida para centrifugación y lavado.

- a. Se centrifuga a 1500 RPM durante 15 minutos y se vierte el sobrenadante.
- b. Se repiten la centrifugación y decantación del sobrenadante dos veces más.

Etapa 8. La pella final se volvió a suspender en agua DI y se liofilizó durante aproximadamente 96 horas (4 días). Durante las primeras 24 horas en el liofilizador, el sistema de vacío en el sistema se purgó cada 2 horas.

Ejemplo 3

Análisis morfológico de micropartículas

- 5 La morfología de las micropartículas se observó mediante análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM). Las micropartículas se recubrieron con oro utilizando un sistema Anatech LTD Hummer 6.2. Las imágenes microscópicas electrónicas de barrido se tomaron utilizando un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-5600 y el software que lo acompaña a una tensión de aceleración de 5-10 keV. Para muestras seleccionadas, se realizó un análisis SEM de la estructura de microesferas internas después de incorporar micropartículas en L.R. White Resin y luego dividir la preparación después la resina endurecida.

10 Las imágenes de micrografía de barrido de micropartículas formadas por el proceso como se indica en el ejemplo 1 se muestran en las figuras 1 y 2. Las imágenes en la figura 1 muestran que las micropartículas tienen una morfología externa lisa. La imagen de la figura 2 muestra que las micropartículas tienen una morfología interna monolítica.

- 15 En la figura 3 se muestra una imagen de micrografía electrónica de barrido de micropartículas formadas por el proceso agua-en-aceite-en-agua como se ha indicado en el ejemplo 2. La imagen muestra que las micropartículas tienen un tamaño de partícula de menos de aproximadamente 10 μm y una morfología externa lisa.

- 20 Los métodos de análisis de liberación *in vitro* e *in vivo* como se indica en el ejemplo 7 y el ejemplo 8 a continuación indican que la morfología monolítica lisa de las micropartículas libera pegaptanib de una manera de liberación sostenida con una ráfaga baja.

Ejemplo 4

Análisis de carga del núcleo de pegaptanib y Pureza

- 25 Se prepararon microesferas de pegaptanib como se indica en el ejemplo 1 anterior. Las microesferas se analizaron para determinar si el pegaptanib se degradaba durante su preparación. Las preparaciones de las microesferas se caracterizaron por el contenido de pegaptanib y pureza por HPLC. Aproximadamente 6.5 mg de formulación se pesaron con precisión en un tubo de microcentrífuga de 2 mL. La formulación se disolvió en 1.0 mL de 5% (agua)/95% (acetonitrilo), y el polímero precipitó por adición de 1.0 mL de fosfato de Na 10 mM pH 2.5. La suspensión turbia resultante se agitó en vórtex y se clarificó por centrifugación a 14.000 rpm, durante 2 minutos. El sobrenadante claro se ensayó mediante HPLC. Las muestras se analizaron frente a una solución patrón EYE-001 de 670.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (equivalente a 126.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de oligómero) preparada en agua y se almacenó a -80°C .

30 La figura 8 muestra un cromatograma RP-HPLC utilizado para medir la carga del núcleo y la pureza de pegaptanib extraído de las microesferas. El cromatograma muestra una carga de núcleo alta (12.3%) y que la pureza de pegaptanib (99.18%) no se altera por el proceso de formulación.

Ejemplo 5

- 35 Análisis del efecto del surfactante sobre la liofilización

- 40 Se prepararon micropartículas con polímero 50:50-2.5A (Alkermes) y una carga inicial de pegaptanib al 15% como se indica en el ejemplo 1. Después de la extracción con solvente, las microesferas se tamizaron a través de un tamiz de 45 μm y se recogieron en una pantalla de 25 μm . Las microesferas se lavaron con agua y el lote se dividió en tres. Una fracción se liofilizó en agua. La segunda fracción se liofilizó en SDS, de manera que el producto seco era 7.8% (p/p) de SDS. La tercera fracción se liofilizó en Tween20, de tal manera que el producto seco fue Tween20 al 0.24% (p/p). Con el fin de medir la suspensibilidad y la capacidad de inyección, se adicionaron 100 μL del vehículo a 20 mg de microesferas de pegaptanib en un tubo de centrífuga de 1.5 mL. Se ensayaron los siguientes vehículos: PBS; PBS con SDS al 0.5%; PBS con Tween20 al 0.02%; PBS con CMC al 0.5%; y PBS con CMC al 0.5% y Tween20 al 0.2%. La mezcla se suspendió golpeando suavemente para determinar la facilidad de suspensión. A continuación, la mezcla se agitó en vórtex durante varios segundos. Se examinó la mezcla para determinar la uniformidad de la suspensión y la capacidad de inyección. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

	077-141	077-141 Tween20 al 0.24%	077-141 SDS al 7.8%	077-151 Manitol al 2%
PBS		Suspende fácilmente Inyecta bien, obstrucción ligera Poca fuerza requerida después de la sedimentación	Suspende OK Se adhiere algo a los lados Inyecta OK, leve obstrucción Poca fuerza requerida después de la sedimentación	Visiblemente grumoso Se adhiere a los lados Inyecta OK al inicio, peor con el tiempo
PBS + Tween 20 al 0.02%	Difícil de suspender Inyecta bien Se sedimenta rápidamente	Suspende fácilmente Inyecta bien Poca fuerza requerida después de la sedimentación		
PBS + SDS al 0.5%			Suspende fácilmente Inyecta bien Poca fuerza requerida después de la sedimentación Espumoso	
PBS + CMC al 0.5%		Suspende OK Inyecta con algo de obstrucción	Suspende OK Inyecta OK Incluso después de la sedimentación	
PBS + CMC al 0.5% + Tween 20 al 0.02%	Muy difícil de suspender. Obstrucción inicialmente luego OK	Suspende fácilmente Inyecta bien Se mantiene bien en suspensión		Inyecta OK Incluso con sedimentación

Ejemplo 6

Análisis de suspensibilidad y capacidad de inyección

- 5 Se adicionaron alícuotas de 10, 20 o 30 mg de microesferas de pegaptanib, preparadas mediante el método expuesto en el ejemplo 1, a 100 µL del vehículo (CMC al 0.5% y SDS al 0.05% en PBS). La mezcla se examinó para determinar la uniformidad de la suspensión. A continuación, se extrajo la solución en una jeringa de 1 cc a través de una aguja de calibre 27 de ½ pulgada y se mantuvo durante un tiempo antes de empujar la muestra a través de la misma aguja. Se repitió el proceso para una aguja de calibre 29, de ½ pulgada. El ensayo se repitió después de permitir que las microesferas se depositaran hacia el centro de la jeringa durante 30 segundos. Se ensayaron los siguientes vehículos: Solución salina; PBS; PBS con SDS al 0.05 o al 0.5%; PBS con Tween20 al 0.02%; PBS con manitol al 1%; PBS con SDS al 0.5% y CMC al 0.5%; y PBS con Tween 20 al 0.02% y CMC al 0.5%. Los resultados se muestran en las Tablas 2 y 3.

Tabla 2

	100 mg de microesferas/mL	150 mg/mL	200 mg de microesferas/mL
Solución salina	Visiblemente grumoso Se adhiere al tubo Inyecta bien		
PBS	Se adhiere al tubo Inyecta bien		
PBS + SDS al 0.1%	Se adhiere al tubo Inyecta bien Fuerza requerida después de la sedimentación		
PBS + SDS al 0.5%	Inyecta bien Inyecta bien después de la sedimentación Espumoso		Difícil de suspender Se sedimenta rápidamente Obstrucción

ES 2 616 296 T3

	100 mg de microesferas/mL	150 mg/mL	200 mg de microesferas/mL
PBS + Tween ₂₀ al 0.02%	Inicialmente obstruido, luego inyecta bien Inyecta bien después de la sedimentación	Difícil de suspender Obstrucción/ Panqueques	Difícil de suspender Se retira bien Panqueques en la inyección
PBS + Manitol al 1%	Se adhiere al tubo Inyecta bien inicialmente, luego se aglomera visiblemente		
PBS + CMC al 0.5%	Difícil de suspender Se adhiere al tubo inyecta bien Inyecta bien después de la sedimentación		
PBS + CMC al 0.5% + SDS al 0.5%	Difícil de suspender inyecta bien Inyecta bien después de la sedimentación		
PBS + CMC al 0.5% + Tween 20 al 0.02%	Difícil de suspender Obstrucciones en la retirada Panqueques formados en la inyección	Difícil de suspender Panqueques en la inyección	

Tabla 3

	> 45 μ m (Lote 077-132)	45-38 μ m (Lote 077-132)		38-25 μ m (Lote 077-132)		<25 μ m (Lote 077-110)	
	100 mg/mL	100 mg/mL	200 mg/mL	100 mg/mL	200 mg/mL	100 mg/mL	200 mg/mL
PBS		aglomeraciones		aglomeraciones			
PBS SDS al 0.05%		aglomeraciones		aglomeraciones			
PBS al 0.5% SDS	No se puede extraer en jeringa		Inyecta bien Incluso con sedimentación	Inyecta bien Incluso con sedimentación	Inyecta bien Incluso con sedimentación	Inyecta bien	Inyecta bien Incluso con sedimentación
PBS, Tween ₂₀ al 0.02%		Inyecta bien		Inyecta bien			
PBS Manitol al 1%				aglomeraciones			

Ejemplo 7

5 Liberación *in vitro* de microesferas de pegaptanib

Las microesferas se analizaron para determinar el perfil de liberación *in vitro* de pegaptanib. La liberación *in vitro* de pegaptanib de formulaciones de microesferas se determinó en PBS (pH 7.4) que contenía 0.02% de Tween-20 y 0.05% de azida de sodio. Por lo general, se adicionaron 10 mg de microesferas a 1 mL de solución reguladora en un tubo tapado y se colocaron en una incubadora de baño de agua agitando a (150 ciclos por minuto) a 37°C. El sobrenadante del medio de liberación se muestreó periódicamente y se ensayó la cantidad de conjugado y la pureza aproximada por HPLC de fase inversa. La "liberación de ráfaga" se determinó por el porcentaje de fármaco que se liberó en las primeras tres horas de incubación.

Los perfiles de liberación se caracterizaron por una liberación de ráfaga inicial baja de pegaptanib en las primeras 24 horas de liberación seguido por un período de liberación sostenida que varía de 40 días a más de 200 días dependiendo de la composición y la viscosidad inherente del polímero de PLGA utilizado para preparar la formulación.

Ejemplo 8

Liberación *in vivo* de microesferas de pegaptanib

La duración *in vivo* de la liberación para formulaciones de microesferas producidas de acuerdo con el ejemplo 1 se evaluó en conejos Nueva Zelanda mediante el control de la concentración en plasma sanguíneo después de la dosificación bilateral intravítrea de las formulaciones de ensayo.

