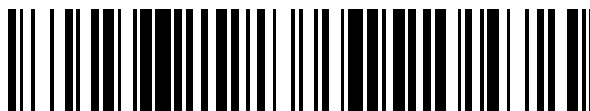


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 761 340**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 47/30 (2006.01)

A61K 9/08 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.06.2012 PCT/US2012/041950**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.03.2013 WO13036309**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.06.2012 E 12829655 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2019 EP 2717914**

54 Título: **Formulaciones de liberación mantenida para la administración de proteínas al ojo y procedimientos de preparación de las mismas**

30 Prioridad:

10.06.2011 US 201161495672 P

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

19.05.2020

73 Titular/es:

**RAMSCOR, INC. (50.0%)
180 Sand Hill Circle
Menlo Park, California 94025, US y
ICON BIOSCIENCE, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**WONG, VERNON;
WOOD, LOUIS y
HUANG, GLENN**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 761 340 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

Formulaciones de liberación mantenida para la administración de proteínas al ojo y procedimientos de preparación de las mismas

5 La presente invención proporciona formulaciones farmacéuticas inyectables biocompatibles y biodegradables que comprenden proteínas terapéuticas útiles en el tratamiento de enfermedades del ojo.

10 Los modos actuales de administración de fármacos, tales como la aplicación tópica, la administración oral y la inyección intramuscular, intravenosa y subcutánea, pueden dar como resultado concentraciones en sangre altas y bajas y/o una semivida en sangre reducida. En algunos casos, lograr la eficacia terapéutica con estas administraciones estándar requiere grandes dosis de medicamentos que pueden provocar efectos secundarios tóxicos. Las tecnologías relacionadas con la liberación controlada de fármacos se han desarrollado en un esfuerzo por sortear algunos de los escollos del tratamiento convencional. Sus objetivos son administrar medicamentos de forma continua y mantenida. 15 Adicionalmente, las administraciones con liberación de fármacos controlada localmente son específicas del sitio o del órgano. Sigue existiendo la necesidad de una forma más económica, práctica y eficaz de producir y fabricar sistemas de administración de fármacos que puedan utilizarse localmente o sistémicamente, en formulaciones sólidas, semisólidas o líquidas. En particular, se han desarrollado formulaciones para la liberación mantenida en el ojo, pero existe la necesidad de perfeccionarlas para mejorar la liberación mantenida de medicamentos de base biológica en el 20 ojo.

25 El documento US2004/0001889 divulga una composición de depósito inyectable que comprende: (a) un polímero biocompatible, bioerosionable, de bajo peso molecular; (b) un disolvente que tiene una miscibilidad en agua inferior o igual al 7% a 25 °C, en una cantidad eficaz para plastificar el polímero y formar un gel con el mismo, en la que dicho disolvente es un alcohol aromático; y (c) un agente beneficioso, en la que el agente beneficioso es un anticuerpo. Anand, O. Controlled release of insulin and modified insulin from a novel injectable biodegradable gel, 2008, páginas 1-119 (disertación en línea) divulga la administración de depósitos sólidos que comprenden PLGA en plastificante y cargados con insulina o insulina-sulfatos de cinc mediante la inyección subcutánea de los depósitos sólidos en el 30 cuello dorsal de las ratas, en las que después de la administración la formulación formó depósitos sólidos de insulina.

35 La presente invención proporciona formulaciones líquidas de liberación mantenida en las que la cinética de liberación del agente activo puede controlarse utilizando formulaciones relativamente sencillas que comprenden al menos un excipiente líquido no polimérico (por ejemplo, un éster de citrato, un benzoato de bencilo o dimetilsulfona), y una pequeña cantidad (por ejemplo, menos del 10% ± 1%) de un polímero poli(D,L-láctido) (PLA) o poli(D,L-láctido-co-glicólido) (PLGA). Además, cuando se combinan con los excipientes no poliméricos de la presente invención, el PLA y el PLGA con o sin grupos terminales ácidos producen diferentes cinéticas de liberación. Además, el PLGA con diferentes porcentajes de restos de láctido y glicólido (por ejemplo, láctido:glicólido de 50:50; 65:35; 75:25 o 85:15) produce diferentes cinéticas de liberación mantenida. Por lo tanto, estos excipientes proporcionan una diversidad de formulaciones a partir de las cuales se puede mantener la velocidad de liberación del agente activo durante un periodo 40 de tiempo deseado.

45 Las formas de realización de la presente invención proporcionan una formulación farmacéutica para su inyección en el ojo para la liberación mantenida de un agente activo que comprende: al menos un agente activo; al menos un excipiente líquido biodegradable, biocompatible, no polimérico, seleccionado del grupo que consiste en benzoato de bencilo (BB); ésteres de ácido benzoico con alcoholes alifáticos de cadena lineal, ramificada o cíclica que tienen de uno a veinte átomos de carbono en los que uno de los átomos de hidrógeno de la cadena alifática está reemplazado por un grupo hidroxilo (por ejemplo, alcoholes tales como metanol, etanol, n-propanol, i-propanol, n-butanol, i-butanol, s-butanol, t-butanol, n-pentanol, i-pentanol, neo-pentanol, n-hexanol, ciclohexanol, n-heptanol, n-octanol, n-nonanol, n-decanol y similares); sulfuro de dimetilo; dimetilsulfóxido; dimetilsulfona; dimetilsulfozida; mono-, di- y triésteres de ácido O-acetilcitríco o ácido O-propionilcitríco o ácido O-butilcitríco con alcoholes alifáticos C₁ a C₁₀ de cadena lineal y ramificada; los mono-, di- y triésteres de ácido cítrico con alcoholes alifáticos C₁ a C₁₀ de cadena lineal y ramificada; citrato de trietilo (TEC); citrato de trietil-O-acetilo (TEAC); citrato de acetil-trietilo (ATEC); citrato de tri-n-butilo; citrato de acetil-tri-n-butilo; citrato de acetil-tri-n-hexilo; citrato de butiril-tri-n-hexilo; o éteres de ácido cítrico; d-alfa-tocoferol; d,1-alfa-tocoferol; d-beta-tocoferol; d,1-beta-tocoferol; d-eta-tocoferol; y d,1-eta-tocoferol (incluidas las formas de éster 50 de PEG de acetato, hemisuccinato, nicotinato y succinato de cada uno de los anteriores); acetato de tocoferilo; isómeros de tocotrienol, ésteres de tocotrienol; y al menos un polímero poli(D,L-láctido) (PLA) o poli(D,L-láctido-co-glicólido) (PLGA) biodegradable y biocompatible; en la que la proporción de excipiente no polimérico:excipiente polimérico es de aproximadamente 90:10 a aproximadamente 99:1, ambos inclusive; de forma que tras la inyección inicial la composición mantiene su integridad monolítica en estado líquido; y en la que la composición libera el agente activo durante un periodo de al menos aproximadamente 14 días.

55 Las formulaciones de las presentes formas de realización pueden ser incoloras o casi incoloras; se pueden inyectar a través de una aguja pequeña; y se pueden utilizar en los ojos. Las formulaciones de las presentes formas de realización son particularmente ventajosas para la liberación mantenida de proteínas, tales como anticuerpos, en los ojos.

60 En una forma de realización específica, la formulación es una formulación de dosificación unitaria de aproximadamente

5 μ l a aproximadamente 100 μ l que puede inyectarse en la subconjuntiva, el espacio periocular, el espacio retrobulbar en la órbita, la epiesclera, el espacio intracorneal, el espacio intraescleral, la cámara anterior, el segmento anterior, la cámara posterior, el segmento posterior, la cavidad vítrea, el espacio subretiniano, el segmento supracoroideo o la región intrarretiniana del ojo.

5 Descripción de los dibujos

10 La figura 1 muestra perfiles de liberación *in vitro* de dexametasona liberada a partir de tres formulaciones diferentes: 6% de dexametasona/95% de ATEC (■); 6% de dexametasona/94% de (5% de RG752H/95% de ATEC) (□); 6% de dexametasona/94% de (5% de RG502/95% de ATEC) (◆).

15 La figura 2 muestra perfiles de liberación *in vitro* de dexametasona liberada a partir de cuatro formulaciones diferentes, cada una de las cuales consiste en el 6% de dexametasona, siendo el resto ATEC (■); 5% de R202H/95% de ATEC (◆); 5% de R203H/95% de ATEC (●) o 5% de R203S/95% de ATEC (▲).

La figura 3 presenta perfiles de liberación *in vitro* de dexametasona liberada a partir de cuatro formulaciones diferentes, cada una de las cuales consiste en el 6% de dexametasona, siendo el resto ATEC (■); RG502H al 5% /ATEC (□); RG502 al 5%/ATEC (◆) o RG505 al 5%/ATEC (▲).

20 La figura 4 representa perfiles de liberación *in vitro* de dexametasona liberada a partir de cuatro formulaciones diferentes, cada una de las cuales consiste en el 6% de dexametasona, siendo el resto ATEC (■); PLGA (85:15 de lactido:glucólido) al 1,25%/ATEC (◆); RG502H (50:50 de lactido:glucólido) al 5%/ATEC (□) o RG756S (75:25 de lactido:glucólido) al 5%/ATEC (●).

25 La figura 5 muestra perfiles de liberación *in vitro* de gamma-globulina bovina (BGG) liberada a partir de una formulación de BGG al 1% en PLGA RG502H al 5%/ATEC a temperatura ambiente (□) o a 37 °C (Δ). N = 10.

30 La figura 6 muestra perfiles de liberación *in vitro* de BGG liberada a partir de formulaciones de BGG al 1% en PLGA RG502H al 5%/ATEC (Δ) o BGG al 1% en PLGA RG502 al 5%/ATEC (□), ambas formulaciones mantenidas a 37 °C.

La figura 7 muestra el perfil de liberación *in vitro* a 37 °C de BGG liberada a partir de una formulación de BGG al 1% en excipiente que consiste en PLGA RG502 al 5% en ATEC/BB/DMSO (50:38:12).

35 La figura 8 compara perfiles de liberación *in vitro* de BGG liberada a partir de una formulación de BGG al 1% en PLGA RG502 al 5% en ATEC dispuesta en condiciones de sumidero infinito, ya sea inmediatamente después de la preparación (□), o después de un almacenamiento durante aproximadamente 24 horas a 4 °C (Δ).

40 La figura 9 muestra perfiles de liberación *in vitro* de BGG liberada a 37 °C a partir de formulaciones de BGG al 1% y RG502 al 5%/ATEC (□); RG502H al 5%/ATEC (Δ); RG653H al 5%/ATEC (◇) o RG752H al 5%/ATEC (○).

La figura 10 compara perfiles de liberación *in vitro* de BGG (% promedio, eje y) liberada a partir de una formulación de BGG al 3% en un excipiente que consiste en PLGA RG502 al 1,7% en BB:DMSO 75:25 (◆); o PLGA RG502 al 5% en BB:DMSO 75:25 (■). Eje x, días; N = 4.

