

19

OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 782 111**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/13** (2006.01)  
**A61K 47/10** (2007.01)  
**A61K 9/00** (2006.01)  
**A61K 9/10** (2006.01)  
**A61K 9/16** (2006.01)  
**A61K 31/00** (2006.01)  
**A61K 47/26** (2006.01)  
**A61K 47/38** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.12.2016 PCT/EP2016/081593**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **22.06.2017 WO17103218**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2016 E 16819876 (0)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.01.2020 EP 3389626**

54 Título: **Micropartículas cargadas con ciclosporina de liberación sostenida**

30 Prioridad:

**18.12.2015 GB 201522441**45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**10.09.2020**

73 Titular/es:

**MIDATECH PHARMA (WALES) LIMITED (100.0%)**  
**Oddfellows House, 19 Newport Road**  
**Cardiff, South Glamorgan CF24 0AA, GB**

72 Inventor/es:

**SEAMAN, PAUL;**  
**BAMSEY, KATHARINE;**  
**THOMAS, NIGEL y**  
**PAICE, DEWI**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro****Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 782 111 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Micropartículas cargadas con ciclosporina de liberación sostenida

**5 Campo de la invención**

La presente invención hace referencia a formulaciones farmacéuticas de liberación controlada que contienen ciclosporina encapsulada dentro de micropartículas poliméricas biocompatibles tal como se definen por las reivindicaciones para su uso en la medicina, incluido su uso en el tratamiento de la uveítis. También se describen procesos para la producción de las micropartículas y sistemas de administración.

**Antecedentes de la invención**

La presente invención se refiere a composiciones y productos, y métodos para preparar y administrar tales composiciones y productos, inclusive para el tratamiento de trastornos oculares en mamíferos y particularmente humanos.

Los documentos WO2012/042273 y WO2012/042274 describen aparatos y procesos para la preparación de perlas sólidas que encapsulan un agente bioactivo y que son adecuadas para su uso en liberación sostenida, por ejemplo, mediante inyección de depósito.

El documento EP1484054 describe un sistema de administración de fármacos para la administración subconjuntival de granos finos.

Copland *et al.*, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2008, Vol. 49, No. 12, pp. 5458-5465, describe la evolución temporal clínica de la Uveoretinitis Autoinmune Experimental (EAU, por su sigla en inglés) mediante imagenología fundal endoscópica tópica (TEFI, por su sigla en inglés) con correlación infiltrada histológica y celular.

He *et al.*, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2006, Vol. 47, pp. 3983-3988, describe microesferas cargadas con ciclosporina para el tratamiento de la uveítis.

El documento W02016/011449 se publicó el 21 de enero de 2016 y describe las composiciones de suspensión de la ciclosporina A para la inyección subconjuntival y periocular.

El documento WO96/31202 describe una formulación farmacéutica de liberación controlada que comprende ciclosporina contenida en un polímero biodegradable para formar microesferas o nanoesferas de forma tal que la ciclosporina está sustancialmente en un estado amorfo y el polímero biodegradable comprende más del 12,5 % p/p de poli(láctico).

Li *et al.*, *Int. J. Pharmaceutics*, 2005, Vol. 295, pp. 67-76, describe estudios in vitro e in vivo de microesferas cargadas con ciclosporina A basados en copolímeros de lactida y  $\epsilon$ -caprolactona en comparación con las microesferas de PLGA.

Sánchez *et al.*, *Int. J. Pharmaceutics*, 1993, Vol. 99, pp. 263-273, describe el desarrollo de microesferas y nanoesferas biodegradables para la liberación controlada de ciclosporina A. El documento US2004/0092435 describe un método para el tratamiento de enfermedades oculares con ciclosporina A.

El documento WO2010/111449 describe sistemas y métodos de administración de fármacos de liberación sostenida intraoculares para el tratamiento de afecciones oculares. El documento US 2003/147954 A1 desvela micropartículas inyectables de liberación controlada que comprenden ciclosporina y PLA o PLGA que tienen un tamaño de partícula de menos de 30 micrómetros. La uveítis se menciona como una enfermedad para la cual se pueden aplicar.

Todavía existe una necesidad insatisfecha de formulaciones farmacéuticas y sistemas de administración para uso en el tratamiento de la uveítis, particularmente aquellos que minimizan o reducen la frecuencia y/o las molestias de la inyección intravítrea. La presente invención aborda estas y otras necesidades.

**Breve descripción de la invención**

En términos generales, la presente invención se refiere a formulaciones farmacéuticas de liberación controlada o sostenida de ciclosporina tal como se definen por las reivindicaciones para inyección intravítrea, por ejemplo, para el tratamiento de la uveítis. Los inventores de la presente han encontrado, de forma sorprendente, que una formulación de microesferas altamente monodispersa de alrededor de 20-40  $\mu\text{m}$  de diámetro formada por ciclosporina encapsulante poli(láctica) muestra una capacidad de inyección intravítrea superior en comparación con las formulaciones de microesferas cargadas con ciclosporina conocidas. Asimismo, los datos de un modelo murino in vivo de uveítis autoinmune indican una eficacia similar a la de la administración de ciclosporina sistémica, pero con un sitio de acción mucho más definido localmente y por lo tanto con menos efectos no específicos esperados.

Por consiguiente, en un primer aspecto la presente invención proporciona una formulación farmacéutica de liberación controlada que comprende micropartículas cargadas con ciclosporina de un polímero biorreabsorbible que comprende poli(D,L-lactida), en donde el diámetro promedio de las micropartículas se encuentra en el intervalo de 20  $\mu\text{m}$  a 40  $\mu\text{m}$ , por ejemplo 25  $\mu\text{m}$  a 36  $\mu\text{m}$ . En algunos casos, al menos el 95 % de las micropartículas de la formulación tienen un diámetro en el intervalo de 25  $\mu\text{m}$  a 40  $\mu\text{m}$ .

En algunos casos el polímero biorreabsorbible comprende poli(D,L-lactida) y poli(L-lactida). El poli(L-lactida) se encuentra preferentemente al menos parcialmente en forma cristalina. Se cree que tener una proporción de poli(L-lactida) cristalino en la matriz polimérica junto con el poli(D,L-láctico) no cristalino contribuye con una tasa de degradación más lenta *in vivo* y por lo tanto extiende el periodo de liberación sostenida de la carga útil de ciclosporina en comparación con las formulaciones de micropartículas de poli(D,L-lactida) puro, que carecen de poli(L-lactida) cristalino. En algunos casos, el polímero comprende entre 1 % y 15 % p/p de poli(L-lactida).

En algunos casos el polímero biorreabsorbible comprende poli(D,L-lactida) y poli(D,L-lactida-co-glicólico) y puede, de forma opcional, también incluir poli(L-lactida). La relación entre co-monomeros lácticos a glicólicos en la mezcla final de polímeros ("la relación L:G") puede influir en la tasa de biorreabsorción y por lo tanto en las características de la liberación de la ciclosporina en el tiempo. En determinados casos, la relación L:G puede estar en el intervalo de 60:40 a 95:5, por ejemplo, dentro del intervalo de 70:30 a 80:20.

En algunos casos las micropartículas de la invención comprenden entre 15 % y 25 % en p/p de ciclosporina. En particular, la carga de ciclosporina puede estar en el intervalo de 17 % a 21 % (p/p).

En algunos casos, el coeficiente de variación del diámetro de las micropartículas es 0,1 o menor (por ejemplo, 0,05, 0,01 o 0,001 o menor), donde el coeficiente de variación es la desviación estándar del diámetro de las micropartículas dividido por el diámetro promedio de las micropartículas. Los inventores de la presente han encontrado que una formulación monodispersa, es decir, donde las micropartículas son de tamaño esencialmente igual o muy similar y de geometría sustancialmente esférica y por lo tanto poseen un bajo coeficiente de variación del diámetro de las micropartículas, contribuye a una mejor capacidad de inyección a través de las agujas de calibre estrecho empleadas en la administración por inyección intravítrea. Sin limitarse a cualquier teoría en particular, se cree actualmente que el empaquetamiento relativamente suelto de esferas idénticas en tamaño, en comparación con el empaquetamiento relativamente más ajustado de micropartículas de tamaño o forma irregular, conlleva a una reducción de la viscosidad y de la obstrucción de las agujas durante las inyecciones.

En algunos casos, la desviación estándar del diámetro de las micropartículas es menor que 3,0  $\mu\text{m}$ , por ejemplo, en el intervalo de 1,0  $\mu\text{m}$  a 3,0  $\mu\text{m}$ .

En algunos casos, las micropartículas tienen una superficie "curada". Curar en este contexto hace referencia a una superficie lisa lograda por medio del calentamiento de la micropartícula formada, en un proceso de posproducción, hasta una temperatura inmediatamente por debajo de la temperatura de cristalización o la "temperatura de transición vítrea" ( $T_g$ ) del polímero. Calentar la micropartícula de esta manera produce que la superficie adopte temporalmente un estado fundido o similar al caucho en el cual el polímero fluye de forma tal que llena y/o alisa las deformaciones de la superficie, lo que produce una superficie lisa. Después del enfriamiento posterior, se retiene la superficie lisa. Las micropartículas que tienen una superficie curada muestran una liberación más lenta de la carga útil farmacéutica debido a que la superficie irregular o microporosa se vuelve lisa, lo que tiende a retener la carga útil contenida en el interior de la micropartícula en comparación con la micropartícula no curada con una superficie relativamente más porosa e irregular.

En algunos casos, la formulación comprende además un portador, diluyente, vehículo, tampón, agente antiaglomerante y/o modificador de la viscosidad farmacéuticamente aceptable. La formulación comprende dichas micropartículas suspendidas en un vehículo líquido, cuyo vehículo líquido tiene una viscosidad que oscila entre 30 y 45 mPas medidos a 17 °C o medidos a 20 °C. Las medidas de viscosidad pueden ser como las determinadas por medio de un vibro viscosímetro A&D SV-1a (A&D Instruments Ltd, Abingdon, Reino Unido) conforme a las instrucciones del fabricante. Como se escribe en el Ejemplo 5 del presente documento, se descubrió que un vehículo líquido que tiene una viscosidad de este intervalo ayuda a mantener a las micropartículas en suspensión por un periodo de tiempo adecuado para la inyección mientras se evitan dificultades significativas en la capacidad de colocación en una jeringa. En determinados casos, las micropartículas están suspendidas en un vehículo de inyección líquido que presenta un comportamiento de adelgazamiento por cizalladura y/o tixotrópico. En otras palabras, la viscosidad del fluido es menor bajo un cizallamiento que en la ausencia de un cizallamiento. Como se describe de forma detallada en la presente, el comportamiento de adelgazamiento por cizalladura retiene favorablemente las micropartículas en suspensión por un periodo de tiempo (por ejemplo, varios minutos), pero aun así la caída en la viscosidad bajo el cizallamiento de la inyección a través de una aguja intravítrea estrecha facilita la inyección, por ejemplo, reduciendo la fuerza de eyección mecánica requerida. En determinados casos, la formulación de la presente invención comprende un agente tixotrópico. El agente tixotrópico se selecciona del grupo que consiste en: hipromelosa, hidroxietilcelulosa, hidroxietilcelulosa modificada de forma hidrofílica, goma xantana, goma guar, y alcohol cetílico.

