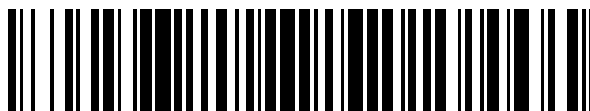


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 699 249**

51 Int. Cl.:

A61K 31/573 (2006.01)
A61K 31/58 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/10 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 9/19 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.01.2010 E 14180435 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.08.2018 EP 2813229**

54 Título: **Sistema de suministro de fármaco oftálmico que contiene fosfolípido y colesterol**

30 Prioridad:

10.08.2009 US 538435

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

08.02.2019

73 Titular/es:

TAIWAN LIPOSOME CO., LTD. (50.0%)
11F.-1, No. 3, Yuanqu Street, Nangang District
Taipei City 115, TW y
TLC BIOPHARMACEUTICALS, INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

SHIH, SHEUE-FANG;
CHANG, PO-CHUN;
TSENG, YUN-LONG;
GUO, LUKE. , S., S., y
HONG, KEELUNG

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 699 249 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

Sistema de suministro de fármaco oftálmico que contiene fosfolípido y colesterol.

5 **Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud US nº 12/538.435, presentada el 10 de agosto de 2009. El contenido de la solicitud se incorpora en su totalidad como referencia en la presente memoria.

10 **Antecedentes de la invención**

Debido a que los ojos son órganos encapsulados con una circulación sanguínea lenta, la mayoría de agentes terapéuticos no puede alcanzarlos en cantidades eficaces al administrarlos sistémicamente.

15 Se han contemplado sistemas de suministro de fármaco oftálmico tópicos (por ejemplo, Jafari *et al.*, Drug Delivery 5(4):227-238, 1998).

Con el fin de resolver este problema, se ha adoptado la inyección intravítrea para la administración oftálmica de agentes terapéuticos (por ejemplo, Abrishami *et al.*, Retina 29(5):699-703, 2009; documento nº US 2008/0118500; García-Arumi *et al.*, Ophthalmologica 211(6):344-350, 1997; Barza *et al.* Investigative Ophthalmology and Visual Science 28(5):893-900, 1987; documento nº TR 1997 01683), en particular en los extremos posteriores de los ojos (por ejemplo, retina y corioide). Debido a que los agentes terapéuticos típicamente permanecen en los ojos durante un periodo limitado, se requieren inyecciones intravítreas repetidas para conseguir el efecto terapéutico deseado. Sin embargo, la administración frecuente utilizando este abordaje invasivo resulta altamente indeseable.

Existe una necesidad de un sistema de suministro de fármaco que prolongue la vida útil de un agente terapéutico en los ojos de manera que se reduzcan los tiempos de inyección intravítrea requeridos en un tratamiento.

30 **Sumario de la invención**

La presente invención se basa en el inesperado resultado de que un sistema de suministro de fármaco que contiene fosfolípido y colesterol prolonga significativamente la vida útil de Avastin (un anticuerpo específico para el factor de crecimiento endotelial vascular) en los ojos.

35 De acuerdo con lo anterior, la presente invención se refiere a un sistema de suministro de fármaco que contiene un agente terapéutico (por ejemplo, proteína, ácido nucleico o molécula pequeña) y un vehículo de suministro que incluye fosfolípido y colesterol.

40 Un sistema de suministro de fármaco según la presente invención comprende:

un vehículo de suministro que contiene un fosfolípido y colesterol, en el que el fosfolípido es una mezcla de un primer fosfolípido y un segundo fosfolípido, siendo el primer fosfolípido, DOPC, POPC, SPC o EPC, y siendo el segundo fosfolípido, PEG-DSPE o DOPG, en el que el porcentaje molar de colesterol en el vehículo de suministro es de 10-33; y

50 y un agente terapéutico para el ojo que es un antagonista específico para VEGF, o un corticoesteroide soluble en agua, en el que dicho antagonista específico para VEGF es un anticuerpo específico para VEGF o un receptor de VEGF soluble,

en el que 50% a 90% del agente terapéutico se encuentra en forma no asociada y la proporción en peso de fosfolípido y colesterol en combinación respecto al agente terapéutico para el ojo es de 5-80 a 1, y

55 con la condición de que cuando el primer fosfolípido sea DOPC y el segundo fosfolípido sea DOPG, el porcentaje molar de DOPG en el vehículo de suministro es de 3 a 18,75 y el porcentaje molar de DOPC en el vehículo de suministro es de 29,5 a 90.

60 El porcentaje molar de colesterol en el vehículo de suministro (por ejemplo, en forma liofilizada) es de 10% a 33%, particularmente de 20% a 25%. El vehículo de suministro y el agente terapéutico pueden estar mezclados o estar separados.

65 En el sistema de suministro de fármaco de la presente invención, 50% a 90% del agente terapéutico se encuentra en forma no asociada y la proporción en peso de fosfolípido y colesterol en combinación respecto al agente terapéutico es de 5-80 a 1. En un ejemplo, el agente terapéutico es un anticuerpo contra el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y 60% a 90% del anticuerpo se encuentra en forma no asociada y la proporción en peso de fosfolípido y colesterol en combinación respecto al anticuerpo es de 5-40 a 1. En otro

ejemplo, el agente terapéutico es un corticoesteroide.