45 La figura 11 muestra un perfil de liberación *in vitro* de BGG (% promedio, eje y) liberada a partir de una formulación de BGG al 1,5% en PLGA RG502 al 5% en ATEC/BB/DMSO (50:38:12). Eje x, días.

50 La figura 12 compara perfiles de liberación *in vitro* de BGG (% promedio, eje y) liberada a partir de una parte alícuota de 10 μ l de una formulación que consiste en BGG al 1% en PLGA RG502 al 7,5% en ATEC (◆); PLGA RG502 al 5% en ATEC (■) o PLGA RG502 al 7,1% en ATEC al 87,5% y DMSO al 4,4% (●). Las formulaciones se habían almacenado a temperatura ambiente durante 8 días antes de disponerlas en condiciones de liberación de sumidero infinito. Eje x, días.

55 La figura 13 presenta varios perfiles de liberación *in vitro* de BGG (% promedio, eje y) liberada a partir de una parte alícuota de 10 μ l de una formulación que consiste en BGG al 1% en PLGA (85:15 de lactido:glucólido) al 1,25% (siendo el resto ATEC en cada formulación) (□); PLGA RG653H al 5% (●); PLGA RG752H al 5% (◇); PLGA RG756S al 5% (○); PLGA RG502H al 10% (■); PLGA RG502H al 5% o PLGA RG502 al 5%. Eje x, días.

60 La figura 14 compara los perfiles de liberación de BGG (% promedio, eje y) liberada a partir de dos partes alícuotas de diferentes tamaños que consisten en BGG al 1% o BGG al 3% en un excipiente que consiste en PLGA RG502 al 5% en ATEC:EA 98:2. Las partes alícuotas fueron de 10 μ l de BGG al 1% (◆); 50 μ l de BGG al 1% (■); 10 μ l de BGG al 3% (▲); 50 μ l de BGG al 3% (○). N = 3; eje x, días.

La figura 15 muestra la liberación *in vivo* de BGG a partir de formulaciones que consisten en BGG al 1% o el 3% en un excipiente que consiste en PLGA R502 al 5% en ATEC. Se inyectó una dosis unitaria de 50 µl en el segmento posterior de ojos de conejo.

5 Descripción detallada

Se entenderá que la presente invención no se limita a la metodología, los protocolos y los reactivos, etc., particulares descritos en el presente documento, que como tales pueden variar. La terminología utilizada en el presente documento tiene solo el propósito de describir formas de realización particulares, y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que está definido únicamente por las reivindicaciones.

15 Tal como se utilizan en el presente documento y en las reivindicaciones, las formas singulares incluyen la referencia plural y viceversa, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Aparte de en los ejemplos de operación, o cuando se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de ingredientes o condiciones de reacción utilizados en el presente documento deberá entenderse que están modificados en todos los casos por el término "aproximadamente", que a menos que se indique lo contrario, con respecto a valores porcentuales, significa ± 1%.

20 A menos que se definan de otra forma, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención. Aunque puede utilizarse cualquier procedimiento, dispositivo y material conocido en la puesta en práctica o el sometimiento a ensayo de la invención, en el presente documento, a este respecto, se describen procedimientos, dispositivos y materiales.

25 La presente invención proporciona formulaciones de liberación mantenida en las que la cinética de liberación de agente activo puede controlarse utilizando formulaciones relativamente sencillas que comprenden un excipiente (por ejemplo, un éster de citrato, un benzoato de bencilo, dimetilsulfona) y una pequeña cantidad (por ejemplo, menos de aproximadamente el 10%) de un polímero poli(D,L-láctido) (PLA) o poli(D,L-láctido-co-glicólido) (PLGA). Además, el PLA y el PLGA con y/o sin grupos terminales ácidos producen diferentes cinéticas de liberación. Además, los PLGA con diferentes porcentajes de restos de láctido y glicólido (por ejemplo, láctido:glicólido de 50:50; 65:35; 75:25 o 85:15) producen diferentes cinéticas de liberación mantenida. Por lo tanto, estos excipientes proporcionan el diseño de una diversidad de formulaciones a partir de las cuales se puede mantener la velocidad de liberación del agente activo durante el periodo de tiempo deseado.

35 Los excipientes no poliméricos de las presentes formas de realización incluyen benzoato de bencilo; ésteres de ácido benzoico con alcoholes alifáticos de cadena lineal, ramificada o cíclica que tienen de uno a veinte átomos de carbono en los que uno de los átomos de hidrógeno de la cadena alifática está reemplazado por un grupo hidroxilo (por ejemplo, alcoholes tales como metanol, etanol, n-propanol, i-propanol, n-butanol, i-butanol, s-butanol, t-butanol, n-pentanol, i-pentanol, neo-pentanol, n-hexanol, ciclohexanol, n-heptanol, n-octanol, n-nonanol, n-decanol y similares); dimetilsulfóxido, dimetilsulfona; dimetilsulfonato; mono-, di- y triésteres de ácido O-acetilcitrónico o ácido O-propionilcitrónico o ácido O-butilcitrónico con alcoholes alifáticos C₁ a C₁₀ de cadena lineal y ramificada; los mono-, di- y triésteres de ácido cítrico con alcoholes alifáticos C₁ a C₁₀ de cadena lineal y ramificada; citrato de trietil; citrato de acetiltriethyl; citrato de tri-n-butilo; citrato de acetil-tri-n-butilo; citrato de acetil-tri-n-hexilo; citrato de butiril-tri-n-hexilo; y/o éteres de ácido cítrico; d-alfa-tocoferol; d,1-alfa-tocoferol; d-beta-tocoferol; d,1-beta-tocoferol; d-eta-tocoferol; y d,1-eta-tocoferol (incluidas las formas de éster de PEG de acetato, hemisuccinato, nicotinato y succinato de cada uno de los anteriores); acetato de tocoferol; isómeros de tocotrienol y sus ésteres. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N^o 7.906.136, N^o 7.560.120 y N^o 6.960.346 y la publicación de patente de Estados Unidos 2011/0111006. Los excipientes no poliméricos de las presentes formas de realización son biocompatibles en el sentido de que no son tóxicos ni irritantes, son físicamente y químicamente estables y no comprometen la estabilidad del agente activo con el que están formulados.

40 El poli(ácido glicólico) (PGA), el poli(ácido láctico) (PLA) y sus copolímeros han sido investigados para una amplia gama de aplicaciones. Estos poliésteres alifáticos biodegradables tienen una biocompatibilidad comprobada y propiedades de biodegradación versátiles dependiendo de su peso molecular y sus composiciones químicas: los PLA/PGA son poliésteres biodegradables que se degradan en el cuerpo mediante simple hidrólisis del esqueleto de éster dando compuestos no perjudiciales y no tóxicos. Los productos de degradación *in vivo* son excretados por los riñones o se eliminan como dióxido de carbono y agua a través de rutas bioquímicas bien conocidas. Generalmente, el agente activo se ha atrapado en matrices sólidas basadas en poli(D,L-láctido-co-glicólido) (basadas en PLGA) en las que la liberación del agente se logra mediante bioerosión del polímero seguida de la exposición del agente previamente atrapado. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N^o 6.369.116; N^o 6.699.493; N^o 6.726.918; N^o 7.048.946.

65 Algunos implantes basados en PLGA se han fabricado disolviendo el polímero en un disolvente aprótico polar biocompatible que es de miscible a dispersable en el fluido corporal de forma que, tras su administración, el disolvente se disipa para producir un implante sólido (formado implantes *in situ*). Para que esto ocurra, el componente polimérico

está presente en $\geq 30\%$ en peso y el disolvente está presente en $\leq 70\%$ en peso. Véase la patente de Estados Unidos N° 6.773.714.

5 A diferencia de otros sistemas de administración de fármacos basados en polímeros, las presentes formas de realización proporcionan formulaciones en las que se mantiene el estado líquido del polímero, y la integridad monolítica de la dosis unitaria se mantiene después de la inyección. Más específicamente, cuando se inyectan con cuidado (por ejemplo en un ojo), las formulaciones de las presentes formas de realización mantienen la integridad monolítica en un estado líquido, en el que los excipientes biocompatibles y biodegradables se mantienen y se disuelven gradualmente a lo largo del tiempo a medida que se suministra el agente activo. Las formas de realización de la presente invención son formulaciones líquidas inyectables en las que el polímero está presente en $\leq 10\%$ en peso ($\pm 1\%$) de la formulación. Por ejemplo, el excipiente polimérico: no polimérico puede prepararse con una relación de excipiente polimérico:excipiente(s) no polimérico(s) que puede ser de 1:99 a 10:90 (% en peso), ambos inclusive; por ejemplo, 5:95 de PLGA:TEC (5% en peso de PLGA y 95% en peso de éster de citrato). La porción de excipiente de la formulación puede prepararse y después mezclarse con el agente activo. Por ejemplo, se prepara PLGA al 5% en benzoato de bencilo (BB) (por ejemplo, mediante agitación) y después se mezcla con inmunoglobulina al 2% en peso (es decir, 2 mg de inmunoglobulina y 98 mg de PLGA:benzoato de bencilo).

20 Las formulaciones de la presente invención se pueden inyectar a través de una aguja de jeringa de calibre relativamente pequeño, por ejemplo, una aguja de calibre 25, 27, 28 o 30, o inferior. La dosis unitaria de la formulación para su administración en el ojo es diminuta, generalmente de aproximadamente 5 μl a aproximadamente 100 μl , ambos inclusive, aunque una dosis unitaria única proporciona una concentración terapéutica mantenida de agente activo durante al menos 14 días. Las formulaciones de la presente invención pueden ser incoloras o casi incoloras, lo que puede ser ventajoso para su uso en el ojo.

25 Las formulaciones de la presente invención también son ventajosas para su uso en los ojos porque, aunque son líquidas, mantienen la integridad monolítica cuando se disponen en un ojo, es decir, forman una forma contigua y no se disgregan ni se dispersan en partículas más pequeñas o precipitantes en el ojo. Una vez administrada en un ojo, el médico puede observar la ubicación y el tamaño de la formulación en el ojo, aunque el sujeto no es consciente de su presencia (es decir, la dosis de la formulación no obstruye la visión). Típicamente, mientras la formulación aún sea visible para el médico, aún está administrando agente activo. Esta caracterización física también es útil para preparar formulaciones según las formas de realización del presente documento, porque una mezcla particular de excipientes se puede preparar fácilmente y disponerla en un entorno salino u otro fluido que imite las condiciones del ojo, y observarla para determinar si mantiene la integridad monolítica.