En particular, el portador, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable puede comprender uno o más de: una sal, un tensioactivo, un azúcar, y agua estéril. En determinados casos, la formulación de la invención puede comprender además uno o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o más) de: polisorbato 20, polisorbato 80, solución salina tamponada con fosfato, sacarosa, carboximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hipromelosa, hidroxietilcelulosa, hidroxietilcelulosa modificada de forma hidrofílica, goma xantana, goma guar, alcohol cetílico, y manitol.

En algunos casos, la formulación comprende, además: solución salina tamponada con fosfato, polisorbato 80, hidroxietilcelulosa e hipromelosa, y opcionalmente manitol.

En algunos casos, la concentración de los componentes de la formulación se encuentra en los intervalos de concentración respectivos a continuación:

- (i) solución salina tamponada con fosfato: 5,0 a 8,0 mg/ml, por ejemplo 6,5 mg/ml;
- (ii) polisorbato 80: 0,8 a 1,2 mg/ml, por ejemplo 1,0 mg/ml;
- (iii) hidroxietilcelulosa: 1,8 a 2,2 mg/ml, por ejemplo 2,0 mg/ml;
- (iv) hipromelosa: 3,8 a 4,2 mg/ml, por ejemplo 4,0 mg/ml;
- (v) manitol, cuando está presente: 4,8 a 5,2 mg/ml, por ejemplo 5,0 mg/ml; y/o
- (vi) dichas micropartículas cargadas con ciclosporina: 100 a 200 mg/ml, por ejemplo 125 mg/ml o 150 mg/ml.

La formulación de la invención puede presentarse en forma inyectable o estar adaptada para ser reconstituida en forma inyectable antes de su uso. Preferentemente, la formulación es para inyección de depósito intravítrea. La formulación puede proporcionarse en forma de una dosis inyectable única, en donde el volumen de inyección es compatible con la inyección intravítrea.

En algunos casos, la formulación puede ser inyectable a través de una aguja hipodérmica de 0,5 pulgadas de longitud y calibre 30 (diámetro interno de  $0,159 \pm 0,019$  mm; longitud 25,4 mm) con un porcentaje de recuperación de al menos 80 %, al menos 85 % o al menos 90 %. Como se muestra en la Tabla 1 de la presente, se han demostrado porcentajes de recuperación de inyección superiores al 90 % para determinadas modalidades de la presente invención.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una formulación farmacéutica de liberación controlada del primer aspecto de la invención para su uso en la medicina.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona una formulación farmacéutica de liberación controlada del primer aspecto de la invención para su uso en el tratamiento de la uveítis en un sujeto mamífero (por ejemplo un humano o un caballo).

En algunos casos al sujeto mamífero se le ha diagnosticado o se sospecha que padece uveítis. En determinados casos, la uveítis es intermedia, posterior o panuveítis que pone en riesgo la visión de etiología no infecciosa o es uveítis equina, por ejemplo, uveítis equina recurrente. El tratamiento puede tener el objetivo de reducir o prevenir la recurrencia de uveítis en un sujeto que se somete a un tratamiento con esteroides para la uveítis. En determinados casos, la uveítis puede ser uveítis tuberculosa que pone en riesgo la visión (es decir, uveítis que es secundaria a una infección con *Mycobacterium tuberculosis*). En particular, el tratamiento puede combinarse con una terapia antibiótica para el tratamiento de una infección tuberculosa latente. El tratamiento antibiótico puede, por ejemplo, involucrar el tratamiento con isoniazida y/o rifampicina.

De conformidad con el primer, segundo o tercer aspecto de la invención, la formulación puede ser para administración mediante inyección intravítrea. La formulación puede, por ejemplo, ser para administración por inyección semanal, inyección cada dos semanas, cada tres semanas, cada cuatro semanas, inyección mensual, inyección cada seis semanas, inyección cada ocho semanas, inyección cada dos meses, inyección cada 12 semanas, inyección cada tres meses, inyección cada 16 semanas o inyección cada cuatro meses. El alcance de la invención se define por las reivindicaciones. Cualquiera de las referencias en la descripción para los métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, las composiciones farmacéuticas y los medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia.

En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un método para tratar la uveítis en un sujeto mamífero (por ejemplo, un humano o un caballo), que comprende administrar una formulación farmacéutica de liberación controlada del primer aspecto de la invención al sujeto que necesita terapia. En algunos casos, la uveítis puede ser intermedia, posterior o panuveítis que pone en riesgo la visión de etiología no infecciosa. En determinados casos, la uveítis puede ser uveítis equina, por ejemplo, uveítis equina recurrente (también conocida como ceguera de la luna). En determinados casos, el tratamiento puede tener el objetivo de reducir o prevenir la recurrencia de uveítis en un sujeto que se somete a un tratamiento con esteroides para la uveítis. En algunos casos, el método puede ser para tratar uveítis tuberculosa que pone en riesgo la visión. El método puede comprender además administrar terapia antibiótica al sujeto para el tratamiento de la infección tuberculosa. En algunos casos, la formulación farmacéutica de liberación controlada se administra al sujeto mediante inyección intravítrea.

En un quinto aspecto, la presente invención proporciona el uso de la formulación farmacéutica de liberación controlada del primer aspecto de la invención en la preparación de un medicamento para uso en un método del cuarto aspecto de la invención.

5 En un sexto aspecto, la invención proporciona un artículo de fabricación que incluye:  
una formulación farmacéutica de liberación controlada del primer aspecto de la invención;  
un recipiente para alojar la formulación; y  
10 un prospecto o etiqueta. El prospecto y/o etiqueta proporciona instrucciones, dosificación y/o información con respecto a la administración relacionada al uso de la formulación en el tratamiento de la uveítis en un sujeto mamífero.

15 En un séptimo aspecto, la presente invención proporciona un proceso para producir una formulación farmacéutica de liberación controlada del primer aspecto de la invención, que comprende:

proporcionar un primer líquido que comprende un soluto, un disolvente y ciclosporina o una sal, solución o suspensión de esta, donde el soluto comprende un polímero que contiene poli(D,L-lactida), donde la concentración polimérica del primer líquido es al menos del 10 % p/v, donde "p" es el peso del polímero y "v" es el volumen del disolvente;  
20 proporcionar un generador de gotas de líquido que comprende un componente piezoeléctrico operable para generar gotas de líquido,  
provocar que el generador de gotas de líquido forme gotas de líquido del primer líquido; hacer pasar las gotas de líquido a través de un gas;  
25 poner en contacto las gotas de líquido con un segundo líquido para causar que el disolvente salga de las gotas, y por lo tanto forme micropartículas sólidas;  
donde la solubilidad del disolvente en el segundo líquido es de al menos 5 g del disolvente cada 100 ml del segundo líquido, donde el disolvente es sustancialmente miscible con el segundo líquido,  
30 en donde se proporciona el segundo líquido como un flujo y el método comprende poner en contacto las gotas de líquido con el flujo del segundo líquido.

35 En algunos casos, el proceso puede ser como el descrito en la solicitud pendiente de aprobación PCT/EP2016/081436, presentada el 16 de diciembre de 2016 y/o GB1522423.1, presentada el 18 de diciembre de 2015.

En algunos casos, el disolvente puede comprender sulfóxido de dimetilo (DMSO). En algunos casos, el segundo líquido comprende agua. En particular, el segundo líquido puede comprender un alcohol en agua, tal como *tere-*butanol en agua.

40 En algunos casos, la temperatura del primer líquido cercano al generador de gotas de líquido está en el intervalo de 10 °C a 25 °C.

En algunos casos, la temperatura del segundo líquido está en el intervalo de 1 °C a 10 °C.

45 En algunos casos, la concentración de polímero en el primer líquido es al menos del 30 % p/v.

En determinados casos de conformidad con este aspecto de la invención, el proceso comprende además recolectar las micropartículas sólidas mediante la separación de las micropartículas sólidas del segundo líquido.

50 En algunos casos, el proceso comprende además recolectar las micropartículas sólidas y formular o empaquetar las micropartículas en una composición farmacéutica o forma de administración. En particular, las micropartículas sólidas pueden formularse en un líquido para administración mediante inyección intravítrea.

55 En determinados casos, el proceso del séptimo aspecto de la invención comprende además la liofilización de las micropartículas para formar una población liofilizada de las micropartículas. En particular, las micropartículas pueden ser liofilizadas con uno o más excipientes, por ejemplo, el o los excipientes pueden incluir manitol. En algunos casos, el proceso puede comprender además una etapa de reconstitución en la cual las micropartículas secas (por ejemplo, micropartículas liofilizadas) se mezclan con un vehículo de inyección líquido para formar una suspensión adecuada para inyección. El vehículo de inyección líquido puede ser el definido en conexión con el primer aspecto de la invención.  
60

En un octavo aspecto, la presente invención proporciona un proceso para producir una formulación inyectable de micropartículas que contienen activos (por ejemplo, cargadas con ciclosporina), que comprende:

65 proporcionar una población seca de micropartículas que contienen activos (por ejemplo, cargadas con ciclosporina);

poner a las partículas en contacto con una solución de vehículo de inyección que comprende: una solución salina tamponada con fosfato, polisorbato 80, hidroxietilcelulosa e hipromelosa, y opcionalmente manitol.

5 En algunos casos, la concentración de los componentes del vehículo de inyección está en los intervalos de concentración respectivos a continuación:

10 solución salina tamponada con fosfato: 5,0 a 8,0 mg/ml, por ejemplo 6,5 mg/ml;  
 polisorbato 80: 0,8 a 1,2 mg/ml, por ejemplo 1,0 mg/ml;  
 hidroxietilcelulosa: 1,8 a 2,2 mg/ml, por ejemplo 2,0 mg/ml;  
 hipromelosa: 3,8 a 4,2 mg/ml, por ejemplo 4,0 mg/ml; y  
 manitol, cuando está presente: 4,8 a 5,2 mg/ml, por ejemplo 5,0 mg/ml.

15 Las micropartículas cargadas con ciclosporina pueden, en algunos casos, combinarse con el vehículo de inyección para brindar una concentración en suspensión (p/v) de 100 a 200 mg/ml, por ejemplo 125 mg/ml o 150 mg/ml. En algunos casos, el vehículo de inyección tiene una viscosidad que oscila entre 30 y 45 mPas medida a 20 °C. En algunos casos, el vehículo de inyección muestra un comportamiento tixotrópico y/o adelgazamiento por cizalladura.

20 En algunos casos, las micropartículas cargadas con ciclosporina son las definidas en conexión con el primer aspecto de la invención.