El fosfolípido en el vehículo de suministro descrito en la presente memoria es una mezcla de dos fosfolípidos. El fosfolípido es uno de 2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DOPC), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (POPC), fosfatidilcolina de soja (SPC) o fosfatidilcolina de huevo (EPC) mezclado con diestearoilfosfatidiletanolamina-polietilenglicol (PEG-DSPE) o dioleilfosfatidilglicerol (DOPG). En el caso de que el fosfolípido sea una mezcla de DOPC y DOPG, el porcentaje molar del primero es de 29,5% a 90% (por ejemplo, 50% a 80%) y el porcentaje molar del segundo es de 3% a 18,75%. En un ejemplo, el vehículo de suministro contiene DOPC, DOPG y colesterol en una proporción de porcentajes molares de 56,25-72,5: 7,5-18,75:20-25.

La presente descripción da a conocer además un método de suministro de un agente terapéutico en un ojo de un sujeto. El método incluye: (i) proporcionar el sistema de suministro de fármaco descrito anteriormente, que puede encontrarse en forma de suspensión acuosa, e (ii) administrarlo en un ojo de un sujeto que lo necesita mediante, por ejemplo, inyección intravítrea. El sistema de suministro puede prepararse mediante la mezcla de fosfolípido, colesterol y uno o más agentes terapéuticos para formar una mezcla; liofilizar la mezcla; y, antes de la administración, suspensión de la mezcla en una solución acuosa para formar la suspensión acuosa. Alternativamente, se prepara mediante la mezcla de fosfolípido y colesterol para formar una mezcla; liofilización de la mezcla y, antes de la administración, la suspensión de la mezcla junto con uno o más agentes terapéuticos en una solución acuosa para formar la suspensión acuosa.

La presente descripción da a conocer además la utilización de un vehículo de suministro descrito anteriormente en la administración de un agente terapéutico oftálmicamente y en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad oftálmica.

Los detalles de una o más formas de realización de la invención se proporcionan en la descripción, a continuación. Otras características o ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de los dibujos y descripción detallada siguientes de varias formas de realización, y también a partir de las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

En primer lugar, se describen los dibujos.

La figura 1 es un gráfico que representa las concentraciones de Avastin en el humor vítreo los días 7, 21, 28, 35, 41 y 49 después de la inyección intravítrea. Vehículo de suministro de TLC se refiere a un vehículo de suministro que contiene DOPC/Colesterol/DOPG en una proporción 67,5/25/7,5. "*" y "*" se refieren a los puntos temporales, en los que se examinaron 1 y 2 ojos de conejo, respectivamente. Se examinaron 4 ojos de conejo en los demás puntos temporales.

La figura 2 es un gráfico que representa las concentraciones de Avastin en el humor vítreo los días 7, 28, 49, 70, 91 y 112 después de la inyección intravítrea. Vehículo de suministro de TLC se refiere a un vehículo de suministro que contiene DOPC/Colesterol/DOPG en una proporción 67,5/25/7,5. "*" y "*" se refieren a los puntos temporales, en los que se examinaron 2 y 3 ojos de conejo, respectivamente. Se examinaron 4 ojos de conejo en los demás puntos temporales.

La figura 3 es un gráfico que representa las concentraciones de dexametasona sodio fosfato (DSP) en el humor vítreo 2h, 1d, 4d, 8d, 15d y 35d después de la inyección intravítrea. Vehículo de suministro de TLC se refiere a un vehículo de suministro que contiene DOPC/Colesterol/DOPG en una proporción 67,5/25/7,5.

Descripción detallada de la invención

En la presente memoria se describe un sistema de suministro de fármaco ventajoso para la administración oftálmica de por lo menos un agente terapéutico, que, tras la administración, muestra una vida útil prolongada en los ojos, en particular en el humor vítreo.

Vehículo de suministro

Este sistema de suministro de fármaco, descrito en la presente memoria, incluye un vehículo de suministro que contiene fosfolípido y colesterol. El fosfolípido es una mezcla de diferentes tipos de fosfolípido. Entre los ejemplos de fosfolípido para preparar el vehículo de suministro se incluyen fosfatidilcolina de huevo (EPC), fosfatidilcolina de soja (SPC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DOPC), dioleilfosfatidilglicerol (DOPG), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (POPC), diestearoilfosfatidiletanolamina-polietilenglicol (PEG-DSPE) y una mezcla de los mismos.

En un ejemplo, el vehículo de suministro se encuentra libre de ácido graso (es decir, ácido carboxílico con una cola alifática no ramificada larga), lípido catiónico (es decir, lípido portador de una carga positiva neta a pH

fisiológico) y polímero mucoadhesivo (por ejemplo, Carbopol934 P, poloxámero, carbómero y lectina vegetal).

El vehículo de suministro puede prepararse mediante métodos conocidos en la industria farmacéutica. A continuación, se proporciona un ejemplo. Se suspendieron fosfolípido, colesterol y otros componentes, en caso de haber, en agua destilada o en una solución acuosa, formando una suspensión. A continuación, la suspensión se sometió a homogeneización mediante métodos convencionales, por ejemplo, sonicación, agitación o extrusión. Tras esterilizar, la suspensión de vehículo homogeneizado puede introducirse asépticamente en un recipiente y después liofilizarse para formar unos polvos.

