

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 748 032**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/02** (2006.01)

**A61K 9/16** (2006.01)

**A61K 31/522** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.10.2016 PCT/FI2016/050745**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.04.2017 WO17068245**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.10.2016 E 16794670 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2019 EP 3365020**

54 Título: **Formulación de depósito de compuesto de hidrogel**

30 Prioridad:

**22.10.2015 FI 20155750**

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

**12.03.2020**

73 Titular/es:

**DELSITECH OY (100.0%)  
Itäinen Pitkätatu 4 B  
20520 Turku, FI**

72 Inventor/es:

**LEINO, LASSE;  
JALONEN, HARRY;  
FORSBACK, ARI-PEKKA;  
JOKINEN, MIKA y  
NOPPARI, PANU**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 748 032 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**

Formulación de depósito de compuesto de hidrogel

## 5 Campo de la invención

Esta invención se refiere a una formulación de depósito que comprende un compuesto de hidrogel de sílice biodegradable que incorpora un inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleótido o nucleósido y la formulación de depósito es viable para la administración de fármacos. La invención también se refiere a una jeringa precargada que comprende la formulación de depósito.

Antecedentes de la invención

15 Varias infecciones víricas son importantes problemas mundiales de salud pública. Algunos virus provocan infecciones crónicas y los portadores de infecciones crónicas no tratadas tienen un mayor riesgo de desarrollar complicaciones a largo plazo, tales como insuficiencia hepática o cáncer. Se ha estimado que cada año más de 1 millón de pacientes con infección crónica por el virus de la hepatitis B (VHB) mueren a causa de las complicaciones hepáticas provocadas por la infección. Se usan interferones y análogos de nucleósidos y nucleótidos antivíricos para curar o suprimir las actividades de replicación del virus para mantener la infección inactiva y para prevenir la progresión de complicaciones.

20 Las opciones de tratamiento más comunes incluyen la autoadministración oral diaria o inyecciones diarias (o varias inyecciones semanales). Debido a la terapia farmacológica a largo plazo o incluso de por vida, la autoadministración diaria requiere un fuerte compromiso por parte del paciente. Esto también es un desafío desde el punto de vista del cumplimiento del paciente, ya que cualquier interrupción del tratamiento más larga promueve la resistencia a fármacos antivíricos y es probable que se produzca reaparición cuando se omite el efecto supresor de antivíricos. Por lo tanto,

25 existe una necesidad insatisfecha de formulaciones de depósito a largo plazo en el tratamiento de infecciones víricas y especialmente para infecciones mínimamente invasivas, tales como formulaciones inyectables con intervalos de administración relativamente largos.

Se han usado geles de sílice ampliamente como material transportador para el suministro controlado de fármacos y se pueden procesar en diferentes formas de dosificación y las formas de dosificación se pueden combinar para dar como resultado compuestos de sílice-sílice con propiedades específicas. Las micropartículas de sílice derivadas de sol-gel con fármacos encapsulados se pueden combinar con un sol de sílice para formar un compuesto de depósito de hidrogel inyectable para la administración controlada de medicamentos antivíricos.

35 El documento WO 2014/207304 de Jokinen *et al.* describe composiciones de hidrogel combinadas pseudoplásticas formadas a partir de micropartículas de sílice secadas por pulverización con agentes encapsulados y soles de sílice.

El documento KR20120138908 desvela microesferas que contienen entecavir y un proceso para prepararlas.

40 El documento WO2015020240 desvela microesferas de entecavir y una composición farmacéutica para administración parenteral que las contiene.

Recientemente, Genentech/Roche ha desarrollado y comercializado un interferón alfa pegilado para tratamiento por inyección una vez a la semana de la infección crónica por VHB. Sin embargo, la terapia con interferón se asocia con efectos secundarios sistémicos frecuentes y no se puede administrar a pacientes con función hepática descompensada.

Objeto y resumen de la invención

50 Un objeto de la presente invención es proporcionar una formulación de depósito que comprenda un compuesto de hidrogel de sílice biodegradable que incorpore un inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleótido o nucleósido.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar la formulación de depósito para su uso en el tratamiento.

55 La presente invención proporciona una formulación de depósito que comprende un compuesto de hidrogel de sílice biodegradable que incorpora un inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleótido o nucleósido, en donde el compuesto de hidrogel de sílice se puede obtener mezclando

60 a) partículas de sílice que comprenden dicho inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleótido o nucleósido y que tienen un diámetro máximo de  $\leq 1000 \mu\text{m}$ , tal cual o como una suspensión, con

b) un sol de sílice  
en donde

65 i) dicho sol de sílice tiene un contenido sólido de  $\leq 5 \%$  en peso,

- ii) dicho compuesto de hidrogel de sílice comprende hasta 85 % en peso de dichas partículas de sílice y
- iii) dicho compuesto de hidrogel no es fluido y es estructuralmente estable cuando se almacena en reposo y es pseudoplástico cuando se aplica tensión de cizallamiento por inyección.

5 La presente invención también proporciona la formulación de depósito para su uso en el tratamiento de infecciones víricas crónicas y la prevención de la reinfección vírica crónica.

La presente invención proporciona además una jeringa precargada que comprende dicha formulación de depósito.

10 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra la liberación acumulada de entecavir y disolución de sílice del compuesto de hidrogel.

15 La Figura 2 ilustra el módulo complejo promedio ( $G^*$ ) para compuestos de hidrogel en función del tiempo de almacenamiento.

La Figura 3 ilustra la propiedad de pseudoplasticidad por viscosidad dinámica a diferentes velocidades de cizallamiento para un compuesto de hidrogel.

20 La Figura 4 ilustra la estructura del compuesto de hidrogel antes de la inyección por factor de pérdida ( $\tan \delta = G''/G'$ ).

25 La Figura 5 ilustra la estructura del compuesto de hidrogel después de la inyección por factor de pérdida ( $\tan \delta = G''/G'$ ).

La Figura 6 ilustra las concentraciones en plasma de entecavir en perros beagle machos a los que se ha administrado entecavir en un compuesto de hidrogel.

30 La Figura 7 ilustra las concentraciones en plasma de entecavir en perras beagle a las que se ha administrado entecavir en un compuesto de hidrogel.

Descripción detallada de la invención

35 Los inventores han demostrado sorprendentemente que un inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleótido o nucleósido incorporado en micropartículas de sílice e incluido en un gel de sílice para da como resultado un compuesto de hidrogel de sílice que funciona excepcionalmente como una formulación de depósito inyectable para administrar un inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleótido o nucleósido a pacientes que lo necesiten.

40 Se pueden preparar micropartículas por muchos métodos diferentes. Las micropartículas (con frecuencia partículas esféricas, microesferas) son normalmente partículas pequeñas con diámetros en el intervalo de micrómetros (normalmente de 1  $\mu\text{m}$  a 1000  $\mu\text{m}$ ). Existen varias técnicas directas que se usan habitualmente para preparar o fabricar micropartículas con una distribución controlada del tamaño de las partículas, tales como secado por pulverización (seguido con frecuencia de separación centrífuga de las micropartículas en ciclones), emulsión única, emulsión doble, polimerización, separación de fases de coacervación y métodos de extracción con disolventes. Mediante el uso de estas técnicas, se puede incluir una fracción de volumen pequeño de partículas submicrométricas (habitualmente entre 0,5 y 1,0  $\mu\text{m}$ ) en el producto resultante, pero su proporción suele ser muy baja, con frecuencia menos de 1 % en volumen. Por tanto, su efecto, por ejemplo, en formulaciones de micropartículas de liberación controlada, es menor. También es posible preparar micropartículas moldeando o aplastando estructuras mayores a micropartículas, pero en ese caso, el tamaño y la forma de las partículas resultantes pueden variar mucho y son necesarias etapas de preparación adicionales, tales como volteo y dimensionamiento de partículas.

55 Las micropartículas de sílice de los compuestos de sílice-sílice desempeñan un papel en la liberación controlada de fármacos y la estructura de hidrogel garantiza tanto la estabilidad como la inyectabilidad del compuesto resultante. Aunque es estable en reposo, por ejemplo, almacenado en una jeringa precargada, la estructura del compuesto de hidrogel es tan flexible que se pseudoplastifica cuando el compuesto de hidrogel se inyecta desde jeringas listas para su uso a través de agujas delgadas. Esta combinación de propiedades proporciona una mínimamente invasiva, tratamiento a largo plazo de infecciones víricas.

Términos

60 Debe entenderse que el *gel* en el contexto de esta solicitud es una mezcla homogénea de al menos una fase sólida y una fase líquida, es decir, una dispersión coloidal, donde la fase o fases sólidas, por ejemplo, sílice como tal y/o como parcial o totalmente hidrolizada, es la fase continua y el líquido o líquidos, por ejemplo, agua, etanol y residuos de precursores de sílice, se dispersa de manera homogénea en la estructura. El gel es viscoelástico y las propiedades elásticas dominan, lo que se indica mediante mediciones reológicas en cizallamiento oscilatorio de ángulo pequeño. Las propiedades elásticas dominan y la estructura no es fluida cuando el factor de pérdida (o la tangente de pérdida),

$\tan \delta = (G''/G')$ , es menor que 1. El efecto combinado del módulo elástico  $G'$  y el módulo viscoso  $G''$  también se puede expresar en forma de módulo complejo (o módulo de cizallamiento complejo),  $G^* = G' + iG''$ .

5 Debe entenderse que el *hidrogel* es un gel, donde la fase líquida es agua o a base de agua que contiene más de 50 % en peso de agua. Normalmente, la fase líquida del hidrogel comprende >65 % en peso, más normalmente >90 % en peso y lo más normalmente >95 % en peso de agua. La fase líquida puede comprender adicionalmente otros líquidos, normalmente disolventes orgánicos, por ejemplo, etanol. Normalmente la concentración de dichos disolventes, por ejemplo, etanol, es <10 % en peso, más normalmente <3 % en peso y más normalmente <1 % en peso. En el contexto de esta invención, el compuesto de la invención se considera un hidrogel ya que cumple los criterios básicos de un hidrogel. En consecuencia, cuando se hace referencia al compuesto de hidrogel de la invención, esta referencia es equivalente a una referencia al compuesto de la invención. En el contexto de esta invención, el compuesto de hidrogel de sílice de la invención comprende preferentemente de 20 a 80 % en peso, más preferentemente de 30 a 70 % en peso y lo más preferentemente de 40 a 60 % en peso de agua.

15 Debe entenderse que el *sol* es una mezcla homogénea de al menos una fase líquida y una fase sólida, es decir, una dispersión coloidal, donde la fase o fases líquidas, por ejemplo, agua, etanol y residuos de precursores de sílice, es la fase continua y la fase o fases sólidas, por ejemplo, partículas coloidales de sílice y/o como sílice parcial o totalmente hidrolizada y/o agregados de dichas partículas se dispersan homogéneamente en dicha fase líquida caracterizada por que el sol tiene claras propiedades de flujo y la fase líquida es dominante. Una *suspensión* también se puede denominar un *sol* especialmente si las partículas sólidas son coloidales, siendo menores de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro. En el contexto de la presente invención, sin embargo, el término *sol* se refiere a una dispersión coloidal en donde las partículas sólidas son <50 nm y el término *suspensión* se refiere a una dispersión en la que las partículas sólidas son >50 nm.

25 *Gel inyectable o hidrogel* en el contexto de esta aplicación es una propiedad reológica de una composición. Antes de la inyección, por ejemplo, almacenada en una jeringa y/o en un papel de aluminio a temperaturas <37 °C, por ejemplo, a temperatura ambiente (a 20-25 °C) o a temperatura de frigorífico (a 3-6 °C) la composición es un gel, es decir, el módulo elástico (medido bajo un cizallamiento oscilatorio de ángulo pequeño)  $G'$  es mayor que el módulo viscoso  $G''$  y el factor de pérdida,  $\tan \delta = (G''/G')$ , es menor que 1. Aunque la estructura compuesta de hidrogel es una estructura de tipo gel y la estructura compuesta permanece estable y no fluida almacenada en reposo, la estructura del gel es tan flexible que se pseudoplastifica cuando se aplica tensión de cizallamiento, por ejemplo, en forma de inyección a través de una aguja de una jeringa, por ejemplo, usando una aguja 25G (0,50 mm x 25 mm).