Se suspendieron microesferas que contenían pegaptanib en un vehículo de inyección de PBS que contenía 0.02% de surfactante a una concentración de 100 mg de microesferas por mililitro. Un volumen de 50 µL de la suspensión de la formulación de ensayo se inyectó por vía intravítrea en el ojo utilizando una jeringa de insulina de 300 µL equipada con una aguja de 29 G, de media pulgada para proporcionar una dosis de 5 mg de la formulación de ensayo

Las muestras de plasma sanguíneo se recogieron a intervalos específicos y se almacenaron a -20°C hasta su análisis. Las muestras se analizaron para la concentración de pegaptanib mediante ensayo de hibridación-PCR Dual.

Animales

Se utilizaron conejos machos adultos Nueva Zelanda blancos, que pesaban aproximadamente 2.5-4.0 kg.

Metodología Experimental

Los animales fueron pesados y anestesiados con xilazina (5 a 10 mg/kg administrados por vía subcutánea) seguido por ketamina (35 a 50 mg/kg administrados por vía intramuscular). Se administraron una a dos gotas de Tropicamida® en cada ojo antes del examen oftálmico y la dosificación.

Las inyecciones intravítreas se administraron el día de estudio 1 por un oftalmólogo veterinario certificado por el consejo (DACVO). Para cada una de las inyecciones intravítreas, el conejo se colocó en una posición recostada lateral y el ojo se anestesió por vía tópica con 1 a 2 gotas de solución al 0.1% de proparacaina. El volumen de la dosis (para cada ojo) fue de 50 µL que contenía 5 mg de formulación de PLGA. El artículo de ensayo se inyectó por vía intravítrea utilizando una jeringa de insulina de 300 µL equipada con una aguja de 29 G, media pulgada u otra aguja de tamaño apropiado. La aguja se insertó 1 a 2 mm posterior al limbo en el cuadrante superotemporal. El bisel se mantuvo en una posición anterior y la aguja avanzó hacia el medio vítreo. Se administró un ungüento antibiótico (triple antibiótico o equivalente) al ojo, después de la inyección. El procedimiento se repitió en el ojo opuesto. El primer día de dosificación se designó como día de estudio 1. Después de la administración de la dosis en el día de estudio 1, los animales se observaron durante la duración del estudio.

En el momento designado se recogieron 2 mL de sangre entera de la vena del oído lateral utilizando EDTA de potasio como anticoagulante. Todas las muestras se analizaron para las concentraciones de pegaptanib mediante un Ensayo de hibridación-RT PCR dual. El método de la regla trapezoide se usó para calcular el AUC y evaluar la biodisponibilidad relativa de la liberación de pegaptanib de microesferas de PLGA. Después de la recolección final de sangre, todos los animales fueron sometidos a eutanasia vía anestesia por la mezcla de ketamina: xilazina seguida de una sobredosis de pentobarbital sódico.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos de hibridación-RT PCR dual se realizó utilizando Graph Pad Prism® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Las concentraciones de la muestra curva estándar se calcularon mediante una curva de 4 parámetros ajustándose a los parámetros estadísticos apropiados.

5 Estudios previos han demostrado que después de la administración IVT bilateral de pegaptanib de sodio en una solución salina estandarizada con fosfato, las concentraciones de pegaptanib en vítreo y plasma disminuyen de una manera bien definida y predecible. La constante de velocidad de fase terminal fue equivalente en humor vítreo y plasma y refleja la absorción lenta de pegaptanib desde el ojo hacia la circulación sistémica después de una inyección IVT. Por lo tanto, los niveles en plasma sanguíneo se utilizaron como marcador de niveles vítreos después de la dosificación intravítrea de pegaptanib de sodio en solución salina estandarizada con fosfato.

10 Se esperaba que el pegaptanib se liberara de una manera sostenida de las formulaciones de ensayo al vítreo y que el pegaptanib liberado en el vítreo tuviera propiedades de distribución y eliminación similares a las propiedades del pegaptanib dosificado en una solución salina estandarizada con fosfato. Por lo tanto, la farmacocinética plasmática de pegaptanib reflejó la liberación *in vivo* de pegaptanib de la formulación de liberación sostenida como eliminación del ojo en circulación sistémica. Esto se consideró como la etapa limitante de la velocidad que determina la farmacocinética en plasma de pegaptanib.

Ejemplo 9

Perfiles de liberación de microesferas de pegaptanib

15 (Formulaciones 093-063, 093-003-1, y 093-059)

Se prepararon microesferas de pegaptanib que tenían una carga de núcleo entre aproximadamente 12 y 15% p/p como se indica en el ejemplo 1. Las formulaciones 093-063, 093-003-1 y 093-059 se resumen en la Tabla 4. Las formulaciones fueron tamizadas para proporcionar microesferas con un tamaño de partícula de menos de 45 µm.

Tabla 4

Lot No.	Carga del núcleo del fármaco (% en peso)	Polímero de PLGA	Ráfaga de 1 día (%)
093-033-1	14.3	50:50 4A	8.1
093-059	12.9	75:25 2A	13.5
093-063	14.4	50:50 3A	6.1

20 El perfil de liberación *in vitro* de las microesferas se analizó como se indica en el ejemplo 7. Los resultados del análisis de liberación *in vitro* se indica en las figuras 13. Los resultados mostrados en la figura 13 demuestran las propiedades de liberación sostenida de las micropartículas de las microesferas de la presente invención. Los resultados también demuestran que las micropartículas de la presente invención pueden ser diseñadas selectivamente para controlar la liberación de un agente biológicamente activo durante un periodo de tiempo deseado. La preparación de microesferas con diversos polímeros demostró que la liberación *in vitro* de pegaptanib se puede extender.

25 El perfil de liberación *in vivo* de las microesferas se analizó como se indica en el ejemplo 8. Los grupos de animales y el programa de recolección de sangre se resumen en la Tabla 5.

30 Programa de identificación y muestreo de grupos

Tabla 5

Grupo	Artículo de prueba	Contenido de Pegaptanib (% p/p)	Ruta	Puntos de tiempo	Número de ojos/punto de tiempo	Número de animales/punto de tiempo	Número total de animales
Grupo 1M	Microesferas de pegaptanib 093-063	14.4%	Intravítrea	2 y 6 horas después de la dosis; y Días de Estudio 2, 4, 9, 16, 23, 30, 37, 44, 51, 58, 65, 72, 79 y 86	12	6	6

ES 2 616 296 T3

Grupo	Artículo de prueba	Contenido de Pegaptanib (% p/p)	Ruta	Puntos de tiempo	Número de ojos/punto de tiempo	Número de animales/punto de tiempo	Número total de animales
Grupo 2M	Microesferas de pegaptanib 093-003-1	14.3%	Intravítreo	2 y 6 horas después de la dosis; y Días de Estudio 2, 4, 9, 16, 23, 30, 37, 44, 51, 58, 65, 72, 79 y 86	12	6	6
Grupo 3M	Microesferas de pegaptanib 093-059	13.9%	Intravítreo	2 y 6 horas después de la dosis; y Días de Estudio 2, 4, 9, 16, 23, 30, 37, 44, 51, 58, 65, 72, 79 y 86	12	6	6

El perfil de liberación *in vivo* de las microesferas se ilustra en la Tabla 6 y las figuras 14 y 15. Los datos de farmacocinética se presentan en la Tabla 7.

Tabla 6

Formulación del contenido de fármaco polímero API Dosis (ug)	093-003-1 50: 50-4A 14.2% 134		093-059 75: 25-2A 12.9% 122		093-063 50: 50-3A 14.4% 136	
	Media (ng/mL)	Desv Estd	Media (ng/mL)	Desv Estd	Media (ng/mL)	Desv Estd
Día						
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.08	0.67	0.17	0.85	1.06	0.72	0.66
0.25	1.99	0.82	3.57	2.67	1.61	1.04
2	3.38	1.26	5.00	1.42	4.57	1.91
4	4.72	1.44	3.41	1.65	5.41	2.65
9	2.24	0.56	2.14	1.30	2.67	0.98
16	1.08	0.32	1.39	0.69	0.94	0.32
23	0.50	0.30	0.60	0.47	0.55	0.13
30	4.81	1.71	4.60	1.73	1.90	0.38
37	4.15	2.09	5.61	1.69	5.94	1.22
44	1.93	0.85	2.62	0.90	5.52	2.16
51	0.74	0.50	0.84	0.53	3.29	1.80
58	0.20	0.21	0.28	0.19	1.14	0.95
65	0.00	0.00	0.03	0.08	0.42	0.31

72	0.00	0.00	0.00	0.00	0.17	0.24
79	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	0.09
86	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

5 Las figuras 14 y 15 muestran concentraciones en plasma resultantes de un estudio ocular de 86 días *in vivo* en conejos dosificados por vía intravítrea con 5 mg de micropartículas de PLGA que contienen 15% en peso de pegaptanib se muestran en las figuras 14 y 15. Las figuras 14 ilustran que tres formulaciones ensayadas todas tenían baja liberación de ráfaga *in vivo* seguida por un período de mantenimiento de los niveles en plasma sanguíneo durante 60-70 días. El análisis de liberación *in vitro* de estas formulaciones indicó perfiles de liberación similares para las tres formulaciones de ensayo que eran predictivos del rendimiento *in vivo*.

La figura 14 ilustra que las tres formulaciones ensayadas tenían perfiles de liberación *in vivo* que están bien correlacionados con los perfiles de liberación *in vitro* para clasificar la ráfaga y la duración de la liberación.

10 Las curvas de concentración en plasma demuestran una liberación de ráfaga controlada que se predijo bien mediante análisis de liberación *in vitro*. Además, se observa un perfil típico de liberación de microesferas de PLGA con una fase de retardo seguido por una fase de liberación secundaria controlada con polímero que da como resultado una concentración en plasma sostenida por encima de lo que se alcanza por dosificación intravítrea de la misma dosis de pegaptanib de sodio líquido en conejos. El análisis bioanalítico reveló que la concentración en plasma sanguíneo de pegaptanib se mantuvo durante un período de varias semanas.

Tabla 7

Formulación	Descripción	Dosis (ug)	AUC _{tot} ng*hr/mL	F _{rel}	Ráfaga <i>in vitro</i>	Ráfaga <i>in vivo</i>
	Líquido	141	4427	100%		
093-003-1	50:50-4A	134	3173	75%	8.08%	7.20%
093-059	75:25-2A	122	3589	94%	13.54%	12.93%
093-063	50:50-3A	136	4429	104%	6.06%	5.83%

Ejemplo 10

Perfiles de liberación de microesferas de pegaptanib

20 (Formulaciones 093-023, 093-051, 077-189 y 093-041)

Se prepararon microesferas de pegaptanib que tenían una carga de núcleo entre aproximadamente 13 y 17% p/p como se indica en el ejemplo 1. Las formulaciones 093-023, 093-051, 077-189 y 093-041 se indica en la Tabla 8. Las formulaciones se tamizaron para proporcionar microesferas que tenían un tamaño de partícula de menos de 45 µm.