35 Con respecto a los excipientes poliméricos que pueden utilizarse en conjunto con los excipientes no poliméricos de las presentes formas de realización, el PLGA es un polímero que, cuando se mezcla con excipientes particulares tal como se describen en el presente documento, es adecuado para formulaciones de liberación mantenida. El PLGA puede tener diferentes cantidades de restos de láctido y de glicólido (por ejemplo, láctido:glicólido de 50:50; 65:35; 75:25 o 85:15), lo que afecta a la cinética de liberación mantenida de la formulación. Por ejemplo, el PLGA 50/50 es un polímero con una composición molar 50:50 de ácido D,L-láctico y glicólico en la cadena de PLGA. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 4.728.721. Generalmente, existen tres tipos de funciones de grupos finales de PLGA: (i) grupo de ácido carboxílico libre, (ii) grupo terminado en éster y (iii) grupo de éster alquílico. Los polímeros "encapsulados" con grupos éster y éster alquílico tienen una polaridad diferente y típicamente presentan periodos de degradación más largos que los análogos carboxílicos libres. Además, cuando se utilizan como una matriz sólida (por ejemplo, implantes o nanopartículas), los polímeros de PLGA que tienen un peso molecular alto típicamente liberan el agente más lentamente que los PLGA de menor peso molecular. Véase Gasper et al., 52 J. Control Release 53 (1998)).

50 Según las presentes formas de realización, se pueden mezclar diversos polímeros PLA, PGA y PLGA en excipientes líquidos en un pequeño porcentaje (típicamente de aproximadamente el 10% o inferior) del volumen de la porción de excipiente de una formulación farmacéutica, y prolongar el perfil de liberación mantenida del agente en comparación con su liberación a partir del excipiente líquido solo. Aunque se ha informado del uso de dichos polímeros en la formulación sólida de liberación mantenida (por ejemplo, implantes, microesferas o nanoesferas de polímeros sólidos), el que la adición de una cantidad relativamente pequeña de polímero líquido a un excipiente líquido no polimérico de liberación mantenida modulara el perfil de liberación mantenida del excipiente no polimérico es inesperado. Por lo tanto, el polímero puede utilizarse en las formulaciones de la presente invención a aproximadamente el 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, o aproximadamente el 10% (p/p), o cualquier fracción de los mismos, ambos extremos inclusive.

60 Sin vincularse a ninguna teoría, a diferencia de las actuales composiciones y formulaciones de liberación mantenida de PLGA en las que el agente activo queda atrapado en los poros de una matriz sólida de PLGA, en las formas de realización de la presente invención el polímero permanece líquido y actúa conjuntamente con el excipiente no polimérico líquido, asociándose con el excipiente líquido y el agente activo en una red flotante suelta que se disocia a medida que los residuos de láctido abandonan el polímero.

65 Las formulaciones descritas en el presente documento proporcionan la liberación mantenida de agentes tales como proteínas terapéuticas durante al menos 14 días. Los expertos en la técnica entienden que esto se distingue del efecto

5 terapéutico, que puede presentarse durante un periodo más largo (o un periodo más corto) que el periodo a lo largo del cual la proteína terapéutica se libera de la formulación particular. La liberación puede mantenerse durante al menos 14 días o más, tal como 21 días, 28 días, 35 días, 42 días, 49 días, etc., hasta 150 días o más. A este respecto, un experto en la técnica puede interpretar y extrapolar los días o las semanas de liberación mantenida a partir de las figuras, que se incorporan a la presente descripción escrita.

10 Los agentes activos que pueden utilizarse en las presentes formas de realización incluyen, pero sin limitación, agentes antiglaucoma, analgésicos, anestésicos, narcóticos, esteroides angiostáticos, esteroides antiinflamatorios, inhibidores de la angiogénesis, antiinflamatorios no esteroideos, agentes antiinfecciosos, antifúngicos, antipalúdicos, agentes antituberculosos, antivirales, agonistas alfa-adrenérgicos, agentes bloqueantes beta-adrenérgicos, inhibidores de anhidrasa carbónica, estabilizadores de mastocitos, mióticos, prostaglandinas, antihistamínicos, agentes antimicrotúbulos, agentes antineoplásicos, antiapoptóticos, inhibidores de aldosa reductasa, antihipertensivos, antioxidantes, antagonistas de la hormona del crecimiento, agentes para vitrectomía, antagonistas del receptor de adenosina, inhibidor deslaminado de adenosina, antagonistas de la glucosilación, péptidos antienviejamiento, 15 inhibidores de la topoisomerasa, antimetabolitos, agentes alquilantes, antiandrógenos, antiestrógenos, inhibidores de la activación del oncogén, inhibidores de telomerasa, anticuerpos o porciones de los mismos, oligonucleótidos antisentido, proteínas de fusión, agonistas de hormonas liberadoras de la hormona luteinizante, agonistas de hormonas liberadoras de onadotropina, inhibidores de tirosina quinasa, inhibidores del factor de crecimiento epidérmico, inhibidores de ribonucleótido reductasa, citotoxinas, productos terapéuticos IL2, antagonistas de la 20 neurotensina, ligandos sigma periféricos, antagonistas del receptor ETA de endotelina, antihiper glucémicos, enzimas modificadoras de la cromatina, agentes para la gestión de obesidad, productos terapéuticos para la anemia, productos terapéuticos para la emesis, productos terapéuticos para la neutropenia, productos terapéuticos para la hipercalcemia inducida por tumores, anticoagulantes sanguíneos, antiproliferativos, agentes inmunosupresores, agentes reparadores de tejidos, agentes psicoterapéuticos, aptámeros (Eyetechn), Lucentis (Genentech), Inhibidores de ARN, insulina, 25 insulina humana, GLP-1 y Byetta (exenatida, Amylin).

30 Las formulaciones de la presente invención son particularmente ventajosas para la liberación mantenida de proteínas, en particular de ligandos proteínicos tales como anticuerpos. Anticuerpos, tal como se utiliza en el presente documento, significa molécula de inmunoglobulina intacta, así como porciones, fragmentos, péptidos, análogos o derivados de la misma tales como, por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, regiones CDR, parátomos o cualquier porción o secuencia peptídica de un anticuerpo que sea capaz de unirse a un antígeno o un epítipo, e incluye anticuerpos monovalentes, anticuerpos divalentes, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos totalmente humanizados, anticuerpos recombinantes y anticuerpos monoclonales producidos por animales transgénicos. Se dice que un anticuerpo es "capaz de unirse" a una molécula si es capaz de reaccionar 35 específicamente con la molécula de forma que la molécula se una al anticuerpo.

40 Los trastornos oculares que pueden tratarse utilizando formulaciones según las presentes formas de realización incluyen retinopatías diabéticas, retinopatías proliferativas, desprendimiento de retina, retinopatías tóxicas, enfermedades vasculares retinianas, degeneraciones retinianas, anomalías vasculares, degeneración macular relacionada con la edad, enfermedades infecciosas, enfermedades inflamatorias, isquemia ocular, trastornos relacionados con el embarazo, tumores retinianos, tumores coroideos, trastornos coroideos, trastornos vítreos, traumatismos, complicaciones de cataratas, ojo seco, neuropatías ópticas inflamatorias y otros trastornos adquiridos.

45 Un "trastorno" es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento con, por ejemplo, un agente de liberación mantenida. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas, incluidas aquellas afecciones patológicas que predisponen al sujeto al trastorno en cuestión.

50 Por ejemplo, trastornos relacionados con los ojos en los que la vasculatura del ojo está dañada o está regulada de forma insuficiente. La neovascularización se asocia con degeneración macular exudativa relacionada con la edad, retinopatía diabética, neovascularización corneal, neovascularización coroidea, glaucoma neovascular, ciclitis, enfermedad de Hippel-Lindau, retinopatía del prematuro, pterigión, histoplasmosis, neovascularización del iris, edema macular, neovascularización asociada al glaucoma y similares. Los trastornos asociados con componentes neovasculares y atróficos, tales como degeneración macular relacionada con la edad y retinopatía diabética, son particularmente difíciles de tratar debido a la aparición de una amplia diversidad de complicaciones. Las 55 complicaciones atróficas incluyen, por ejemplo, la formación de drusas y depósitos laminares basales, irregularidad en la pigmentación retiniana y la acumulación de gránulos de lipofusina.

60 Las formulaciones de la presente invención se pueden utilizar para el tratamiento terapéutico o profiláctico de los ojos de un sujeto. "Terapéutico" se refiere a la mejora del trastorno relacionado con los ojos, en sí mismo, y a la protección, total o parcial, contra otras enfermedades relacionadas con los ojos, tales como la neovascularización ocular o la degeneración macular relacionada con la edad. "Profiláctico" se refiere a la protección, total o parcial, frente a los trastornos relacionados con los ojos, tales como neovascularización ocular o degeneración macular relacionada con la edad. Un experto en la técnica apreciará que cualquier grado de protección o mejora de un trastorno relacionado con los ojos es beneficioso para un sujeto. La invención es particularmente ventajosa porque un agente terapéutico 65 puede aplicarse directamente a las zonas afectadas del ojo sin los efectos secundarios dañinos de los tratamientos sistémicos.

Las proteínas terapéuticas que se pueden formular según las presentes formas de realización incluyen citocinas, inhibidores de la angiogénesis, agentes neurotróficos, esteroides, enzimas (por ejemplo, hialuronidasa) y anticuerpos.

5 Los ejemplos de inhibidores de la angiogénesis incluyen aflibercept (una proteína de fusión de dominios de unión claves de VEGFR-1 y -2 humano combinada con un fragmento Fc de IgG humana), factor derivado de epitelio pigmentario (PEDF), anticuerpo anti-VEGF o una porción del mismo (tal como ranibizumab o bevacizumab) angioestatina, vasculostatina, endostatina, factor plaquetario 4, heparinasa, interferones, inhibidor tisular de metaloproteínasa 3 e inhibidores de tirosina quinasa, y similares. Dichos factores pueden prevenir el crecimiento de
10 nuevos vasos sanguíneos, promover la maduración de los vasos, inhibir la permeabilidad de los vasos sanguíneos, inhibir la migración de las células endoteliales y similares. Véase, por ejemplo, el documento WO 02/22176.

Otra clase de proteínas terapéuticas son los factores neurotróficos, que incluyen citocinas neuropoyéticas, neurotrofinas y factores de crecimiento de fibroblastos. El factor neurotrófico ciliar (CNTF) es un ejemplo de citocina neuropoyética que promueve la supervivencia de neuronas ganglionares ciliares y apoya a determinadas neuronas que responden al NGF. Las neurotrofinas incluyen, por ejemplo, el factor neurotrófico derivado del cerebro y el factor de crecimiento nervioso, quizás el factor neurotrófico mejor caracterizado. Otros factores neurotróficos incluyen, por ejemplo, factores de crecimiento transformantes, factor neurotrófico derivado de la línea celular glial, neurotrofina 3, neurotrofina 4/5 e interleucina 1-β. Los factores neurotróficos mejoran la supervivencia neuronal y pueden revertir la degradación de las neuronas. El PEDF es un ejemplo de proteína que muestra actividades antiangiogénicas y neurotróficas.

Siguiendo con los anticuerpos, los tratamientos inmunosupresores basados en anticuerpos incluyen anticuerpos anti-IL-2R (por ejemplo, basiliximab o daclizumab) y anticuerpos anti-CD52 (por ejemplo, alemtuzumab), abatacept y el belatacept madurado por afinidad (constructos basados en anticuerpos que combinan la parte extracelular del receptor inmunomodulador CTLA4 con una región Fc de IgG humana), globulina antitimocítica, murinomab (anticuerpo anti-CD3) o infliximab (anti-TNF-α). Véase Thiel et al., 23 Eye 1962 (2009). Además, el anticuerpo monoclonal humano lerdelumab (anti-TGFβ2) se ha utilizado en sujetos que se han sometido a cirugía por glaucoma y cataratas.