35 *Inyectable* significa, en el contexto de la presente invención, administrable a través de un aparato de administración quirúrgica, por ejemplo, una aguja, un catéter o una combinación de estos.

40 *Pseudoplasticidad* en el contexto de esta solicitud es una propiedad reológica de una composición. Siempre que se altera la tensión de cizallamiento o la velocidad de cizallamiento de una composición de este tipo, la composición se moverá gradualmente hacia su nuevo estado de equilibrio y a velocidades de cizallamiento menores la composición de pseudoplasticidad es más viscosa y a velocidades de cizallamiento mayores es menos viscosa. Por tanto, la pseudoplasticidad se refiere a un efecto donde la viscosidad de un fluido, es decir, la medida de la resistencia de un fluido al flujo, se reduce con una tasa creciente de tensión de cizallamiento.

45 La *formulación de depósito* a la que se hace referencia en la solicitud se define como la administración de una formulación farmacológica de acción sostenida (agente activo) que permite la liberación lenta y la absorción gradual, de modo que el agente activo pueda actuar y se libere en el cuerpo durante periodos de tiempo más largos, es decir, de varios días a varios meses. Las formulaciones de depósito se administran por vía parenteral, ya sea por implantación o inyección subcutánea, intramuscular, peritoneal u ocular.

50 El término *sílice* se refiere a  $\text{SiO}_2$  amorfo que se prepara preferentemente mediante un proceso de sol-gel. La sílice derivada de sol-gel se refiere a sílice preparada por el proceso de sol-gel en donde la sílice se prepara a partir de precursores de fase líquida, tales como alcóxidos, alquilalcóxidos, aminoalcóxidos o soluciones de silicato inorgánico, que, por reacciones de hidrólisis y condensación, forman un sol que se convierte en un gel o forma un sol estable. Los líquidos en el sol de sílice estable pueden evaporarse, lo que da como resultado la formación de un polvo que consiste normalmente en partículas de sílice coloidal. Los geles/partículas resultantes pueden ser opcionalmente envejecidos, secados y tratados térmicamente y, si son tratados térmicamente, preferentemente por debajo de 700 °C. La sílice derivada de sol-gel preparada por debajo de 700 °C es habitualmente amorfa. El tratamiento térmico normalmente se omite si el gel contiene un agente biológicamente activo, tales como fármacos e ingredientes farmacéuticos activos. Después, el gel formado normalmente solo se envejece (normalmente a  $\leq 40$  °C) y se seca (normalmente a  $\leq 40$  °C).  
55 Los soles pueden dejarse gelificar en un molde para su moldeado. La sílice derivada de sol-gel también se puede preparar procesando a diferentes morfologías mediante gelificación simultánea, envejecimiento, secado y moldeado, por ejemplo, mediante secado por pulverización a micropartículas, mediante inmersión/drenaje/recubrimiento por rotación a películas, mediante extrusión a estructuras monolíticas o mediante hilado a fibras.

65 El término *sol de sílice* se refiere a una suspensión, es decir, mezcla de una fase líquida (la fase continua) y una sólida (la fase dispersa), donde la fase sólida se compone de partículas de sílice y/o partículas de sílice agregadas, donde

el tamaño de partícula de las partículas y/o agregados de sílice es normalmente inferior a 1 µm, es decir, las partículas de sílice y/o los agregados de partículas son coloidales. Un sol de sílice se prepara habitualmente a partir de alcóxidos o silicatos inorgánicos que, a través de hidrólisis, forman especies de sílice parcialmente hidrolizadas o ácido silícico totalmente hidrolizado. La fase líquida está compuesta normalmente de agua y productos de hidrólisis y condensación, tales como etanol. Las reacciones de condensación posteriores de especies que contienen SiOH conducen a la formación de especies de sílice mayores que tienen una cantidad creciente de enlaces de siloxano. Estas especies forman partículas coloidales y/o agregados de partículas de tamaños nanométricos.

Dependiendo de las condiciones, el sol de sílice permanece como una suspensión coloidal estable o se convierte en un gel.

El término *biodegradación* se refiere a la erosión, es decir, a la degradación gradual del material de la matriz, por ejemplo, sílice en el cuerpo. La degradación se produce preferentemente por disolución en los fluidos corporales.

Debe entenderse que los *agentes encapsulados* son fármacos, ingredientes farmacéuticos activos (API) y otros agentes terapéuticos y biológicamente activos funcionales que están dentro de los materiales de sílice derivados de sol-gel.

*Inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleótido o nucleósido* se refiere a una clase de fármacos antirretrovíricos usados para tratar la infección por VIH o el SIDA y la hepatitis B. Los ITI inhiben la actividad de la transcriptasa inversa, una ADN polimerasa vírica que es necesaria para la replicación del VIH y otros retrovirus. Los análogos de nucleósidos que se fosforilan en el sitio 5' se denominan con frecuencia análogos de nucleótidos.

Se entenderá que el *punto de gel* significa el punto temporal en el que el sol fluido se convierte en un gel que es viscoelástico y las propiedades elásticas dominan, lo que se indica mediante mediciones reológicas con cizallamiento oscilatorio de ángulo pequeño por el módulo elástico,  $G'$  que es mayor que el módulo viscoso y el factor de pérdida es menor que 1. Las propiedades viscoelásticas se miden habitualmente con un reómetro (un dispositivo de medición para determinar la correlación entre la deformación, la tensión de cizallamiento y el tiempo) por el cizallamiento oscilatorio, donde las tensiones de cizallamiento son pequeñas (pequeños ángulos de deformación). La resistencia total en cizallamiento oscilatorio pequeño se describe por el módulo complejo ( $G^*$ ). El módulo complejo (o módulo de cizallamiento complejo), contiene dos componentes ( $G^*=G' + iG''$ ): 1) módulo elástico, también denominado módulo de almacenamiento,  $G'$  que describe que el material tiene algunas propiedades elásticas que son características de un material sólido, es decir, el sistema de gel obtendrá energía del movimiento oscilatorio siempre que el movimiento no interrumpa la estructura del gel. Esta energía se almacena en la muestra y se describe mediante el módulo elástico; 2) módulo viscoso, también denominado módulo de pérdida,  $G''$  que describe propiedades de flujo, es decir, un sistema, por ejemplo, un sol de sílice que creará, en un cizallamiento oscilatorio, movimiento entre los ingredientes del sol que describe la parte de la energía, que se pierde como disipación viscosa. Cuando  $G^*=G'$  un material se denomina elástico y cuando  $G^*=G''$  un material se denomina viscoso. En el punto de gel, el módulo elástico,  $G'$  se vuelve mayor que el módulo viscoso,  $G''$ . Cuando  $G' > G''$ , un material viscoelástico se denomina semisólido y, de manera correspondiente cuando  $G'' > G'$ , un material viscoelástico se denomina semi-líquido. La magnitud del módulo elástico y viscoso depende de la tensión de cizallamiento, que depende de la presión aplicada (deformación de ángulo pequeño) y la frecuencia (del cizallamiento oscilatorio). Las mediciones se realizan asegurando una señal adecuada para un sistema de medición específico, es decir, se realiza habitualmente un barrido de deformación a frecuencias constantes para encontrar la señal adecuada y la región viscoelástica lineal para el sistema de reómetro y después se realizan las mediciones reales a deformación constante con frecuencia variable. Las frecuencias variables proporcionan módulos elásticos y viscosos variables y la medición muestra si domina la fase sólida o líquida. También es habitual que el módulo elástico aumente rápidamente después del punto de gel si las condiciones circundantes no cambian significativamente, por ejemplo, un aumento de 100-700 veces de  $G'$  en unos minutos después del punto de gel es habitual para geles formados a partir de sales ácidos casi a temperatura ambiente, por ejemplo, para un sol R15 a pH=2 que se convierte en un gel ( $R$ =relación molar de agua con respecto a alcóxido). Para valores  $R$  mayores, tales como R150 y R400, el módulo elástico,  $G'$  permanece en un nivel bajo incluso después del punto de gel y el aumento de  $G'$  no es rápido, lo que hace posible tener estructuras de gel que permanecen inyectables con agujas delgadas. En forma de gel después del punto de gel definido, domina el estado sólido, pero el sistema todavía contiene cantidades variables de líquidos y el material es normalmente blando y viscoelástico antes del secado y duro y quebradizo si se ha secado de forma exhaustiva. En forma de sol, domina el estado líquido, pero el sistema contiene cantidades variables de fase o fases sólidas y el sistema aún es fluido. Antes del punto de gel, es habitual que se observe un fuerte aumento de la viscosidad dinámica y el módulo elástico, que continúa aumentando después del punto de gel a medida que se desarrolla la estructura. En el contexto de la presente invención, se ha alcanzado el punto de gel del compuesto de la invención antes de obtener el gel inyectable de la invención.

*No fluido y estructuralmente estable cuando se almacena en reposo* se refiere a la estructura de hidrogel compuesta estable que está compuesta de partículas de sílice en el hidrogel de sílice. La estabilidad se indica mediante mediciones reológicas con cizallamiento oscilatorio de ángulo pequeño por el módulo elástico,  $G'$  que es mayor que el módulo viscoso y el factor de pérdida es menor que 1. Cuando el módulo elástico es mayor que el módulo viscoso y el factor de pérdida es menor que 1, la estructura no es fluida. La estructura no fluida garantiza la estabilidad de la estructura de hidrogel compuesta al evitar la separación de fases de las partículas de sílice. En otras palabras, las

partículas de sílice están incluidas en el hidrogel de sílice y, por ejemplo, no precipitan ni se separan en el fondo de un recipiente, por ejemplo, una jeringa, donde se almacena el compuesto de hidrogel, normalmente a temperaturas  $\leq 25$  °C. Aunque la estructura de hidrogel compuesta no es fluida cuando se almacena en reposo, por ejemplo, en una jeringa precargada, lista para usar, la estructura es tan flexible que se pseudoplastifica y, por lo tanto, es inyectable a través de agujas delgadas, a medida que se aplica tensión de cizallamiento sobre el compuesto de hidrogel por inyección.

#### Características de la invención

La presente invención, un depósito compuesto de sílice-sílice inyectable que comprende micropartículas de sílice (con ingrediente farmacéutico activo encapsulado) incluido en un hidrogel de sílice, aborda los desafíos prácticos habituales de la administración de fármacos basada en micropartículas. Otros desafíos, que son particularmente importantes en el tratamiento a largo plazo de infecciones víricas, es decir, el cumplimiento por parte del paciente y la importancia del tratamiento farmacológico antivírico sin interrupciones, también son afrontados por la presente invención proporcionando un compuesto fácil de usar y listo para su uso que es mínimamente invasivo debido a la posibilidad de inyectar el compuesto a través de una aguja delgada desde una jeringa con menos frecuencia que cualquier otro producto médico usado en terapia antivírica.

Las micropartículas (tamaño habitual de 1  $\mu\text{m}$  a 1000  $\mu\text{m}$ ) son tan grandes que, por ejemplo, una suspensión de micropartículas normal con una solución a base de agua como fase continua se desestabilizará relativamente rápido. Las partículas coloidales (tamaño de 1-1000 nm) se ven afectadas por el movimiento browniano y es relativamente fácil formar suspensiones estables, pero el efecto es insignificante en las micropartículas. La separación de fases se realiza normalmente por la sedimentación de micropartículas o si la densidad de micropartículas es claramente menor que la del líquido, también pueden flotar sobre la superficie. La velocidad de separación depende de muchos factores; tamaño de micropartículas, densidad de las micropartículas y la fase continua (líquido), concentración de micropartículas en el líquido y viscosidad dinámica de la fase continua. Cerca del tamaño de partícula de 1  $\mu\text{m}$ , las micropartículas poliméricas o cerámicas normales en suspensiones a base de agua se separan en un periodo de varios días a semanas y cuando el tamaño de partícula es mayor de 10  $\mu\text{m}$ , la separación se produce en un periodo de varios minutos a varios días, dependiendo de las diferencias de densidad entre las micropartículas y de la viscosidad de la fase continua (líquido). Por tanto, es difícil formar suspensiones de micropartículas estables y duraderas con soluciones a base de agua comunes, como solución salina o tampones. El método común es aumentar la viscosidad de la fase continua (líquido) para retardar la separación. Sin embargo, a pesar del aumento de la viscosidad, siempre existe un riesgo de separación en un almacenamiento a largo plazo cuando la fase continua es un líquido, que siempre es más o menos fluido. Esta es una tarea importante a tener en cuenta si se espera una larga vida útil y habitualmente es necesaria para formulaciones farmacológicas.