10 Agente terapéutico

El agente terapéutico para tratar enfermedades oftálmicas puede mezclarse con el vehículo de suministro descrito anteriormente y administrarse en un ojo de un sujeto. En un ejemplo, el agente terapéutico es un compuesto corticoesteroide. La expresión "compuesto corticoesteroide" se refiere a hormonas esteroideas naturales (incluyendo glucocorticoides) y sus derivados, los cuales son solubles en agua. Entre los ejemplos de corticoesteroide se incluyen, aunque sin limitarse a los mismos, cortisona, hidrocortisona, acetato de hidrocortisona, pivalato de tixocortol, flucinolona, prednisolona, metilprednisolona, prednisona, acetónido de triancinolona, triancinolona, mometasona, amcinónido, budesónido, desónido, fluocinónido, acetónido de fluocinolona, halcinónido, betametasona, betametasona sodio fosfato, dexametasona, dexametasona sodio fosfato, fluocortolona, hidrocortisona-17-butilato, hidrocortisona-17-valerato, dipropionato de aclometasona, valerato de betametasona, dipropionato de betametasona, prednicartrato, clobetasona-17-butilato, clobetasol-17-propionato, caproato de fluocortolona, pivalato de fluocortolona y acetato de fluprednido. En otro ejemplo, el agente es un antagonista de VEGF, que es un anticuerpo específico para VEGF o un receptor de VEGF soluble. El término "anticuerpo" utilizado en la presente memoria se refiere a una inmunoglobulina natural, un fragmento funcional de la misma, tal como Fab, Fab', F(ab)₂ o F(ab')₂ o una inmunoglobulina modificada genéticamente, tal como anticuerpo humanizado, anticuerpo quimérico, diacuerpo y anticuerpo monocatenario.

15 Sistema de suministro de fármaco

El sistema de suministro de fármaco de la presente invención incluye el vehículo de suministro indicado anteriormente y uno o más de los agentes terapéuticos también indicados anteriormente. Puede contener una mezcla de vehículo-fármaco en forma liofilizada. En un ejemplo, la mezcla se prepara mediante suspensión de todos los componentes del vehículo en agua o en una suspensión acuosa para formar una suspensión, la homogeneización de la suspensión, la mezcla de la suspensión homogeneizada con uno o más agentes terapéuticos para formar una mezcla y finalmente la liofilización de la mezcla. En otro ejemplo, la mezcla se prepara mediante suspensión de todos los componentes del vehículo y el agente o los agentes terapéuticos en agua o en una solución acuosa para formar una suspensión, liofilizando después la suspensión para formar una mezcla liofilizada. Puede añadirse un crioprotector (por ejemplo, manitol, sacarosa, trehalosa y lactosa) a la suspensión de vehículo-fármaco durante la liofilización. En el caso de que se utilice manitol, el intervalo preferido de concentraciones es de 0,5% a 5% (por ejemplo, de 0,5% a 2% o 1%). Antes de la administración, la mezcla liofilizada de vehículo-fármaco se resuspende en una solución acuosa, que a continuación puede administrarse en un ojo de un sujeto.

En dicho sistema de suministro de fármaco, 50% a 90% del agente terapéutico se encuentra en forma no asociada. La expresión "agente terapéutico en forma no asociada" se refiere a las moléculas terapéuticas separables mediante filtración de la fracción de fosfolípido/colesterol del sistema de suministro. El porcentaje del agente terapéutico no asociado se determina siguiendo el método descrito en el Ejemplo 7, a continuación.

Opcionalmente, el sistema de suministro de fármaco de la presente invención puede incluir además un portador farmacéuticamente aceptable, es decir, un portador compatible con el agente terapéutico en el sistema y preferentemente apto para estabilizar el agente terapéutico y no perjudicial para el sujeto que debe tratarse.

El sistema de suministro de fármaco anteriormente descrito puede administrarse en un ojo de un sujeto mediante, por ejemplo, inyección intravítrea, para el tratamiento de enfermedades oftálmicas.

Sin entrar en más detalles, se cree que el experto en la materia puede, basándose en la descripción anterior, utilizar la presente invención en la máxima medida posible. Por lo tanto, las formas de realización específicas siguientes deben interpretarse como únicamente ilustrativas, y no limitativas del resto de la exposición en modo alguno. Todas las publicaciones citadas en la presente memoria se incorporan como referencia.

60 **Ejemplo 1: preparación de composiciones que contienen fosfolípido-colesterol para la administración de fármaco en ojos**

Se mezclaron los fosfolípidos DOPC y DOPG con colesterol a diversas proporciones molares (67,5:7,5:25, 72:8:20 y 56,25:18,75:25) para formar mezclas de lípidos. Las mezclas se suspendieron en cloroformo y se secaron bajo vacío en un evaporador rotatorio. Cada una de las mezclas secas se resuspendió en H₂O

desionizada, se homogeneizó con un sonicador con sonotrodo (Misonix Sonicator 3000) y después se esterilizaron utilizando un filtro estéril. Se llevaron asépticamente viales con las mezclas de lípidos esterilizadas, se mezclaron con manitol al 1% y después se liofilizaron. Se determinó la concentración total de los fosfolípidos en cada una de las mezclas liofilizadas mediante un ensayo de fósforo. Antes de la administración en los ojos, se mezcló una cantidad adecuada de una mezcla de lípidos mencionada anteriormente, con una cantidad adecuada de Avastin y se suspendió en una solución acuosa, formando una suspensión acuosa.