25 Tabla 8

Lot No.	Carga del núcleo del fármaco (% en peso)	Polímero de PLGA	Ráfaga día (%)
093-023	13.6	50:50 5A	32.8
093-051	14.1	65:35 3A	3.4
077-189	16.1	75:25 4A	5.2
093-041	13.6	PLA 0.36 dL/g IV	1.6

5 El perfil de liberación *in vitro* de las microesferas se analizó como se indica en el ejemplo 7. Los resultados del análisis de liberación *in vitro* se muestran en la figura 16. Los resultados mostrados en la figura 16 demuestran las propiedades de liberación sostenida de las micropartículas de la presente invención. Los resultados también demuestran que las micropartículas de la presente invención pueden ser diseñadas selectivamente para controlar la liberación de un agente biológicamente activo durante un periodo de tiempo deseado. La preparación de microesferas con diversos polímeros demostró que la liberación *in vitro* de pegaptanib se puede extender.

El perfil de liberación *in vivo* de las microesferas se analizó como se indica en el ejemplo 8. El perfil de liberación *in vivo* de las microesferas se ilustra en la Tabla 9 y la figura 17. Los datos farmacocinéticos se presentan en la Tabla 10.

10

Tabla 9

Formulación Contenido de fármaco Polímero API Dosis (ug)	093-023 50: 50-5A 13.6% 128		093-051 65:35-3A 14.1% 133		077-189 75:25-4A 16.1% 152		093-041 PLA (0 36) 13.6%128	
Día	Media (ng/mL)	Std Dev	Media (ng/mL)	Std Dev	Media (ng/mL)	Std Dev	Media (ng/mL)	Std Dev
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.08	0.79	0.40	0.15	0.30	0.69	0.97	0.25	0.33
025	259	1.13	0.60	0.26	1 78	1.12	1 45	0.96
1	5.83	3.67	1.91	0.25	2.81	0.96	3.78	241
3	3.23	1.84	1.20	0.32	2 38	1.09	2.73	1.38
7	2.55	0.61	1.02	0.28	2.47	1.36	1.86	0.73
14	1.64	0.65	1.45	0.39	1 23	0.31	1.21	0.10
21	0.99	035	073	0.22	0.72	0.31	0.60	0.17
28	3.43	0.92	0.46	0.11	0.46	0.04	022	0.18
35	7.28	2.10	3.24	2.22	0.25	0.05	0.00	0.00
42	3.06	0.94	6.96	2.45	0.25	0.07	0.00	000
49	1.50	0.52	5.63	1.38	0.38	0.09	0.00	0.00
56	0.60	0.17	2.63	1.03	1.25	0.50	0.00	0.00
63	0.11	0.12	0.56	0.18	275	0.82	0.00	0.00
70	0.03	0.06	0.26	0.14	3.64	1.33	0.00	0.00
77	0.00	0.00	0.00	0.00	3.16	1.54	0.00	0.00
84	0.00	0.00	0.00	0.00	1.53	0.83	0.00	0.00
91	0.00	0.00	0.00	0.00	0 78	035	0.00	0.00
98	0.00	0.00	0.00	0.00	0.35	0.16	0.00	0.00
105	0.00	0.00	0.00	0.00	0.14	0.22	0.00	0.00
112	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
119	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

ES 2 616 296 T3

126	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
133	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
140	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
147	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
154	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
161	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.08
168	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.13
175	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.18	0.28
182	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.47	0.53
196							1.44	0.34
210							1.71	0.72
217							1.25	0.48
224							0.93	0.47
231							0.62	0.24
238							0.31	0.15
245							0.18	0.16
252							0.12	0.15
259							0.00	0.00

5 La figura 17 representa las concentraciones en plasma resultantes de un estudio ocular *in vivo* de 8 meses en conejos dosificados por vía intravítrea con 5 mg de micropartículas de PLGA que contienen 15% en peso de pegaptanib. Es de destacar la ausencia de una liberación de ráfaga grande común a las formulaciones de PLGA que contienen compuestos solubles en agua o hidrófilos. Los niveles en plasma sanguíneo se controlaron como un marcador sustituto para las concentraciones vítreas basadas en la farmacocinética establecida de pegaptanib de sodio.

10 La figura 17 ilustra que las cuatro formulaciones ensayadas tenían una baja liberación de ráfaga *in vivo* seguida por un período de mantenimiento de los niveles en plasma sanguíneo. El análisis de liberación *in vitro* de estas formulaciones indicó perfiles de liberación similares para las tres formulaciones de ensayo que eran predictivos del rendimiento *in vivo*. La figura 17 ilustra que las cuatro formulaciones ensayadas tenían perfiles de liberación *in vivo* que están bien correlacionados con los perfiles de liberación *in vitro* para clasificar la ráfaga y la duración de la liberación.

15 Las curvas de concentración en plasma demuestran una liberación de ráfaga controlada que se predijo bien mediante análisis de liberación *in vitro*. El análisis bioanalítico reveló que la concentración en plasma sanguíneo de pegaptanib se mantuvo durante un período de varios meses.

Tabla 10

Formulación	Descripción	Dosis (ug)	AUC _{tot} ng*hr/mL	F _{rel} *	Ráfaga <i>in vitro</i>	Ráfaga <i>in vivo</i>
	Líquido	141	4427	100%		
093-023	5050-5A	128	3924	98%	11.9%	21.1%
093-051	6535-3A	133	3974	96%	3.4%	6.9%
077-189	7525-4A	151	3449	73%	5.2%	10.2%
093-041	PLA 0.36	128	2573	64%	16.2%	13.7%

Ejemplo 11

Liberación *in vivo* de micropartículas cargadas con pegaptanib

(Formulaciones 079-089 y 079-102)

- 5 Los solicitantes evaluaron las propiedades de liberación *in vivo* de las micropartículas cargadas con pegaptanib. A los solicitantes se les administró microesferas de poli (lactida-co-glicolida) (PLGA) cargadas con pegaptanib, formadas por el proceso como se establece en el ejemplo 1, por vía intravítrea en conejos blancos Nueva Zelanda y muestras de plasma se recogieron en diversos puntos de tiempo de 2 horas a 28 días como se establece en la Tabla 11. Esta evaluación demostró la viabilidad de suministrar pegaptanib durante un periodo de aproximadamente un mes o más de una formulación de liberación sostenida basada en polímero (PLGA).
- 10

Tabla 11

Grupo	Número de puntos de tiempo	Número de animales/punto de tiempo	Número total de animales
Inyección intravítrea de microesferas	6	3	18
Control inyección intravítrea de microesferas de blanco	2	3	6
Control inyección intravítrea de 50 µL de cloruro de sodio al 0.9%	2	3	6
Número total de animales			30

Materiales y métodos

- 15 Las formulaciones de las microesferas de PLGA 079-089 y 079-102 se prepararon como se indica en el ejemplo 1 anterior y se mezclaron para proporcionar material suficiente para la dosificación de animales. Se suspendieron microesferas que contenían pegaptanib al 15% sobre una base en porcentaje en peso en vehículo de inyección de PBS que contenía 0.02% de surfactante a una concentración de 100 mg de microesferas por mililitro. Las formulaciones de microesferas de PLGA cargadas con pegaptanib se administraron mediante inyección intravítrea (IVT) en conejos blancos Nueva Zelanda. Las microesferas de placebo se dosificaron de una manera idéntica en el control. Se recogieron muestras de plasma sanguíneo en diversos puntos de tiempo, de 2 horas a 28 días como se indica en la Tabla 10. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su análisis. Las muestras se analizaron para la concentración de pegaptanib mediante un ensayo de Hibridación-PCR dual como se indica en el ejemplo 14. (véase la Publicación de Solicitud de Patente No. WO 2006/012468, que se incorpora en este documento como referencia en su totalidad).
- 20

25 Animales

Se utilizaron conejos blancos Nueva Zelanda adultos de sexo femenino, que pesaban aproximadamente 2.5-4.0 kg. Los grupos se resumen en la Tabla 11. El programa de tratamiento se resume en la Tabla 12.

Programa de tratamiento

Tabla 12

Grupo	Artículo de prueba	Ruta	Puntos de tiempo	Número de ojos/puntos de tiempo	Número de animales/ puntos de tiempo	Número total de animales
Grupo 1	Microesferas de pegaptanib	Intravítreo	2 horas, 1, 5, 9, 14, 28 días	6	3	18
Grupo 2	Microesferas en blanco	Intravítreo	1, 9 días	6	3	6

Metodología Experimental

5 Se midió la presión intraocular en cada animal antes de la anestesia utilizando un tonómetro de aplanación portátil (Tonopen™). Los animales fueron pesados y anestesiados con ketamina/xilazina administrada por vía intramuscular. Se administró tropicamida® a cada ojo antes del examen oftálmico. Con el conejo en decúbito lateral derecho, el ojo izquierdo fue anestesiado tópicamente con solución de proparacaína al 0.1%.

10 Se inyectó un volumen de 50 µL del artículo de ensayo por vía intravítrea, utilizando una jeringa de insulina de 500 µL equipada con una aguja de 29G, media pulgada u otro dispositivo de tamaño apropiado. Para las inyecciones intravítreas, la aguja se insertó 1-2 mm posterior al limbo en el cuadrante superotemporal. El bisel se mantuvo en una posición anterior y la aguja avanzó hacia el vítreo medio. Después de la inyección, se administró un ungüento antibiótico (antibiótico triple o equivalente) al ojo. El procedimiento se repitió en el ojo derecho. Se registraron observaciones, incluyendo, pero no limitadas a, fugas de material de ensayo del sitio de inyección.

15 Se recogió sangre entera (500 µL) de la vena lateral del oído. Para los animales del Grupo 1 (punto de tiempo, día 28), se recogieron muestras de sangre en los siguientes puntos de tiempo: 2 y 6 horas, 1, 3, 5, 9, 14 y 21 días, además del punto de tiempo terminal.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando Graph Pad Prism. Las muestras se analizan mediante ajuste de curva de 4 parámetros que se ajustan a los parámetros estadísticos apropiados.

20 Resultados

25 Las concentraciones en plasma resultantes de un estudio de distribución ocular *in vivo* de 28 días en conejos dosificados por vía intravítrea con 5 mg de micropartículas de PLGA que contienen 15% en peso de pegaptanib se muestran en la Tabla 13 y la figura 12. Los resultados muestran que las micropartículas tienen una liberación de ráfaga baja. No existe una liberación de ráfaga grande, común a las formulaciones de PLGA que contienen compuestos solubles en agua o hidrófilos. Además, los niveles de concentración en plasma de pegaptanib se miden a un nivel relativamente constante entre 0.05-0.4 nM durante el periodo de estudio de 28 días con respecto a una dosis equivalente de pegaptanib líquido IVT, indicando que se logra una liberación sostenida de pegaptanib en el vítreo.

30 Se sabe en la técnica que la modificación de la composición de polímeros de una formulación de micropartículas de liberación sostenida afecta la velocidad de descomposición del polímero *in vivo* y por lo tanto afecta las características de liberación de la formulación de micropartículas. Por lo tanto, la demostración de una duración de liberación de un mes de una formulación de microesferas *in vivo* indica que es factible una duración de liberación de más de un mes a partir de una formulación de microesferas *in vivo*.