25 De conformidad con la presente invención, particularmente el segundo al quinto aspecto de esta, el sujeto puede ser un humano, un animal de compañía (por ejemplo, un perro o un gato), un animal de laboratorio (por ejemplo, un ratón, rata, conejo, cerdo o primate no humano), un animal doméstico o de granja (por ejemplo, un cerdo, vaca, caballo u oveja). Preferentemente, el sujeto es un humano. Se conoce que la uveítis afecta a los caballos. La uveítis equina recurrente es la forma de ceguera más común en los caballos. El tratamiento de sujetos equinos con las composiciones de la presente invención se contempla de forma específica.

30 La presente invención incluye la combinación de los aspectos y rasgos preferidos descritos, excepto en el caso de que dicha combinación claramente no se pueda permitir o se establezca que se evite de forma expresa. Dichos y otros aspectos y modalidades de la invención se describen de forma más detallada más adelante y con referencia a los ejemplos y figuras adjuntos.

### Breve descripción de las figuras

35 La **Figura 1** muestra el asentamiento de microesferas después de la suspensión en un rango de vehículos de inyección. La velocidad de sedimentación se gráfica (porcentaje de microesferas suspendidas con respecto al tiempo) para cada una de las cuatro formulaciones: Tween20 (0,4 mg/ml) en WFI (azul); Tween20 (0,4 mg/ml) en PBS (rojo); Tween20 (0,4 mg/ml) en PBS y CMC (5 mg/ml) (verde); y Tween20 (0,4 mg/ml) en WFI con sacarosa (5 %) (morado).

40 La **Figura 2** muestra una gráfica de severidad de la enfermedad uveítis puntuada por imagenología fundal endoscópica tópica (TEFI) en el transcurso de días para un modelo murino de uveítis no tratada (rombos), vehículo tratado mediante inyección intravítrea (cuadrados), tratado con 4,5 µg de ciclosporina (CsA) en forma de micropartículas cargadas con CsA de la invención (cruces) y tratado con 6,7 mg/kg/día de CsA oral (círculos).  
 45 Tanto los grupos tratados con CsA mostraron una menor puntuación TEFI (es decir, enfermedad menos severa) que los no tratados o el vehículo.

50 La **Figura 3** muestra una gráfica de capacidad de inyección de fuerza (N) con respecto a la extensión compresiva (mm) para el vehículo de inyección "actual" tal como se midió utilizando el dispositivo Instron.

La **Figura 4** muestra una gráfica de capacidad de inyección de fuerza (N) con respecto a la extensión compresiva (mm) para el vehículo de inyección "de desarrollo" tal como se midió utilizando el dispositivo Instron. Cabe observar que la escala del eje y difiere de la de la Figura 3.

55 La **Figura 5** muestra una gráfica de la velocidad de sedimentación para las formulaciones de vehículos de inyección "actual" (triángulos) y "de desarrollo" (cuadrados) tal como se midieron por el cambio en absorbancia en 420nm con respecto al tiempo en minutos para una suspensión de microesferas cargadas con CsA de 17,5 mg/ml en los respectivos vehículos de inyección.

60 La **Figura 6** muestra una gráfica de temperatura (°C) con respecto a la Viscosidad (mPas) para el vehículo de inyección "de desarrollo".

### Descripción detallada de la invención

65 En la descripción de la presente invención se emplearán las siguientes expresiones, las cuales se pretende que sean definidas de la siguiente manera.

## Micropartículas

Las micropartículas de acuerdo con la presente invención se pueden encontrar en forma de perlas sólidas. Como se usa en la presente en conexión con micropartículas o perlas, sólido pretende comprender un gel. El término micropartículas tal como se usa en la presente incluye específicamente cualquier partícula polimérica o perla de escala en micrones (normalmente hasta 999  $\mu\text{m}$  de diámetro). Las micropartículas contempladas en la presente incluyen favorablemente las perlas poliméricas monodispersas que se pueden obtener mediante el proceso descrito en el documento WO 2012/042274.

## Ciclosporina ("CsA")

La ciclosporina (Denominación Común Internacional; INN), también conocida como ciclosporina, ciclosporina, ciclosporina A, ciclosporina A, ciclosporina A o "CsA" es un péptido no ribosómico cíclico de 11 aminoácidos que posee actividad inmunosupresora. La CsA tiene el nombre IUPAC (3S,6S,9S, 12R, 15S, 18S,21 S,24S,30S,33S)-30-Etil-33-[(1 R,2R,4E)-1 -hidroxi-2-metil-4-hexen-1 -yl]- 6,9,18,24-tetraisobutil-3,21 -diisopropil-1,4,7,10,12,15,19,25,28-nonametil- 1,4,7,10,13,16,19,22,25,28,31 -undecaazaciclotritriacontano-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32- undecano. La CsA presenta una baja solubilidad en agua y ha sido comercializada en formulaciones de cápsulas de gelatina, emulsiones y suspensiones.

## Proceso para encapsular ciclosporina dentro de micropartículas

En determinados casos las micropartículas pueden ser producidas por medio del proceso descrito en el documento WO2012/042274. En algunos casos, las micropartículas se pueden producir por medio del proceso descrito en la solicitud pendiente de aprobación PCT/EP2016/081436, presentada el 16 de diciembre de 2016, y/o GB1522423.1, presentada el 18 de diciembre de 2015. En particular, la ciclosporina se puede agregar al primer líquido como el "material diana", donde el primer líquido es un polímero que comprende poli(D,L-lactida) disuelto en un disolvente (por ejemplo, DMSO). El segundo líquido puede ser una mezcla de agua y un alcohol (por ejemplo, *terc*-butanol) y se proporciona en forma de un chorro. El primer líquido se expulsa de múltiples generadores de gotas de líquido (por ejemplo, un cabezal de impresión por inyección de tinta con un banco de 100-1500 salidas) para formar gotas de líquido que pasan a través de un gas y hacia adentro del chorro del segundo líquido. El disolvente luego expulsa las gotas mientras pasa al segundo líquido lo que resulta en la formación de micropartículas poliméricas sólidas en las cuales se encapsula la ciclosporina. Se ha descubierto que este método de producción produce micropartículas encapsuladas de ciclosporina de tamaño pequeño (20-40  $\mu\text{m}$  de diámetro) con excelente uniformidad de tamaño (por ejemplo, coeficiente de variación de 0,1 o menor). Se ha descubierto que la combinación del tamaño pequeño y la uniformidad de tamaño mejora la capacidad de inyección de las micropartículas a través de las agujas de calibre estrecho (por ejemplo, 27G) necesarias para la inyección intravítrea en comparación con las micropartículas cargadas con ciclosporina de mayor tamaño y/o menor carácter monodisperso. En particular, los métodos de producción anteriormente descritos, tales como las técnicas de evaporación disolvente o a base de emulsiones, normalmente producen micropartículas más grandes con mayor variabilidad de tamaño (véase, por ejemplo, la Tabla 1 de He *et al.*, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2006, Vol. 47, pp. 3983-3988).

## Administración y tratamiento

Las micropartículas y formulaciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse a pacientes mediante una cantidad de vías diferentes. Sin embargo, en la presente se contempla específicamente que la administración se realiza por medio de inyección de depósito intravítrea.

Las micropartículas cargadas con CsA de la presente invención pueden utilizarse en el tratamiento de la uveítis. En particular, el tratamiento de la uveítis puede ser uno o más de los siguientes:

1. La prevención de la recurrencia de la uveítis intermedia, posterior o panuveítis que pone en riesgo la visión de etiología no infecciosa en pacientes que requieren terapia convencional con altas dosis prolongadas de esteroides (administradas de forma sistémica o tópica).

- Los presentes inventores creen que el uso de las micropartículas cargadas con CsA de la presente invención puede reducir la cantidad y/o gravedad de las recurrencias, lo que evita el uso de mayores dosis de esteroides sistémicos o medicación inmunosupresora sistémica (por ejemplo, CsA oral).

2. El tratamiento de la uveítis intermedia, posterior o panuveítis que pone en riesgo la visión de etiología no infecciosa.

- Los inventores de la presente creen que el uso de las micropartículas cargadas con CsA de la presente invención como tratamiento principal proporcionaría beneficios en forma de menores efectos secundarios (administración no sistémica) y menor frecuencia de dosificación, lo que por lo tanto mejoraría la experiencia y el cumplimiento del paciente.

3. El tratamiento de la uveítis tuberculosa (TB) que pone en riesgo la visión.

Los inventores de la presente creen que el uso de micropartículas cargadas con CsA de la presente invención para

tratar las manifestaciones oculares de la TB previene las secuelas oculares de la uveítis crónica. De forma conveniente, el tratamiento con las micropartículas cargadas con CsA de la presente invención puede llevarse a cabo en combinación con la terapia antibiótica para el tratamiento de la infección de TB latente.

5 Lo que se presenta a continuación es a modo de ejemplo y no debe ser interpretado como una limitación del alcance de las reivindicaciones.

**Ejemplos**

10 **Ejemplo 1 - Encapsulamiento de ciclosporina (CsA) dentro de microesferas poliméricas**

La siguiente formulación se utilizó en la síntesis de microesferas encapsuladas con CsA.  
Para 1 ml

- 15
- 150 mg de Resomer R202H (poli(D,L-lactida) terminado en ácido,  $\mu\text{m}$  18000-24000)
  - 150 mg de Resomer RG752H (Poli(D,L-lactida-co-glicólico) terminado en ácido, láctico:glicólico 75:25,  $\mu\text{m}$  4000-15000)
  - 75 mg de Ciclosporina A
  - cantidad suficiente para DMSO
- 20

Se realizó la síntesis mediante un dispositivo generador de gotas piezoeléctrico tal como se describe en el documento WO2012/042273 y/o en la solicitud pendiente de aprobación PCT/EP2016/081436, presentada el 16 de diciembre de 2016 y/o en GB1522423.1, presentada el 18 de diciembre de 2015. En resumen, el primer líquido estuvo compuesto por la combinación anterior de Resomer R202H, Resomer RG752H y Ciclosporina A, disueltos en DMSO. El segundo líquido fue una mezcla de agua y un alcohol (por ejemplo, *terc*-butanol), que se proporcionó en forma de un flujo en un canal o en forma de un chorro. El primer líquido se expulsa de múltiples generadores de gotas de líquido para formar gotas de líquido que pasan a través de un gas (por ejemplo, el aire) y hacia adentro del flujo de un segundo líquido (dentro del canal o hacia adentro del chorro, respectivamente). El disolvente luego expulsa las gotas mientras pasa al segundo líquido lo que resulta en la formación de micropartículas poliméricas sólidas en las cuales se encapsula la ciclosporina.

25

30

Se produjo una masa total de 1,5 g de microesferas, las cuales tenían una carga de fármaco del 20,2 %. Luego las microesferas se procesaron posteriormente en un proceso por lotes de la siguiente manera:

- 35
- Medio de lavado = 5 mg/ml de manitol
  - Temperatura de lavado = 37 °C
  - Duración del lavado = 1 hora

La carga de fármaco en el producto final fue del 20,1 %, lo que indica una mínima pérdida del fármaco durante el procesamiento.