Ejemplo 2: utilización de vehículos de suministro que contienen DOPC/PEG-DSPE/Colesterol para la administración de Avastin en ojos

Se prepararon vehículos de suministro que contenían DOPC, PEG-DSPE y colesterol en diversas proporciones molares siguiendo el método descrito en el Ejemplo 1, anteriormente. Se mezcló cada uno de dichos vehículos de suministro con una cantidad adecuada de Avastin para formar suspensiones acuosas.

Se examinó el efecto de los vehículos de suministro mencionados anteriormente en la prolongación de la vida útil de Avastin en ojos, siguiendo el método descrito en Bakri *et al.*, Ophthalmology 114(5):855-859, 2007. Brevemente, se sedaron conejos New Zealand blancos mediante inyección intramuscular de una mezcla que contenía Zoletil (15 mg/ml) y Rompun (7 mg/ml). En ambos ojos de cada conejo se inyectaron intravítreamente 50 µl de Avastin (25 mg/ml) o una de las suspensiones acuosas mencionadas anteriormente (a una dosis de Avastin de 1,25 mg en cada ojo) utilizando una aguja de calibre 30. Se sacrificaron los conejos a los 7 días o a los 21 días de la inyección y rápidamente se enuclearon los ojos. Se aisló el humor vítreo de cada ojo junto con la retina y se determinó la concentración de Avastin mediante ELISA de la manera siguiente. Se recubrió una placa F96 MaxiSorp™ NUNC-IMMUNO con VEGF (10 µg/ml en PBS, pH 7,4, 100 µl/pocillo) a 4°C durante la noche. La placa recubierta con VEGF se lavó con PBS y después se bloqueó con un tampón de bloqueo (leche desnatada al 5% en PBS) a temperatura ambiente durante 1 hora. Las muestras de humor vítreo/retina mencionadas anteriormente se diluyeron en el mismo tampón de bloqueo y los diluyentes resultantes se añadieron a la placa recubierta con VEGF, 100 µl/pocillo. Tras la incubación a temperatura ambiente durante 1 hora, la placa se lavó con Tween-20 al 0,1% y leche desnatada al 0,5% en PBS 5 veces y con PBS durante 5 veces adicionales. A continuación, se añadió a la placa IgG de cabra antihumano marcado con HRP (Jackson ImmunoResearch Lab. Inc.), diluido en el tampón de bloqueo. Tras la incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos, la placa se lavó exhaustivamente. A continuación se añadió a la placa un reactivo que contenía tetrametil bencidina para el revelado del color. Tras un periodo suficiente, se terminó la reacción mediante la adición a cada pocillo de 50 µl de HCl 2 N. Se determinó la absorbancia a 450 nm (DO₄₅₀) de cada pocillo con un lector ELISA. Se utilizaron diversas concentraciones predeterminadas de Avastin (3,125-25 ng/ml) para establecer una curva estándar de Avastin/DO₄₅₀. Se determinó la concentración de Avastin en cada muestra basándose en su valor de DO₄₅₀ en vista de la curva estándar.

Los resultados obtenidos de este estudio se muestran en la Tabla 1, a continuación.

Tabla 1. Concentraciones de Avastin suministrado con vehículos que contienen DOPC/PEG-DSPE/Colesterol en diversas proporciones molares siete días después de la inyección intravítrea

	Concentración de Avastin (µg/ml)
Avastin ^a	247±27
Avastin + DOPC/PEG-DSPE (97/3) ^{*a}	234±21
Avastin + DOPC/CHOL/PEG-DSPE (70/25/5) [*]	632±75
Avastin + DOPC/CHOL/PEG-DSPE (55/40/5) ^{*a}	354±91
* Los números entre paréntesis se refieren al porcentaje molar de fosfolípidos y colesterol ^a Ejemplos de referencia	

Tal como se muestra en la Tabla 1, anteriormente, Avastin permaneció en los ojos durante un periodo de tiempo más largo al coadministrarse con los vehículos que contienen DOPC/PEG-DSPE/colesterol en comparación con Avastin administrado solo. Los resultados indican además que el colesterol resulta esencial para el efecto del vehículo de suministro de ampliación de la vida útil de Avastin en los ojos y el porcentaje molar de PEG-DSPE no afecta a este efecto.

Ejemplo 3: utilización de vehículos de suministro que contienen diversos fosfolípidos para prolongar la vida útil de Avastin en ojos

Se prepararon vehículos de suministro que contenían diversos fosfolípidos y colesterol en diversas proporciones molares siguiendo el método descrito en el Ejemplo 1, anteriormente. Se mezclaron los vehículos con Avastin y las mezclas resultantes se inyectaron en los ojos de conejos New Zealand intravítreamente. 7 o 21 días después de la inyección, se examinaron las concentraciones de Avastin en los ojos de los conejos siguiendo el método descrito en el Ejemplo 2, anteriormente. Los resultados obtenidos de esta manera se muestran en las tablas 2 y 3, a continuación.

