

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 991 863**

51 Int. Cl.:

A61K 9/127 (2006.01)
A61K 9/51 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 31/436 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
A61P 27/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.04.2017** **PCT/SG2017/050216**
87 Fecha y número de publicación internacional: **26.10.2017** **WO17184080**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.04.2017** **E 17786259 (6)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2024** **EP 3445334**

54 Título: **Nanoliposomas para la administración sostenida de tacrolimus para el tratamiento de enfermedades oculares del segmento anterior**

30 Prioridad:

19.04.2016 SG 10201603094P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.12.2024

73 Titular/es:

NANYANG TECHNOLOGICAL UNIVERSITY
(50.0%)
50 Nanyang Avenue
Singapore 639798, SG y
SINGAPORE HEALTH SERVICES PTE. LTD.
(50.0%)

72 Inventor/es:

VENKATRAMAN, SUBRAMANIAN;
NATARAJAN, JAYAGANESH V.;
BOEY, YIN CHIANG FREDDY;
MEHTA, JODHBIR SINGH;
HOWDEN, TINA TZEE LING;
NG, XU WEN y
NG, HERR CHEUN ANTHONY

74 Agente/Representante:

LLAGOSTERA SOTO, María Del Carmen

ES 2 991 863 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

Nanoliposomas para la administración sostenida de tacrolimus para el tratamiento de enfermedades oculares del segmento anterior

Referencia cruzada a la solicitud relacionada

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud de patente de Singapur n.º 10201603094P, presentada el 19 de abril de 2016.

Campo técnico

La presente descripción se refiere en general a un nanoliposoma para el uso en la profilaxis y/o en el tratamiento de enfermedades oculares del segmento anterior.

Antecedentes

Tacrolimus (también conocido como FK506 o FK-506) es un derivado del macrolactum con actividad inmunomoduladora y antiinflamatoria. El tacrolimus se ha utilizado en gotas para los ojos y las gotas para los ojos de tacrolimus tópico se han utilizado de forma rutinaria en la ciencia clínica para el tratamiento de diversas enfermedades oculares del segmento anterior. Generalmente, las gotas para los ojos de tacrolimus se pueden utilizar para tratar alergias estacionales (por ejemplo, conjuntivitis), enfermedades de la superficie ocular (por ejemplo, ojo seco), tratamiento postoperatorio de trabeculectomía y rechazo de injertos. Si bien el uso prolongado de las gotas para los ojos tiende a ser necesario para una mejor respuesta terapéutica, puede provocar complicaciones como por ejemplo efectos secundarios e incumplimiento por parte del paciente. Por ejemplo, algunos inconvenientes potenciales del uso de gotas para los ojos con demasiada frecuencia pueden ser una gestión subóptima de las afecciones o enfermedades anteriormente mencionadas y/o efectos secundarios graves como por ejemplo enrojecimiento permanente o daño a los vasos sanguíneos del ojo.

Con el fin de mitigar el uso prolongado o el abuso de las gotas para los ojos, es necesario desarrollar una estrategia de tratamiento alternativa que proporcione una liberación sostenida de tacrolimus. La estrategia de tratamiento también debe minimizar la administración invasiva y/o arriesgada (por ejemplo, inyección intravítrea) de tacrolimus.

El documento US 2002/013340 A1 describe un método para tratar enfermedades oculares por medio de proporcionar una cantidad efectiva de tacrolimus contenida en una formulación farmacéuticamente aceptable, por ejemplo en una solución acuosa que contenga tacrolimus unido a liposomas. La formulación se puede aplicar por inyección intraocular. Los liposomas pueden prepararse a partir de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) o fosfatidilcolina de yema de huevo (EggPC).

Sobre la base de lo anteriormente mencionado, existe por tanto la necesidad de proporcionar un medio de administración de fármacos que posea las ventajas anteriores y al mismo tiempo mejore uno o más de los inconvenientes mencionados anteriormente.