40

Todas las microesferas se almacenaron a 2-8 °C.

Resultados de análisis por lote

Prueba	Especificación	Resultados
Apariencia	Polvo blanco a blancuzco	Polvo blanco a blancuzco
Apariencia tras la reconstitución	Suspensión homogénea blanca a blancuzca libre de agregados visibles	Suspensión homogénea blanca a blancuzca libre de agregados visibles
Tiempo de reconstitución	<3 minutos	Aprobado
Identidad	Perfil y tiempos de retención que serán cualitativamente similares a la referencia	Aprobado

45

Prueba	Especificación	Resultados
Ensayo (rpHPLC)	18-22 % p/p de Ciclosporina A	20,1 % p/p de Ciclosporina A
Tamaño de partícula	Resultado del informe. Diana 26-30 $\mu\text{m}$	28,24 $\mu\text{m}$ (DE=3,3)
pH tras la reconstitución	Para el informe	7,04
Métodos biológicos		
Esterilidad (PhEur)	Aprobado	No analizado (lote no estéril)
Endotoxina (PhEur)	Aprobado	No analizado (lote no estéril)

Los constituyentes del vehículo de inyección fueron los siguientes:



- 5 mg/ml Carboximetilcelulosa sódica
  - 0,4 mg/ml de polisorbato-20
- 5 • Solución tamponada con fosfato, pH 7

Resultados de análisis por lote

Prueba	Especificación	Resultados
Apariencia	Líquido transparente, incoloro	Líquido transparente, incoloro
PH	Para el informe	7,1
Densidad	Para el informe	1,01 g/ml
Métodos biológicos		
Esterilidad (PhEur)	Aprobado	No analizado
Endotoxina (PhEur)	Aprobado	No analizado

**Ejemplo 2 - Desarrollo del vehículo de inyección y evaluación de la capacidad de inyección**

10 Debido a la vía intravítrea y la naturaleza de las microesferas cargadas con CsA, se llevó a cabo una optimización del vehículo de inyección para proporcionar inyecciones simples y repetibles. Los inventores de la presente han llevado a cabo una gran cantidad de estudios para observar el tiempo de reconstitución, la velocidad de sedimentación y la capacidad de inyección de las microesferas placebo. A estos efectos, las microesferas placebo presentan propiedades muy similares a las de las cargadas con CsA. En las investigaciones iniciales se observó el sistema tampón, el contenido de tensioactivos, el contenido de poliol y modificadores de viscosidad. Gracias a estos experimentos, los inventores de la presente han podido establecer una resuspensión preferente y un protocolo de inyección. Las suspensiones homogéneas pueden formarse en <2 minutos y han sido optimizadas para proporcionar una velocidad de sedimentación satisfactoria, Figura 1, y los datos obtenidos hasta ahora indican que estas son inyectables por medio de agujas 30G ½", Tabla 1 (0,5 pulgadas relativas a 12,7 cm).

**Tabla 1.** Recuperación de ciclosporina encapsulada ("Opsisporin") después de la expulsión desde una aguja hipodérmica 30G ½".

Muestra n.º	Tamaño de aguja	% de recuperación
1	30G / 0,5"	92,9
2	30G / 0,5"	90,4
3	30G / 0,5"	98,0

25 **Ejemplo 3 - Investigación de la capacidad de colocación en una jeringa de cinco lotes diferentes de microesferas cargadas con ciclosporina en un rango de agujas hipodérmicas.**

**Método**

30 En esta investigación se utilizaron cinco lotes de microesferas y sus propiedades se describen en la Tabla 2.

**Tabla 2 - Propiedades de los lotes de microesferas 1-5:**

Lote de microesferas n.º	Carga de fármaco (%p/p)	Tamaño promedio (µm)	Desviación estándar	% CV
<b>Vial 1</b> - 231-114-001	21,0	55,76	3,77	6,76
<b>Vial 2</b> - 231-180-003	18,0	35,69	2,83	7,93
<b>Vial 3</b> - 231-105 + 180	20,4	41,86	8,98	21,45
<b>Vial 4</b> - 231-108-001	20,5	52,25	4,46	8,54
<b>Vial 5</b> - 231-175-001	19,3	53,18	5,39	10,14

**Preparación del vehículo de inyección de Opsisporin**

35 El vehículo de inyección consistió en una solución salina tamponada con fosfato (pH 7) con 0,8 µg/ml de tween<sub>20</sub> y 5 mg/ml de carboximetilcelulosa sódica.

**Capacidad de colocación en una jeringa**

40 Se examinó la capacidad de colocación en una jeringa de los lotes de microesferas a una concentración de 18, 36, 54, 72 y 140 mg/ml. En particular, se pesó una masa específica de microesferas en un tubo Eppendorf de 2 ml, se

agregó 1 ml\_ del vehículo de inyección (descrito anteriormente) y se colocaron los tubos Eppendorf en un sonicador durante 1 minuto. Esto produjo una suspensión homogénea, de la cual se extrajo 100 µl en una jeringa de 1 ml\_ montada con una aguja hipodérmica de 21G, 25G, 27G o 30G. Luego se expulsó la suspensión a través de la misma aguja hipodérmica.

5 Para considerarse aprobado, el volumen correcto de la suspensión debe haber sido tanto aspirado dentro de la jeringa como expulsado de esta. La incapacidad de aspiración, el bloqueo de la aguja o la incorrecta administración de la dosis se consideraron fracasos.

10 **Resultados**

Los resultados se muestran en las Tablas 3 a 7, y se utilizó Sí (✓) o No (X) para identificar si fue posible la aspiración e inyección en cada concentración. Tres fracasos consecutivos (indicados por "X") confirmaron que la suspensión no fue inyectable.

15 **Tabla 3: capacidad de colocación en una jeringa de 100 µl de una suspensión de microesferas a una concentración de 18 mg de microesferas/ml**

Lote de microesferaa	21G	25G	27G	30G
<b>Vial 1</b> 231-114-001	✓	✓	✓	✓
<b>Vial 2</b> 231-180-003	✓	✓	✓	✓
<b>Vial 3</b> 231-105 + 180	✓	✓	✓	✓
<b>Vial 4</b> 231-108-001	✓	✓	✓	X
<b>Vial 5</b> 231-175-001	✓	✓	✓	X

20 **Tabla 4: capacidad de colocación en una jeringa de 100 µl de una suspensión de microesferas a una concentración de 36 mg de microesferas/ml**

Lote de microesferaa	21G	25G	27G	30G
<b>Vial 1</b> 231-114-001	✓	✓	✓	X
<b>Vial 2</b> 231-180-003	✓	✓	✓	✓
<b>Vial 3</b> 231-105 + 180	✓	✓	✓	✓
<b>Vial 4</b> 231-108-001	✓	✓	✓	X
<b>Vial 5</b> 231-175-001	✓	✓	✓	X

**Tabla 5: capacidad de colocación en una jeringa de 100 µl de una suspensión de microesferas a una concentración de 54 mg de microesferas/ml**

Lote de microesferas	21G	25G	27G	30G
<b>Vial 1</b> 231-114-001	✓	✓	✓	X
<b>Vial 2</b> 231-180-003	✓	✓	✓	✓
<b>Vial 3</b> 231-105 + 180	✓	✓	✓	✓
<b>Vial 4</b> 231-108-001	✓	✓	✓	✓
<b>Vial 5</b> 231-175-001	✓	✓	✓	X

25

**Tabla 6: capacidad de colocación en una jeringa de 100 µl de una suspensión de microesferas a una concentración de 72 mg de microesferas/ml**

Lote de microesferas	21G	25G	27G	30G
<b>Vial 1</b> 231-114-001	✓	✓	X	X
<b>Vial 2</b> 231-180-003	✓	✓	✓	✓
<b>Vial 3</b> 231-105 + 180	✓	✓	✓	X
<b>Vial 4</b> 231-108-001	✓	✓	✓	X
<b>Vial 5</b> 231-175-001	✓	✓	✓	X

5

**Tabla 7: capacidad de colocación en una jeringa de 100 µl de una suspensión de microesferas a una concentración de 140 mg de microesferas/ml**

Lote de microesferas	21G	25G	27G	30G
<b>Vial 1</b> 231-114-001	✓	✓	X	X
<b>Vial 2</b> 231-180-003	✓	✓	✓	✓
<b>Vial 3</b> 231-105 + 180	✓	✓	✓	X
<b>Vial 4</b> 231-108-001	✓	✓	✓	X
<b>Vial 5</b> 231-175-001	✓	✓	✓	X

**Conclusiones**

10 Los resultados de este experimento mostraron que las microesferas de CsA con un diámetro de 35 µm y CV de <10 % pudieron ser aspiradas y expulsadas a través de agujas hipodérmicas de 27G y 30G en concentraciones de suspensión más altas que las poblaciones de microesferas más grandes y/o menos monodispersas. Esto confirmó que el diámetro de las microesferas y la distribución del tamaño fueron de crucial importancia para que la suspensión de microesferas pudiera pasar a través de las agujas hipodérmicas más pequeñas.

15 **Ejemplo 4 - Tratamiento in vivo de un modelo murino de uveítis autoinmune**

Antecedentes del modelo experimental

20 Se evaluó la efectividad de las micropartículas cargadas con ciclosporina de la presente invención mediante un modelo *in vivo* establecido de uveítis autoinmune. Copland *et al.*, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2008, Vol. 49, No. 12, pp. 5458-5465, describe la evolución temporal clínica de la Uveoretinitis Autoinmune Experimental (EAU) mediante imagenología fundal endoscópica tópica (TEFI) con correlación infiltrada histológica y celular. El trabajo de Copland empleó una cepa de ratón B10 mientras que el presente estudio empleó una cepa de ratón C57. Se ha descubierto que la cepa de ratón B10 presenta una enfermedad más aguda, con una corta duración y enfermedad grave, mientras que la cepa de ratón C57 presenta una enfermedad más duradera y de menor gravedad. Los inventores de la presente seleccionaron la cepa de ratón C57 para el modelo murino experimental de la uveítis autoinmune para el presente estudio debido a que su mayor duración es más adecuada para la evaluación de un producto terapéutico de acción prolongada y liberación sostenida.

30 Descripción del experimento

Después de su llegada, los ratones fueron separados de forma aleatoria en grupos de 10 y se les permitió aclimatarse por una semana. Antes del inicio del estudio se verificó el estado de salud de todos los animales.

35 Con el fin de inducir la uveítis autoinmune experimental (EAU), en el Día 0 los animales recibieron una inyección subcutánea del antígeno del péptido 1-20 (IRBPp 1-20, GPTHLFQPSLVLDMAKVLLD (SEQ ID NO: 1); Severn Biotech.) de la proteína de unión al retinoide interfotorreceptor emulsionado con adyuvante completo de Freund (CFA; Sigma) (1:1 vol/vol) complementado con 2,5 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* H37 Ra (Difeo). Los ratones también recibieron 1,5 µg de la toxina *Bordetella pertussis* (Calbiochem) vía inyecciones i.p. al momento de la inmunización. Se administraron los tratamientos de acuerdo con el cronograma a continuación (Tabla 8) con el fin de comparar la eficacia de la liberación sostenida con ciclosporina A administrada de forma oral y los grupos de control solamente con vehículo.