También se puede diseñar un sistema donde las micropartículas y el líquido se combinan poco antes de la administración, pero esta no es una opción deseada debido a los riesgos asociados con la mezcla de los componentes antes de la administración. Una buena mezcla de las micropartículas en el líquido es de crucial importancia tanto con respecto a la seguridad como con respecto a la inyectabilidad. Si la suspensión no se mezcla bien y es suficientemente estable, tanto la dosis correcta como la inyectabilidad de la suspensión están en riesgo.

Debido a que la presente invención está diseñada específicamente para administración mínimamente invasiva, el depósito compuesto de hidrogel está diseñado para ser una formulación lista para usar. El uso de un hidrogel como una fase continua (las micropartículas de sílice están incluidas en el hidrogel) en lugar de un líquido garantiza la estabilidad del compuesto a largo plazo, la inyectabilidad y la dosis correcta. Sin embargo, esto conlleva otro desafío. El compuesto de hidrogel tiene que conservar su estructura de gel no fluida en reposo (en condiciones de almacenamiento) para garantizar la estabilidad, pero tiene que ser al mismo tiempo inyectable, por ejemplo, se debe poder inyectar el compuesto de hidrogel a través de agujas delgadas desde una jeringa. Significa que el compuesto de hidrogel tiene que ser pseudoplástico (la viscosidad dinámica, con unidad del SI Pas, disminuye al aumentar la velocidad de cizallamiento en los modos de medición rotacionales en reómetros) cuando se aplica tensión de cizallamiento, por ejemplo, por inyección. Por tanto, la presente invención introduce un compuesto de hidrogel de sílice-sílice que no es fluido en reposo, pero es pseudoplástico y fluido, cuando se aplica tensión de cizallamiento. Esto es posible debido a la estructura de hidrogel suficientemente flexible, que conserva la estructura de gel no fluida, estable, durante 6-24 meses a la temperatura de almacenamiento de 4-25 °C, pero es fácil de inyectar a través de agujas, como una aguja 25G (diámetro interno de aguja de 0,50 mm). La aguja 25G es mínimamente invasiva en administraciones subcutáneas e intramusculares que son las principales vías de administración para inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleótidos o nucleósidos, tales como entecavir.

La composición combinada de micropartículas de sílice y soles de sílice que forman una estructura de hidrogel estable y no fluida (que permanece estable en reposo, por ejemplo, en una jeringa precargada) son pseudoplásticas y, después del cizallamiento (por ejemplo, debido a la inyección a través de una aguja delgada) y un tiempo de recuperación corto a 37 °C, las composiciones combinadas se convierten nuevamente en hidrogeles estables y no fluidos o en una forma de dosificación de flujo lento, altamente viscosa. La estructura de hidrogel estable y no fluida preferible proporciona mejores posibilidades para reducir la explosión (liberación rápida inicial) debido a una estructura que mantiene las micropartículas de sílice estrechamente unidas en una entidad tridimensional dentro del hidrogel.

El material extraño, tal como partículas microscópicas, es reconocido y eliminado del tejido por leucocitos fagocíticos. Normalmente, el reconocimiento implica también una reacción inflamatoria, lo que no es deseable para sistemas de liberación controlada de fármacos usados, por ejemplo, para administración subcutánea de fármacos. Las micropartículas de sílice, que están incluidas en el hidrogel de sílice, son más difíciles de reconocer por leucocitos humanos que las micropartículas de sílice solas, es decir, el hidrogel de sílice inhibe la activación de leucocitos humanos inducida por las micropartículas de sílice. De este modo, las composiciones de hidrogel combinadas preparadas a partir de micropartículas de sílice y sol de sílice tienen un efecto positivo sobre la tolerabilidad y seguridad de las formulaciones de depósito de sílice cuando se inyectan localmente en el tejido.

También hay otro beneficio en el compuesto de hidrogel de sílice-sílice de la presente invención, que se basa en la baja solubilidad de la sílice. La sílice amorfa, ya que las micropartículas de sílice derivadas de sol-gel y el hidrogel de sílice de la presente invención tienen una solubilidad de 130-150 ppm (mg/l) en agua neutra (y solo aproximadamente 10-20 % mayor a, por ejemplo, pH 5) y, por tanto, también en fluidos corporales simulados y en fluidos corporales. Esto significa que las micropartículas de sílice se disuelven solo en una cantidad insignificante en la fase acuosa del hidrogel. Significa que cualquier fase de agua presente en un sistema se satura rápidamente con respecto a la sílice y se detiene la disolución de sílice. Ya que la eficacia de encapsulación de los ingredientes farmacéuticos activos (API) encapsulados, tales como entecavir, es buena en las micropartículas de sílice de la presente invención, es decir, la liberación de entecavir se basa principalmente en la disolución (degradación por disolución en la fase acuosa), significa que API no se libera de las micropartículas de sílice en la fase acuosa del hidrogel de sílice, por ejemplo, durante el almacenamiento. La liberación insignificante de API se ve respaldada adicionalmente por el hecho de que el agua no está presente como una fase libre, sino una parte de una estructura de dispersión (hidrogel) con movilidad restringida de la fase líquida. Esto garantiza que las micropartículas de sílice controlen la liberación de API en el tejido, donde fluyen los fluidos corporales y, por tanto, la baja solubilidad no es un problema y la tarea principal del hidrogel de sílice es garantizar la estabilidad a largo plazo y las propiedades mínimamente invasivas y facilidad de uso.

En la presente invención, un proceso continuo o un proceso de flujo y reactores continuos (también denominados reactores de flujo), especialmente un proceso continuo en un reactor de tubo, se utiliza antes del moldeado, tal como secado por pulverización, para controlar mejor el procesamiento de sílice y la encapsulación de los ingredientes farmacéuticos activos (API), tales como inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleótido o nucleósido, en sílice. En un caso normal, el sol de sílice y API (disuelto o disperso en un líquido, normalmente en agua con pH ajustado o en soluciones de etanol-agua) para encapsular se bombean como flujos separados en un reactor donde se combinan los 2 flujos. También es posible que el precursor de sílice, normalmente un alcoxisilano, tal como tetraetoxisilano (también denominado tetraetilortosilicato, TEOS) o soluciones de silicato inorgánico y API se bombean en un flujo y agua con pH ajustado en otro flujo. Las composiciones de los flujos se ajustan dependiendo de las propiedades de API para garantizar la estabilidad de API y buena encapsulación. El reactor continuo puede ser un reactor de tanque con agitación continua (CSTR), por ejemplo, un vaso de precipitados con un sistema de mezcla o agitador separado con flujos de entrada y salida constantes o correspondientes o un reactor de tubo sin mezcla, es decir, un reactor de flujo de pistón (PFR) con un flujo laminar (un flujo sin mezcla lateral) o correspondiente, o un reactor de tubo con mezcla (la mezcla puede producirse por un flujo turbulento (un flujo con corrientes de corriente transversal perpendiculares a la dirección de flujo) creando, por ejemplo, remolinos) o mediante elementos de mezcla separados integrados en el reactor de tubo). El uso de reactores continuos permite un mejor ajuste de diferentes velocidades de reacción y agregación de precursores de sílice y especies de sílice que los reactores no continuos, por ejemplo, un reactor discontinuo (BR). En BR se permite que se produzcan todas las reacciones, normalmente con agitación, pero sin alimentación (flujos de entrada y salida) antes de que se produzcan las reacciones deseadas. En un caso normal de la presente invención, se utiliza un reactor de tubo continuo para garantizar que el tiempo de contacto entre el sol de sílice y API se mantenga constante y lo suficientemente corto como para garantizar la solubilidad de API y/o el grado deseado de reacciones y agregación de especies de sílice antes del modelado. El proceso de modelado lleva tiempo y si el sol de sílice con un pH y la solución API con otro pH se mezclan en un reactor discontinuo y después se bombean al proceso de modelado, tal como secado por pulverización, el tiempo de contacto entre el sol de sílice y API varía dentro del lote. Si un proceso de secado por pulverización tarda 30 minutos, las primeras micropartículas secadas por pulverización se forman con un tiempo de contacto 30 minutos más corto entre el sol de sílice y API que las últimas micropartículas. La solubilidad de cualquier sustancia es normalmente dependiente del pH, pero el tiempo de contacto también afecta a la estabilidad de todo el sistema, porque las especies de sílice en el sol de sílice reaccionan y se agregan con el tiempo. El pH óptimo del sol de sílice (por ejemplo, con respecto a la tasa de biodegradación deseada de la forma de dosificación de sílice después del moldeado) y API con frecuencia difieren entre sí y los reactores continuos proporcionan una opción para acoplar mejor estas propiedades para dar como resultado buena encapsulación y perfil de liberación deseado para el API encapsulado.

Las formulaciones de depósito según la presente invención se almacenan en jeringas para mantener estables los compuestos de hidrogel inyectables. Las jeringas preferibles evitan la filtración de un vapor de los compuestos de hidrogel (ofrecen una alta barrera contra la humedad), lo que garantiza la inyectabilidad estable y las propiedades de liberación del compuesto de hidrogel durante el almacenamiento. Las jeringas según la presente invención pueden estar hechas de un vidrio, plástico o compuesto, preferentemente vidrio.

Realizaciones preferentes

En las formulaciones de depósito preferidas de la presente invención, el compuesto de hidrogel de sílice es un hidrogel estructuralmente estable y no fluido a 37 °C después de aplicar la tensión de cizallamiento por inyección.

5 En formulaciones de depósito preferidas de la presente invención, el sol de sílice tiene un contenido sólido de  $\leq 3$  % en peso, preferentemente  $\leq 2$  % en peso y lo más preferentemente  $\leq 1$  % en peso.

10 En formulaciones de depósito preferidas de la presente invención, las partículas de sílice comprenden de 0,1 a 70 % en peso, preferentemente de 0,3 a 50 % en peso y lo más preferentemente de 1 a 15 % en peso del inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleótido o nucleósido incorporado.

15 Normalmente, las partículas de sílice de la presente invención son micropartículas que tienen un diámetro entre 0,5  $\mu\text{m}$  y 300  $\mu\text{m}$ , preferentemente 0,5  $\mu\text{m}$  y 100  $\mu\text{m}$ , más preferentemente 0,5  $\mu\text{m}$  y 30  $\mu\text{m}$  y lo más preferentemente 0,5  $\mu\text{m}$  y 20  $\mu\text{m}$ . La fracción en volumen de partículas de sílice que tienen un diámetro  $< 1$   $\mu\text{m}$  es normalmente  $< 3$  %, preferentemente  $< 2$  % y lo más preferentemente  $< 1$  % en volumen.

20 El compuesto de hidrogel de formulación de depósito de la presente invención normalmente comprende hasta 80 % en peso, preferentemente de 10 a 80 % en peso, más preferentemente de 20 a 60 % en peso de las partículas de sílice.

El contenido sólido compuesto de la formulación de depósito de la presente invención es normalmente de 10 % en peso a 75 % en peso, preferentemente de 15 % en peso a 60 % en peso y lo más preferentemente de 25 % en peso a 55 % en peso.

25 El módulo complejo de la formulación de depósito de la presente invención medido con cizallamiento oscilatorio de ángulo pequeño en la región viscoelástica lineal es  $< 2400$  kPa, preferentemente  $< 1200$  kPa y lo más preferentemente  $< 600$  kPa.

30 El factor de pérdida, es decir, módulo viscoso/módulo elástico, de la formulación de depósito de la presente invención es normalmente  $< 1$ , preferentemente  $< 0,8$  y lo más preferentemente  $< 0,6$ .

35 La viscosidad medida de la formulación de depósito de la presente invención depende normalmente de la velocidad de cizallamiento empleada. La viscosidad normalmente es de 10-50 Pas medida con una velocidad de cizallamiento de 10-50  $\text{s}^{-1}$ , 0,4-1,5 Pas medida con una velocidad de cizallamiento de 200-210  $\text{s}^{-1}$  y 0,1-0,4 Pas medida con una velocidad de cizallamiento de 600-610  $\text{s}^{-1}$ .

Las partículas de sílice de la formulación de depósito pueden comprender más de un inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleótido o nucleósido.