Tabla 2. Concentraciones de Avastin suministrado con vehículos que contienen diferentes fosfolípidos y colesterol siete días después de la inyección intravítrea

	Concentración de Avastin (µg/ml)
Avastin ^a	247±27
Avastin + DOPC/CHOL/PEG-DSPE (74,5/25/0,5)*	688±16
Avastin + POPC/CHOL/PEG-DSPE (74,5/25/0,5)*	572±32
Avastin + SPC/CHOL/PEG-DSPE (74,5/25/0,5)*	746
* Los números entre paréntesis se refieren al porcentaje molar de fosfolípidos y colesterol ^a Ejemplo de referencia	

5

Tabla 3. Concentraciones de Avastin suministrado con vehículos que contienen colesterol y diferentes fosfolípidos veintiún días después de la inyección intravítrea

	Concentración de Avastin (µg/ml)
Avastin ^a	37±7
Avastin + DOPC/CHOL/PEG-DSPE (74,5/25/0,5)*	41±6
Avastin + DOPC/CHOL/PEG-DSPE (55/40/5)** ^a	48±9
Avastin + PC_huevo/CHOL/PEG-DSPE (74,5/25/0,5)*	155±64
* Los números entre paréntesis se refieren al porcentaje molar de fosfolípidos y colesterol ^a Ejemplo de referencia	

10 **Ejemplo 4: utilización de vehículos de suministro que contienen fosfolípidos aniónicos para prolongar la vida útil de Avastin en ojos**

15 Se prepararon vehículos de suministro que contenían DOPG, un fosfolípido aniónico, PEG-DSPE o DOPC con o sin colesterol siguiendo el método descrito en el Ejemplo 1, anteriormente. Se mezclaron estos vehículos con Avastin y las mezclas resultantes se inyectaron en los ojos de conejos New Zealand intravítreamente. 7 o 21 días después de la inyección, se examinaron las concentraciones de Avastin en los ojos de los conejos siguiendo el método descrito en el Ejemplo 2, anteriormente.

20 Tal como se muestra en la Tabla 4, a continuación, el vehículo de suministro que contenía el fosfolípido aniónico DOPG condujo a una concentración de Avastin incrementada 7 días después de la inyección en comparación con el vehículo de suministro que no contenía DOPG.

25 Tabla 4. Concentración en humor vítreo de Avastin suministrado con vehículos que contienen fosfolípidos aniónicos siete días después de la inyección

	Concentración de Avastin (µg/ml)
Avastin ^a	247±27
Avastin + DOPC/PEG-DSPE (97/3)** ^a	234±21
Avastin + DOPC/DOPG (90/10)** ^a	371±16
* Los números entre paréntesis se refieren a los porcentajes molares de fosfolípidos y colesterol. ^a Ejemplos de referencia	

30 Los resultados obtenidos de este estudio también indican que los vehículos de suministro que contienen colesterol y DOPG incrementan drásticamente la concentración de Avastin del vítreo 21 días después de la inyección. Ver la Tabla 5, a continuación.

Tabla 5. Concentración en el humor vítreo de Avastin suministrado con vehículos que contienen fosfolípidos aniónicos 21 días después de la inyección

	Concentración de Avastin (µg/ml)
Avastin ^a	37±7
Avastin + DOPC/CHOL/PEG-DSPE (74,5/25/0,5)*	41±6
Avastin + DOPC/CHOL/DOPG (67,5/25/7,5)*	225±21
* Los números entre paréntesis se refieren a los porcentajes molares de fosfolípidos y colesterol ^a Ejemplo de referencia	

35 **Ejemplo 5: utilización de vehículos de suministro que contienen colesterol a diversos porcentajes molares aniónicos para prolongar el tiempo útil de Avastin en ojos**

Se prepararon vehículos de suministro que contenían colesterol en diversos porcentajes molares, DOPG y DOPG siguiendo el método descrito en el Ejemplo 1, anteriormente. Se mezclaron estos vehículos con Avastin y

las mezclas resultantes se inyectaron en los ojos de conejos New Zealand intravítreamente. 21 días después de la inyección, se examinaron las concentraciones de Avastin en los conejos siguiendo el método descrito en el Ejemplo 2, anteriormente. Los resultados obtenidos de este estudio se muestran en la Tabla 6, a continuación.

5 **Tabla 6. Concentración en humor vítreo de Avastin suministrado con vehículos que contienen colesterol 21 días después de la inyección**

	Concentración de Avastin (µg/ml)
Avastin ^a	37±7
Avastin + DOPC/CHOL/DOPG (81/10/9)*	51±53
Avastin + DOPC/CHOL/DOPG (72/20/8)*	198±131
Avastin + DOPC/CHOL/DOPG (67,5/25/7,5)*	225±21
Avastin + DOPC/CHOL/DOPG (60/33/7)*	58±6
Avastin + DOPC/CHOL/DOPG (56,25/25/18,75)*	185±85
Avastin + DOPC/CHOL/DOPG (37,5/25/37,5) ^{*a}	65±39
Avastin + DOPC/CHOL/DOPG (18,75/25/56,25) ^{*a}	25
Avastin + DOPC/CHOL/DOPG (7,5/25/67,5) ^{*a}	68±22
Avastin + CHOL/DOPG (25/75) ^{*a}	130±45