40

Debido a las propiedades de liberación sostenida del producto de micropartículas cargadas con ciclosporina (“Opsisporin”), se administró el tratamiento intravítreo solamente en una única ocasión, el día 0, después de la inducción de la enfermedad. También se inyectó en el día 0 a un grupo de control que recibió solamente el vehículo. De manera adicional, dos grupos de 10 animales recibieron CsA en CMC de forma oral, una vez al día, como un tratamiento de control positivo.

Se monitorearon los síntomas de enfermedad clínica mediante imagenología fundal endoscópica tópica (TEFI) a partir del día 7, dos veces a la semana, hasta el día de finalización 28. Los animales también fueron monitoreados dos veces a la semana en búsqueda de síntomas de mala salud y se pesaron, y se registraron todas las anomalías.

**Tabla 8: Grupos de tratamiento y dosificaciones**

Grupo	Tratamiento	Vía	Dosis	Tiempo/frecuencia de la 1ª dosificación
1	Ninguno	n/a	n/a	n/a
2	Vehículo de inyección	Intravítrea	n/a	Una vez en el día 0
3	Opsisporin	Intravítrea	13,5 µg de CsA	Una vez en el día 0
4	Opsisporin	Intravítrea	4,5 µg de CsA	Una vez en el día 0
5	CsA en CMC	Oral	20 mg/kg/día	s.i.d. a partir del Día 0
6	CsA en CMC	Oral	6,7 mg/kg/día	s.i.d. a partir del Día 0

n/a - no corresponde.; s.i.d. - dosis única diaria; s.c. - subcutánea; i.p. - intraperitoneal; IRBPp - péptido 1-20 de la proteína de unión al retinoide interfotorreceptor; CFA - adyuvante completo de Freund; CsA - ciclosporina A

El volumen de inyección intravítrea se fijó en 4 µl, por lo tanto, para lograr las dosis apropiadas se prepararon suspensiones de Opsisporin como se muestra en la Tabla 9.

**Tabla 9: Suspensiones de micropartículas**

Grupo	Dosis diana de CsA	Carga de fármaco de microesferas	Dosis microesferas Q-Sphera	Suspensión de microesferas	Volumen de inyección
3	13,5 µg	20,1 % de p/p	67,1 µg	16,8 mg/ml	4 µl
4	4,5 µg	20,1 % de p/p	22,4 µg	4,6 mg/ml	4 µl

**Lecturas**

**Observaciones clínicas:**

Los animales se pesaron al inicio del estudio (Día 0) y posteriormente dos veces a la semana hasta su finalización el día 28. Todos los animales también fueron observados dos veces a la semana en búsqueda de síntomas de mala salud y se registraron todas las anomalías.

**Imagenología retiniana mediante imagenología fundal endoscópica tópica (TEFI)**

Desde el día 7 hasta la finalización el día 28 se puntuaron las retinas de los ratones, después de la dilatación de pupilas con Tropicamida al 1 %, seguida de clorhidrato de fenilefrina al 2,5 %. Las imágenes retinianas se capturaron mediante Imagenología Fundal Endoscópica Tópica (TEFI) y se puntuaron de acuerdo con el sistema de puntuación estandarizado a continuación, que otorga una máxima puntuación de 20 (Tabla 10).

**Tabla 10: Puntuación TEFI**

Puntuación	Disco óptico	Vasos retinianos	Infiltración de tejido retiniano	Daño estructural
1	Inflamación mínima	1-4 Infiltración leve	1-4 lesiones pequeñas o 1 lesión lineal	Lesiones retinianas o atrofia que involucre ½ a ¼ del área de la retina
2	Infiltración leve	>4 Infiltración leve o 1-3 infiltración moderada	5-10 lesiones pequeñas o 2-3 lesiones lineales	Atrofia panretinal con múltiples lesiones pequeñas (cicatrices) o ≤3 lesiones lineales (cicatrices)
3	Inflamación moderada	>3 Infiltración moderada	>10 Lesiones pequeñas o >3 Lesiones lineales	Atrofia panretinal con >3 lesiones o lesiones confluentes (cicatrices)

(continuación)

Puntuación	Disco óptico	Vasos retinianos	Infiltración de tejido retiniano	Daño estructural
4	Inflamación grave	>1 Infiltración grave	Lesión lineal confluyente	Desprendimiento de retina con pliegues
5	No visible (blanco o total o desprendimiento grave)	No visible (blanco o total o desprendimiento grave)	No visible (blanco o total o desprendimiento grave)	No visible

**Resultados**

5 La Figura 2 muestra la gravedad de la enfermedad de uveítis puntuada mediante imagenología fundal endoscópica tópica (TEFI) a lo largo del tiempo en días para el modelo murino de uveítis descrito anteriormente. Sin tratamiento (rombos), vehículo tratado por inyección intravítrea (cuadrados), tratado con 4,5 pg de ciclosporina (CsA) en forma de micropartículas cargadas con CsA de la invención (cruces) y tratado con 6,7 mg/kg/día de CsA oral (círculos).  
10 Ambos grupos tratados con CsA presentaron una menor puntuación TEFI (es decir, enfermedad menos grave) que los no tratados o el vehículo.

**Ejemplo 5 - Comparación de capacidad de inyección de diversas formulaciones de vehículo de inyección**

15 El presente estudio apuntó a identificar una formulación del vehículo de inyección con una mayor facilidad de humectación, mejor estabilidad de suspensión (es decir, más tiempo de permanencia en suspensión antes de que las micropartículas se asienten) y/o mejor capacidad de inyección.

Se prepararon las siguientes formulaciones de vehículo de inyección:

20

**Tabla 11: Formulaciones de vehículo de inyección**

Vehículo de inyección	Excipientes	Concentración (mg/ml)	Densidad (g/ml)	Viscosidad (mPas )
<b>A</b>	PBS	6,5	1,012	2,84
	Polisorbato 20	0,7		
	Carboximetilcelulosa sódica	5		
<b>B</b>	PBS	6,5	1,010	6,16
	Polisorbato 20	0,5		
	Hidioxietilcelulosa	2,5		
<b>C</b>	PBS	6,5	1,004	2,55
	Polisorbato 80	1		
	Carboximetilcelulosa sódica	5		
<b>D</b>	PBS	6,5	0,965	21,6
	Polisorbato 80	1		
	Hypromellose	5		
	Edetato de disodio	1,3		
<b>E</b>	Cloruro de sodio	8,5	1,012	1,35
	Sacarosa	4,5		
	Polisorbato 20	0,5		
<b>F</b>	PBS	6,5	0,984	51,3
	Hipromelosa	5		
	Polisorbato 80	1		
	Poloxámero 407	2		
	Hidioxietilcelulosa	2,5		

(continuación)

Vehículo de inyección	Excipientes	Concentración (mg/ml)	Densidad (g/ml)	Viscosidad (mPas)
<b>G</b>	PBS	6,5	0,952	52,1
	Hipromelosa	5		
	Polisorbato 80	1		
	Poloxámero 407	2		
	Hidroxietilcelulosa	2,5		
	Sacarosa	4,5		
	Edetato de sodio	1,3		
<b>H</b>	PBS	6,5	0,967	29,7
	Polisorbato 20	0,5		
	Hidroxietilcelulosa	2		
	Hipromelosa	4		
	Mannitol	6		
<b>I</b>	PBS	6,5	0,996	24,6
	Polisorbato 20	0,5		
	Hidroxietilcelulosa	2		
	Hipromelosa	3		
	Manitol	5		
	Poloxámero 407	1		
	Edetato de sodio	1,3		

Se midió la viscosidad por medio de un vibro viscosímetro A&D SV-1a (A&D Instruments Ltd, Abingdon, Reino Unido) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El manual de instrucciones del vibro viscosímetro A&D SV-1a © 2008 está disponible en el sitio web de A&D.

Antes de su uso, se llevó a cabo la calibración con una muestra de agua a 20 °C. Se utilizaron volúmenes de muestra de 35-45 ml para determinar la viscosidad. Las lecturas de viscosidad se muestran en la Tabla 11 anterior y en las Tablas 12 y 13 a continuación. Todas las lecturas se tomaron a 20 °C salvo que se indique lo contrario.

Se llevó a cabo una evaluación del tiempo de reconstitución, la capacidad de humectación y la capacidad de colocación en una jeringa de las micropartículas (50 mg de micropartículas en 400 µl para 125 mg/ml o en 333,3 µl para 150 mg/ml del vehículo de inyección). Se descubrió que los vehículos de inyección A, B, C y E presentaron una reconstitución y capacidad de colocación en una jeringa subóptimas debido a que las micropartículas tendieron a asentarse rápidamente, lo cual a su vez causó que solamente el vehículo de inyección sin micropartículas fuera colocado en la jeringa. Se descubrió que los vehículos de inyección F y G fueron demasiado viscosos, lo que llevó a dificultades al aspirar el vehículo de inyección puro a través de jeringas de insulina de 27G y 29G. Los vehículos de inyección D, H e I presentaron la mejor reconstitución de micropartículas en una solución homogénea, así como presentaron la mejor capacidad de colocación en una jeringa según lo evaluado por volumen de inyección de 100 µl por medio de una jeringa de insulina de 27G o 29G fija. En función del tiempo de reconstitución, la capacidad de humectación, la capacidad de colocación en una jeringa y la calidad de suspensión, se decidió combinar los vehículos de inyección D, H e I con los excipientes y concentraciones modificados para producir una formulación de vehículo de inyección adicional "J" (véase Tabla 12 a continuación). Además del vehículo de inyección J, también se realizó una formulación de vehículo de inyección de repetición "K", la cual difirió del vehículo de inyección J por la adición de manitol. Esto se llevó a cabo para analizar cualquier diferencia que pudiera presentarse después de la liofilización; normalmente se añadiría manitol para las formulaciones de micropartículas que son liofilizadas antes de la reconstitución.