30 Un experto en la técnica apreciará que una proteína terapéutica particular puede modificarse o truncarse (por ejemplo, mediante enfoques recombinantes o de fragmentación) y conservar su actividad biológica. Como tales, las porciones activas de diversas proteínas (por ejemplo, aquellas porciones de proteínas antiangiogénicas que tienen actividad biológica suficiente para inhibir la angiogénesis) también son adecuadas para su uso en las presentes formulaciones.

35 Las citocinas también pueden formularse según las formas de realización del presente documento. Una "citocina" se refiere a cualquiera de entre un grupo diverso de proteínas y péptidos solubles que actúan como reguladores humorales a concentraciones de nanomolares a picomolares y que, ya sea en condiciones normales o patológicas, modulan las actividades funcionales de células y tejidos individuales. Estas proteínas también median las interacciones entre las células directamente y regulan los procesos que tienen lugar en el entorno extracelular. Los ejemplos de citocinas incluyen, sin limitación, interleucinas IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18; factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF); factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF); interferones que incluyen interferón alfa (IFN-α), interferón beta (IFN-β) e interferón gamma (IFN-γ); factor de necrosis tumoral (TNF), factor de crecimiento transformante beta (TGF-β); ligando FLT-3 y ligando CD40.

45 En una forma de realización de la presente invención, el agente activo es un anticuerpo monoclonal. En un ejemplo específico de formulación, se suspendió aproximadamente el 2% (en peso) de anticuerpo en una solución de PLGA a aproximadamente el 5% (láctido:glucólido 50:50, intervalo de PM de 7.000-17.000, grupo terminal de éster alquílico) (Evonik Röhm GmbH, Darmstadt, Alemania; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), en citrato de acetiltriethyl (ATEC). La liberación de anticuerpos a partir de esta formulación se mantuvo durante al menos 14 días a niveles bioactivos y terapéuticos. En otra forma de realización, el agente activo es un anticuerpo monoclonal suspendido en una formulación que consiste en PLGA a aproximadamente el 5% (láctido:glucólido 65:35, intervalo de PM de 24.000-38.000, grupo terminal de ácido carboxílico libre) en ATEC. La liberación de anticuerpos se mantuvo a un nivel bajo, mostrando una cinética de orden casi cero, durante al menos 14 días, y el anticuerpo mantuvo la especificidad de unión al antígeno. En otra forma de realización más, el agente activo es un anticuerpo monoclonal suspendido en una formulación que consiste en PLGA a aproximadamente el 6% (láctido:glucólido 75:25, intervalo de PM de 4.000-15.000, grupo terminal de ácido carboxílico libre) en ATEC. La liberación de anticuerpos se mantuvo a un nivel bajo durante al menos 14 días, y el anticuerpo mantuvo la especificidad de unión al antígeno durante este periodo de tiempo.

60 En otra forma de realización, el anticuerpo IgG monoclonal recombinante se formuló en PLGA al 5% en ATEC o, como control, PBS. Se administraron a conejos dosis de 50 μl que contenían 1 mg de IgG, por inyección intravítrea bilateral. Los conejos se sacrificaron de forma humanitaria los días 1, 7, 14 y 28 después de la administración, y se compararon las concentraciones de IgG de ensayo en humor vítreo (fracciones de sedimento y sobrenadante), retina, coroides y plasma. Se evaluaron puntos temporales por duplicado o por triplicado y se promediaron. En el plasma, la concentración de IgG de la formulación de PBS aumentó rápidamente hasta alcanzar su punto máximo el día 7; mientras que la concentración de IgG de la formulación de PLGA/ATEC permaneció más baja y nivelada el día 28. En el vítreo, la concentración de IgG de la formulación de PBS disminuyó con el tiempo en todos los tejidos; mientras que

la concentración de IgG de la formulación de PLGA/ATEC se mantuvo estable en la fracción de sedimento y aumentó constantemente en la fracción de sobrenadante; la concentración de IgG de la formulación de PLGA/ATEC fue mayor en ambas fracciones en el vítreo el día 28 en comparación con la concentración de IgG de la formulación de PBS. En la retina y la coroides, la concentración de IgG de la formulación de PBS aumentó inicialmente, luego disminuyó con el tiempo. Por el contrario, la concentración de IgG de la formulación de PLGA/ATEC aumentó de forma constante con el tiempo, y fue mayor el día 28 tanto en la retina como en la coroides en comparación con la formulación de PBS. Se suministró IgG a los tejidos oculares durante al menos 14 días (es decir, 28 días).

"Tratar", "tratamiento", "tratando" o "mejora" se refieren a tratamientos terapéuticos, en los que el objetivo es revertir, aliviar, mejorar, inhibir, ralentizar o detener la progresión o la gravedad de una afección asociada con una enfermedad o un trastorno. El término "tratar" incluye reducir o aliviar al menos un efecto adverso o un síntoma de una afección, una enfermedad o un trastorno asociado con un trastorno del ojo, tal como edema ocular. El tratamiento generalmente es "eficaz" si se reducen uno o más síntomas o marcadores clínicos. Alternativamente, el tratamiento es "eficaz" si la progresión de una enfermedad se reduce o se detiene. Es decir, el "tratamiento" incluye no solo la mejora de los síntomas o marcadores, sino también el cese o al menos la desaceleración del progreso o el empeoramiento de los síntomas que se esperarían en ausencia de tratamiento. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero sin limitación, alivio de uno o más síntomas, disminución de la extensión de la enfermedad, estado de enfermedad estabilizado (es decir, que no empeora), retardo o desaceleración de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de la enfermedad y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. El término "tratamiento" de una enfermedad también incluye el alivio de los síntomas o efectos secundarios de la enfermedad (incluido el tratamiento paliativo).

En general, el objetivo del tratamiento es reducir el tamaño de un tumor o el nivel de un antígeno, o inhibir la actividad de una diana, medida utilizando un estudio *in vitro*, celular o *in vivo*. En particular, la disminución de la actividad biológica de una diana, un antígeno o un tumor, medida utilizando un ensayo *in vitro*, celular o *in vivo* adecuado (que generalmente dependerá de la diana involucrada), en al menos el 5%, 10%, 25%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90%, o el 100%, ambos extremos inclusive, en comparación con un control no tratado equivalente. Una disminución se refiere a una disminución estadísticamente significativa. Para evitar dudas, una disminución será al menos del 5% con respecto a una referencia, tal como al menos el 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más, hasta el 100% inclusive, ambos extremos inclusive. Reducir o inhibir puede referirse, por ejemplo, a los síntomas del trastorno que se está tratando, tal como la reducción de la presión ocular o la disminución del edema retiniano.

Una "cantidad eficaz", tal como se utiliza en el presente documento, es cualquier cantidad que sea suficiente para promover la aparición de un resultado o una condición deseada, o para reducir o inhibir la aparición de un resultado o una condición no deseada. En algunos casos, un resultado o una condición deseada es un ideal que representa un extremo de un espectro de posibles resultados o condiciones. En tales casos, una cantidad eficaz es cualquier cantidad asociada con un resultado o una condición que se encuentra más cerca del ideal deseado de lo que se lograría o se observaría sin la cantidad eficaz. Por lo tanto, una cantidad eficaz promueve la aparición de un resultado o una condición deseada, pero no es necesario que alcance en última instancia un punto final.

Se pueden combinar agentes y tratamientos adicionales con la administración de las formulaciones de las presentes formas de realización. Así, aunque las formulaciones y los procedimientos de la invención en determinados casos pueden ser útiles para reemplazar procedimientos quirúrgicos existentes o tratamientos farmacológicos, la presente invención también es útil para mejorar la eficacia de los tratamientos existentes para tratar tales afecciones. En consecuencia, el tratamiento combinado puede utilizarse para tratar a los sujetos que se someten o que se someterán a un tratamiento de, entre otras enfermedades, una enfermedad ocular o un tumor/cáncer. Por ejemplo, los agentes de la presente invención pueden administrarse junto con agentes antimicrobianos o agentes antiproliferativos. Los agentes de la invención también pueden administrarse junto con otros inmunotratamientos, tales como antígenos, coadyuvantes, inmunomoduladores o inmunoterapia pasiva con anticuerpos. En algunas formas de realización, el procedimiento según este aspecto de la invención implica también administrar al sujeto un medicamento contra el cáncer. Los agentes de la invención también pueden administrarse junto con tratamientos no farmacológicos, tales como cirugía, radioterapia o quimioterapia. Alternativamente, y según lo indique la condición médica, el tratamiento con agentes terapéuticos de liberación mantenida tal como se describe en el presente documento implica también administrar al sujeto un medicamento antibacteriano, antivírico, antimicrobiano, antifúngico, antiparasitario u otro medicamento antiinfeccioso. Dicho otro tratamiento puede administrarse antes, simultáneamente o después del tratamiento con los agentes de la invención. También puede producirse un retraso de varias horas, días y, en algunos casos, semanas entre la administración de los diferentes tratamientos, pudiendo administrarse los agentes de la invención antes o después del otro tratamiento.

Como entenderán los expertos en la técnica, las dosis apropiadas de los agentes formulados tal como se describen en el presente documento, con o sin agentes adicionales, generalmente se encontrarán alrededor de las que ya se emplean en tratamientos clínicos, por ejemplo cuando los productos quimioterapéuticos se administran solos o en combinación con otros productos quimioterapéuticos. La variación en la dosis probablemente se producirá dependiendo de la afección que se está tratando. El médico que administra el tratamiento podrá determinar la dosis apropiada para el sujeto individual.

Las formulaciones farmacéuticas pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse por cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica de la farmacia. Todos los procedimientos incluyen la etapa de asociar el agente activo, por ejemplo, la proteína terapéutica, con los excipientes de la presente invención. En general, las formulaciones se preparan asociando de forma uniforme e íntima el agente con un excipiente líquido que contiene $\leq 10\%$ de polímero. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multidosis.

La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos no limitantes.

10 EJEMPLOS

Ejemplo 1. Formulaciones que comprenden dexametasona en ATEC con o sin PLGA

En general, se prepararon formulaciones de dexametasona en citrato de acetil-trietilo (ATEC) de la forma siguiente. Se pesaron poli(D,L-láctido-co-glicólido) (PLGA) o poli(D,L-láctido) (PLA) (Evonik Röhm GmbH, Darmstadt, Alemania; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y ATEC y se dispusieron en un vial de centelleo de 20 ml. El tamaño de lote típico era de 10 gramos de peso total, por ejemplo, para una formulación de RG502H al 5% (láctido:glicólido 50:50, intervalo de PM de 7.000-17.000, grupo final de ácido carboxílico libre) en ATEC: se pesaron 500 mg de RG502H y 9500 mg de ATEC, se mezclaron y se agitaron en el vial de centelleo con una barra de agitación magnética. La mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta la disolución total del polímero. Esto generalmente precisa varias horas de agitación durante la noche, dependiendo del polímero utilizado. Una vez que el polímero/ATEC se habían mezclado dando una solución transparente e incolora, se pesaron la cantidad deseada de dexametasona y la solución de polímero/ATEC, por ejemplo, para obtener el 6% en peso de dexametasona en RG502H al 5%/ATEC, 120 mg de dexametasona y 1880 mg de RG502H al 5%/ATEC, para obtener un total de 2 g de la formulación.