40 Las partículas de sílice de la formulación de depósito de la presente invención se pueden obtener con diferentes procesos. El proceso empleado se selecciona normalmente de secado por pulverización, emulsión única, emulsión doble, polimerización, separación de fases de coacervación y métodos de extracción con disolventes, preferentemente secado por pulverización, lo más preferentemente secado por pulverización con separación continua de partículas mediante un separador ciclónico.

45 Las partículas de sílice de la formulación de depósito de la presente invención pueden seleccionarse del grupo que consiste en partículas de sílice obtenidas por secado por pulverización tal cual, fragmentos de fibra de sílice y monolitos de sílice moldeados o fundidos tal cual o triturados.

50 El inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleótido o nucleósido, comprendido en las partículas de sílice de la formulación de depósito de la presente invención se incorpora normalmente en las partículas de sílice empleando un proceso continuo dentro de un reactor de tubo en donde dicho inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleótido o nucleósido y el sol de sílice se alimentan continuamente como flujos separados y se combinan en dicho reactor, después se sacan continuamente de dicho reactor de tubo y se introducen en un proceso de secado por pulverización continuo con separación continua de partículas mediante un separador ciclónico.

55 El inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleósido, comprendido en las partículas de sílice de la formulación de depósito de la presente invención se selecciona, en algunas realizaciones de la presente invención, del grupo que consiste en didesoxinucleósidos.

60 El inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleótido o nucleósido, comprendido en las partículas de sílice de la formulación de depósito de la presente invención se selecciona, en algunas realizaciones de la presente invención, del grupo que consiste en zidovudina, didanosina, zalcitabina, estavudina, lamivudina abacavir, emtricitabina, entecavir, tenofovir, adefovir, apricitabina, elvucitabina, amdoxovir y racivir, preferentemente entecavir.

65 El inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleótido o nucleósido, comprendido en las partículas de sílice de

la formulación de depósito de la presente invención es, en algunas realizaciones de la presente invención, un análogo de desoxiguanosina, preferentemente seleccionado del grupo que consiste en hidroximetil(metilenciclopentil)purinas y pirimidinas.

5 La formulación de depósito de la presente invención se selecciona normalmente del grupo que consiste en formulaciones inyectables y formulaciones implantables, preferentemente inyectables.

La formulación de depósito de la presente invención es normalmente para administración seleccionada del grupo que consiste en administración parenteral, preferentemente subcutánea, intramuscular, peritoneal y ocular.

10 La formulación de depósito de la presente invención es normalmente para la administración de una vez a la semana a una vez al año, preferentemente de una vez al mes a una vez cada seis meses y más preferentemente de una vez cada dos meses a una vez cada tres meses, y lo más preferentemente una vez cada tres meses.

15 La formulación de depósito de la presente invención es normalmente para la administración de una dosis de depósito del inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleótido o nucleótido que es de 0,1 mg a 200 mg, preferentemente de 20 mg a 160 mg, más preferentemente de 30 mg a 120 mg y lo más preferentemente de 40 mg a 100 mg.

20 El uso de la formulación de depósito de la presente invención es normalmente para el tratamiento de infecciones víricas crónicas y la prevención de la reinfección vírica crónica. Preferentemente, el uso de la formulación de depósito de la presente invención es para infecciones víricas seleccionadas del grupo que consiste en infecciones por hepatitis B y VIH y lo más preferentemente el grupo que consiste en infecciones por hepatitis B. Más preferentemente, la formulación de depósito utilizada para el tratamiento de infecciones víricas crónicas y la prevención de la reinfección vírica crónica comprende entecavir.

En las jeringas precargadas preferidas de la presente invención, la pérdida de peso de la jeringa que comprende la formulación de depósito después de 2 semanas de almacenamiento a 70 °C es inferior a 10 % en peso, preferentemente inferior a 5 % en peso, más preferentemente inferior a 3 % en peso del peso original.

30 Figuras

La Figura 1 ilustra la liberación acumulada de entecavir y disolución de sílice del compuesto de hidrogel después de 3 meses de almacenamiento en jeringas precargadas en envases cerrados de papel de aluminio a 25 °C y humedad relativa del 60 %.

La Figura 2 ilustra el módulo complejo promedio ( $G^*$ ) para los compuestos de hidrogel en función del tiempo de almacenamiento (25 °C/60 %).

40 La Figura 3 ilustra la viscosidad dinámica en función de las velocidades de cizallamiento para el compuesto de hidrogel formado a partir de micropartículas de sílice R10-120 MP (con carga del 7 % (p/p) de entecavir) y sol de sílice R400 (1 g de R10-120 MP en 1 ml de sol R400) (A = nuevo (= 0 meses), B = almacenado 3 meses y C = almacenado 6 meses en una jeringa a 25 °C y 60 % de humedad relativa en una jeringa cerrada en papel de aluminio).

45 La Figura 4 ilustra el factor de pérdida ( $\tan \delta = G''/G'$ ) para las composiciones de hidrogel combinadas preparadas a partir de 0,5 g y 1,0 g de micropartículas de sílice en 1 ml de sol de sílice R400 que simula la estructura en la jeringa antes de la inyección.

50 La Figura 5 ilustra el factor de pérdida ( $\tan \delta = G''/G'$ ) para las composiciones de hidrogel combinadas preparadas a partir de 0,5 g y 1,0 g de micropartículas de sílice en 1 ml de sol de sílice R400 después de la tensión (cizallamiento constante) que simula la estructura después de la inyección.

La Figura 6 ilustra las concentraciones en plasma individuales de entecavir (ng/ml) por tiempo (h) en 6 perros beagle macho a los que se han administrado 36 mg de entecavir en el compuesto de hidrogel de micropartículas R15-120 y sol de sílice R400.

La Figura 7 ilustra las concentraciones en plasma individuales de entecavir (ng/ml) por tiempo (h) en 6 perras beagle a las que se han administrado 36 mg de entecavir en el compuesto de hidrogel de micropartículas R15-120 y sol de sílice R400.

60 **Ejemplos**

La siguiente sección experimental ilustra la invención proporcionando ejemplos.

65 Ejemplo 1

*Preparación de compuestos de hidrogel inyectables con entecavir encapsulado a partir de micropartículas de sílice (MP) y diferentes soles de sílice (SS)*

5 Las micropartículas de sílice (MP) derivadas de sol-gel se prepararon usando TEOS (ortosilicato de tetraetilo = tetraetoxisilano, Sigma - Aldrich) como precursor de sílice. La preparación de las micropartículas de sílice con 7 % en peso de entecavir encapsulado comenzó por la preparación de un sol inicial (relación molar  $R = \text{H}_2\text{O}/\text{TEOS}=3$ , 10 o 15 a pH 2 (se usó HCl para ajustar el pH). Se permitió que la hidrólisis de TEOS se produjera a temperatura ambiente (a 21-23 °C) durante 25-30 minutos con mezcla continua. A continuación, los soles de sílice se enfriaron hasta 0 °C para evitar la formación de gel. Los soles de sílice y las soluciones de entecavir (cuyo pH se ajustó a 9,7-10,1 usando NaOH) se combinaron en un periodo de 75-110 minutos después de la hidrólisis bombeando el sol inicial (R3, R10 o R15) y la solución de entecavir en un recipiente separado con mezcla o en un tubo cilíndrico antes de que el flujo combinado alcance la boquilla del secador por pulverización (BUchi, B-191 y GEA Mobile Minor). Después de la combinación de los flujos, la relación molar final  $R = \text{H}_2\text{O}/\text{TEOS}$  fue de 120 y el pH fue de 5,8-6,0 para todas las formulaciones (la relación molar aumentó debido al agua en la solución de entecavir. Por lo tanto, las formulaciones finales se expresan como R3-120, R10-120 y R15-120). El sol de sílice y la solución de entecavir estuvieron en contacto durante aproximadamente 4-6 minutos antes de alcanzar la boquilla (por ejemplo, R3-120 con 7 % (p/p) de entecavir (4 min) o R3-120 con 7 % (p/p) de entecavir (6 min)). El flujo combinado se secó por pulverización a micropartículas de sílice con 7 % en peso de entecavir encapsulado (parámetros del secador por pulverización; GEA Mobile Minor: Temperatura de entrada: 180-182 °C; Temperatura de salida: 80-83 °C; Aspirador: 80 kg/h (nitrógeno); Presión de atomización 150 kPa (1,5 Bar), Flujo de atomización 11,0 kg/h.

Boquilla de corriente simultánea de dos fluidos: Boquilla: 1,0 mm; Tapa de la boquilla: 5,0 mm y espaciador: medio; Buchi B-191: Temperatura de entrada: 120 °C; Temperatura de salida: 59-67 °C; Aspirador 32 m<sup>3</sup>/h; Flujo de alimentación 3,4 ml/min; Flujo de atomización: 700 l/h (aire).

25 Los soles de sílice (SS) para mezclar con las micropartículas de sílice secadas por pulverización se prepararon usando TEOS (ortosilicato de tetraetilo = tetraetoxisilano, Sigma-Aldrich) como precursor. Se preparó y se calculó un sol de sílice con  $R = \text{H}_2\text{O}/\text{TEOS}$  (relación molar) = 400, correspondiente a aproximadamente 0,9 % en peso de sílice, el pH inicial en cada muestra fue pH 2 (se usó HCl para ajustar el pH). Se permitió que se produjera la hidrólisis a temperatura ambiente (a 21-23 °C) durante 25-65 min con mezcla continua antes del enfriamiento (a 0 °C) y el ajuste del pH del sol. El pH se elevó a 6,2 mediante la adición de NaOH 0,1 M con agitación continua. Después del ajuste del pH, los soles de sílice se mezclaron en un periodo de 5-10 min con las micropartículas secadas por pulverización.

35 Las micropartículas de sílice y el sol de sílice se mezclaron con agitación ligera para evitar la formación de burbujas. La concentración de las micropartículas de sílice (MP) en los soles de sílice (SS) fue de 1,0 g/ml. Las suspensiones (la composición combinada en forma fluida) formadas a partir de micropartículas de sílice y sol de sílice se transfirieron a las jeringas de plástico o vidrio (BD Medical y Gerresheimer) por succión directa de 1 o 10 ml de la composición combinada en la jeringa (sin usar una aguja) o usando adaptadores de conexión de luer y se eliminaron las posibles burbujas de aire. Las composiciones combinadas se convirtieron en un hidrogel en un periodo de minutos, en algunos casos en un periodo de pocas horas después del llenado. Si la formación de gel tardó varias horas, la composición combinada se mantuvo estable mezclando suavemente en un mezclador rotatorio.

Ejemplo 2

45 *La liberación in vitro de entecavir y la disolución de sílice a partir de compuestos de hidrogel y micropartículas de sílice simples*

50 La liberación (*in vitro*) de entecavir y la disolución de sílice del compuesto de hidrogel de R10-120 con 7 % (p/p) de entecavir encapsulado y sol de sílice R400 se estudió sumergiendo 20-30 mg de compuesto en 50 ml de solución de tampón Tris 50 mM (pH 7,4, 37 °C). Los estudios se realizaron en condiciones de sumidero, es decir, a  $c(\text{SiO}_2) < 30$  ppm, es decir, a  $c(\text{SiO}_2)$  que es menos del 20 % de la solubilidad del  $\text{SiO}_2$  particular en el mismo. Las tasas de liberación acumulada para el compuesto de hidrogel almacenado en jeringas precargadas (jeringas de vidrio con conexión de luer, 1 ml, Gerresheimer) en los envases cerrados de papel de aluminio después del almacenamiento de 3 meses a 25 °C y 60 % de humedad relativa se ilustran en la Figura 1. Los resultados muestran que la velocidad de liberación de entecavir es de aproximadamente 0,25 %/h, lo que indica que se alcanza el 100 % en un periodo de aproximadamente 17 días. Esto predice la tasa de liberación de aproximadamente 170 días, es decir, 5-6 meses *in vivo*, ya que se ha observado que el factor de correlación *in vivo-in vitro* habitual para la liberación de sílice es aproximadamente 10 en administración subcutánea, intramuscular e intraperitoneal. Después de la liberación en estallido (liberación rápida inicial) de entecavir, la liberación de entecavir y disolución de sílice se producen aproximadamente a las mismas velocidades, lo que indica una buena encapsulación de entecavir en sílice.