Tabla 13

Concentración en plasma de pegaptanib después de la inyección intravítrea					
Días	Microesfera de pegaptanib		Días	Pegaptanib líquido	
	Conc (nM)	SD		Conc (nM)	Desv. Est.
0.08	0.055	0.078	0.08	0.051	0.05
0.25	0.142	0.200	0.25	0.436	0.12
1	0.126	0.065	1	1.861	0.06
4	0.137	0.067	5	1.476	0.26
7	0.080	0.014	8	0.941	0.04
11	0.051	0.005	11	0.539	0.21
16	0.069	0.016	15	0.451	0.13
19	0.138	0.070	19	0.241	0.06
23	0.362	0.203	23	0.219	0.09
26	0.423	0.273	28	0.088	0.02
28	0.415	0.271			

Ejemplo 12

Perfil de liberación de micropartículas de pegaptanib

5 (Agua en aceite en agua)

La Tabla 14 muestra las propiedades de las micropartículas de pegaptanib que se prepararon como se indica en el ejemplo 2. Los perfiles de liberación *in vitro* de las micropartículas de pegaptanib se determinaron mediante el proceso como se indica en el ejemplo 7

10 Los perfiles de liberación de las micropartículas de la Tabla 14 se muestran en la figura 10. La figura 10 es un gráfico que representa los perfiles de velocidad de disolución *in vitro* que demuestra la cinética de liberación de control a partir de microesferas de pegaptanib-PLGA.

Tabla 14

Descripción	Rendimiento	EYE001 Carga del núcleo (% p/p)	% Eficiencia de encapsulación	Tamaño de partícula	Morfología superficial
EYE001 50:50 PLGA	65.78%	7.09 ± 0.84	46.14 ± 5.5	<10 µm	Suave
EYE001 50:50 PLGA	66.02%	7.05 ± 0.07	47.09 ± 0.45	<10 µm	Suave
EYE001 50:50 PLGA	66.28%	8.22 ± 0.09	52.8 ± 0.54	NT	NT
Placebo 50:50 PLGA	64.05%	n/a	n/a	<10 µm	Suave

Descripción	Rendimiento	EYE001 Carga del núcleo (% p/p)	% Eficiencia de encapsulación	Tamaño de partícula	Morfología superficial
EYE001 50:50 PLGA	56.49%	9.02 ± 0.11	59.08 ± 0.69	<10 µm	Suave
Placebo 50:50 PLGA	64.10%	n/a	n/a	<10 µm	Suave
EYE001 50:50 PLGA	87.01%	7.70 ± 0.46	51.06 ± 3.04	<10 µm	Suave

Los resultados del análisis de liberación *in vitro* se representan en la figura 10. La figura 10 muestra las propiedades de liberación de micropartículas formadas por el proceso w/o/w como se indica en el ejemplo 2. Los resultados mostrados en la figura 10 demuestran las propiedades de liberación sostenida de las micropartículas de la presente invención. Los resultados también demuestran que las micropartículas de la presente invención pueden ser diseñadas selectivamente para controlar la liberación de un agente biológicamente activo durante un periodo de tiempo deseado. La preparación de microesferas con diversos polímeros demostró que la liberación *in vitro* de pegaptanib se puede extender.

Ejemplo 13

10 Inhibición con pegaptanib de la expresión del factor de tejido inducido por VEGF en células HUVEC

Las microesferas de pegaptanib se prepararon como se indica en el ejemplo 1 anterior. Las microesferas se analizaron para determinar si pegaptanib mantenía su eficacia después de la liberación de las microesferas.

15 Las células HUVEC se sembraron a 1.5×10^5 células/pozo en medio completo (Cascade Biologics Medium 200, suplementado con Suplemento de Crecimiento Suero Bajo y Penicilina, Estreptomocina y Anfotericina B (PSA)) en placas de 24 pozos y se dejaron unir durante la noche en una incubadora a 37°C/CO₂ al 5%. Dieciséis horas más tarde, se eliminó el medio completo y se lavaron las células una vez con medio al 1% (Cascade Biologics Medium 200, suplementado con suero fetal bovino al 1% y PSA). A continuación, las células se privaron del medio al 1% durante 4 horas en una incubadora a 37°C/CO₂ al 5%. Durante la inanición, se prepararon controles de ensayo y muestras. Los controles de ensayo incluyeron 1% de medio solo (control cero), medio al 1% con VEGF de 12.5 ng/mL (control de inducción de VEGF) y medio 1% con pegaptanib a 10 nM (control de pegaptanib). Las muestras de microesferas de ensayo se prepararon a una concentración de 10 nM en medio al 1% con VEGF (12.5 ng/mL). Después de 4 horas de inanición, se eliminó el medio y se adicionaron las muestras de ensayo preparadas a los respectivos pozos. Todos los controles y muestras de ensayo se hicieron por duplicado (2, pozos cada uno). Las células se trataron durante 1 hora en una incubadora a 37°C/CO₂ al 5%. Después de 1 hora de incubación, se retiró el medio y las células se lavaron con PBS 1X estéril. A continuación, las células se lisaron con solución reguladora de lisis RLT/βME (Qiagen). Las células lisadas se recogieron en tubos estériles y se almacenaron a -80°C o se utilizaron inmediatamente para el aislamiento de ARN total. El aislamiento de ARN se realizó utilizando el protocolo Qiagen RNeasy®. Se hizo ADNc y se cuantificó el gen del factor tisular utilizando un protocolo típico Taqman® Real Time PCR.

30 Los resultados de ensayos de proliferación celular de células endoteliales de venas umbilicales humanas (HUVEC) incubadas con formulaciones EYE001 después de la liberación de micropartículas PLGA se muestran en la figura 11. La figura ilustra que la adición de VEGF al medio aumentó la expresión de Factor Tisular en 9 veces. En presencia de pegaptanib 10 nM, la expresión del Factor Tisular se redujo a los niveles basales. El pegaptanib liberado de microesferas PLGA tuvo un efecto similar en la expresión del Factor Tisular como pegaptanib nativo. Los resultados demostraron así que la bioactividad *in vitro* del pegaptanib no se modificó por el proceso de fabricación de las microesferas y posterior liberación *in vitro*.

Ejemplo 14

Análisis por hibridación-PCR dual de liberación de pegaptanib *in vivo*

Digestión vítrea

40 Se colocan muestras vítreas de microesferas de conejo en tubos de 15 mL y 50 mL y se incuban durante la noche a 37°C. Después de la incubación, se adiciona proteinasa K (20 µL/muestra) y las muestras se incuban durante 2 horas a 65°C. Después de 2 horas, las muestras se enfrían a temperatura ambiente y luego se ponen en hielo. Las

ES 2 616 296 T3

muestras enfriadas están listas para el ensayo de hibridación dual. El plasma no requiere digestión. 1x PBS y no se adiciona SDS a la digestión vítrea

El cóctel de digestión se prepara (por muestra) de la siguiente manera:

1x PBS	500 µL
Cóctel de hialuronidasa	20 µL
Blendzyme III	20 µL
SDS	5 µL
ADNsa	10 µL

- 5 El cóctel de hialuronidasa es una mezcla de 4 hialuronidasas en partes iguales de 5 µL. Cada cóctel de hialuronidasa es una solución de 1 mg/mL en 1xPBS y 1xBSA. Blendzyme (Roche Diagnostics Corporation, Indianápolis, IN); Liberase Blendzymes son mezclas de colagenasa altamente purificada y enzimas neutras de proteasa, formuladas para disociación eficiente, suave y reproducible de tejidos de una amplia variedad de fuentes) como solución de 7 mg/mL en 1xPBS. La proteinasa K se prepara como una solución de 20 mg/mL en 1x PBS.

10 Ensayo de hibridación dual

(Plasma)

- 15 Se prepararon patrones en 1x tejido (tejido de control diluido 1:10). Se adicionaron 165 µL de mezcla de cebadores por muestra en tubos 0.2 de PCR. La mezcla de cebadores se preparó adicionando un cebador de detección 1 µM a solución reguladora de hibridación de manera que la concentración final del cebador de detección en la mezcla requerida fuese de 1 nM. Se adicionaron patrones o muestra (25 µL). Se adicionaron perlas de captura (5 µL). Los tubos de PCR se colocaron entonces en un ciclador térmico y se programaron para que funcionaran a 75°C, durante 15 minutos, 37°C durante 1 hora y luego hasta 25°C. A continuación, las muestras y los patrones se transfirieron de los tubos de PCR a placas de 96 pozos y se transfirieron 180 µL de cada uno.

La placa se hizo funcionar a continuación en un procesador de partículas magnéticas Kingfisher® 96.

- 20 Se prepararon las siguientes placas de 96 pozos:

Placas de 1-96 pozos (100 µL de agua en cada pozo)

Placas de 5-96 pozos (200 µL de solución reguladora de lavado 1x en cada pozo)

- 25 El peine magnético recogió las perlas y las movió de la placa a la placa. Las perlas se lavaron en cada placa dejando atrás cualquier cosa que no estuviera específicamente unida a las perlas. Las perlas se depositaron en la placa de agua al final del análisis. En este punto, la placa estaba lista para ser analizada en Taqman® RT PCR.

Taqman® RT PCR

Se utilizó una placa de 384 pozos. El volumen total en un pozo fue de 10 µL. (Muestra = 4 µL; Cóctel = 6 µL). Se preparó un duplicado para cada muestra en la placa de 96 pozos.

Se preparó el siguiente cóctel por 384 pozos:

H2O	0.4 µL
Mezcla 2xPCR	5 µL
Cebador hacia adelante	0.05 µL
Cebador reverso	0.05 µL
Sonda	0.5 µL

Primero se adicionó el cóctel y después se transfirieron las muestras de la placa de 96 pozos. La placa de 384 pozos se centrifugó en una centrífuga (1000 rpm) durante menos de un minuto. A continuación, la placa se hizo funcionar en Taqman: 50°C, durante 2 min, 95°C, durante 10 min, y luego 40 ciclos de 95°C 15 segundos a 60°C durante 1 min.

5 Análisis de los datos

Al final del análisis, los datos estaban disponibles para la ejecución desde el software SDS. A continuación, estos datos se conectaron en Microsoft Excel y Prism y las concentraciones de las muestras fueron extrapoladas a partir de una curva estándar.

10 Los resultados de un estudio de liberación *in vivo* de 28 días de pegaptanib a partir de micropartículas de PLGA se discuten en el ejemplo 11. La figura 12 es un gráfico que muestra la concentración de pegaptanib en muestras de plasma de conejos dosificados intravítreo o subconjuntival con 5 mg de micropartículas PLGA que contienen un 15% en peso de pegaptanib.

Ejemplo 15

Régimen de dosificación de macropartículas de pegaptanib de liberación retardada

15 Etapa 1. Administrar una formulación farmacéutica de 100 µL que comprende un bolo de aproximadamente 0.3 mg de pegaptanib libre en solución y micropartículas de PLGA de liberación retardada que encapsulan aproximadamente 35 mg de pegaptanib.

Etapa 2. Las microesferas tendrán una ráfaga inicial de aproximadamente 5-30% de pegaptanib y luego se liberarán a cierta velocidad constante durante un período predefinido.