Para la preparación de la muestra, la suspensión de dexametasona/polímero/ATEC se agitó vigorosamente con vórtice durante 5-10 segundos. Se retiró una parte alícuota de la mezcla de formulación con una pipeta mecánica y se cargó en una jeringa de insulina de polipropileno BD con una aguja de calibre 28 (producto VWR N° de referencia 309300). Se pesó la jeringa que contenía la formulación (peso previo a la inyección). Se inyectó una parte alícuota de 10 μ l de la formulación en un vial de centelleo de 20 ml que contenía 10 ml de solución salina al 0,9% ("medio de liberación"), formando una forma monolítica (por ejemplo, una esfera o una "bola") de la formulación en la parte inferior del vial. Se limpió el exceso de solución salina de la jeringa y la jeringa se pesó nuevamente (peso posterior a la inyección). La cantidad real de formulación inyectada se puede calcular restando el peso posterior a la inyección del peso previo a la inyección.

Las muestras se dispusieron en un horno a 37 °C, y cada día de muestreo se retiraron 5 ml del medio de liberación para su análisis y se reemplazaron por 5 ml de medio de liberación nuevo para mantener un volumen total de 10 ml en todo momento (manteniendo un "sumidero infinito"). Los días de muestreo fueron típicamente el día 1, el día 3 (o el día 4), el día 7, el día 14 y semanalmente a partir de este último hasta que se hubiera liberado toda la dexametasona en el medio a partir de la "bola" de formulación.

Todas las muestras se analizaron por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) con las condiciones siguientes:

Columna: Waters Nova-Pak, C18, 4 μ m, 150 mm x 3,9 mm

Fase móvil: H₂O (H₃PO₄), pH 2,5 - acetonitrilo, condición de gradiente de (60:40) a (10:90) en 9 minutos y después de nuevo a (60:40)

Velocidad de flujo: 0,5 ml/min

Detector: 240 nm

Volumen de muestra: 10 μ l

Concentraciones estándar: 30 μ g/ml, 60 μ g/ml y 120 μ g/ml

Se compararon tres formulaciones, cada una con dexametasona al 6% en ATEC (dexametasona al 6%/ATEC) sin o con RG752H (poli(D,L-láctido-co-glicólido) al 5%, láctido:glicólido 75:25, intervalo de PM de 4.000-15.000, grupo terminal de ácido carboxílico libre) (dexametasona al 6%/RG752H al 5%/ATEC); o PLGA RG502 (poli(D,L-láctido-co-glicólido), láctido:glicólido 50:50, intervalo de PM de 7.000-17.000, grupo terminal de éster alquílico) (dexametasona al 6%/RG502 al 5%/ATEC).

Para analizar perfiles de liberación *in vitro* se inyectó una parte alícuota de 10 μ l de cada formulación en 10 ml de solución salina al 0,9% y se incubó a 37 °C, después se intercambiaron partes alícuotas de 5 ml semanalmente (es decir, sumidero infinito) y la muestra se analizó para determinar la concentración de dexametasona mediante el procedimiento de HPLC estándar. Los perfiles de liberación mantenida resultantes se muestran en la figura 1. Como

se puede observar en el gráfico de la figura 1, 10 µl de la formulación de dexametasona en ATEC mantuvieron la liberación de dexametasona durante al menos 14 días; 10 µl de la formulación de dexametasona en ATEC/RG752 al 5% mantuvieron la liberación de dexametasona durante al menos 56 días; y 10 µl de la formulación de dexametasona en ATEC/RG502 al 5% mantuvieron la liberación de dexametasona durante al menos 98 días.

5

Ejemplo 2. Formulaciones que comprenden dexametasona en ATEC con/sin PLA

Se compararon cuatro formulaciones, que comprenden dexametasona en ATEC (dexametasona al 6%/ATEC) sin o con R202H (poli(D,L-láctido) al 5%, intervalo de PM de 10.000-18.000, grupo final de ácido carboxílico libre) (dexametasona al 6%/R202H al 5%/ATEC); R203H (poli(D,L-láctido), intervalo de PM de 18.000-28.000, grupo final de ácido carboxílico libre) (dexametasona al 6%/R203H al 5%/ATEC); o R203S (poli(D,L-láctido), intervalo de PM de 18.000-28.000, terminado en éster) (dexametasona al 6%/R203S al 5%/ATEC).

10

Se generó un perfil de liberación como en el ejemplo 1, y los perfiles de liberación mantenida resultantes se muestran en la figura 2. Como se puede observar en el gráfico de la figura 2, 10 µl de la formulación de dexametasona en ATEC mantuvieron la liberación de dexametasona durante al menos 14 días; 10 µl de la formulación de dexametasona en ATEC/R202H al 5% mantuvieron la liberación de dexametasona durante al menos 70 días; y 10 µl de la formulación de dexametasona en ATEC/R203H al 5% mantuvieron la liberación de dexametasona durante al menos 98 días; y 10 µl de la formulación de dexametasona en ATEC/R203S al 5% mantuvieron la liberación de dexametasona durante al menos 154 días.

15

20

Ejemplo 3. Formulaciones que comprenden dexametasona en ATEC con/sin PLGA

Se compararon cuatro formulaciones, que comprenden dexametasona en ATEC (dexametasona al 6%/ATEC) sin o con PLGA RG502H al 5% (dexametasona al 6%/RG502H al 5%/ATEC); PLGA RG502 (dexametasona al 6%/RG502 al 5%/ATEC); o PLGA RG505 (poli(D,L-láctido-co-glicólido, D,L-láctido:glicólido 50:50, PM ~80,000, grupo terminal de éster alquílico) (dexametasona al 6%/RG505 al 5%/ATEC). Se generó un perfil de liberación como en el ejemplo 1, y los perfiles de liberación mantenida resultantes se muestran en la figura 3.

25

Como puede observarse en el gráfico de la figura 3, 10 µl de la formulación de dexametasona en ATEC mantuvieron la liberación de dexametasona durante al menos 14 días; 10 µl de la formulación de dexametasona en ATEC/RG502H al 5% mantuvieron la liberación de dexametasona durante al menos 49 días; 10 µl de la formulación de dexametasona en ATEC/RG502H mantuvieron la liberación de dexametasona durante al menos 98 días; y 10 µl de la formulación de dexametasona en ATEC/RG505 al 5% mantuvieron la liberación de dexametasona durante al menos 98 días, con una liberación más lenta al comienzo del periodo de análisis.

30

35

Ejemplo 4. Formulaciones que comprenden dexametasona, ATEC y PLGA con diferentes proporciones de láctido:glicólido.

Se compararon cuatro formulaciones, que comprenden dexametasona en ATEC (dexametasona al 6%/ATEC) y dexametasona en ATEC con PLGA que tienen diferentes porcentajes de láctido y glicólido (es decir, relaciones de láctido:glicólido de 50:50; 75:25 o 85:15) (dexametasona al 6%/RG502H al 5% (50:50)/ATEC); RG756S (poli(D,L-láctido-co-glicólido), 75:25, intervalo de PM de 76.000-116.000, terminado en éster) (dexametasona al 6%/RG756S al 5% (75:25)/ATEC); PLGA (85:15) poli(D,L-láctido-co-glicólido), láctido:glicólido (85:15), intervalo de PM de 50.000-75.000 (dexametasona al 6%/PLGA al 1,25% (85:15)/ATEC).

40

45

Se generó un perfil de liberación como en el ejemplo 1, y los perfiles de liberación mantenida resultantes se muestran en la figura 4. Como se puede observar en la figura 4, 10 µl de la formulación de dexametasona en ATEC mantuvieron la liberación de dexametasona durante al menos 14 días; 10 µl de la formulación de dexametasona en ATEC/PLGA (85:15) mantuvieron la liberación de dexametasona durante al menos 42 días; 10 µl de la formulación de dexametasona en ATEC/RG502H al 5% (50:50) mantuvieron la liberación de dexametasona durante al menos 56 días; y 10 µl de la formulación de dexametasona en ATEC/RG756S al 5% (75:25) mantuvieron la liberación de dexametasona durante al menos 84 días.

50

Ejemplo 5. Formulaciones de liberación mantenida de gamma-globulina bovina (BGG)

Se preparó una formulación de BGG al 1% en PLGA RG502H al 5%/ATEC. En resumen, se añadió el 1% o el 1,5% de γ-globulinas en polvo, finas, de sangre bovina (BGG, Cohn fracción II y III, Sigma) a una solución de PLGA al 5% en ATEC. Las suspensiones resultantes se mezclaron mediante agitación con vórtice y sonicación hasta que se observó una distribución uniforme.

60

Para el análisis *in vitro* de liberación mantenida, se dispusieron partes alícuotas de 10 µl de la formulación de BGG en una matriz de 10 ml de solución salina al 0,9%, albúmina porcina al 1% y azida de sodio al 0,05%, y se incubaron a temperatura ambiente o 37 °C. Más específicamente, se pesó un vial de liberación de vidrio de 20 ml. A continuación, se dispuso una gota de 10 µl de la formulación de ensayo (suspensión) en el vial de vidrio, se midió el peso total del vial y la formulación, y se calculó el peso de la formulación añadida (gota). Al vial que contenía la gota, se añadieron

65

10 ml de matriz de liberación. El vial resultante que contiene la matriz de liberación y la gota en el fondo del vial se incubó a temperatura ambiente o a 37 °C. En cada punto temporal, el vial se equilibró a temperatura ambiente y se retiraron cuidadosamente 5 ml de la solución de matriz para la determinación de BGG. Después se añadieron 5 ml de la matriz de liberación al vial de vidrio de 20 ml para mantener condiciones de sumidero infinito, y el vial se retornó a la incubación a 37 °C. El muestreo y el reemplazo de la matriz se repitieron en cada punto temporal.

La determinación de BGG se realizó utilizando el equipo de cuantificación ELISA de IgG bovina (Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, TX). Se preparó un patrón de solución madre de BGG (1,00 mg/ml) en solución salina al 0,9% que contenía PSA al 1% y azida de sodio al 0,05% y se almacenó a +4 °C durante un mes. Se prepararon patrones de trabajo de BGG (en el intervalo de 0 ng/ml a 500 ng/ml) inmediatamente diluyendo el patrón de solución madre en el tampón de ensayo (también utilizado para diluciones de la muestra). Las concentraciones de BGG se determinaron frente a la curva de calibración estándar según el Protocolo ELISA (Bethyl Laboratories, Inc). Se generó la figura 5. En esta formulación, la liberación de BGG se mantuvo durante al menos 16 días a 37 °C y durante al menos 60 días a temperatura ambiente.