Ejemplo 3

65 *Distribución del tamaño de partícula de las micropartículas de sílice secadas por pulverización (R10-120 con 7 % (p/p) de entecavir)*

La distribución del tamaño de partícula se determinó usando Sympatec (HELOS H2296) con la cubeta de celda húmeda (lente

R3 (0,5-175  $\mu\text{m}$ ); etanol dispersante; tiempo de sonicación 30 s (100 % de potencia); densidad óptica 15-20 %; tiempo de medición 20 s; velocidad de agitación máxima (1000) o usando Sympatec HELOS H2370 equipado con un dispersor CUVETTE y la lente R3 que varía de 0,5/0,9 a 175  $\mu\text{m}$ . El método de Partículas en Líquido (PIL) se empleó usando etanol como disolvente. Se toman unos pocos miligramos de la muestra de los viales de muestra y se dispersan en una suspensión de reserva concentrada de aproximadamente 10-20 ml de etanol. La cámara de dispersor de cubeta se llenó con etanol y se colocó un agitador magnético (1000 rpm) en el fondo de la cubeta. Se realizó una medición basal de referencia solo con etanol. En una medición, se toma una muestra adecuada con una pipeta volumétrica de la suspensión de reserva y se pipetea al dispersador de cubeta para obtener una concentración óptica entre 15-25 %. Cuando se inicia una medición, la muestra se sonica automáticamente durante 30 s y se detiene cuando comienza la medición. Una medición dura 20 s y se genera una distribución del tamaño de partículas. Se toman tres muestras paralelas de la solución de reserva y se analizan de la manera descrita anteriormente. Los resultados se resumen en la Tabla 1.

*Tabla 1. Tamaño de partículas de formulaciones de microesferas de sílice con entecavir encapsulado.*

Formulación de microesferas	D10 promedio ( $\mu\text{m}$ )	D50 promedio ( $\mu\text{m}$ )	D90 promedio ( $\mu\text{m}$ )
R10-120 con 7 % (p/p) de entecavir	1,90	3,99	11,59
R15-120 con 7 % (p/p) de entecavir	2,10	4,65	11,58
R3-120 con 7 % (p/p) de entecavir (4 min)	1,75	3,57	7,15
R3-120 con 7 % (p/p) de entecavir (6 min)	1,83	3,77	7,88

#### Ejemplo 4

*Pruebas de mediciones reológicas y pruebas de inyectabilidad para compuestos de hidrogel inyectables de micropartículas de sílice con entecavir encapsulado y soles de sílice que muestran tanto estructura estable de hidrogel en la jeringa como comportamiento de pseudoplasticidad con cizallamiento*

Se realizaron mediciones reológicas con un único reómetro rotacional (ThermoHaake RS 300) equipado con una placa paralela con una geometría de medición de HPP20 TC (D = 20 mm). Este sistema se usó para medir todos los materiales. Para medir la viscosidad dinámica, se usó un programa de rampa rotatoria CS/CR con un hueco de 0,3 mm y una velocidad de cizallamiento que varía de 0,1000 1/s a 1000 1/s a 25 °C. Se realizaron pruebas oscilatorias (para factor de pérdida y módulos elásticos y viscosos) con un barrido de frecuencia con intervalo de frecuencia de 0,01-10 Hz a 25 °C con un hueco de 0,4 mm. Asimismo, la prueba se realizó con deformación controlada donde la deformación se ajustó a 0,002, que se determinó previamente con un programa de barrido de amplitud.

Las mediciones oscilatorias se realizaron para mostrar la estabilidad del compuesto de hidrogel (de microesferas de sílice R10-120 con 7 % en peso de entecavir encapsulado y sol de sílice R400, 1 g de microesferas en 1 ml de sol de sílice) en una jeringa precargada en función del tiempo de almacenamiento (0-6 meses), que muestra la naturaleza del producto listo para su uso. Las muestras para las mediciones reológicas se tomaron de 3 ubicaciones diferentes en la jeringa. Debido a la mínima tensión y cizallamiento en las mediciones oscilatorias, las mediciones de viscosidad dinámica se realizaron para las mismas muestras que se usaron en las mediciones oscilatorias al continuar con el cizallamiento rotacional para la viscosidad dinámica justo después de las mediciones oscilatorias. Todas las mediciones se realizaron a 25 °C. Las mediciones reológicas se realizaron para el compuesto de hidrogel nuevo (0 meses) y para el compuesto de hidrogel almacenado en jeringas precargadas (jeringa de vidrio, 1 ml, Gerresheimer) en los envases cerrados de papel de aluminio después del almacenamiento de 1, 2, 3 y 6 meses a 25 °C y 60 % de humedad relativa. La proporción de módulos viscosos ( $G''$ ) y elásticos ( $G'$ ), el factor de pérdida (tangente de pérdida,  $\tan \delta = G''/G'$ ) y módulos complejos  $G^*$  se muestran en la Tabla 2 y la Figura 2, muestran la estructura de tipo gel del compuesto (el módulo elástico es mayor que el módulo viscoso y el factor de pérdida es menor que 1. Para materiales viscoelásticos, un factor de pérdida mayor que 1 indica que un material se comporta más como un líquido y un factor de pérdida menor que 1 significa que un material se comporta más como un sólido, por ejemplo, como un gel. Para los compuestos de hidrogel, todos los factores de pérdida son claramente menores que 1. La estructura de tipo gel garantiza que las micropartículas no sedimenten en la jeringa y que el material compuesto permanezca estable.

Tabla 2- Factores de pérdida promedio ( $\tan \delta = G''/G'$ ) y pruebas de inyección para los compuestos de hidrogel en función del tiempo de almacenamiento (25 °C/60 %)

Frecuencia en Hz	0 meses	1 mes	2 meses	3 meses	6 meses
0,01	0,44	0,45	0,51	0,55	0,67
0,04	0,25	0,22	0,18	0,19	0,47
0,07	0,17	0,25	0,20	0,22	0,24
0,1	0,13	0,16	0,19	0,20	0,33
0,4	0,06	0,08	0,16	0,14	0,20
0,7	0,04	0,05	0,11	0,09	0,16
1	0,03	0,04	0,08	0,06	0,18
4	0,05	0,07	0,09	0,08	0,16
7	0,04	0,11	0,07	0,05	0,12
10	0,04	0,05	0,08	0,10	0,17
Inyección, aguja	24G	25G	25G	25G	25G

5 Aunque la estructura compuesta de hidrogel es una estructura de tipo gel y permanece estable cuando se almacena, la estructura del gel es tan flexible que puede inyectarse a través de agujas delgadas con diámetros internos de 0,50 y 0,55 mm (24G: 0,55 mm x 25 mm, 25G: 0,50 mm x 25 mm, Terumo) como se muestra en la Tabla 2. Esto también está respaldado por el claro comportamiento de pseudoplasticidad, que se observa en las mediciones de viscosidad dinámica a diferentes velocidades de cizallamiento (Tabla 3 y Figura 3). El comportamiento de pseudoplasticidad fue claro para las muestras nuevas (0 meses), así como para muestras almacenadas en jeringas precargadas en los  
10 envases cerrados de papel de aluminio después del almacenamiento de 3 y 6 meses a 25 °C y 60 % de humedad relativa.

Tabla 3- Viscosidad dinámica a diferentes velocidades de cizallamiento después de 0-6 meses de almacenamiento

Velocidad de cizallamiento, 1/s	Viscosidad dinámica, Pas
42-49	13-46
200-210	0,4-1,5
600-605	0,1-0,4

#### 15 Ejemplo 5

*Preparación de compuestos de hidrogel inyectables preparados a partir de micropartículas de sílice (MP) y diferentes soles de sílice (SS) para inyecciones de aguja delgada*

20 Las composiciones de placebo (compuestos de hidrogel) se prepararon de una manera correspondiente como se describe en el Ejemplo 1. La preparación de las micropartículas de sílice placebo comenzó por la preparación de un sol inicial (relación molar  $R = H_2O/TEOS = 10$  a pH 2, se usó HCl para ajustar el pH). Después de la hidrólisis, el sol de sílice inicial (R10) y el etanol (99 %) se bombearon a un tubo cilíndrico antes de que el flujo combinado alcanzara la boquilla del secador por pulverización (GEA Mobile Minor). El sol de sílice y el etanol estuvieron en contacto durante  
25 4 minutos antes de alcanzar la boquilla. Después de la combinación de los flujos, la relación molar final correspondió a  $R = H_2O/TEOS = 50$  (es decir, la formulación final fue R10-50; se usó el mismo volumen de etanol ya que se necesita agua para obtener R50 del R10 inicial). La formulación de placebo se diseñó para ser un material de referencia para la formulación de micropartículas de sílice R10-120 con 7 % en peso de entecavir encapsulado, es decir, para obtener la misma velocidad de disolución (biodegradación) de sílice que para R10-120 con 7 % en peso de entecavir  
30 encapsulado.

Los soles de sílice (SS) para mezclar con las micropartículas de sílice secadas por pulverización se prepararon de una manera correspondiente como en el Ejemplo 1.  $R = H_2O/TEOS$  (relación molar) de los soles de sílice varió entre R300-400 (R300, R350, R400) y el pH inicial en cada muestra fue pH 2 (se usó HCl para ajustar el pH). Se permitió que la hidrólisis se produjera a temperatura ambiente (a 21-23 °C) durante 25 min con mezcla continua. El pH se elevó a 6,2  
35 mediante la adición de NaOH 0,1 M con agitación continua. Después del ajuste del pH, los soles de sílice se mezclaron en un periodo de 5-15 min con las micropartículas secadas por pulverización o se envejecieron durante 3 horas a 40 °C antes de mezclar.

Las micropartículas de sílice y el sol de sílice se mezclaron con agitación ligera para evitar la formación de burbujas. La concentración de las micropartículas de sílice (MP) en los soles de sílice (SS) varió entre 0,15 y 1,0 g/ml. Las suspensiones (la composición combinada en forma fluida) formadas a partir de micropartículas de sílice y sol de sílice se transfirieron a la jeringa de vidrio (sin usar una aguja) por succión directa de la composición combinada y se eliminaron las posibles burbujas de aire. Las composiciones combinadas se convirtieron en un hidrogel pocas horas después del llenado. Antes de la formación del hidrogel, la composición combinada se mantuvo estable mezclando suavemente en un mezclador rotatorio.

Solo las concentraciones de las micropartículas de sílice (MP) en los soles de sílice (SS) que variaron entre 0,5 y 1,0 g/ml formaron hidrogeles. Con las concentraciones de 0,5 g/ml fue posible inyectar la composición combinada a través de una aguja 27G (0,4 x 20 mm), pero la estructura del compuesto de hidrogel se desintegró parcialmente. El mejor resultado, inyección a través de una aguja 30G (0,3 x 13 mm), se obtuvo con 0,75 g/ml de las micropartículas de sílice (MP) en soles de sílice (SS) R400.

#### Ejemplo 6

*Mediciones reológicas para compuestos de hidrogel inyectables preparados a partir de micropartículas de sílice con entecavir encapsulado y sol de sílice que muestra estructura estable de hidrogel en la jeringa, comportamiento de pseudoplasticidad con cizallamiento e hidrogel estable o estructura fluida después del cizallamiento y la recuperación.*

Las micropartículas de sílice R3-120 con 7 % en peso de entecavir encapsulado y sol de sílice para mezclar con las micropartículas de sílice se prepararon como se describe en el Ejemplo 1. Se usó un sol de sílice nuevo (no envejecido) con  $R = \text{H}_2\text{O}/\text{TEOS}$  (relación molar) = 400 y las concentraciones de dichas micropartículas de sílice fueron 0,5 g y 1,0 g en 1 ml de sol de sílice R400. Ya que las composiciones combinadas de micropartículas de sílice en el sol de sílice R400 todavía eran fluidas, se transfirieron a jeringas de vidrio con conexión de Luer de 1 ml de Gerresheimer. Las composiciones combinadas se mantuvieron mezclando suavemente en un mezclador rotatorio durante 24 horas para evitar la sedimentación de las micropartículas. Las composiciones combinadas se convirtieron en hidrogeles durante las 24 horas en un mezclador rotatorio.