Resumen

Se describe el uso de un nanoliposoma en la fabricación de un fármaco para la profilaxis y/o el tratamiento de las enfermedades oculares del segmento anterior, en que el nanoliposoma incluye una pluralidad de lípidos insaturados y/o saturados que forman al menos una bicapa lipídica que encapsula un fármaco hidrófobo que incluye tacrolimus, y en que el fármaco hidrófobo y la pluralidad de lípidos insaturados y/o saturados tienen un coeficiente de peso de hasta 0.2.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un nanoliposoma para su utilización en la profilaxis y/o en el tratamiento de enfermedades oculares del segmento anterior, en que el nanoliposoma incluye una pluralidad de lípidos insaturados y/o saturados que forman al menos una bicapa lipídica que encapsula un fármaco hidrófobo que incluye tacrolimus, y en que el fármaco hidrófobo y la pluralidad de lípidos insaturados y saturados tienen una relación en peso de hasta 0,2, en que la pluralidad de lípidos saturados e insaturados (i) incluyen al menos un lípido insaturado que constituye más del 50% en peso del la al menos una bicapa lipídica y (ii) tienen el fármaco hidrófobo encapsulado en la al menos una bicapa lipídica, en que el nanoliposoma debe ser administrado por inyección subconjuntival y sostiene la liberación diaria del fármacohidrófobo durante al menos 2 semanas, tal como se mide por medio de un método de diálisis, y en que el al menos un lípido insaturado incluye fosfatidilcolina de yema de huevo (EggPC) y/o 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfolina (POPC), en que el método de diálisis incluye (i) colocar el nanoliposoma en una bolsa de diálisis, (ii) incubar la bolsa de diálisis suspendida en una solución tampón de fosfato a un pH de 7.4 y 37° C, y (iii) realizar un muestreo de una parte

de un medio de diálisis diariamente para cromatografía líquida de alta resolución con el fin de medir la cantidad del fármaco hidrófobo liberado.

Se describe un método para prevenir y/o tratar enfermedades oculares del segmento anterior mediante la administración de un nanoliposoma que comprende una pluralidad de lípidos insaturados y/o saturados que forman al menos una bicapa lipídica que encapsula un fármaco hidrófobo que incluye tacrolimus, en que el fármaco hidrófobo y la pluralidad de lípidos saturados y/o insaturados tienen una relación en peso de hasta 0,2.

Breve descripción de los dibujos

En los dibujos, los caracteres de referencia similares se refieren en general a partes similares en las diferentes vistas. Los dibujos no están necesariamente a escala, sino que generalmente se hace hincapié en ilustrar los principios de la invención. En la siguiente descripción, se describen diversas formas de realización de la presente descripción con referencia a los siguientes dibujos, en los que:

La FIG. 1 muestra un gráfico del porcentaje acumulado de liberación de tacrolimus (%) en relación con el tiempo (días). Este gráfico presenta un perfil de liberación de fármaco in vitro de liposomas de fosfatidilcolina de yema de huevo (EggPC) cargados con tacrolimus para tres muestras independientes (etiquetadas como A, B y C) elaboradas según las formas de realización descritas en el presente documento. Para cada muestra, se dializó 1 ml de liposomas frente a 40 ml de PBS con un pH de 7,4.

La FIG. 2 muestra un porcentaje acumulado de liberación de tacrolimus (%) en relación con el tiempo (días). Este gráfico presenta un perfil de liberación de fármaco in vitro de liposomas de 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC) cargados con tacrolimus para tres muestras independientes elaboradas de acuerdo con las formas de realización descritas en el presente documento. Para cada muestra, se dializó 1 ml de liposomas frente a 40 ml de PBS con un pH de 7,4. Cada punto de datos representa una lectura promedio de las tres muestras.

La FIG. 3 muestra el perfil de liberación de fármaco in vitro de liposomas de POPC cargados con tacrolimus para tres muestras independientes. La liberación masiva diaria (calculada) de tacrolimus (μg) se representó gráficamente en relación con el tiempo (días). Para cada muestra, se dializó 1 ml de liposomas frente a 40 ml de PBS con un pH de 7,4. En la FIG. 3 también se incluye el perfil de liberación de tacrolimus a base de gotas para los ojos representado por la línea plana continua. Cada punto de datos representa una lectura promedio de las tres muestras.