Ejemplo 6. Liberación de BGG comparando PLGA RGA502H con PLGA RG502

Se prepararon formulaciones de BGG al 1% en PLGA RG502H al 5%/ATEC y BGG al 1% en PLGA RG502 al 5%/ATEC como en el ejemplo 5. Se generó la figura 6, N = 3. Los resultados indicaron que se liberó BGG durante al menos 14 días desde el excipiente RG502H/ATEC, y al menos 49 días desde el excipiente RG502/ATEC.

Ejemplo 7. Liberación mantenida de BGG en ATEC/BB/DMSO y PLGA RG502 al 5%

Se prepararon formulaciones de BGG al 1% en PLGA RG502 al 5% en ATEC/BB/DMSO (50:38:12). Los datos se generaron como en el ejemplo 5 y se graficaron, y se muestran en la figura 7, N = 4. Como se puede observar en el gráfico, la liberación de BGG se mantuvo durante al menos 60 días a 37 °C.

En una forma de realización similar, se preparó una formulación de BGG al 1,5% en PLGA RG502 al 5% en ATEC/BB/DMSO (50:38:12). Cuando se dispuso en medio de ensayo, la formulación formó un bolo monolítico, aproximadamente plano, en el fondo del vial. Se generó un perfil de liberación *in vitro* de BGG tal como se muestra en la figura 11. Como se puede observar en los datos, todavía se estaba liberando BGG en el medio después de 130 días.

Ejemplo 8. Comparación de una formulación recién preparada y una almacenada de BGG

Se prepararon formulaciones de BGG al 1% en PLGA RG502 al 5% en ATEC y se estudió la liberación de BGG como en el ejemplo 5. Una formulación se almacenó durante aproximadamente 24 horas a 4 °C (envejecida) antes de someterse al estudio de liberación. Se generó la figura 8, N = 3. Las formulaciones que se habían almacenado durante aproximadamente 24 horas a 4 °C (envejecidas), mostraron una liberación *in vitro* más lenta que las formulaciones recién producidas (recién preparadas), pero en ambos casos la liberación de BGG se mantuvo durante al menos 35 días.

Ejemplo 9. Liberación mantenida de BGG a partir de citrato de trietilo (TEC) y diversos PLGA

Se prepararon formulaciones de BGG al 1% en TEC y el 5% de PLGA RG502, RG502H, RG653H (poli(D,L-láctido-co-glicólido), 65:35, intervalo de PM de 24.000-38.000, grupo final de ácido carboxílico libre), o RG752H (poli (D,L-láctido-co-glicólido) 75:25, intervalo de PM de 24.000-38.000, grupo final de ácido carboxílico libre). Se generó la figura 9 como en el ejemplo 5, N = 3. En todas las formulaciones, la liberación de BGG se mantuvo *in vitro* durante al menos 15 días, aunque se puede proyectar que la formulación TEC/RG752H mantendrá la liberación durante al menos 23 días.

Ejemplo 10. Liberación mantenida de BGG desde PLGA/ATEC o PLGA/ATEC/DMSO

Se prepararon tres formulaciones de BGG mezclando el 1% de BGG en PLGA RG502 al 5% en ATEC; PLGA RG502 al 7,5% en ATEC o PLGA RG502 al 7,1% en ATEC al 87,5% y DMSO al 4,4%. Todas las formulaciones se almacenaron a temperatura ambiente durante 8 días antes de disponerlas en condiciones de liberación de sumidero infinito. Cuando se dispuso una parte alícuota de 10 µl en medio de sumidero infinito, estas formulaciones mantuvieron un monolito bastante redondo en el fondo del vial de ensayo. Los resultados se muestran en la figura 12. Todavía se liberaba BGG de cada formulación a los 51 días.

Ejemplo 11. Liberación mantenida de BGG a partir de formulaciones de PLGA/BB/DMSO

Se prepararon formulaciones de BGG mezclando el 3% de BGG en mezclas de excipientes que consistían en PLGA RG502 al 1,7% en BB:DMSO 75:25; o PLGA RG502 al 5% en BB:DMSO 70:25. Los resultados de liberación *in vitro* se muestran en la figura 10.

Ejemplo 12. Liberación mantenida de BGG a partir de formulaciones de PLGA/EA/A TEC

5 Los tocoferoles proporcionan otro vehículo de liberación mantenida con el que se pueden modular las velocidades de liberación mediante la adición de pequeñas cantidades de PLGA. Se prepararon formulaciones de BGG mezclando el 1% de BGG o el 3% de BGG en una mezcla excipiente que consistía en PLGA RG502 al 5% en ATEC:EA 98:2 (es decir, el 98% en peso de ATEC y el 2% en peso de acetato de tocoferol). Se sometieron a ensayo partes alícuotas de 10 µl o 50 µl, por triplicado, para evaluar la liberación *in vitro* de BGG, y los resultados se muestran en la figura 14.

10 Ejemplo 13. Liberación mantenida *in vivo* de anticuerpos en formulaciones de PLGA/A TEC

15 Se prepararon formulaciones que consistían en BGG al 3% en solución salina o BGG al 1% o el 3% en RG502 al 5% y ATEC. Se administró una dosis unitaria única de 50 µl al segmento posterior de conejos, y posteriormente se midió la liberación de BGG. Como se puede observar en la figura 15, la liberación de BGG desde BGG al 3% en solución salina fue rápida y relativamente corta en comparación con la liberación de BGG desde las formulaciones de PLGA/A TEC, que proporcionaron una liberación lenta durante más de 14 días. De hecho, estos datos respaldan la conclusión de que las presentes formulaciones de liberación mantenida pueden liberar dosis terapéuticas de proteínas terapéuticas durante largos periodos de tiempo y podrían permitir a los pacientes disfrutar de varias semanas o varios meses entre inyecciones.

REIVINDICACIONES

1. Una formulación farmacéutica líquida para su inyección en el ojo para la liberación mantenida de una proteína terapéutica que comprende:

- 5 una proteína terapéutica;
- un excipiente no polimérico líquido, biodegradable y biocompatible seleccionado del grupo que consiste en citrato de trietilo y citrato de acetil-trietilo; y
- 10 un polímero biodegradable biocompatible poli(D,L-láctido-co-glicólido) (PLGA), teniendo el polímero PLGA una relación láctido:glicólido de 50:50, un intervalo de PM de 7.000-17.000, y un grupo terminal de éster alquílico;
- 15 en la que la relación de excipiente no polimérico:polímero es del 90:10 al 99:1% en peso, ambos inclusive;
- en la que durante y después de la inyección de 5 µl a 100 µl, ambos inclusive, de la formulación a través de una aguja de calibre 25, 27, 28, 30 o inferior, la formulación mantiene su integridad monolítica y un estado líquido; y
- 20 en la que la formulación libera la proteína terapéutica durante un periodo de al menos 14 días.

2. La formulación farmacéutica líquida de la reivindicación 1, en la que la formulación es una dosis unitaria de 5 µl a 100 µl para inyección en la subconjuntiva, el espacio periocular, el espacio retrobulbar en la órbita, la epiesclera, el espacio intracorneal, el espacio intraescleral, la cámara anterior, el segmento anterior, la cámara posterior, el segmento posterior, la cavidad vítrea, el espacio subretiniano, el segmento supracoroideo o la región intrarretiniana del ojo.

3. La formulación farmacéutica líquida de la reivindicación 1, en la que la proteína terapéutica es un anticuerpo.

4. Una formulación líquida inyectable para su uso en el tratamiento de una enfermedad ocular de un sujeto con necesidad de ello que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la formulación farmacéutica líquida de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la formulación proporciona la liberación mantenida de una proteína terapéutica que inhibe la angiogénesis.

5. Una formulación farmacéutica líquida para inyección en el ojo para la liberación mantenida de una proteína terapéutica que comprende:

- 35 una proteína terapéutica;
- un excipiente no polimérico líquido, biodegradable y biocompatible, siendo dicho excipiente benzoato de bencilo; y
- 40 un polímero biodegradable biocompatible poli(D,L-láctido-co-glicólido) (PLGA), teniendo el polímero PLGA una relación láctido:glicólido de 50:50, un intervalo de PM de 7.000-17.000, y un grupo terminal de éster alquílico;
- 45 en la que la relación de excipiente no polimérico:polímero es del 90:10 al 99:1% en peso, ambos inclusive;
- en la que durante y después de la inyección de 5 µl a 100 µl, ambos inclusive, de la formulación a través de una aguja de calibre 25, 27, 28, 30 o inferior, la formulación mantiene su integridad monolítica y un estado líquido; y
- en la que la formulación libera la proteína terapéutica durante un periodo de al menos 14 días.