Se realizaron mediciones reológicas con un único reómetro rotacional (ThermoHaake RS 300) equipado con una geometría de medición de placas paralelas ( $D = 20$  mm) y con un hueco de 0,3 mm. Las mediciones reológicas para los materiales no sometidos a tensión (composiciones combinadas en las jeringas) se realizaron a 25 °C y para los materiales sometidos a tensión (velocidad de cizallamiento constante que simula la inyección a través de una aguja delgada) a 37 °C. Para mostrar la estructura de hidrogel estable en la jeringa, se realizaron pruebas oscilatorias (para factor de pérdida y módulos elásticos y viscosos) dentro de la región viscoelástica lineal (deformación de 0,002) con un barrido de frecuencia con el intervalo de frecuencia de 0,01-10 Hz a 25 °C. La relación de módulos viscosos ( $G''$ ) y elásticos ( $G'$ ), factor de pérdida (tangente de pérdida,  $\tan \delta = G''/G'$ ) para ambas composiciones combinadas de 0,5 g y 1,0 g de micropartículas de sílice en 1 ml de sol de sílice R400 es claramente inferior a 1 (promedio de 3 mediciones paralelas indicadas en la Figura 4) lo que muestra una estructura de hidrogel no fluida, estable.

Las composiciones combinadas se sometieron después a tensión en el programa de velocidad de cizallamiento controlada (50 1/s durante 10 s para homogeneización seguido de 5000 1/s durante 30 s para simular la inyección seguido de 1,0 1/s durante 10 s para recuperación). Inmediatamente después de la recuperación, se realizó otra prueba oscilatoria (para factor de pérdida y módulos elásticos y viscosos) dentro de la región viscoelástica lineal (deformación de 0,002) con un barrido de frecuencia con el intervalo de frecuencia de 0,01-1,0 Hz a 37 °C. El factor de pérdida es claramente inferior a 1 para la composición combinada de 1,0 g de micropartículas de sílice en 1 ml de sol de sílice R400, pero no para la composición combinada de 0,5 g de micropartículas de sílice en 1 ml de sol de sílice R400 que tiene un factor de pérdida mayor que 1 (promedio de 3 mediciones paralelas indicadas en la Figura 5). La composición combinada de 1,0 g de micropartículas de sílice en 1 ml de sol de sílice R400 es una estructura de hidrogel estable también después de la tensión (cizallamiento constante) que simula la inyección, pero la composición combinada de 0,5 g de micropartículas de sílice en 1 ml de sol de sílice R400 se ha convertido en una composición fluida, muy viscosa.

#### Ejemplo 7

*Liberación de entecavir de la composición combinada (compuesto de hidrogel) de las microesferas de sílice y sol de sílice in vivo*

La composición combinada (compuesto de hidrogel) de microesferas R15-120 con 7 % (p/p) de entecavir y sol de sílice R400 (36 mg/ml de entecavir en el compuesto final de hidrogel) en jeringas precargadas se administró por vía subcutánea en 12 (6 machos y 6 hembras) perros beagle. Las jeringas listas para usar con un volumen de carga de 1 ml se usaron para estudiar la farmacocinética de 36 mg de entecavir en una sola dosis. Después de la administración, los animales se siguieron durante 91 días. Se recogieron muestras de sangre de una vena yugular de los animales para determinar los niveles en plasma de entecavir antes de la administración y a los 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h y 24 h el día 1 y una vez los días 3, 5, 7, 11, 15, 29, 43, 57, 71, 85 y 91. Se prepararon muestras de plasma K2-EDTA canino para su análisis realizando precipitación de proteínas y eliminación de fosfolípidos. Las muestras de plasma

congeladas se descongelaron y atemperaron a temperatura ambiente. Se utilizaron placas de eliminación de fosfolípidos de Phenomenex para la extracción de muestras. Antes de pipetear las muestras de plasma, cada pocillo se activó con 1 ml de acetonitrilo. El acetonitrilo se eluyó usando vacío. Después, se transfirieron 200 µl de las muestras de plasma a los pocillos. Se añadieron 40 µl de la solución de patrón interno (lamivudina, 100 ng/ml). A continuación, se añadieron 760 µl de acetonitrilo y la placa se cubrió con parafilm. La placa se agitó en el plano horizontal durante 2 min. Las muestras se eluyeron usando vacío y los extractos se evaporaron hasta su sequedad en una placa de recogida de muestras a +50 °C en una corriente suave de nitrógeno. El residuo se disolvió en 200 µl de una mezcla de DMSO y agua (10:90, v/v) que contenía ácido fórmico al 0,1 %. La placa se agitó horizontalmente durante 10 min. Después de transferir a insertos de viales de muestreador automático, las muestras se centrifugaron durante 2 min a 2000 rpm en una microcentrífuga. Finalmente, las muestras se inyectaron (10 µl) en el sistema de HPLC-MS/MS.

Se realizaron separaciones con una columna Waters XSelect® HSS T3 2,1 x 150 mm (3,5 µm) acoplada con un cartucho de precolumna Waters XSelect® HSS T3 2,1 x 10 mm integrado. La fase móvil consistió en dos eluyentes: A era ácido fórmico al 0,1 % en agua y B era ácido fórmico al 0,1 % en metanol. Se usó un desarrollo cromatográfico con un gradiente: 0 min → 1 min A fue 92,5 % (isocrático); de 1 min a 2 min A se redujo de 92,5 % a 5 %, de 2 min a 3 min A fue 5 % (isocrático), de 3 min a 4 min A aumentó de 5 % a 92,5 % y finalmente A se mantuvo constante a 92,5 % de 4 min a 7 min. El horno en columna se ajustó a +25 °C. Se llevó a cabo detección espectrométrica de masas usando un espectrómetro de masas API Sciex 4000 QTrap con ionización positiva por pulverización iónica turbo (TIS) y modo de supervisión de reacción múltiple (MRM). La temperatura TIS fue de +505 °C. La configuración del gas nebulizador (Gas 1) fue de 50 y la configuración del gas turbo (Gas 2) fue de 50. La configuración de tensión TIS fue de 4900 V. Los potenciales de separación fueron 60 V para entecavir y 59 V para el patrón interno. El potencial de entrada se ajustó a 10 V para ambas moléculas. La energía de colisión fue de 25 V para entecavir y 24 V para el patrón interno. El gas de cortina (nitrógeno) se ajustó al valor 10 y el gas de colisión (nitrógeno) se ajustó al valor 5,0. Los pares de ion precursor - ion fragmento detectados fueron m/z 278,1 - 152,0 para entecavir y m/z 230,0 - 111,9 para el patrón interno. El tiempo de permanencia para ambas moléculas fue de 250 ms. Los datos de los análisis de HPLC-MS/MS se obtuvieron usando el software Applied Biosystems Analyst 1.6.1. Las integraciones máximas, curvas de calibración y cuantificaciones se generaron con el mismo software. Las estadísticas se calcularon con el software Microsoft Excel 2010. Las curvas patrón se generaron usando regresión lineal ponderada (1/x<sup>2</sup>). Los datos de concentración en plasma se modelaron con el software Phoenix WinNonlin 6.4 (Certara Pharsight) usando análisis no compartimental.

Las concentraciones individuales por curvas de tiempo se representan en las Figuras 6 y 7. La absorción inicial de entecavir desde el sitio de inyección fue rápida cuando se dosificó como formulación de depósito de sílice y se observó C<sub>máx</sub> a los 30 a 60 min después de la inyección. Posteriormente, la concentración en plasma de entecavir disminuyó cerca del nivel de 1 ng/ml, en promedio, para el día 29. Después de este punto temporal, se observó una clara fase de liberación sostenida durante los siguientes dos meses (hasta el día 91) con una disminución gradual de la concentración en plasma de entecavir.

#### Ejemplo 8

*Jeringas precargadas que mantienen los compuestos de hidrogel inyectable preparados a partir de micropartículas de sílice con entecavir encapsulado y sol de sílice estable.*

Se estudió la estabilidad de las composiciones combinadas de 1,0 g de micropartículas de sílice (R3-100) con 7 % en peso de entecavir encapsulado en 1 ml de sol de sílice R400 y sol de sílice R400 tal cual en dos tipos diferentes de sistemas de jeringas. Los compuestos de hidrogeles inyectables formados se almacenaron en jeringas precargadas (jeringas de vidrio con una conexión de luer y un tapón con pistón de goma separado, 1 ml, jeringa ClearJect, Gerresheimer Bunde GmbH) en los envases cerrados de papel de aluminio (a 4 °C, 25 °C/60 % y a 40 °C/65 %) durante 6 meses con cambios menores en la estructura general (observación visual), inyección y propiedades de liberación de entecavir. Cuando el mismo compuesto de hidrogel se almacenó en jeringas de plástico precargadas (punta de jeringa BD de 1 ml Luer-Lok™ sellada con tapas de punta de jeringa Monoject™ de plástico, Coviden llc) en los envases cerrados de papel de aluminio (a 40 °C/65 %) durante 2 meses, el compuesto de hidrogel se secó en la jeringa y no fue posible inyectar el material a través de una aguja delgada.

En otra serie de pruebas, se inyectaron 500 microlitros de sol de sílice R400 en 3 tipos diferentes de sistemas de jeringas (5 muestras paralelas para cada sistema de jeringas):

- Jeringa de vidrio: Jeringa ClearJect de 1 ml, Gerresheimer Bunde GmbH
- Jeringa de plástico: Jeringa Plajex™ de 1 ml, Terumo
- Jeringa de plástico: Punta de jeringa BD de 1 ml Luer-Lok™ con tapas de punta de jeringa Monoject™, Coviden llc

Las jeringas se mantuvieron en condiciones mejoradas a 70 °C durante dos semanas y el peso de las jeringas se supervisó en función del tiempo para determinar si se filtra vapor de la jeringa. Después de dos semanas, la jeringa

de vidrio Gerresheimer ha conservado el 98 % del peso original, la jeringa de plástico de Terumo 96,8 % y la jeringa de plástico de BD 83,5 %. Los resultados indican que una jeringa con una filtración de vapor menor (alta barrera de humedad), tal como la jeringa de vidrio de Gerresheimer es importante para garantizar la estabilidad del compuesto de hidrogel inyectable que comprende micropartículas de sílice y sol de sílice.

5

## Ejemplo 9

*El hidrogel de sílice inhibe la activación de leucocitos humanos por micropartículas de sílice*

10 Se estudió la interacción entre leucocitos de sangre periférica humana y micropartículas de sílice. Se produjeron micropartículas de sílice placebo como se describe en los Ejemplos 1 y 5. Se obtuvo sangre periférica por punción venosa usando EDTA como anticoagulante de donantes adultos sanos. La fracción de leucocitos se separó usando sedimentación de dextrano (1 ml de Dextrano al 6 % en 9 ml de sangre) a temperatura ambiente. La capa de plasma  
15 rico en leucocitos se lavó dos veces con tampón HBSS sin  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  complementado con gelatina al 0,1 % (CMF-HBSS) y finalmente se resuspendió en aprox. 1 ml de CMF-HBSS. La concentración de leucocitos se determinó usando una cámara Bürker y un microscopio. Se usó un método de quimioluminiscencia mejorada con luminol (CL) para investigar la reacción entre los leucocitos y las micropartículas de sílice. La respuesta de CL se midió usando el contador de multimarcadores Victor<sup>2</sup> a 425 nm en placas de plástico negro de 96 pocillos a 37 °C durante 60 min. Normalmente, la mezcla de reacción contenía 300.000 leucocitos y luminol 0,5 mM en 0,2 ml de gel-tampón de HBSS  
20 con o sin micropartículas de sílice. Las micropartículas de sílice indujeron una respuesta clara de CL dependiente de la dosis en leucocitos. La activación más alta se observó en el intervalo de concentraciones de micropartículas de sílice 1-10 mg/ml, que fue normalmente 100-1000 veces mayor que la respuesta de CL de las mismas células sin ningún estímulo de activación.

25 Para probar el efecto del hidrogel de sílice sobre CL de leucocitos inducida por micropartículas de sílice, se preparó hidrogel de sílice R400 como se describe en el Ejemplo 1 y se dejó envejecer durante 7 días y después se volvió a dispersar y se mezcló con las micropartículas de sílice. Se descubrió que el hidrogel R400 a una concentración de 25 % en la mezcla de reacción de CL inhibía la respuesta de CL de leucocitos desencadenada por 1,25 y 6,25 mg/ml de micropartículas de sílice en 30-40 %, en promedio.