**Tabla 12: Formulaciones adicionales de vehículo de inyección**

Vehículo de inyección	Excipientes	Concentración (mg/ml)	Densidad (g/ml)	Viscosidad (mPas)
<b>J</b>	PBS	6,5	0,959	33,2
	Polisorbato 80	1		
	Hidroxietilcelulosa	1,5		
	Hipromelosa	4,5		

(continuación)

Vehículo de inyección	Excipientes	Concentración (mg/ml)	Densidad (g/ml)	Viscosidad (mPas)
<b>K</b>	PBS	6,5	0,945	34,1
	Polisorbato 80	1		
	Hidroxietilcelulosa	1,5		
	Hipromelosa	4,5		
	Manitol	5		
<b>L</b>	PBS	6,5	0,952	40,2 a 17,4°C
	Polisorbato 80	1,0		
	Hidroxietilcelulosa	2,0		
	Hipromelosa	4,0		

Los vehículos de inyección J y K se evaluaron para determinar su reconstitución y capacidad de humectación. Se añadieron 333,3 µl de cada vehículo de inyección a 50 mg de micropartículas para proporcionar 150 mg/ml. Se facilitó la reconstitución mediante la agitación en vórtice durante aproximadamente 3 minutos y la sonicación durante aproximadamente 3 minutos. La suspensión resultante se descubrió altamente homogénea. La capacidad de colocación en una jeringa de los vehículos de inyección J y K se confirmó por medio del dispositivo Instron con un volumen de inyección de 100 µl y una jeringa de insulina de 27G fija. Ambos vehículos de inyección J y K presentaron resultados similares (se logró la capacidad de inyección en 2 de cada 3 intentos), lo que sugiere que la presencia o ausencia de manitol no altera significativamente la capacidad de colocación en una jeringa del vehículo de inyección.

La optimización adicional de la formulación del vehículo de inyección resultó en el vehículo de inyección L (véase Tabla 12 a continuación), el cual se utilizó para un desarrollo adicional. Las propiedades de una formulación de vehículo de inyección anterior ("actual") y del vehículo de inyección L ("desarrollo") se muestran en la Tabla 13 a continuación.

**Tabla 13: Propiedades del vehículo de inyección**

Vehículo de inyección	Excipientes	Concentración (mg/ml)	Densidad (g/ml)	Viscosidad (mPas)	pH
<b>Actual</b>	PBS	10,0	1,012	3,3 a 17,2°C	7,2
	Polisorbato 20	0,4			
	Carboximetilcelulosa sódica	5,0			
<b>Desarrollo "L"</b>	PBS	6,5	0,952	40,2 a 17,4°C	7,3
	Polisorbato 80	1,0			
	Hidroxietilcelulosa	2,0			
	Hipromelosa	4,0			

Las formulaciones de vehículo de inyección que se muestran en la Tabla 13 se analizaron para determinar su capacidad de inyección mediante un dispositivo Instron. La concentración de micropartículas cargadas con CsA en ambas formulaciones fue de 150 mg/ml. La aguja fue de 27G y el volumen de inyección de 100 µl.

La Figura 3 muestra una gráfica para la formulación de vehículo de inyección actual de fuerza (N) con respecto a la extensión compresiva (mm). La Figura 4 muestra una gráfica para la formulación de vehículo de inyección de desarrollo de fuerza (N) con respecto a la extensión compresiva (mm). Observando la diferencia en la escala del eje y para las Figuras 3 y 4, es evidente que la formulación de vehículo de inyección de desarrollo alcanzó niveles similares de extensión compresiva con fuerza aproximadamente 10 veces menores. Este resultado fue sorprendente porque, tal como se muestra en la Tabla 13, el vehículo de inyección de desarrollo de hecho posee una mayor viscosidad que la formulación de vehículo de inyección actual.

Las velocidades de sedimentación de las formulaciones de inyección de vehículo actual y de desarrollo se evaluaron mediante la medición del cambio en la absorbancia a 420nm en el tiempo para una suspensión de microesferas cargadas con CsA de 17,5 mg/ml en las formulaciones actual y de desarrollo, respectivamente. Los resultados se muestran en la Figura 5. Como es evidente en la Figura 5, la formulación de vehículo de inyección actual presentó una sedimentación mucho más rápida que la formulación de desarrollo (la actual muestra una sedimentación sustancial en un 1 minuto en comparación con aproximadamente 10-30 minutos en la formulación de desarrollo).

Sin limitarse a ninguna teoría en particular, los inventores de la presente creen que la mayor viscosidad de la formulación de vehículo de inyección de desarrollo en comparación con la formulación actual, y el mayor tiempo de

sedimentación correspondiente, significan que las micropartículas se retienen en suspensión de mejor manera en la formulación de desarrollo durante el proceso de inyección. Se cree que la sedimentación de las micropartículas durante la inyección puede llevar a la agregación de micropartículas, lo que a su vez produce la formación de un "tapón" que bloquea parcialmente la angosta aguja requerida para la inyección intravítrea. Esto explicaría el descubrimiento contraintuitivo descrito anteriormente: que la formulación de desarrollo más viscosa requiere menos fuerza para alcanzar un nivel dado de extensión compresiva.

Los menores niveles de fuerza para alcanzar un volumen de inyección dado a través de una aguja angosta para inyección intravítrea (por ejemplo, de 27G o 30G) son altamente deseables. Por consiguiente, se espera que la formulación de vehículo de inyección de desarrollo proporcione una mejor capacidad de inyección de micropartículas cargadas con CsA para inyección intravítrea. Nuevamente, sin limitarse a ninguna teoría en particular, los inventores de la presente creen que la adición del agente tixotrópico hipromelosa (también conocido como hidroxipropilmetilcelulosa, "HPMC" o E464) contribuye a las propiedades favorables de la formulación de vehículo de inyección de desarrollo. La presencia de un agente tixotrópico en el vehículo de inyección resulta en un fluido que presenta adelgazamiento por cizalladura. En reología, el adelgazamiento por cizalladura es el comportamiento no newtoniano de fluidos cuya viscosidad disminuye bajo el esfuerzo de cizallamiento. Nuevamente, sin limitarse a ninguna teoría en particular, los inventores de la presente creen que un vehículo de inyección que presenta adelgazamiento por cizalladura es particularmente favorable en relación con la presente invención. La viscosidad relativamente alta en la ausencia de cizallamiento ayuda a mantener las micropartículas en suspensión. La inyección a través de la aguja angosta (por ejemplo, para inyección intravítrea) induce un cizallamiento que produce una caída en la viscosidad del fluido de adelgazamiento por cizalladura, lo que facilita la inyección. Por lo tanto, en la presente se contempla específicamente que el vehículo de inyección puede comprender uno o más agentes tixotrópicos. Los ejemplos de agentes tixotrópicos para uso en el vehículo de inyección incluyen: hipromelosa, hidroxietilcelulosa, hidroxietilcelulosa modificada de forma hidrofílica, goma xantana, goma guar, y alcohol cetílico.

Las modalidades específicas descritas en la presente se proporcionan a modo de ejemplo y no de modo taxativo. Todos los subtítulos en la presente se incluyen solo para facilitar la lectura y no deben interpretarse como que limitan la descripción de forma alguna.



## REIVINDICACIONES

1. Una formulación farmacéutica de liberación controlada, que comprende micropartículas cargadas con ciclosporina de un polímero biorreabsorbible, que comprende poli(D,L-lactida), en donde el diámetro promedio de las micropartículas se encuentra en el intervalo de 20  $\mu\text{m}$  a 40  $\mu\text{m}$ , y en donde la formulación comprende dichas micropartículas suspendidas en un vehículo líquido, vehículo líquido que tiene una viscosidad de entre 30 y 45 mPas tal como se mide a 20 °C usando un vibro viscosímetro A&D SV-1a (A&D Instruments Ltd) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y en donde la formulación comprende un agente tixotrópico seleccionado del grupo que consiste en: hipromelosa, hidroxietilcelulosa, hidroxietilcelulosa modificada de forma hidrofílica, goma xantana, goma guar y alcohol cetílico, y en donde la formulación líquida presenta un comportamiento de adelgazamiento por cizalladura de manera que la viscosidad disminuye bajo el esfuerzo de cizallamiento.
2. La formulación de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho polímero comprende además poli(L-lactida) y/o poli(D,L-lactida-co-glicólico).
3. La formulación de acuerdo con la reivindicación 2, en la que dicho polímero comprende entre un 1 % y un 15 % p/p de poli(L-lactida).
4. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que:
- dichas micropartículas comprenden del 15 % al 25 % en p/p de ciclosporina; al menos el 95 % de las micropartículas de la formulación tienen un diámetro en el intervalo de 25  $\mu\text{m}$  a 40  $\mu\text{m}$ ; y/o el coeficiente de variación del diámetro de las micropartículas es 0,1 o menor, en donde el coeficiente de variación es la desviación estándar del diámetro de las micropartículas dividido por el diámetro promedio de las micropartículas.
5. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la formulación comprende además un portador, un diluyente, un vehículo, un tampón, un agente antiaglomerante y/o un modificador de la viscosidad farmacéuticamente aceptables.
6. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el agente tixotrópico comprende hipromelosa.
7. La formulación de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la formulación comprende: solución salina tamponada con fosfato, polisorbato 80, hidroxietilcelulosa e hipromelosa, y, opcionalmente, manitol.
8. La formulación de acuerdo con la reivindicación 7, en la que la concentración de los siguientes componentes se encuentra en los intervalos de concentración respectivos a continuación:
- solución salina tamponada con fosfato: 5,0 a 8,0 mg/ml, opcionalmente 6,5 mg/ml;  
 polisorbato 80: 0,8 a 1,2 mg/ml, opcionalmente 1,0 mg/ml;  
 hidroxietilcelulosa: 1,8 a 2,2 mg/ml, opcionalmente 2,0 mg/ml;  
 hipromelosa: 3,8 a 4,2 mg/ml, opcionalmente 4,0 mg/ml;  
 manitol, cuando está presente: 4,8 a 5,2 mg/ml, opcionalmente 5,0 mg/ml; y  
 dichas micropartículas cargadas con ciclosporina: 100 a 200 mg/ml, opcionalmente 150 mg/ml.
9. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la formulación se encuentra en forma inyectable o está adaptada para ser reconstituida en forma inyectable antes de su uso.
10. La formulación de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la formulación es para inyección de depósito intravítrea.
11. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, en donde la formulación es inyectable a través de una aguja hipodérmica, que tiene un diámetro interno de  $0,159 \pm 0,019$  mm y 25,4 mm de longitud (de calibre 30 y 0,5 pulgadas de longitud) a un porcentaje de recuperación de al menos el 80 %.
12. Una formulación farmacéutica de liberación controlada como se define en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para su uso en la medicina.
13. Una formulación farmacéutica de liberación controlada como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para su uso en el tratamiento de uveítis en un sujeto mamífero, opcionalmente, en donde el sujeto mamífero es un ser humano o un caballo.
14. La formulación para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la uveítis es intermedia, posterior o panuveítis de etiología no infecciosa, que ponen en riesgo la visión, o en donde la uveítis es uveítis equina recurrente.

15. La formulación para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el tratamiento es la reducción o prevención de la recurrencia de uveítis en un sujeto que se somete a un tratamiento con esteroides para la uveítis.

5 16. Un proceso para producir una formulación inyectable de partículas cargadas con ciclosporina, tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende:

proporcionar una población seca de dichas micropartículas cargadas con ciclosporina;

10 poner a las partículas en contacto con una solución de vehículo de inyección que comprende: una solución salina tamponada con fosfato, polisorbato 80, hidroxietilcelulosa e hipromelosa, y, opcionalmente, manitol, en donde dicho vehículo de inyección tiene una viscosidad que oscila entre 30 y 45 mPas tal como se mide a 20 °C, usando un vibro viscosímetro A&D SV-1a (A&D Instruments Ltd) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y en donde la formulación líquida presenta un comportamiento de adelgazamiento por cizalladura, de manera  
15 que la viscosidad disminuye bajo el esfuerzo de cizallamiento.