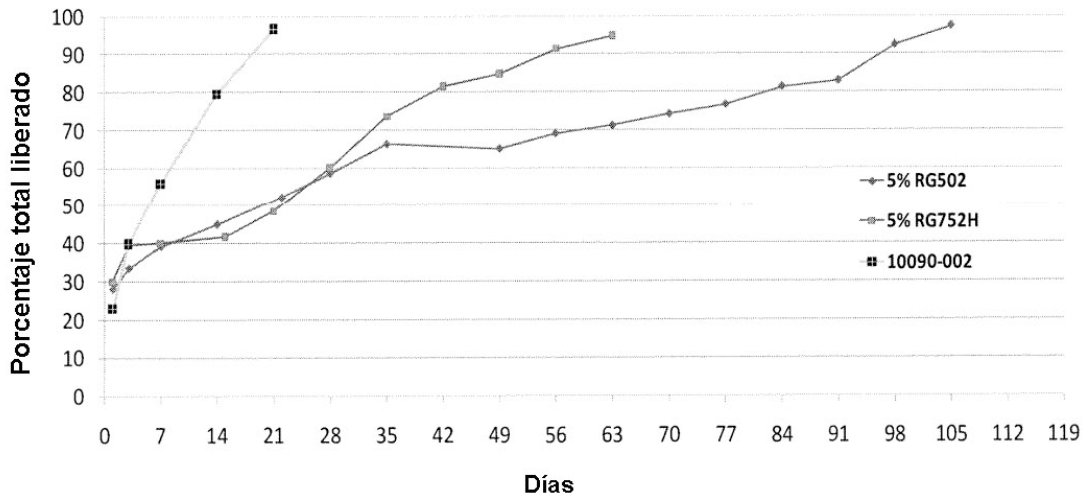


Figura 1

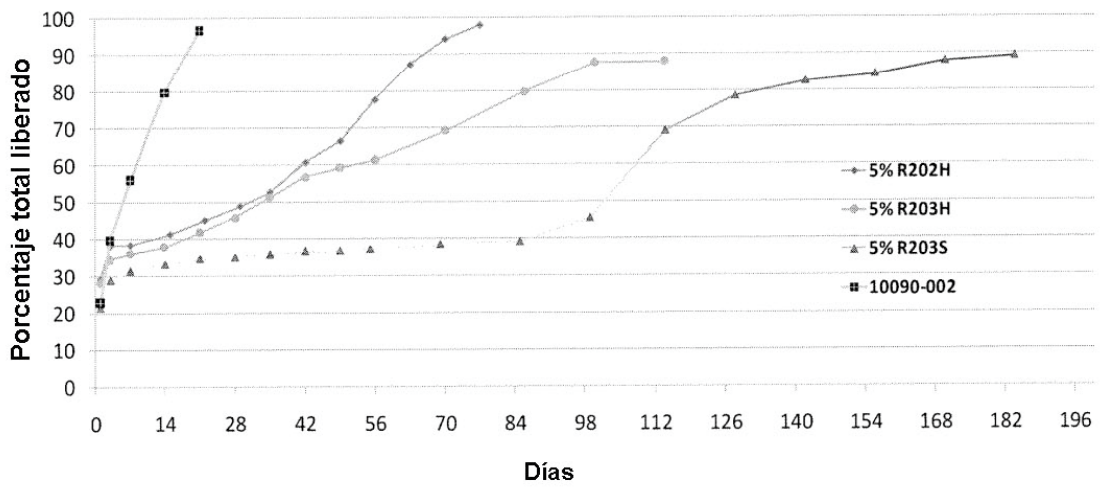


Figura 2

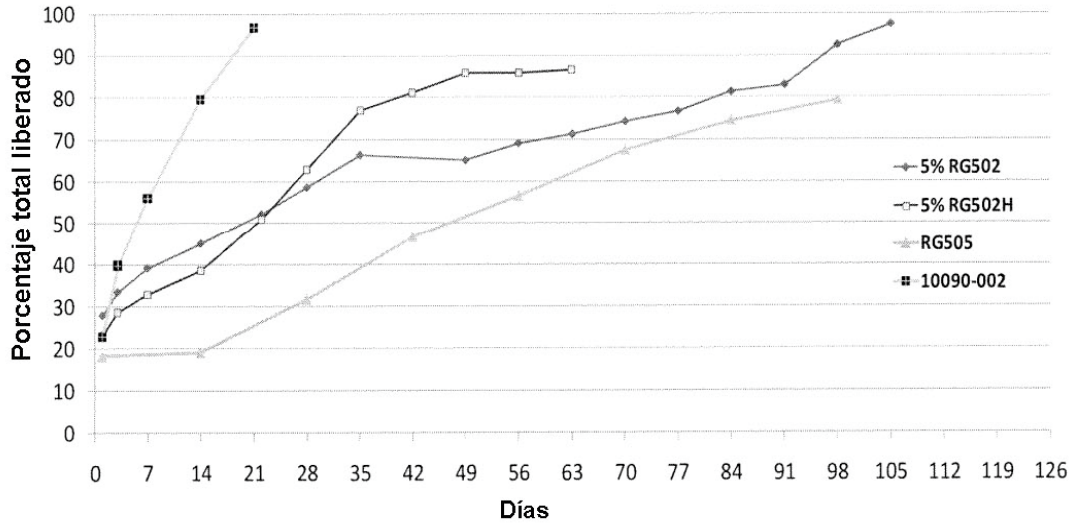


Figura 3

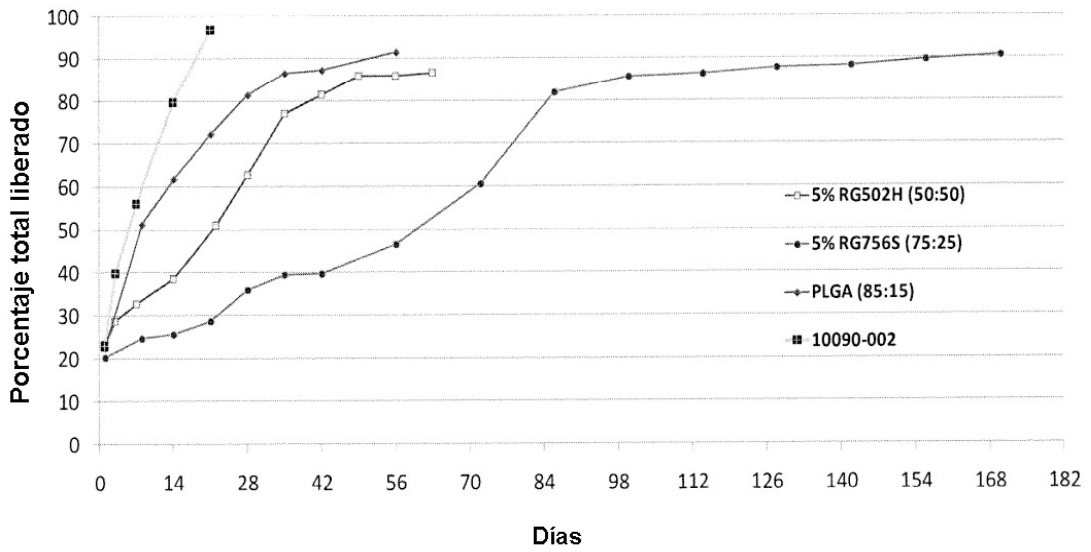


Figura 4

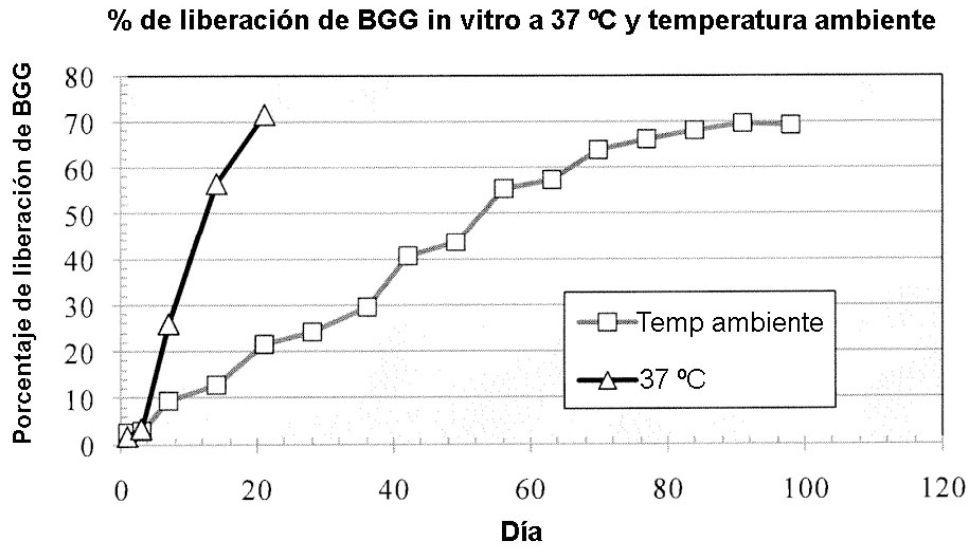


Figura 5

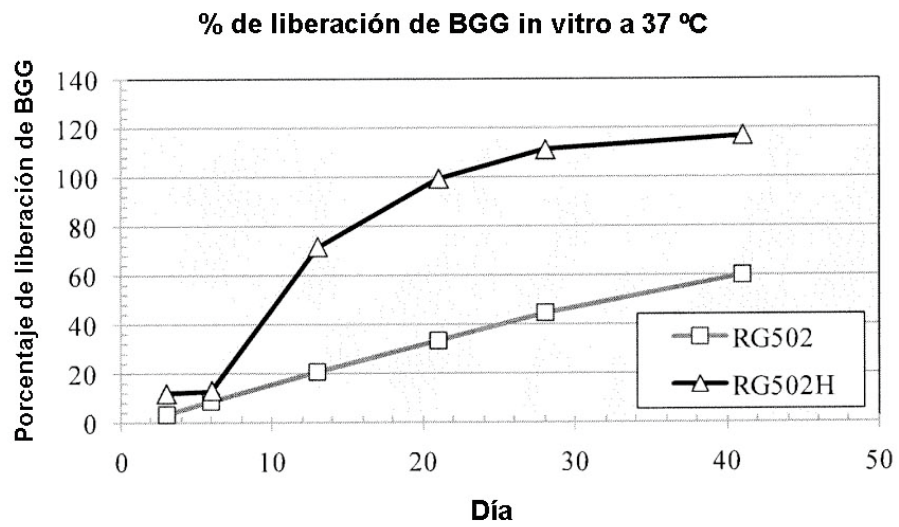


Figura 6

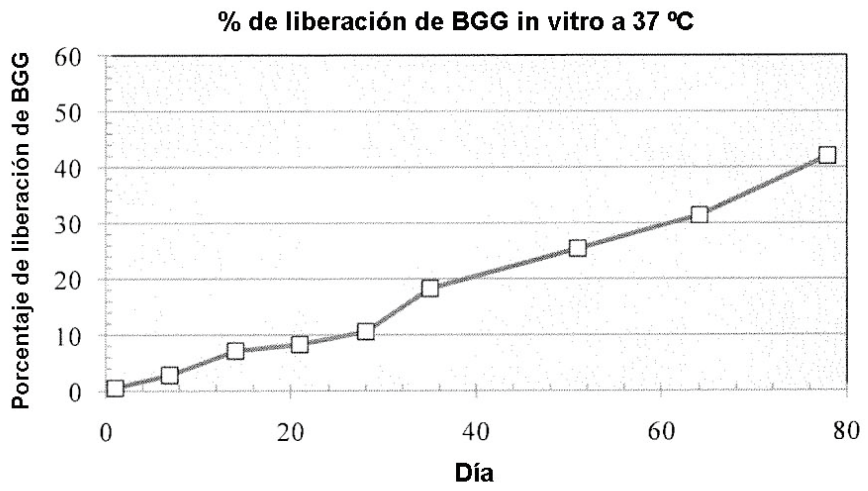


Figura 7

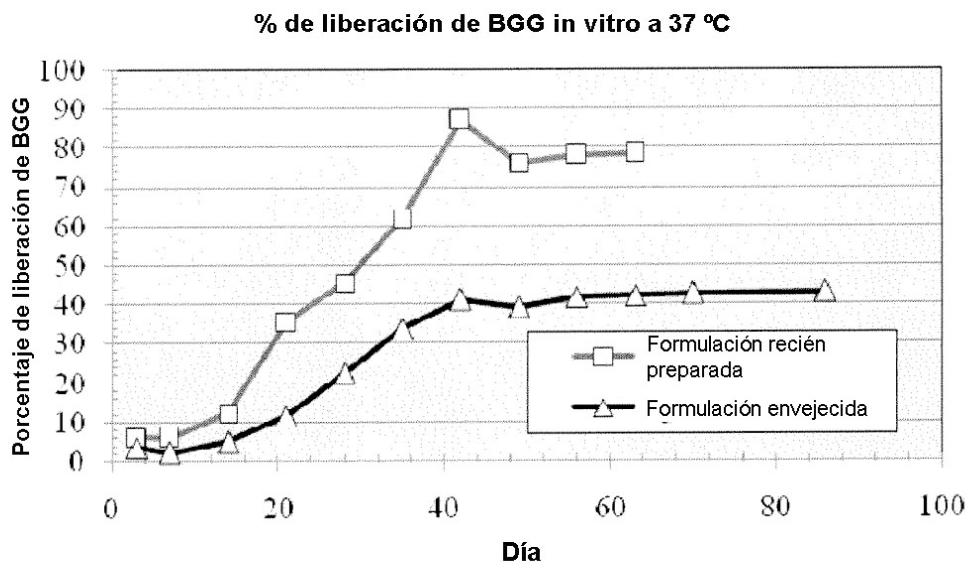