La FIG. 4 muestra una gráfica de liberación acumulada de tacrolimus (%) en relación con el tiempo (días). Este gráfico presenta un perfil de liberación de fármaco in vitro de liposomas de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) cargados con tacrolimus para tres muestras independientes (etiquetadas como E, F y G) elaboradas de acuerdo con las formas de realización descritas en el presente documento. Para cada muestra, se dializó 1 ml de liposomas frente a 40 ml de PBS con un pH de 7,4.

La FIG. 5 muestra una forma de realización ejemplar no limitativa del nanoliposoma tal como se describe en el presente documento. Específicamente, la FIG. 5 muestra que tacrolimus está encapsulado en la bicapa lipídica.

Descripción detallada

La siguiente descripción detallada se refiere a los dibujos adjuntos que muestran, a modo de ilustración, detalles específicos y formas de realización en las que se puede poner en práctica la invención. Estas formas de realización se describen con suficiente detalle para permitir a los expertos en la técnica poner en práctica la invención. Se pueden utilizar otras formas de realización y se pueden realizar cambios sin apartarse del alcance de la invención tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Las características que se describen en el contexto de una forma de realización pueden ser correspondientemente aplicables a características iguales o similares en las otras formas de realización. Las características que se describen en el contexto de una forma de realización pueden ser correspondientemente aplicables a las otras formas de realización, incluso si no se describen explícitamente en estas otras formas de realización. Además, las adiciones y/o combinaciones y/o alternativas tal como se describen para una característica en el contexto de una forma de realización pueden ser correspondientemente aplicables a la misma característica o a una característica similar en las otras formas de realización.

En la presente descripción, se han desarrollado nanoliposomas de liberación sostenida que encapsulan tacrolimus como una estrategia de tratamiento eficaz para diversas enfermedades oculares del segmento anterior. Los ejemplos no limitativos de dichas enfermedades pueden incluir afecciones inflamatorias en el segmento anterior del ojo (por ejemplo, conjuntivitis alérgica), problemas de la superficie ocular (por ejemplo, ojo seco) y afecciones asociadas con la falta de inmunosupresión (por ejemplo, postinjerto de córnea). Los

nanoliposomas de la presente descripción se pueden aplicar mediante un procedimiento menos arriesgado, como por ejemplo la inyección subconjuntival en lugar de la inyección intravítrea.

De manera ventajosa, al utilizar los nanoliposomas de liberación sostenida tal como se describe en el presente documento, se pueden evitar los problemas asociados con las estrategias de tratamiento clínico existentes que requieren el uso diario de gotas para los ojos de tacrolimus para una eficacia terapéutica prolongada. No sólo se evita la necesidad de aplicar gotas para los ojos dado que los nanoliposomas se pueden aplicar mediante inyección subconjuntival, sino que también es probable que los fármacos se liberen durante un período de tiempo más largo (por ejemplo, de días a meses) y, por lo tanto, la respuesta terapéutica se puede gestionar de forma más eficaz. Esto mejora drásticamente el cumplimiento del paciente y minimiza los posibles efectos secundarios que surgen de la aplicación frecuente de gotas para los ojos necesarias para detener la progresión de las enfermedades.

Teniendo en cuenta lo anterior, la presente descripción proporciona el uso de un nanoliposoma en la fabricación de un fármaco para la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedades oculares del segmento anterior. La presente descripción proporciona un nanoliposoma para el uso en la profilaxis y/o tratamiento de enfermedades oculares del segmento anterior. La presente descripción proporciona además un método para prevenir y/o tratar enfermedades oculares del segmento anterior mediante la administración de dicho nanoliposoma. Las formas de realización descritas en el contexto del nanoliposoma y sus usos son válidas de manera análoga para el método de tratamiento tal como se describe en el presente documento, y viceversa.

Antes de entrar en los detalles del nanoliposoma y sus usos, en primer lugar se analizan el método de tratamiento basado en dicho nanoliposoma y las diversas formas de realización, así como las definiciones de ciertos términos, expresiones o frases.

En el contexto de la presente descripción, el término "nanoliposoma" se refiere a un liposoma que tiene un tamaño de como máximo 200 nm.