20 Etapa 3. Al final del perfil de liberación de microesferas, se producirá una segunda ráfaga liberando un segundo bolo de pegaptanib que lleva la concentración vítrea a aproximadamente 0.3 mg.

Etapa 4. Cuatro semanas después de la ráfaga, tiempo durante el cual se eliminan los metabolitos poliméricos, se administrará una nueva inyección de pegaptanib/micropartícula como se describe en la Etapa 1.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de liberación sostenida para administración intravítrea que comprende una pluralidad de micropartículas suspendidas en un portador, en donde el portador comprende un surfactante, en donde
- 5 dichas micropartículas liberan un agente biológicamente activo que comprende un aptámero anti-VEGF durante un período de al menos 1 mes;
- dichas micropartículas tienen un diámetro medio inferior a 45 μm ;
- dichas micropartículas comprenden un material polimérico que incorpora una carga de núcleo de al menos 7% en peso de dicho aptámero anti-VEGF;
- 10 dichas micropartículas liberan dicho aptámero anti-VEGF en una ráfaga inicial de menos del 15% en peso de dicha carga de núcleo dentro de las 24 horas de la administración; y
- dichas micropartículas son inyectables a través de una aguja de calibre 27 o más estrechas cuando están suspendidas en el portador apropiado para la administración intravítrea.
2. La composición de la reivindicación 1, en donde las micropartículas son inyectables a través de una aguja de calibre 29 o más estrecha.
- 15 3. La composición de la reivindicación 1, en donde las micropartículas tienen una carga de núcleo de al menos 10% en peso.
4. La composición de la reivindicación 1, en donde las micropartículas presentan una ráfaga de 24 horas de menos del 10% en peso de dicha carga de núcleo.
5. La composición de la reivindicación 1, en donde el aptámero anti-VEGF es pegaptanib.
- 20 6. La composición de la reivindicación 5, en donde el pegaptanib se libera de las micropartículas a una velocidad que varía de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 10 microgramos (μg) por día.
7. La composición de la reivindicación 1, en donde el portador incluye un surfactante seleccionado del grupo que consiste en poli(alcohol vinílico), carboximetilcelulosa, lecitina, gelatina, poli(vinilpirrolidona), ésteres de ácido graso polioxietilenorbitano, dodecilsulfato de sodio y manitol.
- 25 8. Una composición de liberación sostenida que comprende una pluralidad de micropartículas suspendidas en un portador, comprendiendo dichas micropartículas un material polimérico que incorpora una carga de núcleo de al menos 7% en peso de pegaptanib y liberan pegaptanib durante un período de al menos 1 mes a una ráfaga inicial de menos del 15% en peso de dicha carga de núcleo dentro de las 24 horas de la administración, en donde el pegaptanib se libera de las micropartículas a una velocidad que varía de aproximadamente 0.01 a aproximadamente
- 30 10 microgramos (μg) por día y en donde el portador comprende un surfactante.
9. La composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 8, en donde las micropartículas liberan pegaptanib durante un período de al menos 3 meses.
10. La composición de la reivindicación 6 o la reivindicación 8, en donde el pegaptanib está presente en una cantidad suficiente para proporcionar concentraciones en plasma de pegaptanib de aproximadamente 0.05-0.40 nM
- 35 durante un período de administración de al menos 3 semanas.
11. La composición de la reivindicación 10, cuando depende de la reivindicación 6, en donde las micropartículas se suspenden en solución de pegaptanib.
12. La composición de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el pegaptanib se libera de las micropartículas a una velocidad que varía de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 6 μg por día.
- 40 13. Una composición que comprende una pluralidad de micropartículas que contiene una carga de núcleo de un agente biológicamente activo que comprende un aptámero anti-VEGF, suspendido en un portador, para su uso por inyección en el vítreo de una patente para tratar o inhibir una enfermedad ocular, en donde dicha composición libera dicho aptámero durante un período de al menos 1 mes con una ráfaga inicial de 24 horas de menos del 15% en peso de dicha carga de núcleo de dichas micropartículas y en donde dicho portador comprende un surfactante.
- 45 14. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para uso en el tratamiento o inhibición de una enfermedad ocular seleccionada del grupo que consiste en degeneración macular, neovascularización del disco óptico, neovascularización del iris, neovascularización retinal, neovascularización

coroidea, neovascularización corneal, neovascularización vítrea, glaucoma, catarata, pterigión, edema macular, retinopatía vascular, degeneración retiniana, uveítis, enfermedades inflamatorias de la retina y vitreorretinopatía proliferativa.

- 5 15. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el pegaptanib se libera a una velocidad suficiente para alcanzar concentraciones vítreas de pegaptanib de aproximadamente 10-30 ng/mL.

Figura 1

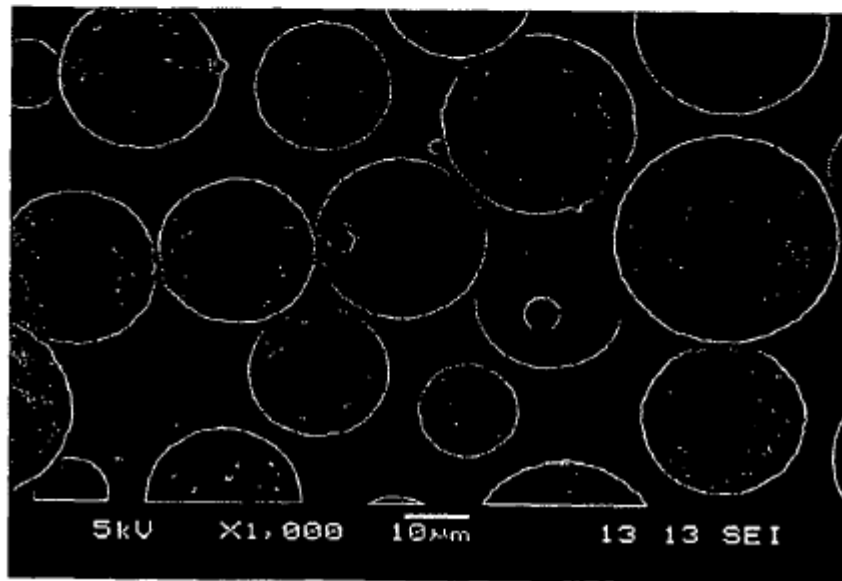
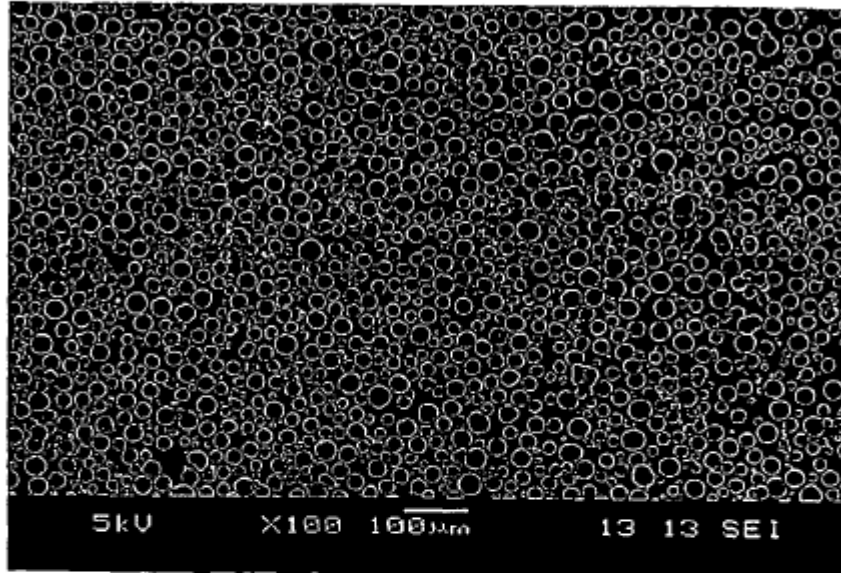