Figura 8

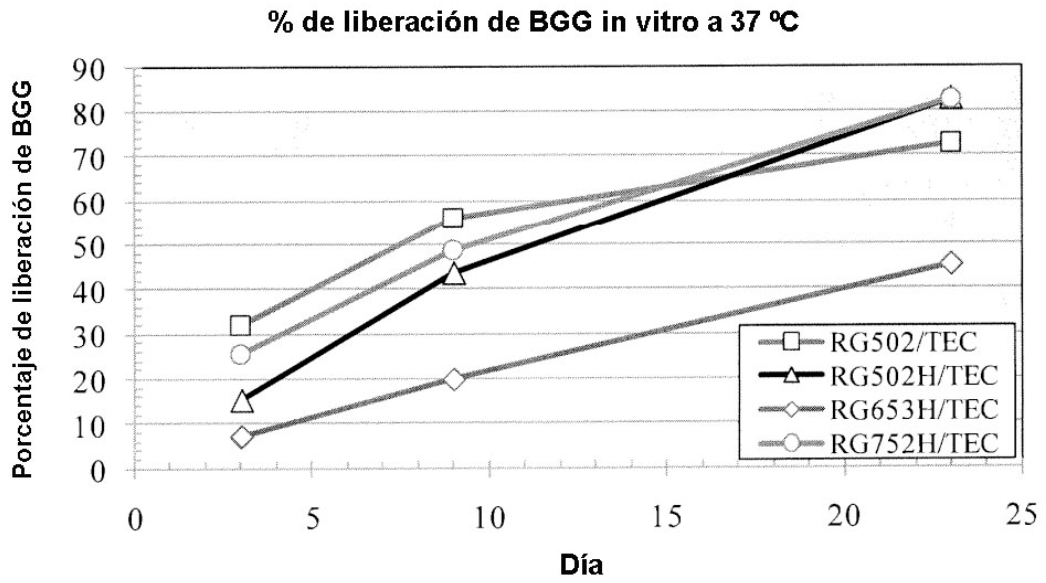


Figura 9

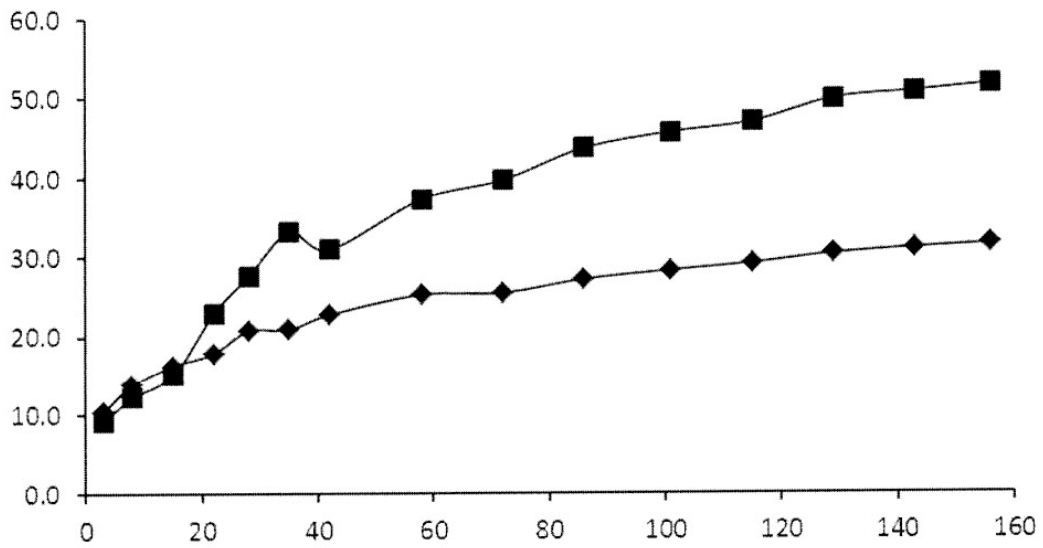


Figura 10

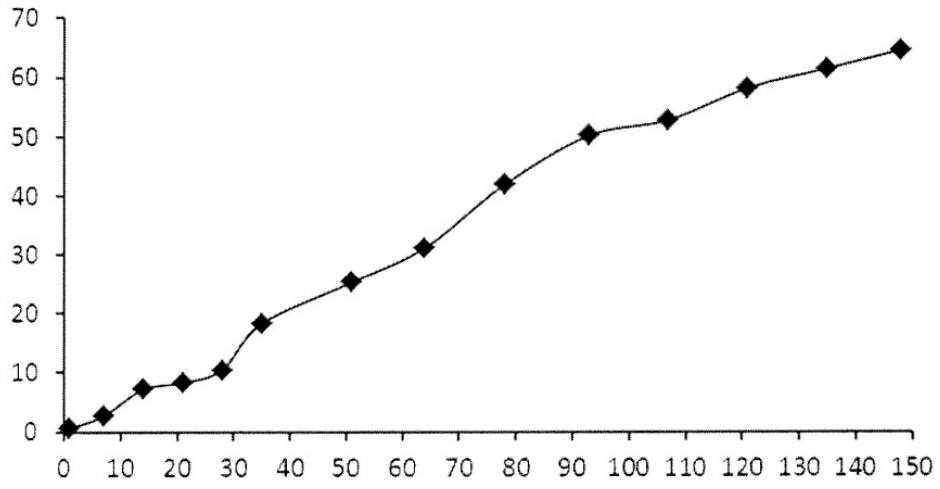


Figura 11

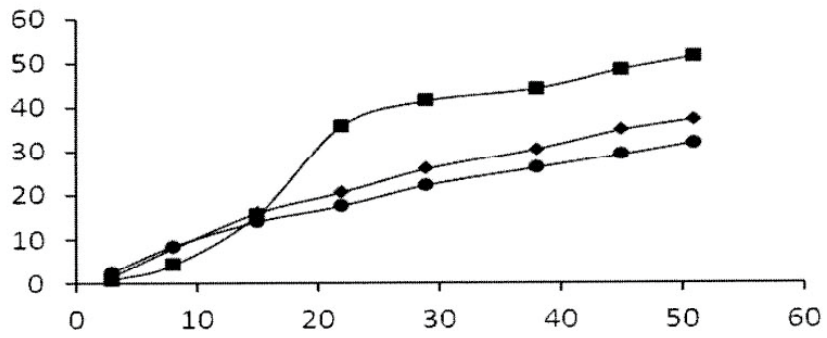


Figura 12

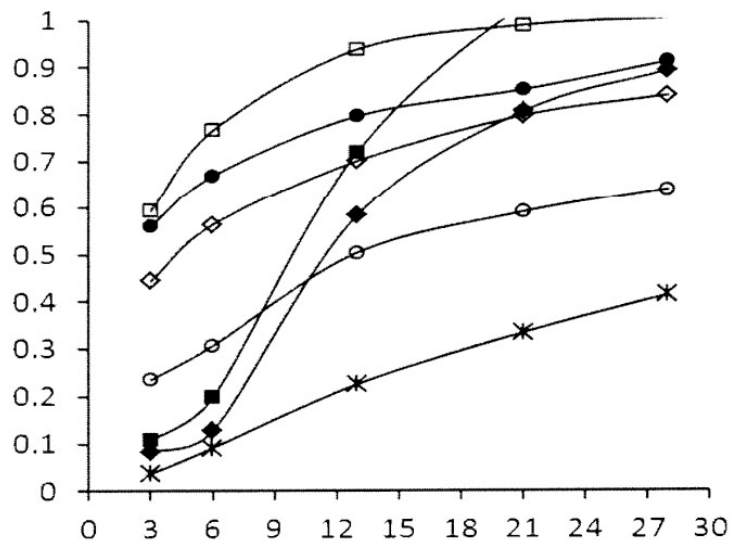


Figura 13

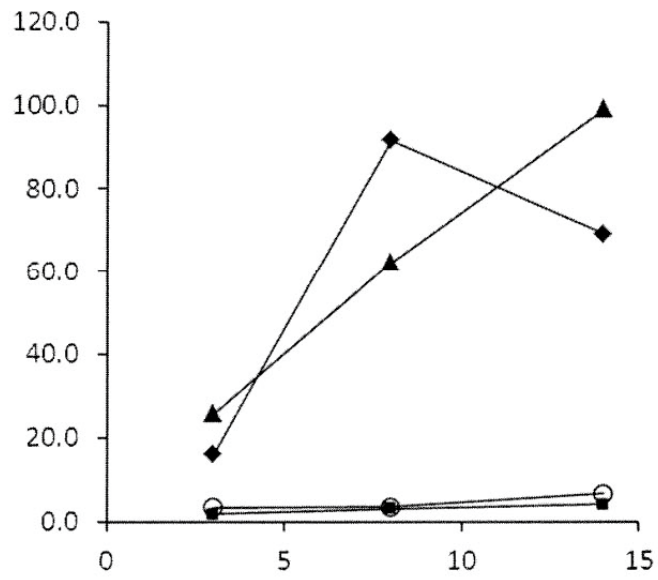


Figura 14

Niveles de BGG PS in vivo

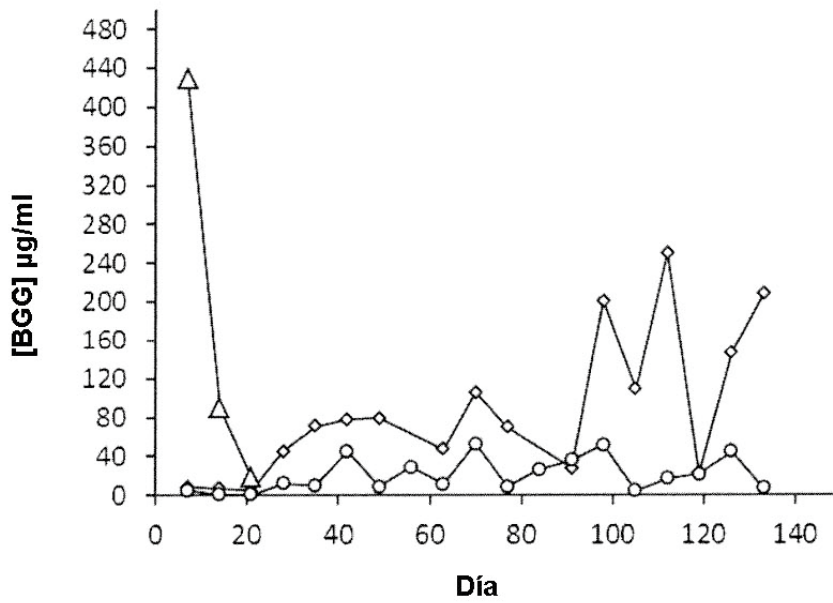


Figura 15