30

## Ejemplo 10

*El hidrogel de sílice inhibe la absorción de micropartículas de sílice por leucocitos humanos*

35 Para investigar la fagocitosis de las micropartículas de sílice por leucocitos humanos, se recogió sangre periférica de voluntarios adultos sanos y se aislaron leucocitos como se describe en el Ejemplo 9. Para medir la fagocitosis de micropartículas de sílice, las micropartículas, preparadas como se describe en el Ejemplo 9, se cargaron con fluoresceína, que emite luz fluorescente a 530 nm cuando se activa con luz láser a 488 nm. Se incubaron leucocitos (300.000 células) con micropartículas de sílice cargadas con fluoresceína 1,25 mg/ml en 0,5 ml de gel-tampón de  
40 HBSS a 37 °C hasta 60 min y la reacción de fagocitosis se detuvo enfriando las muestras rápidamente en un baño de hielo en diversos puntos temporales. Las muestras se analizaron usando el citómetro de flujo FACSCalibur. La fracción de leucocitos polimorfonucleares se seleccionó con la ayuda del anticuerpo monoclonal anti-CD16 marcado con ficoeritrina que reconoce leucocitos fagocíticos que expresan el receptor Fc gamma tipo 3. Solo las células CD16 positivas se analizaron para detectar fagocitosis. Para cada muestra, se recogieron y analizaron 10.000 células para  
45 detectar la señal de fluorescencia que se origina a partir de fluoresceína en micropartículas de sílice. Normalmente, después de 60 min de incubación con micropartículas de sílice con fluoresceína, más del 40 % de las células analizadas se unieron con micropartículas.

50 Cuando el hidrogel de sílice R400, preparado como se describe en el Ejemplo 9, se añadió a la mezcla de reacción de fagocitosis (a una concentración de 1,56 %), el porcentaje de células de unión a micropartículas se redujo a aproximadamente 20 %, lo que indica aproximadamente 50 % de reducción en células que reconocen micropartículas de sílice. Esto muestra que el hidrogel de sílice R400 puede prevenir el reconocimiento de micropartículas de sílice por leucocitos humanos y, por lo tanto, tiene un efecto positivo sobre la tolerabilidad y seguridad de formulaciones de depósito de sílice cuando se inyecta localmente en el tejido.

55

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una formulación de depósito que comprende un compuesto de hidrogel de sílice biodegradable que incorpora un inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleótido o nucleósido, en donde el compuesto de hidrogel de sílice se puede obtener mezclando
- 10 a) partículas de sílice que comprenden dicho inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleótido o nucleósido y que tienen un diámetro máximo de  $\leq 1000 \mu\text{m}$ , tal cual o como una suspensión, con  
b) un sol de sílice  
en donde
- 15 i) dicho sol de sílice tiene un contenido sólido de  $\leq 5 \%$  en peso,  
ii) dicho compuesto de hidrogel de sílice comprende hasta  $85 \%$  en peso de dichas partículas de sílice y  
iii) dicho compuesto de hidrogel no es fluido y es estructuralmente estable cuando se almacena en reposo y es pseudoplástico cuando se aplica tensión de cizallamiento por inyección.
- 20 2. La formulación de depósito de la reivindicación 1, caracterizada por que el compuesto de hidrogel de sílice es hidrogel estructuralmente estable y no fluido a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  después de aplicar la tensión de cizallamiento por inyección.
- 30 3. La formulación de depósito de la reivindicación 1 o 2 caracterizada por que el sol de sílice tiene un contenido sólido de  $\leq 3 \%$  en peso, preferentemente  $\leq 2 \%$  en peso y lo más preferentemente  $\leq 1 \%$  en peso.
- 40 4. La formulación de depósito de cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizada por que las partículas de sílice comprenden de  $0,1$  a  $70 \%$  en peso, preferentemente de  $0,3$  a  $50 \%$  en peso y lo más preferentemente de  $1$  a  $15 \%$  en peso del inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleótido o nucleósido incorporado.
- 50 5. La formulación de depósito de cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizada por que las partículas de sílice son micropartículas que tienen un diámetro entre  $0,5 \mu\text{m}$  y  $300 \mu\text{m}$ , preferentemente  $0,5 \mu\text{m}$  y  $100 \mu\text{m}$ , más preferentemente  $0,5 \mu\text{m}$  y  $30 \mu\text{m}$  y lo más preferentemente  $0,5 \mu\text{m}$  y  $20 \mu\text{m}$ .
- 60 6. La formulación de depósito de la reivindicación 5 caracterizada por que la fracción en volumen de partículas de sílice que tienen un diámetro  $< 1 \mu\text{m}$  es  $< 3 \%$ , preferentemente  $< 2 \%$  y lo más preferentemente  $< 1 \%$  en volumen.
- 70 7. La formulación de depósito de cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizada por que el compuesto de hidrogel comprende hasta  $80 \%$  en peso, preferentemente de  $10$  a  $80 \%$  en peso, más preferentemente de  $20$  a  $60 \%$  en peso de las partículas de sílice.
- 80 8. La formulación de depósito de cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizada por que el contenido sólido compuesto es de  $10 \%$  en peso a  $75 \%$  en peso, preferentemente de  $15 \%$  en peso a  $60 \%$  en peso y lo más preferentemente de  $25 \%$  en peso a  $55 \%$  en peso.
- 90 9. La formulación de depósito de cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizada por que
- 95 - el módulo complejo medido con cizallamiento oscilatorio de ángulo pequeño en la región viscoelástica lineal es  $< 2400 \text{ kPa}$ , preferentemente  $< 1200 \text{ kPa}$  y lo más preferentemente  $< 600 \text{ kPa}$ , y/o  
- el factor de pérdida, es decir, módulo viscoso/módulo elástico, es  $< 1$ , preferentemente  $< 0,8$  y lo más preferentemente  $< 0,6$ , y/o  
- la viscosidad es  $10\text{-}50 \text{ Pas}$  medida con una velocidad de cizallamiento de  $10\text{-}50 \text{ s}^{-1}$ , la viscosidad es  $0,4\text{-}1,5 \text{ Pas}$  medida con una velocidad de cizallamiento de  $200\text{-}210 \text{ s}^{-1}$  y  $0,1\text{-}0,4 \text{ Pas}$  medida con una velocidad de cizallamiento de  $600\text{-}610 \text{ s}^{-1}$ .
- 100 10. La formulación de depósito de cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizada por que las partículas de sílice se obtienen con un proceso seleccionado de secado por pulverización, emulsión única, emulsión doble, polimerización, separación de fases de coacervación y métodos de extracción con disolventes, preferentemente secado por pulverización, lo más preferentemente secado por pulverización con separación continua de partículas mediante un separador ciclónico.
- 110 11. La formulación de depósito según la reivindicación 10 caracterizada por que el inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleótido o nucleósido, comprendido en las partículas de sílice, se incorpora a las partículas de sílice empleando un proceso continuo dentro de un reactor de tubo en donde dicho inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleótido o nucleósido y el sol de sílice se alimentan continuamente como flujos separados y se combinan en dicho reactor, después se sacan continuamente de dicho reactor de tubo y se introducen en un proceso de secado por pulverización continuo con separación continua de partículas mediante un separador ciclónico.
- 120 12. La formulación de depósito según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizada por que el inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleótido o nucleósido se selecciona del grupo que consiste en

- didesoxinucleósidos, y/o

- zidovudina, didanosina, zalcitabina, estavudina, lamivudina abacavir, emtricitabina, entecavir, tenofovir, adefovir, apricitabina, elvucitabina, amdoxovir y racivir, preferentemente entecavir.

- 5
13. La formulación de depósito según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizada por que el inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleótido o nucleósido es un análogo de desoxiguanosina, preferentemente seleccionado del grupo que consiste en hidroximetil(metilenciclopentil)purinas y pirimidinas.
- 10
14. La formulación de depósito según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizada por que se selecciona del grupo que consiste en formulaciones inyectables y formulaciones implantables, preferentemente inyectables.
- 15
15. La formulación de depósito según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en el tratamiento de infecciones víricas crónicas y la prevención de la reinfección vírica crónica, preferentemente seleccionada del grupo de infecciones que consisten en infecciones por hepatitis B y VIH y más preferentemente el grupo que consiste en infecciones por hepatitis B.