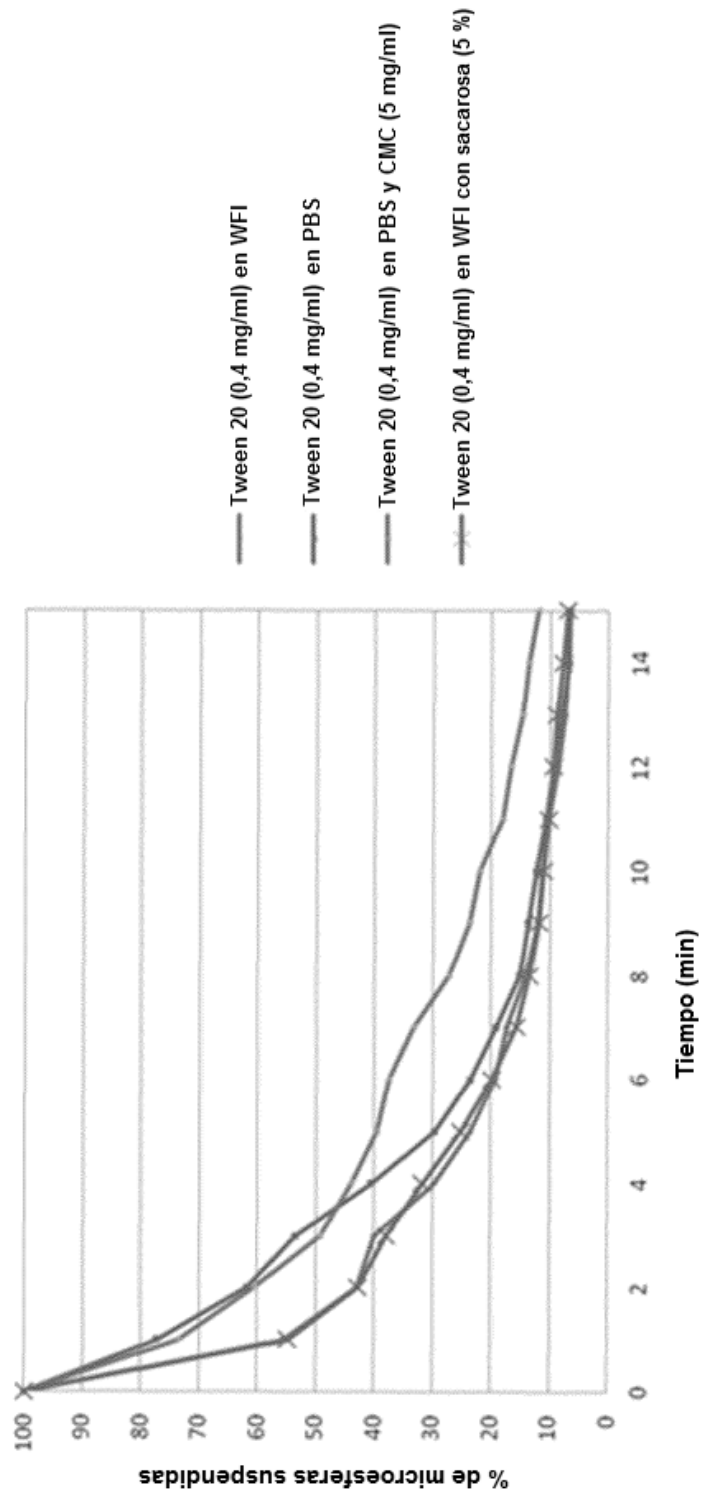


Figura 1

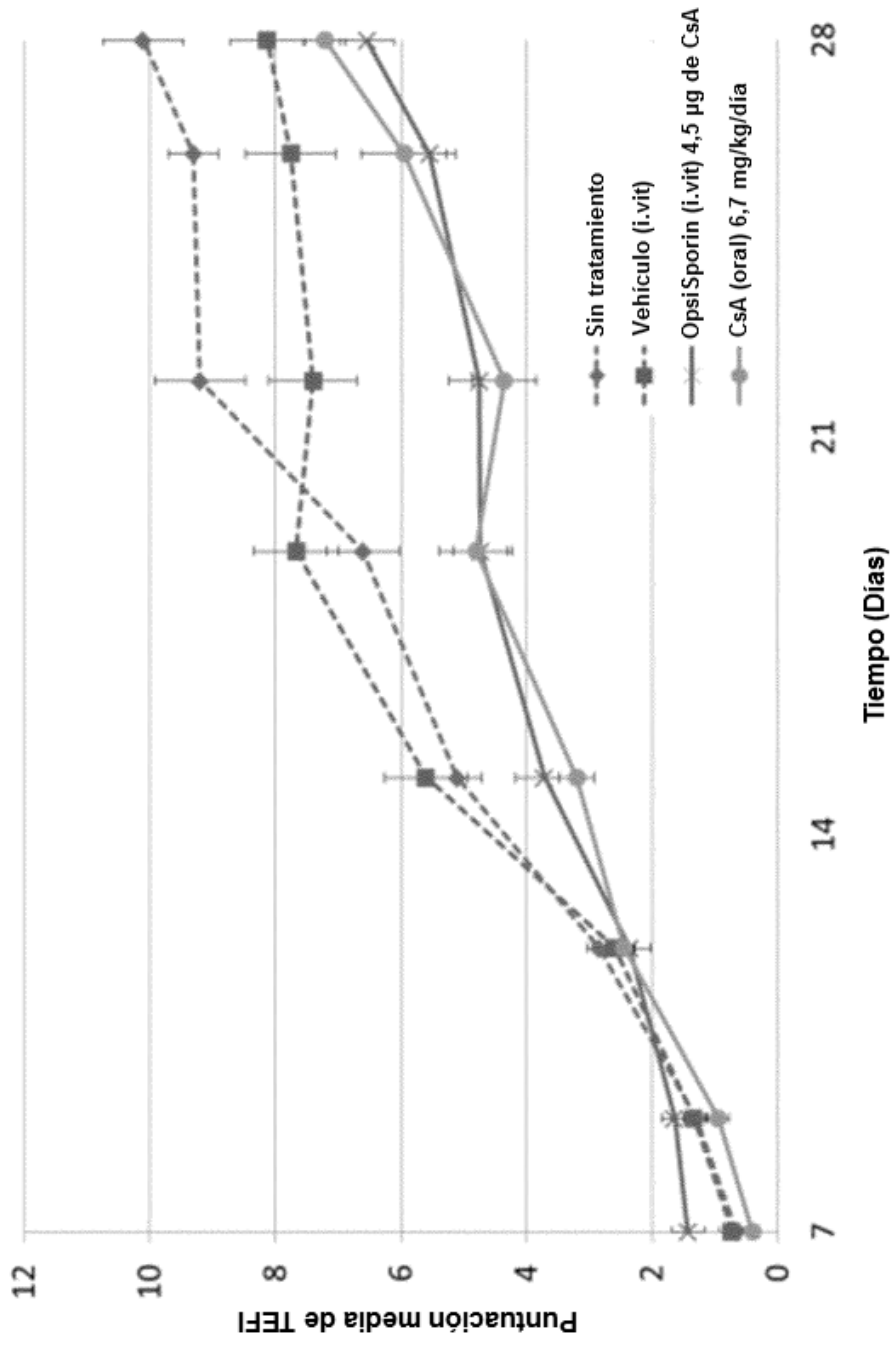


Figura 2

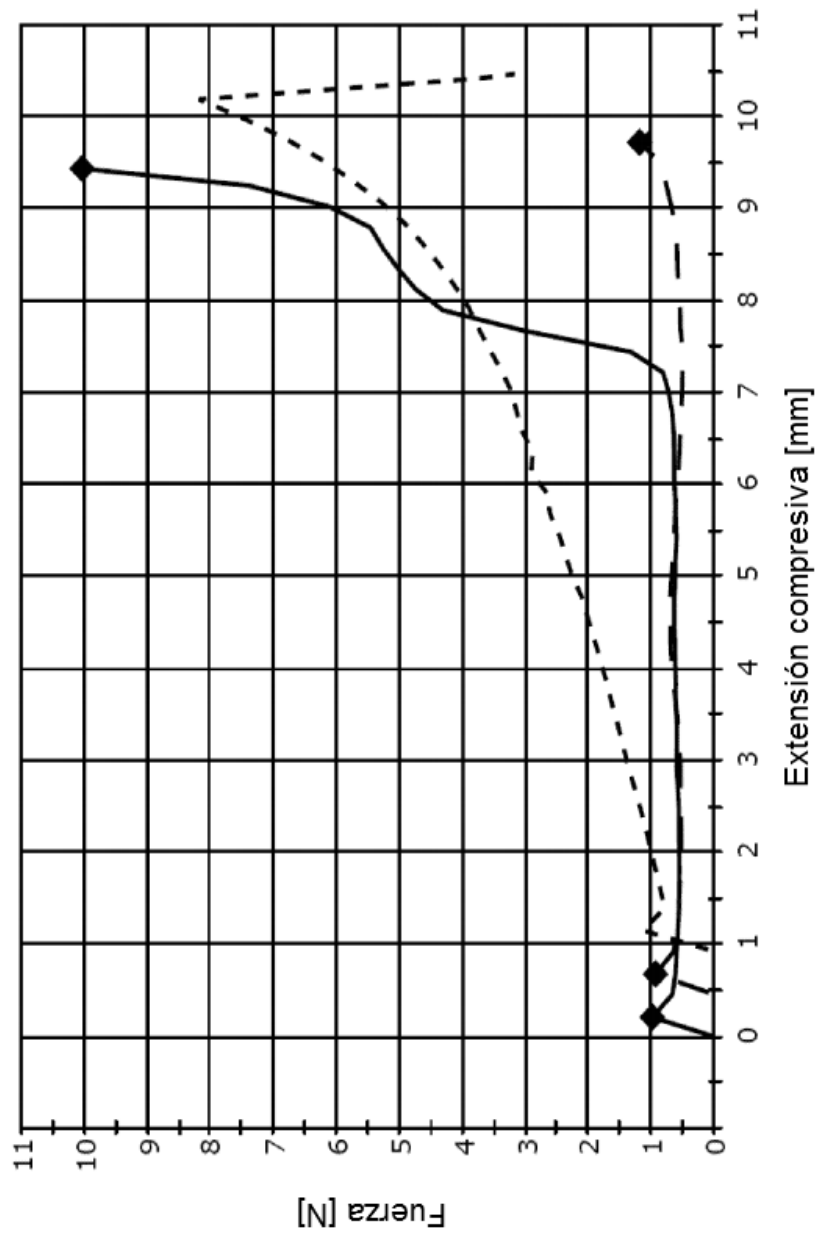


Figura 3