* Los números entre paréntesis se refieren a los porcentajes molares de fosfolípidos y colesterol ^a Ejemplos de referencia

10 **Ejemplo 6: propiedades farmacocinéticas de Avastin suministrado en el humor vítreo con vehículos que contienen fosfolípido y colesterol**

Se inyectó intravítreamente en conejos Avastin solo (conejos de control) o Avastin mezclado con un vehículo de suministro que contenía DOPC/Colesterol/DOPG en una proporción 67,5/25/7,5 (conejos de ensayo). Se examinaron las concentraciones de Avastin en el humor vítreo de los conejos de control mediante ELISA los días 7, 21 y 28 después de la inyección y las de los conejos de ensayo se examinaron los días 7, 21, 28, 35, 41 y 49 después de la inyección.

La concentración en el humor vítreo de Avastin inyectado solo se redujo mucho más rápidamente con el tiempo que la de Avastin inyectado con el vehículo de suministro. Ver la figura 1. Este resultado demuestra que el vehículo de suministro prolonga el tiempo útil de Avastin en ojos.

En un estudio similar, se realizó un seguimiento de las concentraciones de Avastin en el humor vítreo 7, 28, 49, 70, 91 y 112 días después de la inyección intravítrea. En los conejos de control, la concentración de Avastin en el humor vítreo era de 13 µg/ml 28 días después de la inyección, mientras que para los conejos de ensayo, la concentración de Avastin en el humor vítreo en el mismo punto temporal era de 265 µg/ml 20 veces más elevada que la de los conejos de control. Ver la figura 2. La semivida de Avastin intravítrea en los conejos de control era de 3,9 días. Por el contrario, la semivida de Avastin intravítrea en los conejos de ensayo mostró una característica de 2 compartimentos, siendo las semividas inicial y terminal de 5,5 (t_{1/2α}) y 40,5 (t_{1/2β}) días, respectivamente. La AUC (es decir, la superficie bajo la curva) de Avastin entre el 7º día y el infinito (AUC_(7-∞)) en los conejos de ensayo era 6,8 veces superior a la de los conejos de control y la AUC_(112-∞) de Avastin en los conejos de ensayo era 1,1 veces superior en la AUC_(7-∞) de Avastin en los conejos de control. Ver la Tabla 7, a continuación.

35 **Tabla 7. Propiedades farmacocinéticas de Avastin intravítrea**

	Conejos de control	Conejos de ensayo
T _{1/2} (días)*	3,9	5,5 (t _{1/2α})** 40,5 (t _{1/2β})†
AUC ₍₇₋₁₁₂₎ †† (d·µg/ml)	3294	18758
AUC _(112-∞) ‡ (d·µg/ml)	0	3585
AUC _(7-∞) ††† (d·µg/ml)	3294	22343

* t_{1/2}: semivida;
 ** t_{1/2α}: semivida inicial;
 † t_{1/2β}: semivida terminal;
 †† AUC₍₇₋₁₁₂₎: superficie bajo la curva entre el 7º día y el 112º día,
 ‡ AUC_(112-∞): superficie bajo la curva entre el 112º día y el infinito,
 ††† AUC_(7-∞): superficie bajo la curva entre el 7º día y el infinito.

En resumen, los resultados expuestos anteriormente demuestran que el vehículo de suministro prolongó significativamente la vida útil de Avastin en ojos.

Ejemplo 7: preparación de composiciones para el suministro de diversos agentes terapéuticos

Se disolvieron en cloroformo DOPC, DOPG y colesterol en una proporción en peso de 8,8/1/1,6, que después se evaporó bajo vacío utilizando un evaporador rotatorio. La mezcla seca de fosfolípidos y colesterol producida de esta manera se suspendió en agua desionizada, formando una suspensión acuosa. A continuación, la suspensión se homogeneizó mediante sonicación utilizando un sonicador con sonotrodo (Misonix Sonicator 3000), se esterilizó mediante filtración, se utilizó para llenar asépticamente un vial y se liofilizó, formando un vehículo de suministro que contenía fosfolípido-colesterol. La concentración de fosfolípido en el vehículo se determinó mediante un ensayo convencional de fósforo para garantizar que el vehículo contenía una cantidad total apropiada de los fosfolípidos.

A continuación, el vehículo de suministro se mezcló con diversos agentes terapéuticos, es decir, triptófano (10 mg/ml), tirosina (10,4 mg/ml), péptido HFRRHLC (10 mg/ml), péptido HWRGWVC (10 mg/ml), proteína W (13 mg/ml), albúmina de suero bovino (50 mg/ml), Avastin (25 mg/ml) y dexametasona sodio fosfato (6,7 mg/ml), todos disueltos en tampón fosfato 50 mM, pH 6,2. Las mezclas formadas de esta manera se diluyeron 18 a 100 veces en el mismo tampón fosfato y una alícuota de cada mezcla (50 a 200 ml) se sometió a filtración en gel para determinar el porcentaje del agente terapéutico que se encontraba en forma no asociada. Brevemente, se cargó una alícuota de una mezcla en una columna Sepharose 4B (diámetro: 1,8 mm; longitud: 315 mm). Los componentes en la mezcla a continuación se eluyeron con tampón fosfato 50 mM (pH 6,2). Las fracciones que contenían el agente terapéutico en forma diferente, es decir, forma no asociada o asociada con los fosfolípidos, se recogieron y se midió su absorbancia a 215 nm y a 254 nm. Se determinó la cantidad del agente terapéutico en cada fracción basándose en los valores de DO_{215} y DO_{254} . Basándose en estos valores, se determinaron los porcentajes de los agentes terapéuticos no asociados y las proporciones en peso de lípidos a fármacos, y se presentan en la Tabla 8, a continuación.