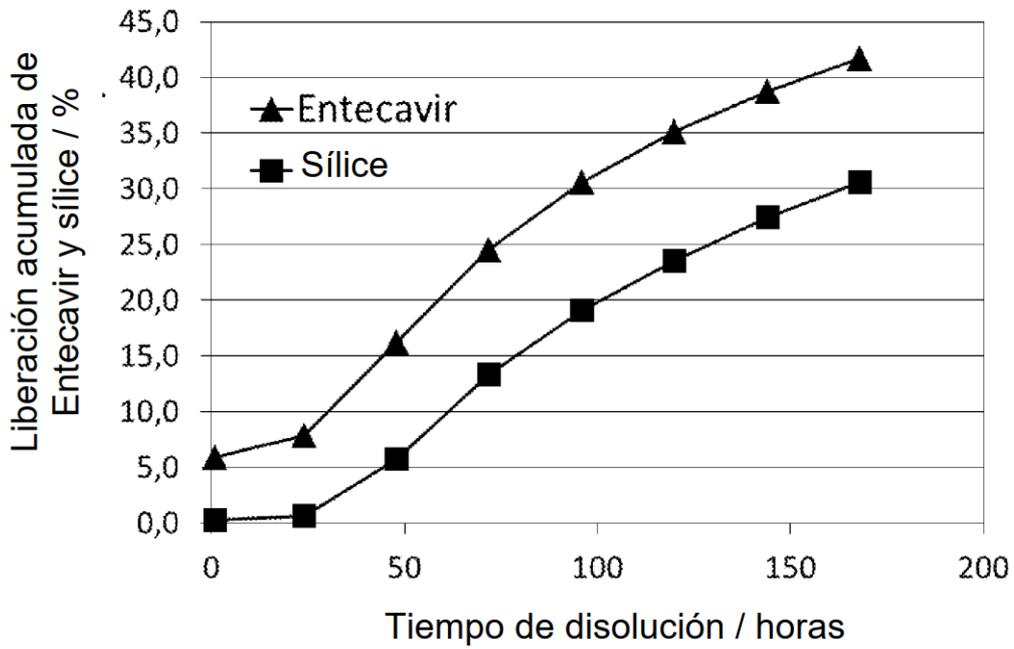


Figura 1

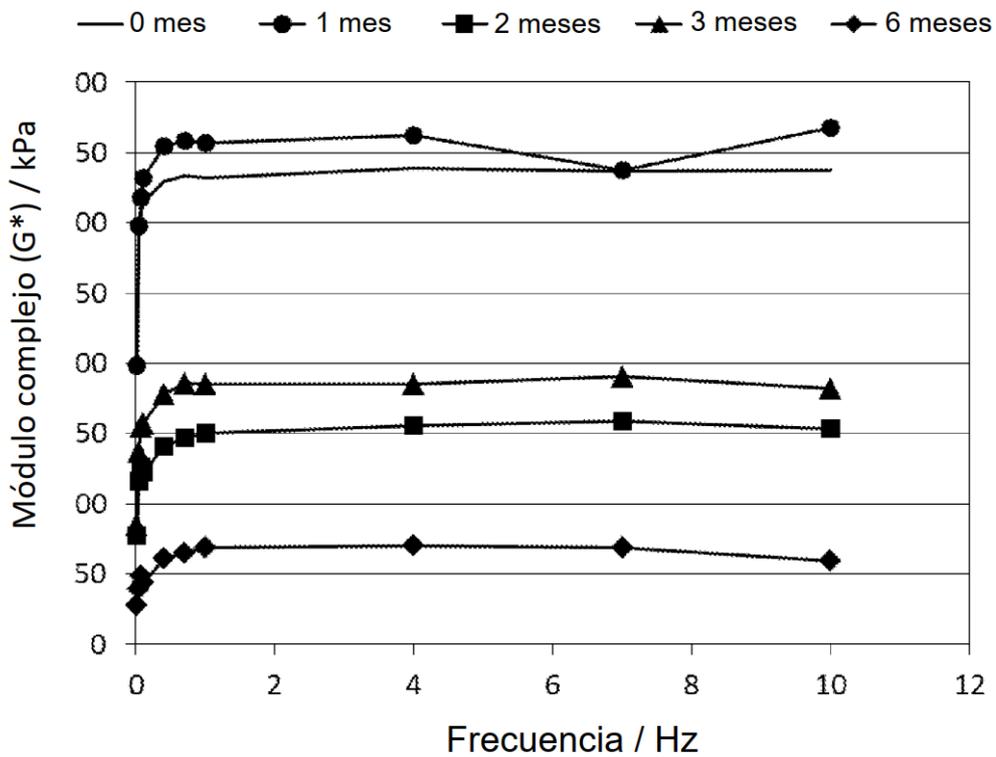


Figura 2

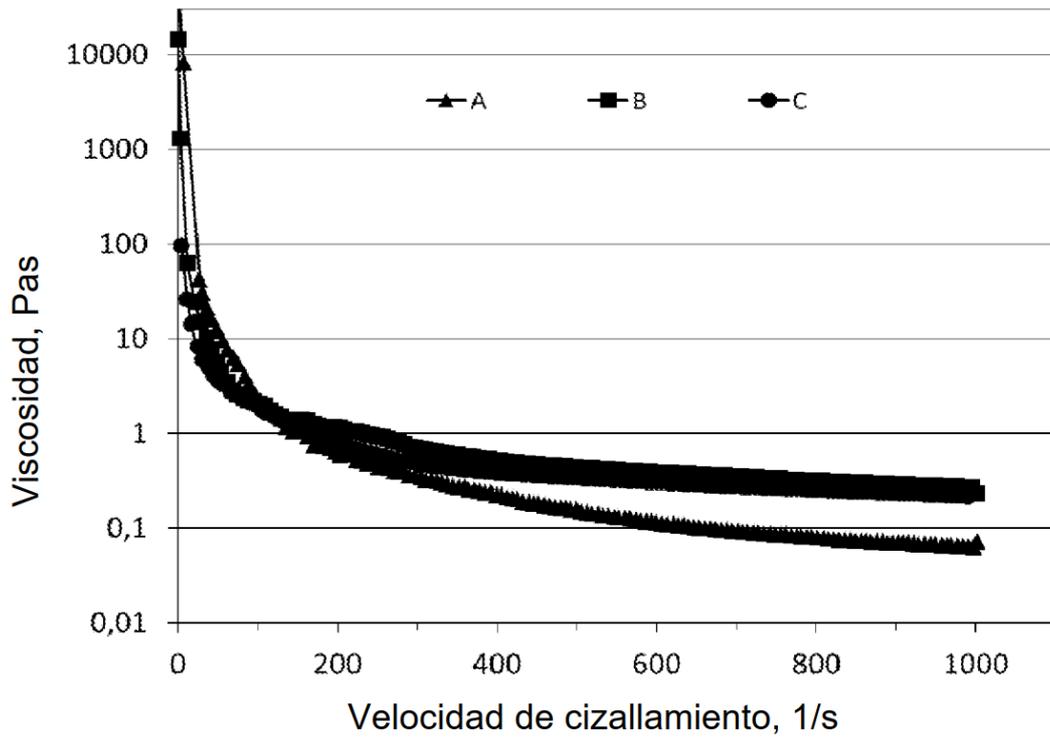


Figura 3

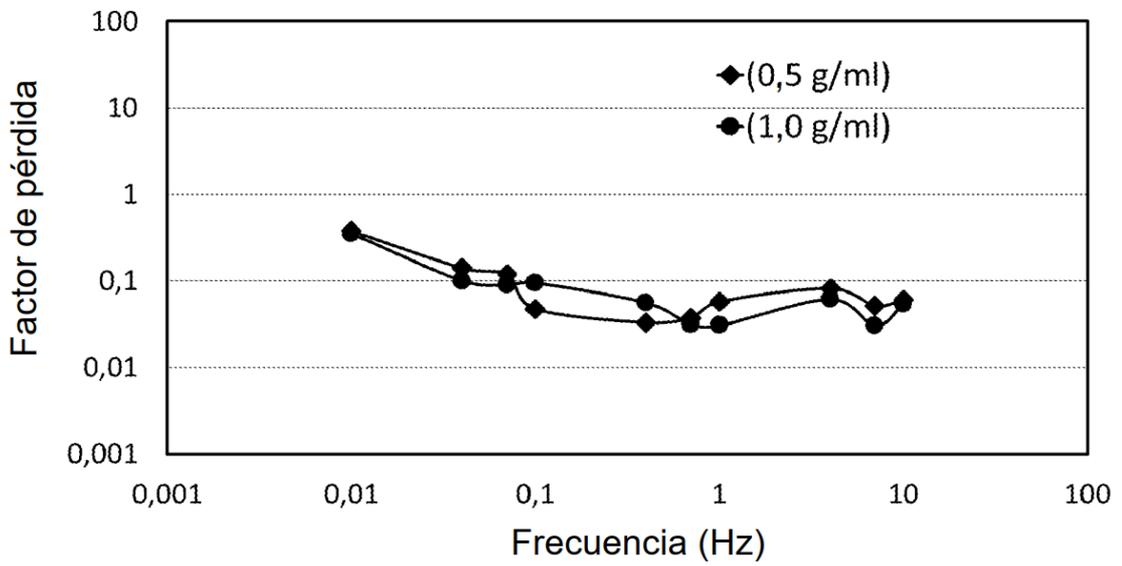


Figura 4

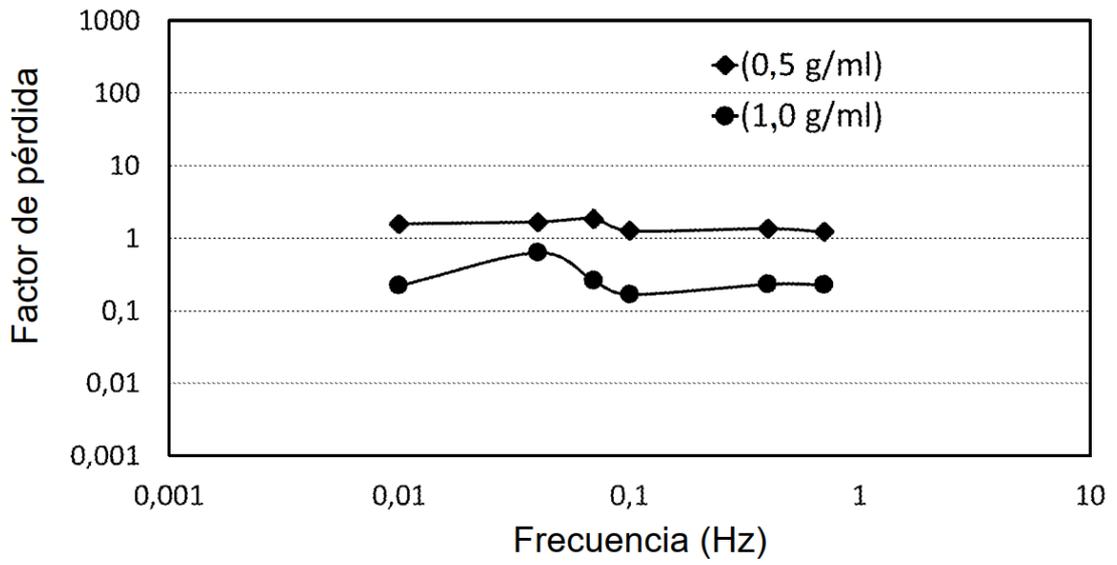


Figura 5

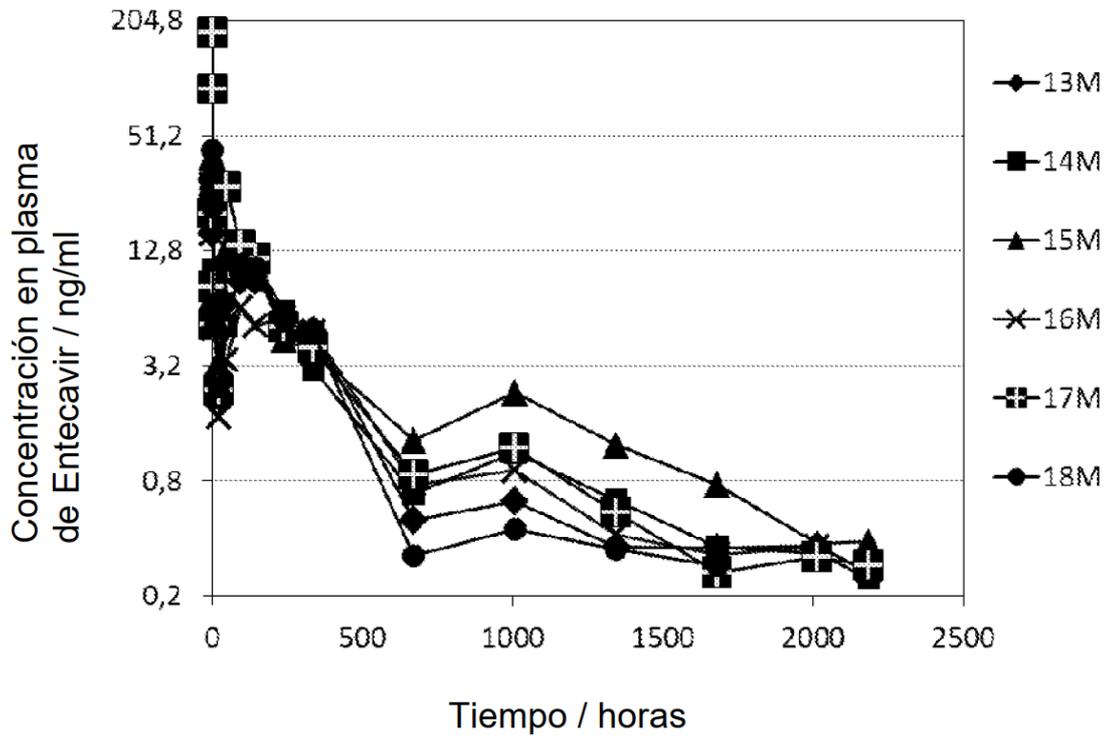


Figura 6

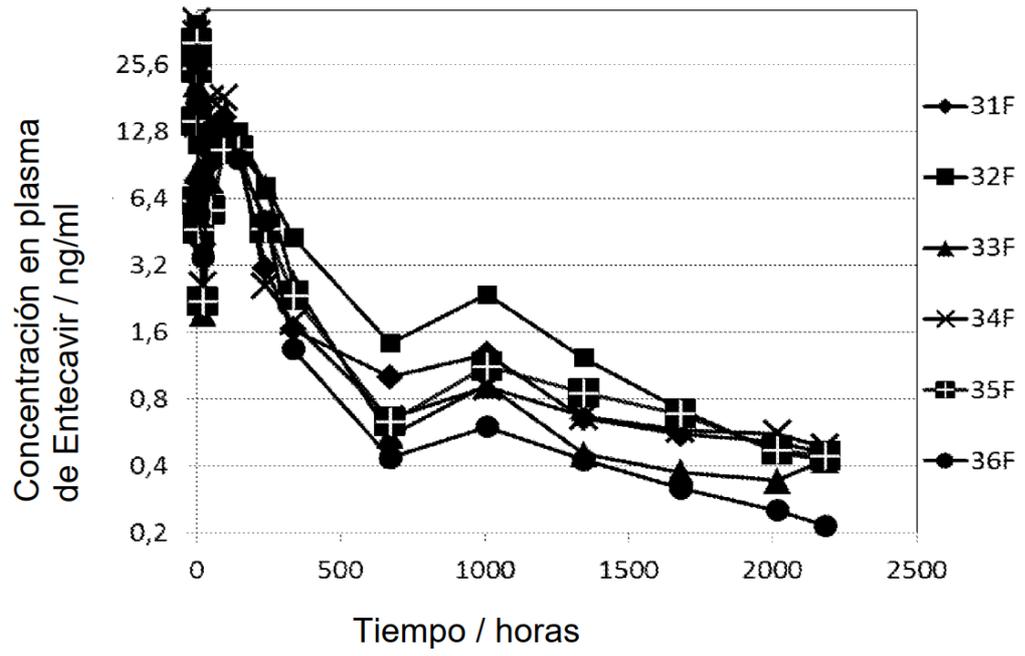


Figura 7