En el contexto de la presente descripción, el término "hidrófobo" se refiere a materiales o sustancias que no son solubles y/o hinchables con agua. Por lo tanto, los materiales o sustancias "hidrófobos" tienden a ser inmiscibles con agua y/o tienden a mantener una fase distinta del agua. A este respecto, la frase "inmiscible" significa que los materiales o sustancias no se mezclan y/o tienden a separarse cuando se dejan reposar.

La expresión "hasta" cuando se utiliza con referencia a valores numéricos podrá entenderse como menor o igual a ese valor numérico. En otras palabras, esta expresión incluye el valor numérico al que se refiere. Por ejemplo, "hasta 0,2" cubriría instancias que pueden ser inferiores a 0,2 y instancias que son iguales a 0,2.

La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente", por ejemplo que una composición que está "sustancialmente libre" de Y pueda estar completamente libre de Y. Cuando sea necesario, la palabra "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la invención.

En el contexto de diversas formas de realización, los artículos "un", "una" y "el" o "la" tal como se utilizan con respecto a una característica o elemento incluyen una referencia a una o más de las características o elementos.

En el contexto de diversas formas de realización, el término "alrededor de" o "aproximadamente", aplicado a un valor numérico, abarca el valor exacto y una variación razonable.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "y/o" incluye cualquiera y todas las combinaciones de uno o más de los elementos enumerados asociados.

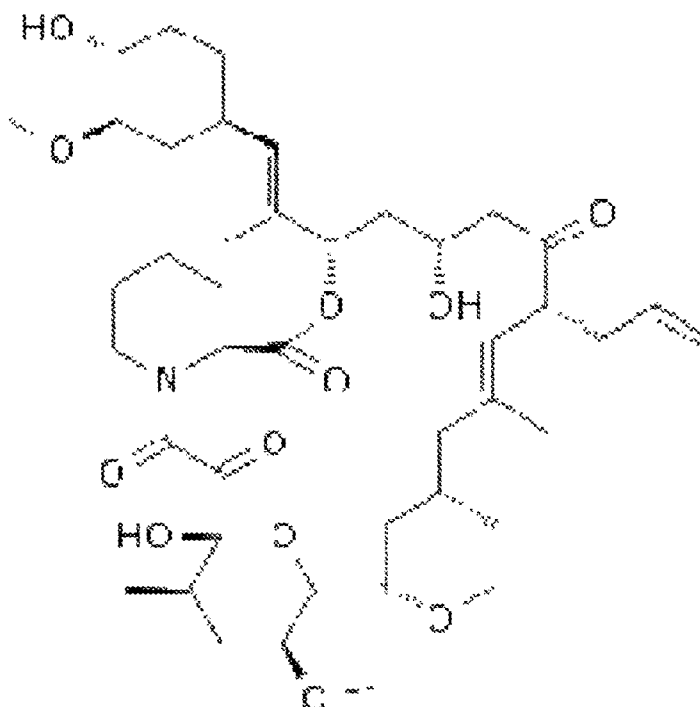
Tal como se utiliza en el presente documento, la frase de la forma de "al menos uno de A y B" puede incluir A o B o tanto A como B. De manera correspondiente, la frase de la forma de "al menos uno de A y B y C", o que incluye elementos listados adicionales, puede incluir cualquiera y todas las combinaciones de uno o más de los elementos listados asociados.

A menos que se especifique lo contrario, los términos "que comprende" y "comprende", y sus variantes gramaticales, pretenden representar un lenguaje "abierto" o "inclusivo" de modo que incluyan elementos mencionados pero también permitan la inclusión de elementos adicionales no mencionados. Al mismo tiempo, los términos "consistente en" y "que consiste en", y sus variantes gramaticales, pretenden representar un lenguaje "cercano" o "exclusivo" de modo que incluyan únicamente los elementos mencionados pero excluyan elementos adicionales no mencionados.

Una vez definidos los diversos términos, expresiones y frases, los detalles del presente nanoliposoma y sus usos, el método de tratamiento basado en dicho nanoliposoma y las diversas formas de realización se describen a continuación.

En la presente descripción, se describe el uso de un nanoliposoma en la fabricación de un fármaco para la profilaxis y/o tratamiento de enfermedades oculares del segmento anterior, en que el nanoliposoma comprende una pluralidad de lípidos insaturados y/o saturados que forman al menos una bicapa lípida que encapsula un fármaco hidrófobo que comprende tacrolimus, y en que el fármaco hidrófobo y la pluralidad de lípidos insaturados y/o saturados tienen una relación en peso de hasta 0,2.