Figura 2

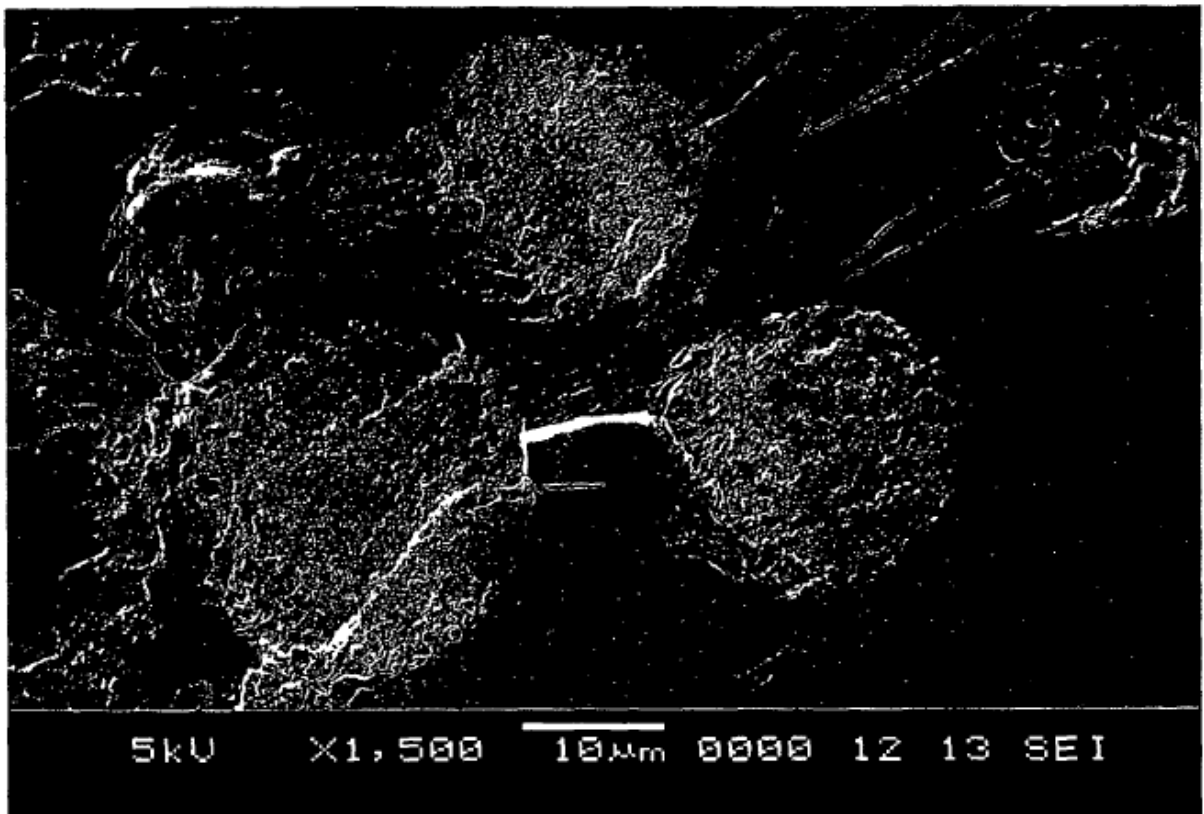


Figura 3

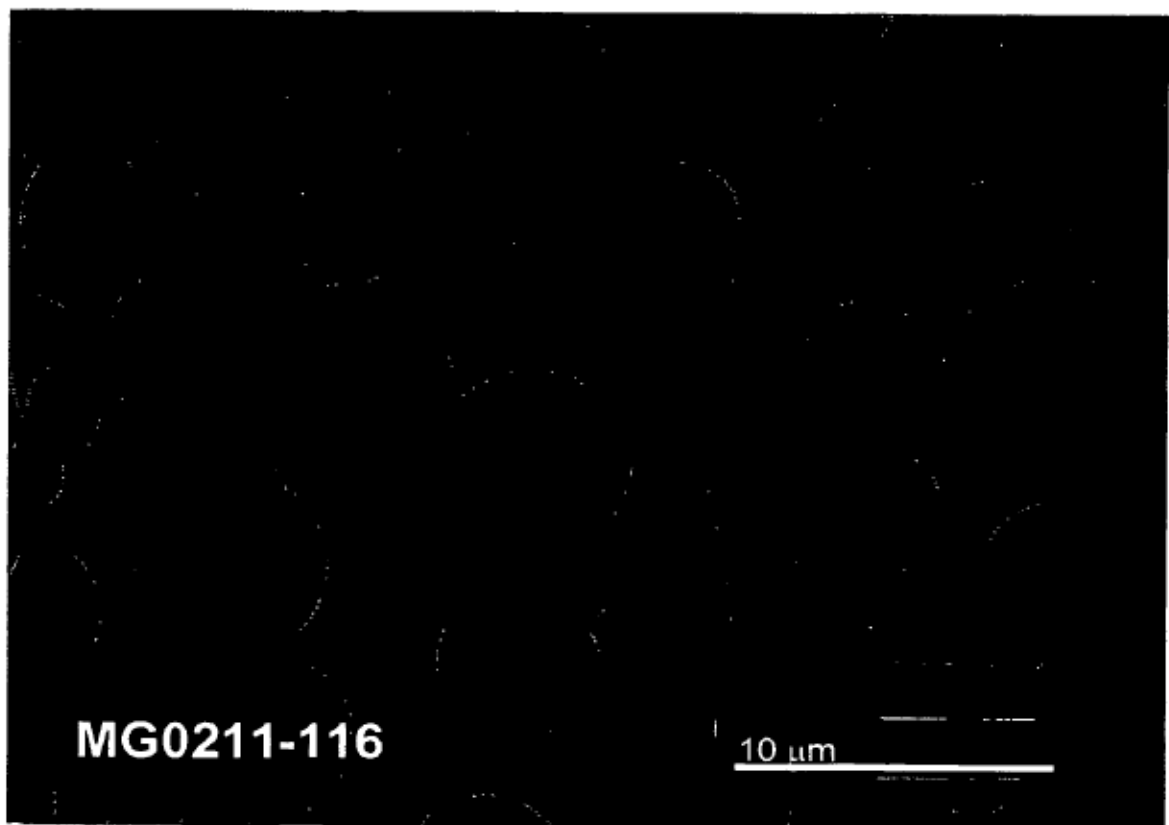


Figura 4

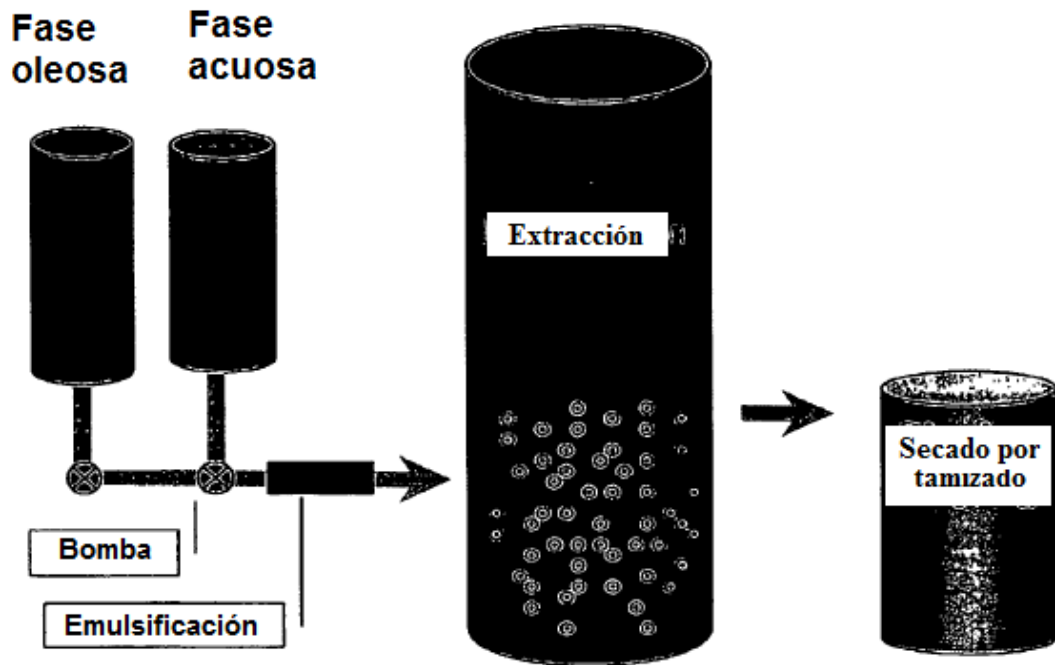


Figura 5

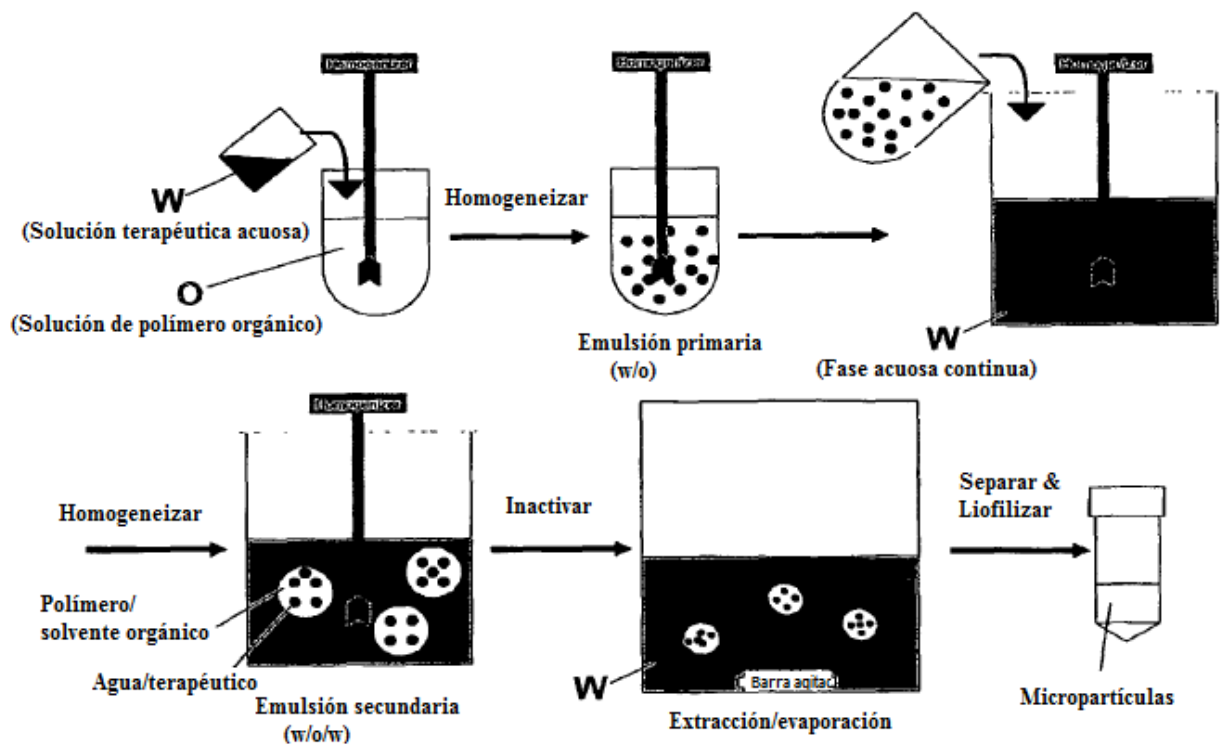


Figura 6

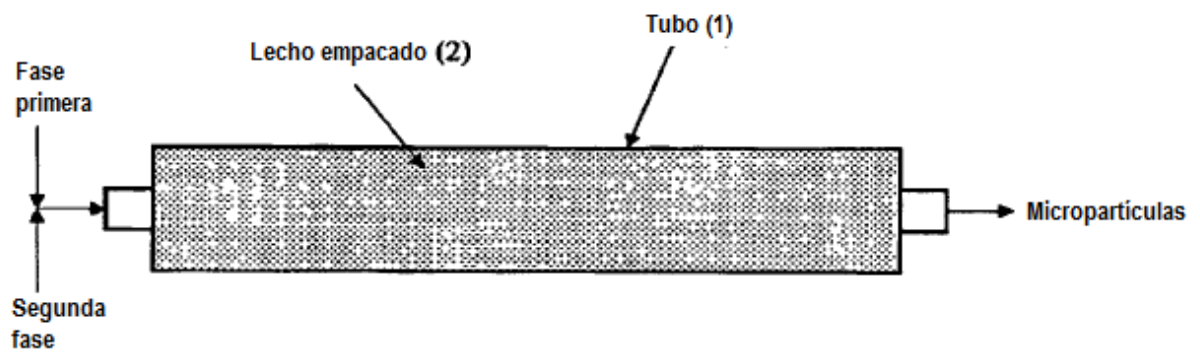


Figura 7

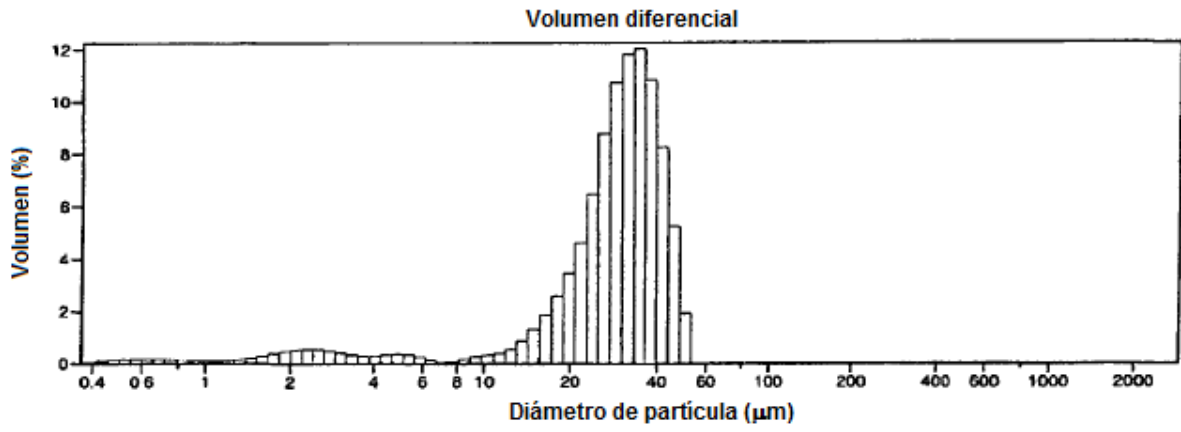
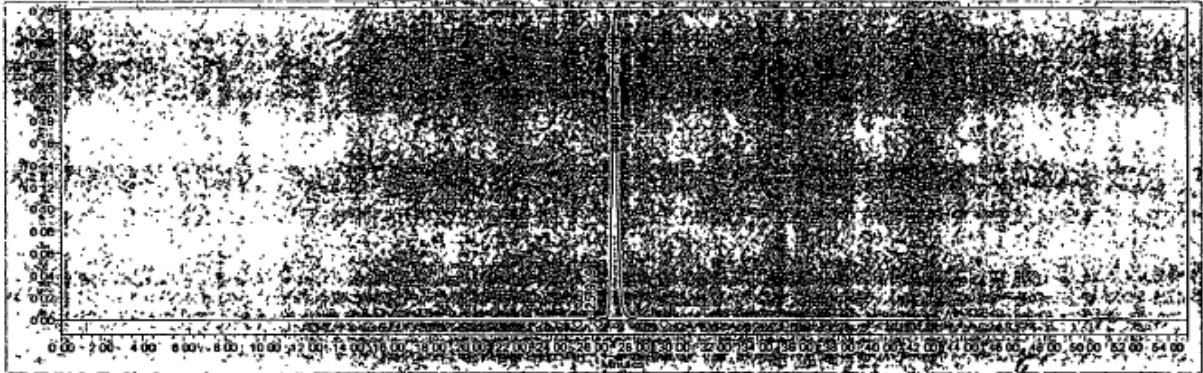