Tabla 8. Porcentajes de agentes farmacológicos no asociados y proporciones en peso de lípidos a fármacos

Fármacos	Porcentaje de fármaco no asociado (%±S.D.)	Proporción de pesos de fosfolípido y col. a fármacos
triptófano	86,1±0,8	69 : 1
Tirosina	80,3±0,1	50 : 1
Péptido HWRGWVC	52,4±0,2	21 : 1
péptido HFRRHLC	71,9±0,2	35 : 1
Proteína W	81,4±0,2	41 : 1
albúmina de suero bovino	87,2±0,4	15 : 1
Avastin	62,1±0,9	10 : 1
Dexametasona sodio fosfato	68,5±0,5	73 : 1

Ejemplo 8: propiedades farmacocinéticas de dexametasona sodio fosfato administrada en el humor vítreo con vehículos que contienen fosfolípido y colesterol

Se inyectó intravítreamente en conejos dexametasona sodio fosfato (DSP) sola (conejos de control) o DSP mezclada con un vehículo de suministro que contenía DOPC/colesterol/DOPG en una proporción 67,5/25/7,5 (conejos de ensayo). En ambos ojos de cada conejo se inyectaron intravítreamente 50 µl de DSP o la mezcla de DSP-vehículo de suministro a una dosis de DSP de 0,2 mg. Se examinaron las concentraciones de DSP en el humor vítreo de los conejos de control mediante cromatografía líquida de ultrarrendimiento (ACQUITY UPLC™) con un detector de matriz de fotodiodos (PDA) 2h, 1d, 4d, 8d y 15d después de la inyección y se examinaron los de los conejos de ensayo 2h, 1d, 4d, 8d, 15d y 35d después de la inyección. Se examinaron los dos ojos en cada punto temporal.

Tal como se muestra en la figura 3, la concentración en el humor vítreo de DSP inyectada sola se redujo muy rápidamente después de la inyección; por el contrario, se observó un nivel significativo de DSP inyectada junto con el vehículo de suministro incluso 35 días después de la inyección. Este resultado demuestra que el vehículo de suministro prolonga el tiempo útil de DSP en ojos.

Otras formas de realización

Todas las características dadas a conocer en la presente memoria pueden combinarse en cualquier combinación. Cada característica dada a conocer en la presente memoria puede sustituirse por una característica alternativa que sirve al mismo propósito o a un propósito equivalente o similar. De esta manera, a menos que se indique expresamente lo contrario, cada característica dada a conocer es sólo un ejemplo de una serie genérica de características equivalentes o similares.

A partir de la descripción anteriormente indicada, un experto en la materia puede determinar fácilmente las características esenciales de la presente invención, y sin apartarse del espíritu y alcance de la misma, puede

introducir diversos cambios y modificaciones de la invención para adaptarla a diversos usos y condiciones. De esta manera, otras formas de realización también se encuentran comprendidas en las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Sistema de suministro de fármaco, que comprende
- 5 un vehículo de suministro que contiene un fosfolípido y colesterol, en el que el fosfolípido es una mezcla de un primer fosfolípido y un segundo fosfolípido, siendo el primer fosfolípido DOPC, POPC, SPC o EPC y siendo el segundo fosfolípido PEG-DSPE o DOPG, en el que el porcentaje molar de colesterol en el vehículo de suministro es 10-33; y
- 10 un agente terapéutico que es un antagonista específico para VEGF o un corticoesteroide soluble en agua, en el que el antagonista específico para VEGF es un anticuerpo específico para VEGF o un receptor de VEGF soluble;
- 15 en el que 50-90% del agente terapéutico se encuentra en forma no asociada, y la proporción en peso del fosfolípido y colesterol en combinación respecto al agente terapéutico es 5-80 a 1, y con la condición de que cuando el primer fosfolípido sea DOPC y el segundo fosfolípido sea DOPG, el porcentaje molar de DOPG en el vehículo de suministro es 3-18,75 y el porcentaje molar de DOPC en el vehículo de suministro es 29,5-90.
- 20 2. Sistema de suministro de fármaco según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo específico para VEGF es una inmunoglobulina natural, un fragmento funcional de la misma, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un diacuerpo o un anticuerpo monocatenario.
3. Sistema de suministro de fármaco según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo específico para VEGF es Avastin.
- 25 4. Sistema de suministro de fármaco según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo específico para VEGF es un fragmento Fab, Fab', F(ab)₂ o F(ab')₂.
5. Sistema de suministro de fármaco según la reivindicación 1, en el que el corticoesteroide soluble en agua se selecciona de entre el grupo que consiste en cortisona, hidrocortisona, fluocinolona, prednisolona, prednisona, triancinolona, metilprednisolona, dexametasona y betametasona.
- 30 6. Sistema de suministro de fármaco según la reivindicación 1, en el que el vehículo de suministro y el agente terapéutico están mezclados y en forma liofilizada.
- 35 7. Sistema de suministro de fármaco según la reivindicación 1, en el que el vehículo de suministro y el agente terapéutico están separados.
8. Sistema de suministro de fármaco según la reivindicación 7, en el que el vehículo de suministro se encuentra en forma liofilizada.
- 40 9. Sistema de suministro de fármaco según la reivindicación 1, en el que 60-90% del antagonista específico para VEGF se encuentra en forma no asociada y la proporción en peso de fosfolípido y colesterol en combinación respecto a dicho antagonista es 5-40 a 1.
- 45 10. Sistema de suministro de fármaco según la reivindicación 1, en el que el primer fosfolípido es POPC, SPC, EPC o DOPC y el segundo fosfolípido es PEG-DSPE.
- 50 11. Sistema de suministro de fármaco según la reivindicación 10, en el que la proporción molar de primer fosfolípido:segundo fosfolípido:colesterol es 74,5:0,5:25.
12. Sistema de suministro de fármaco según la reivindicación 1, en el que la proporción molar de primer fosfolípido:segundo fosfolípido es 29,5-80:3-18,75.
- 55 13. Sistema de suministro de fármaco según la reivindicación 1, en el que la proporción molar de DOPC:DOPG es 56,25-72,5:7,5-18,75.