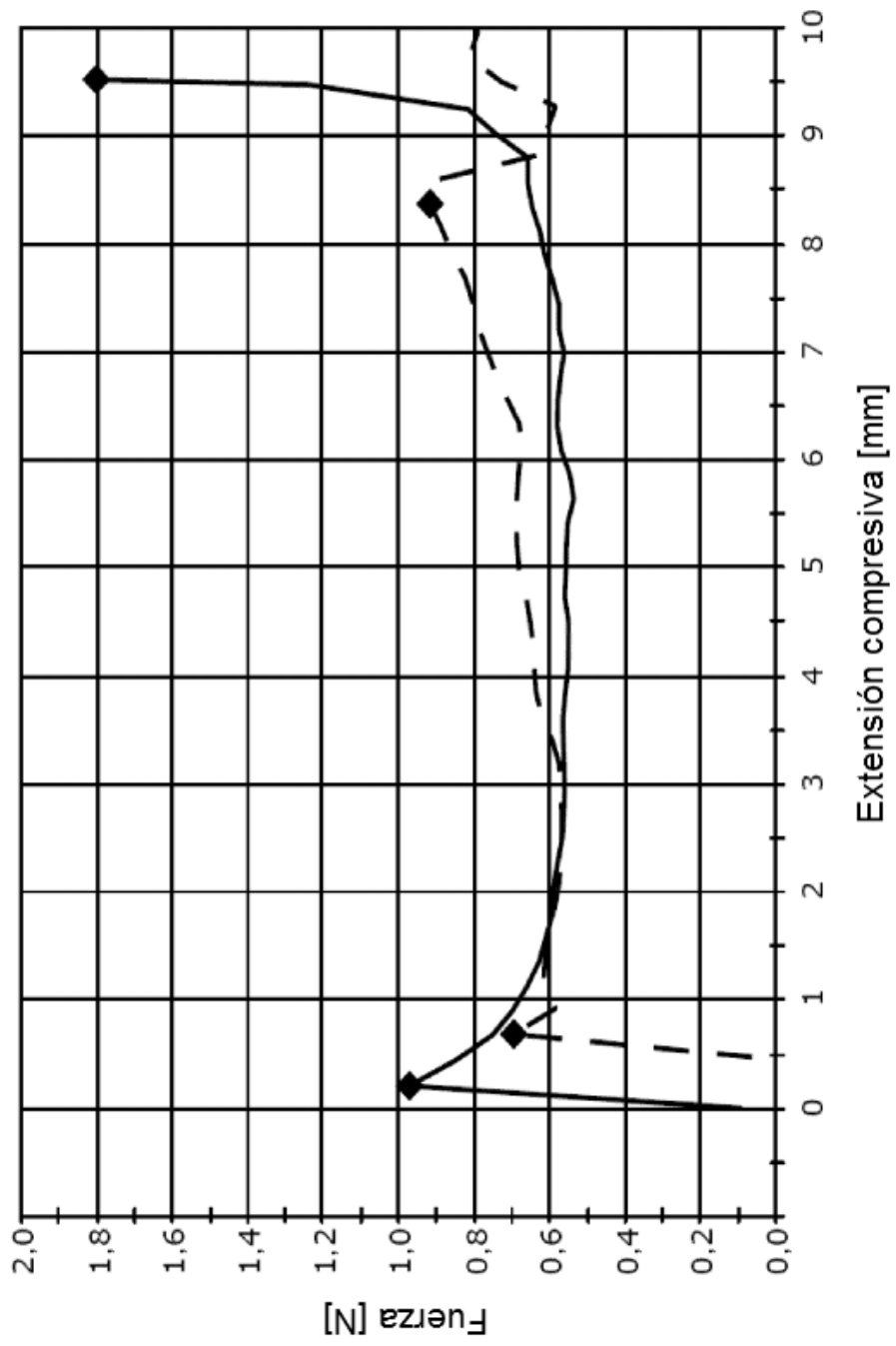


Figura 4

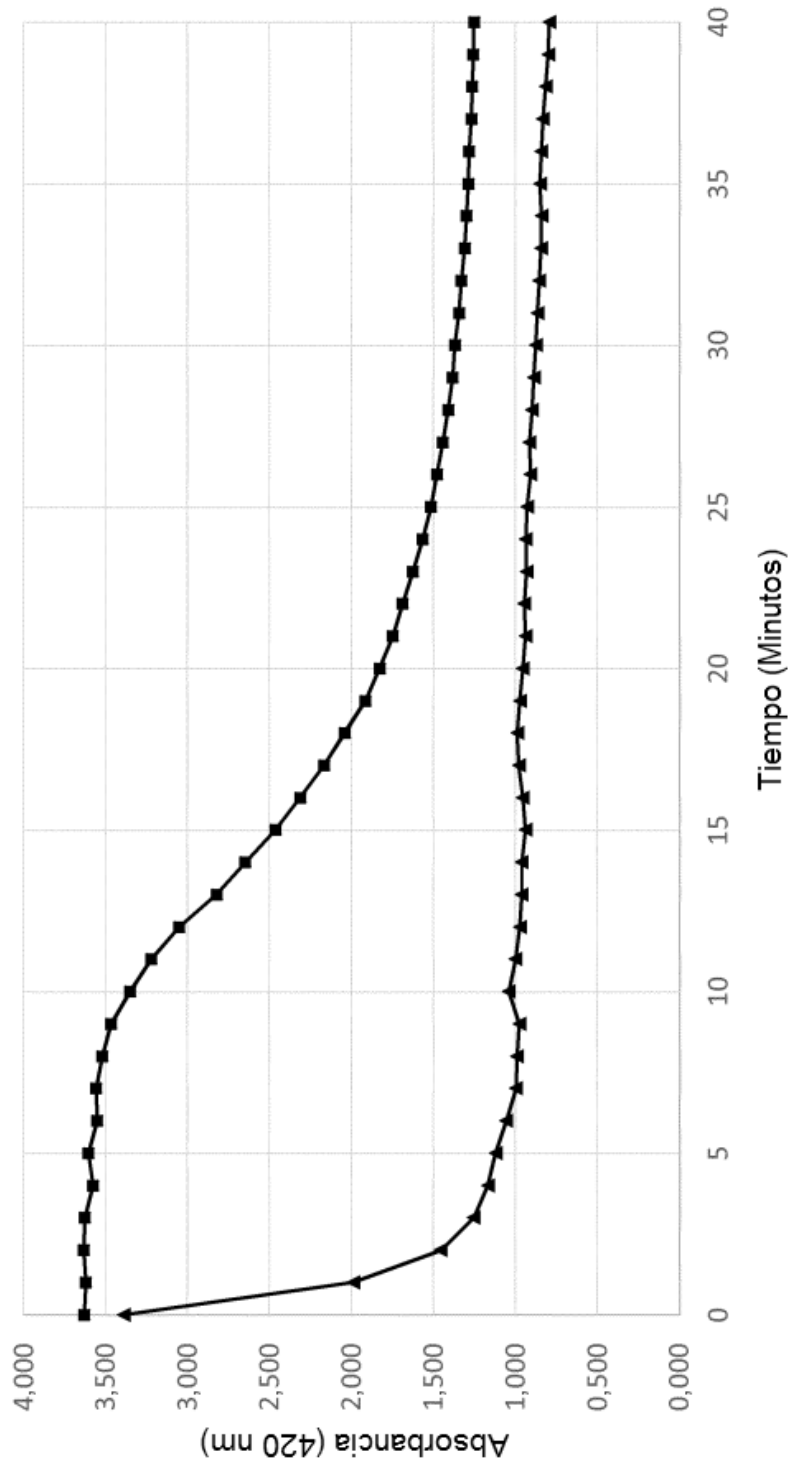


Figura 5

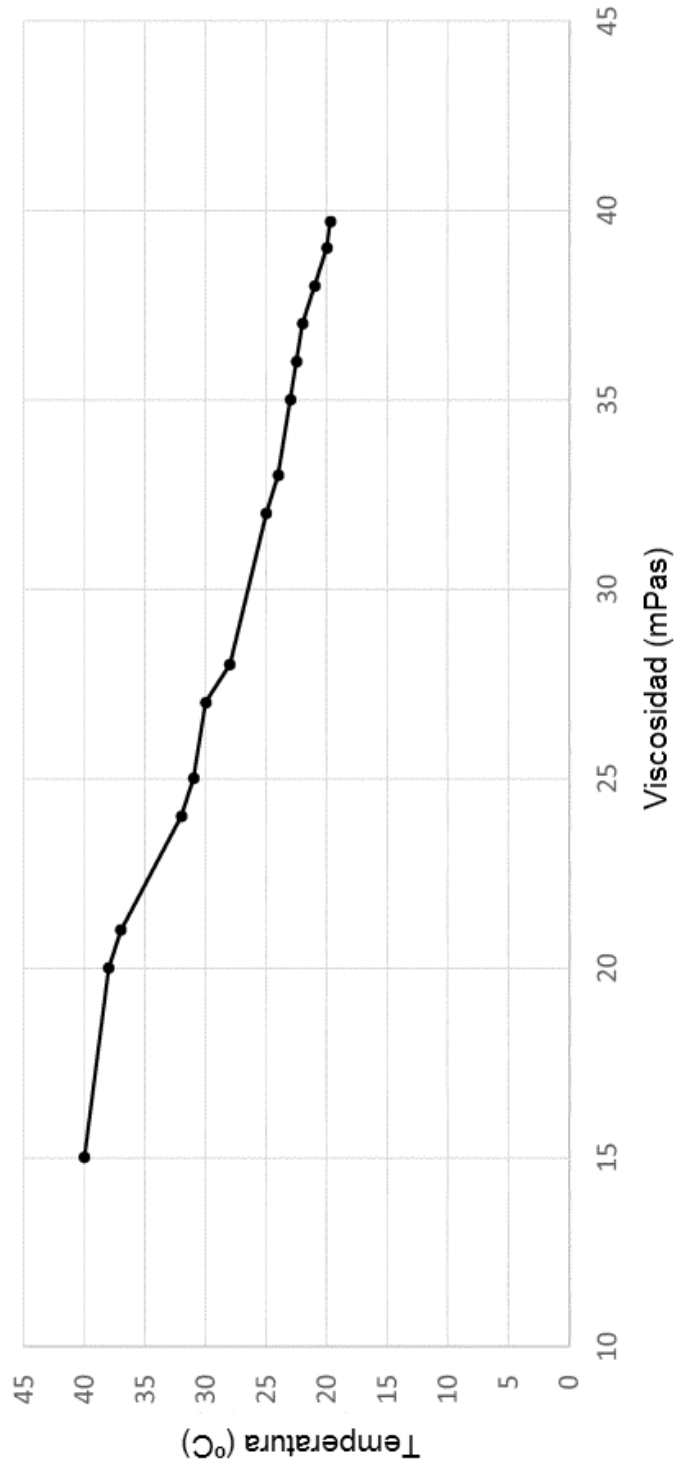


Figura 6