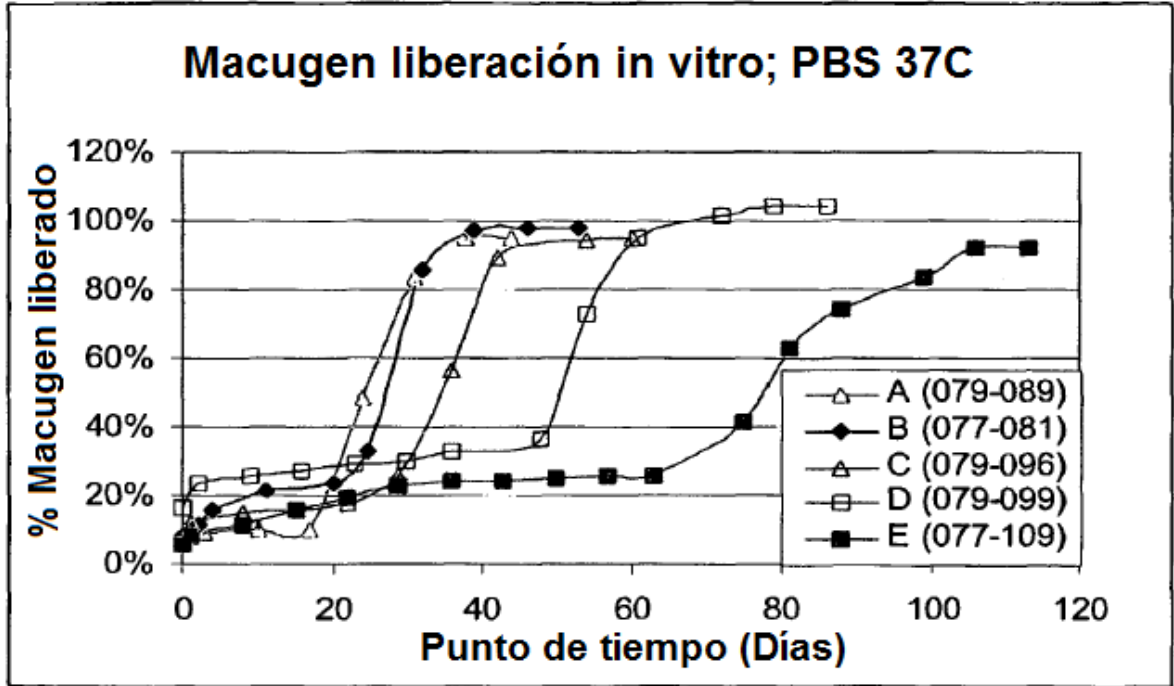
Figura 8



E (077-109)	50:50- IV baja
--------------------	-----------------------

Nombre de pico	RT	Área	% de Área
Pegaptanib	27.092	4446756	99.18%

Figura 9



	Polimero Lac: Gly	Carga del núcleo (conjugado p/p)
A	50:50-2.5A	12.2 %
B	50:50-3A	15.1 %
C	65:35-2A	14.6 %
D	75:25-2A	13.8 %
E	50:50-IV baja	12.3 %