Figura 1

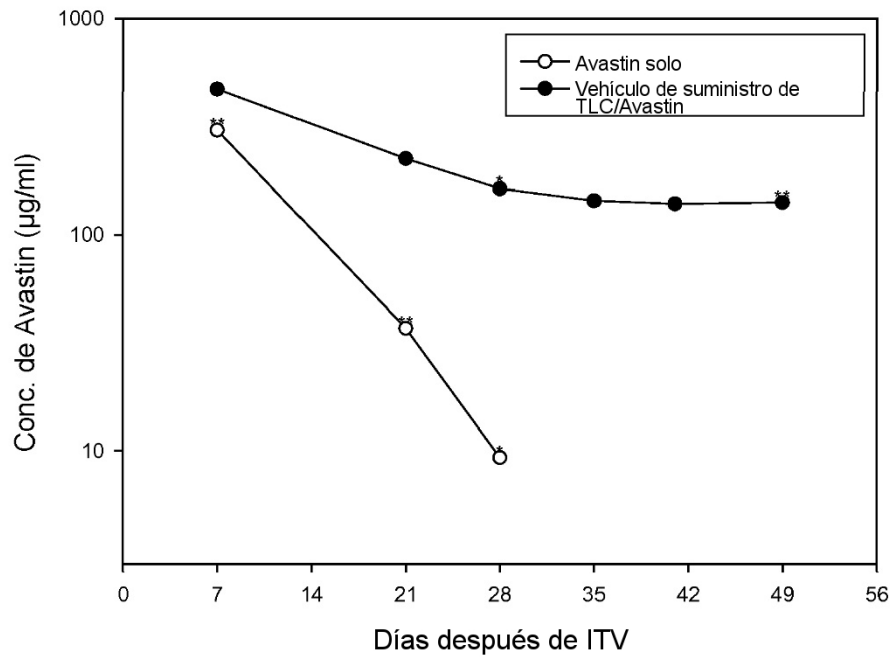


Figura 2

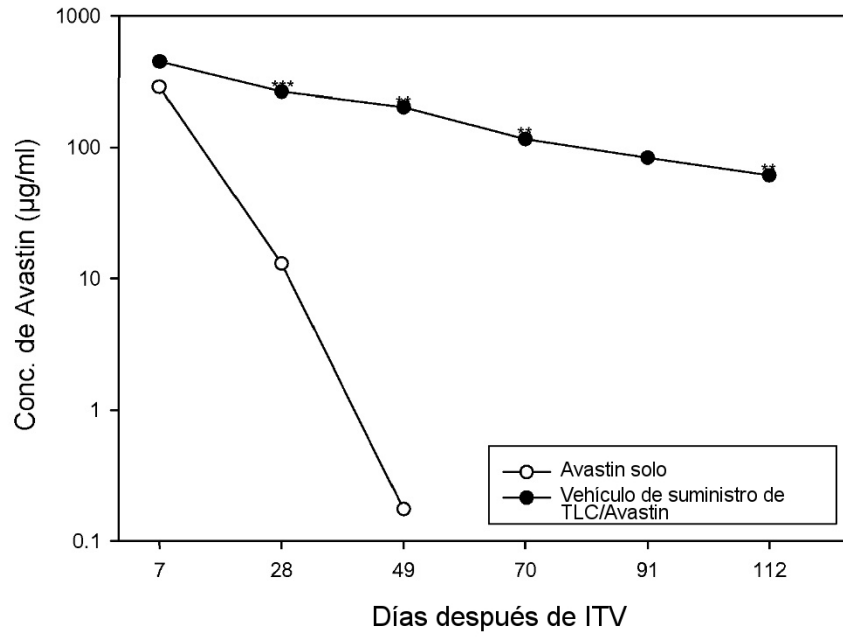


Figura 3