Figura 10

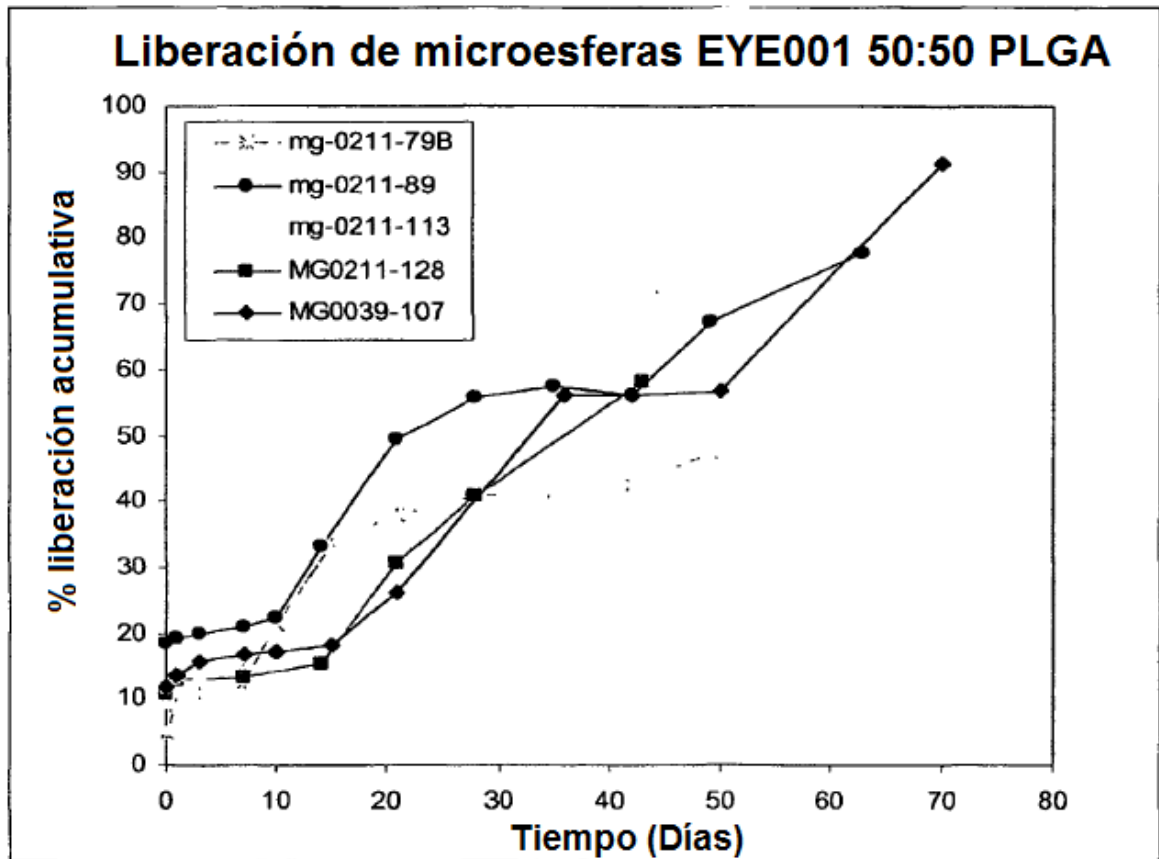


Figura 11

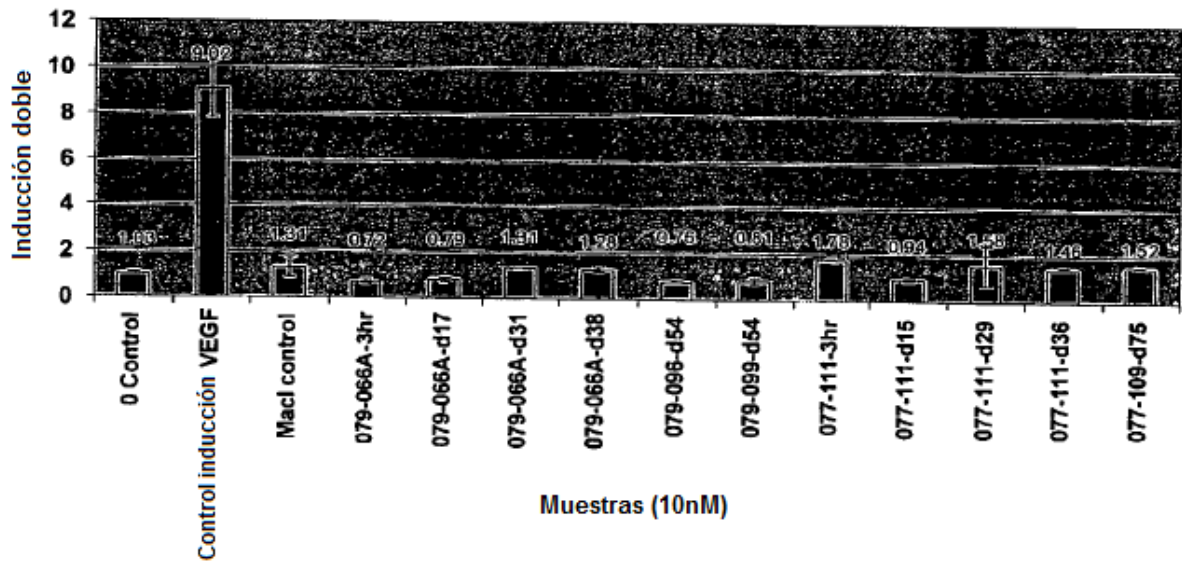


Figura 12

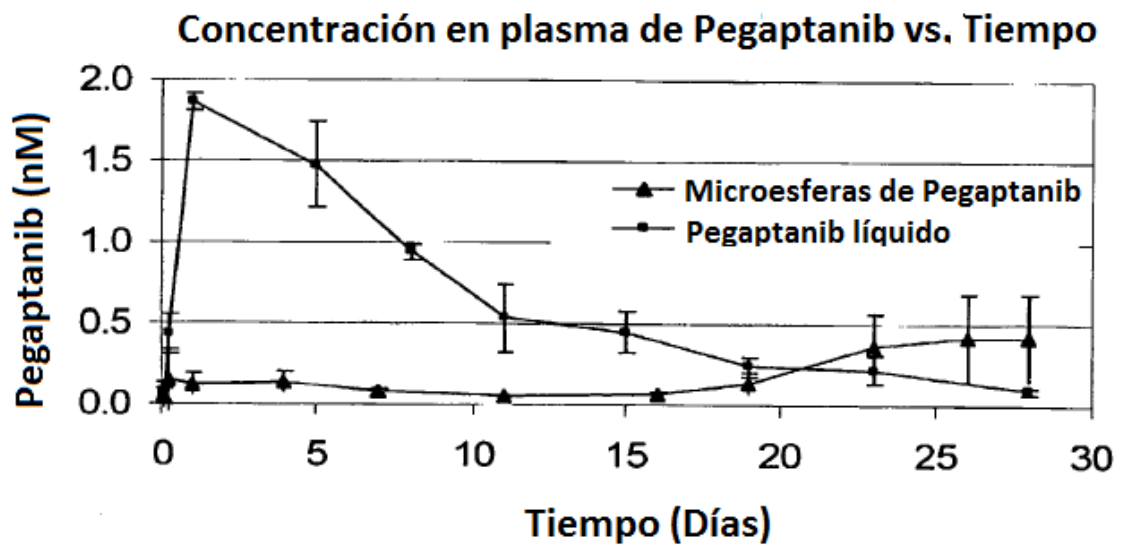


Figura 13

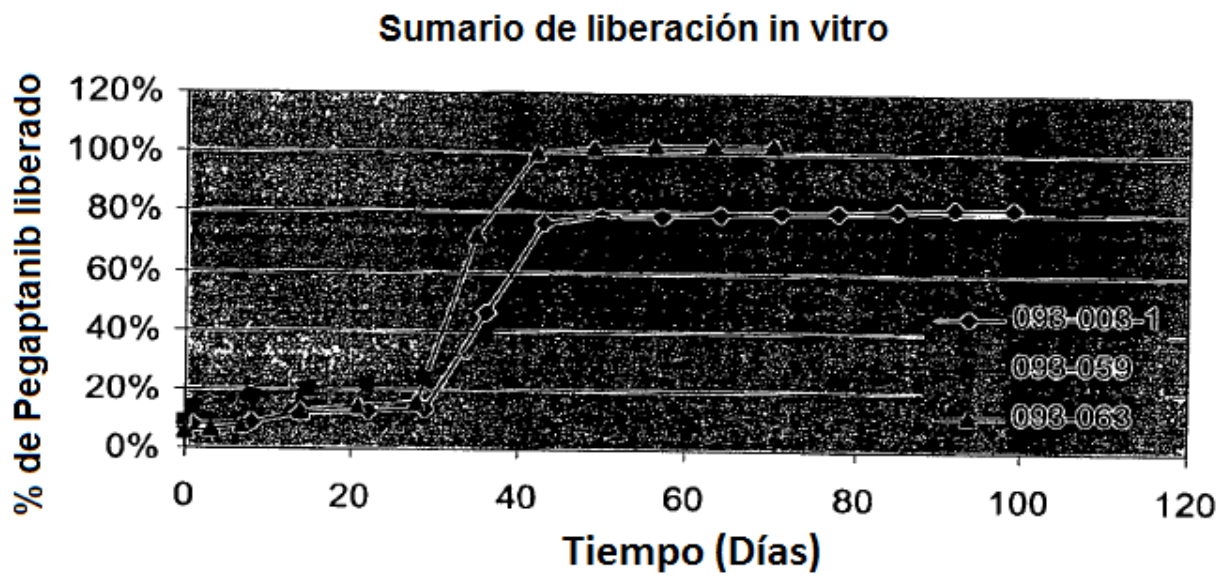


Figura 14

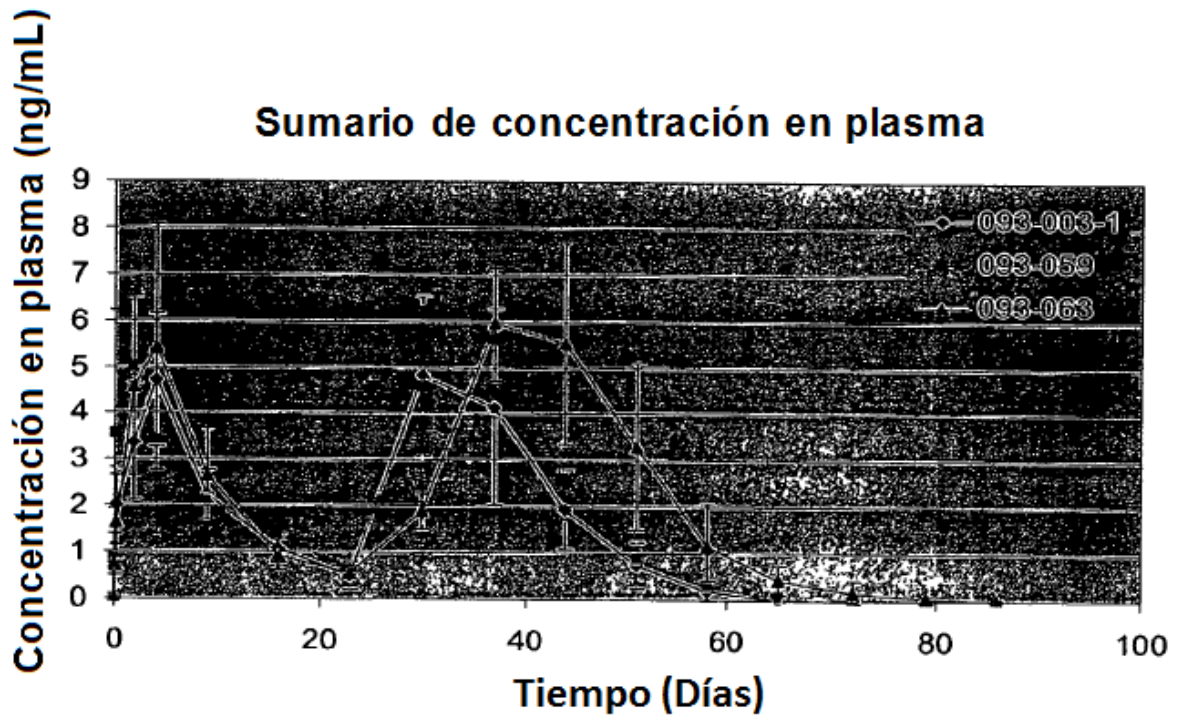
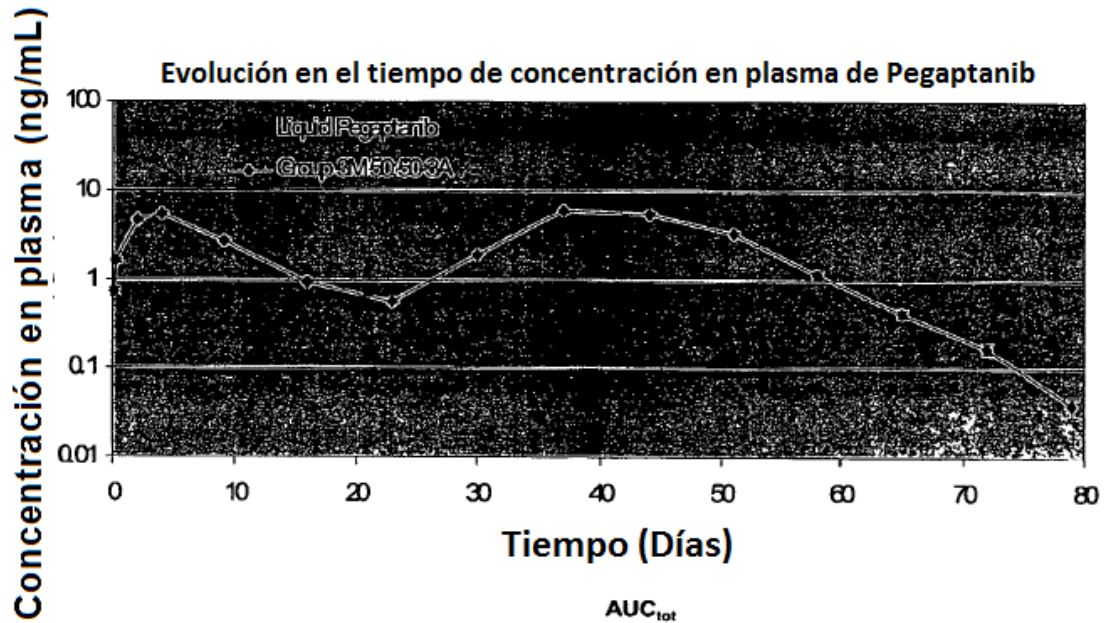


Figura 15



Grupo	Dosis (ug)	AUC _{tot} ng*hr/mL	F _{rel}
Líquido	141	4427	100%
50:50-3A	136	4429	104%

Figura 16

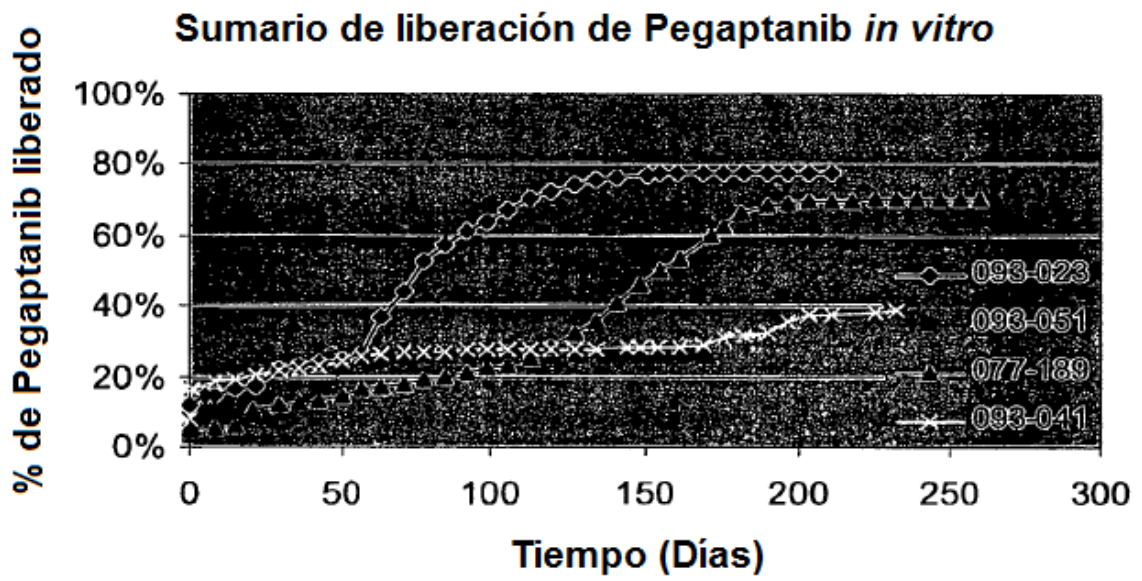


Figura 17