El fármaco hidrófobo se puede cargar en el nanoliposoma hasta una concentración de 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,1 mg/ml o cualquier otra carga dentro de estos intervalos. Por lo tanto, el nanoliposoma puede tener una carga de fármaco de hasta 1 mg/ml de acuerdo con diversas formas de realización. El fármaco hidrófobo cargado puede ser una mezcla de uno o más fármacos hidrófobos. En algunos casos, el fármaco hidrófobo cargado puede comprender o consistir en tacrolimus. La estructura del tacrolimus se muestra a continuación.



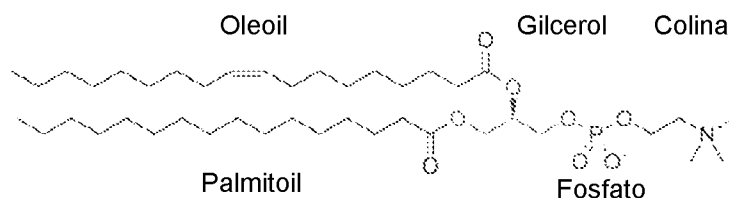
El fármaco hidrófobo puede estar encapsulado en el nanoliposoma. El nanoliposoma puede estar formado con al menos una bicapa lípida. La bicapa lípida puede comprender o consistir en una pluralidad de lípidos insaturados y/o saturados. Por consiguiente, el fármaco o fármacos hidrófobos pueden encapsularse en la bicapa lípida. Por ejemplo, el tacrolimus puede encapsularse entre las colas hidrófobas de los lípidos que forman la bicapa o cualquier otra ubicación dentro de la bicapa.

En diversas formas de realización, la pluralidad de lípidos insaturados y/o saturados se puede seleccionar a partir del grupo que consiste en fosfolípidos y esfingolípidos. En algunos casos, los lípidos insaturados pueden comprender o consistir en fosfolípidos y/o esfingolípidos. En otros casos, los lípidos saturados pueden comprender o consistir en fosfolípidos y/o esfingolípidos.

Las fosfolípidos se pueden seleccionar del grupo que consiste en fosfatidilcolina de yema de huevo (EggPC), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfolina (POPC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfolina (DOPC) y dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC). También se pueden usar otras fosfolípidos adecuadas para formar la al menos una bicapa del nanoliposoma. Al mismo tiempo, los esfingolípidos pueden incluir esfingomielinas, esfingosinas, ceramidas, etc.

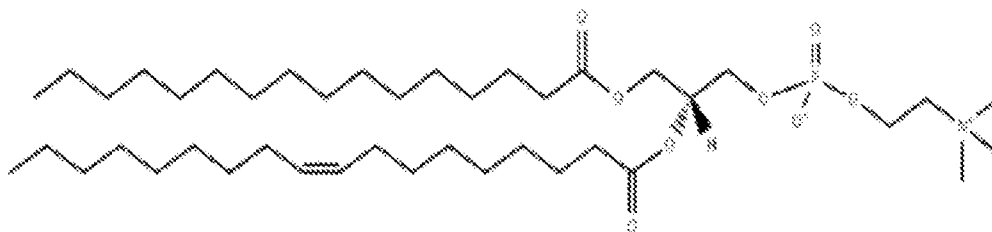
En formas de realización preferentes, la pluralidad de lípidos insaturados y/o saturados puede comprender o consistir en al menos un lípido insaturado que constituye más del 50 % en peso de la al menos una bicapa lípida.

Los nanoliposomas que muestran una mejor liberación sostenida de fármaco(s) hidrófobo(s) (por ejemplo, tacrolimus) durante períodos prolongados (por ejemplo, varios días), pueden tener preferiblemente una cola de lípidos insaturados unida a una "cabeza" de PC como constituyente principal. La "cabeza" de PC puede entenderse como una fosfatidilcolina (PC) que incorpora colina como grupo de cabeza. De acuerdo con formas de realización preferentes, el al menos un lípido insaturado que constituye más del 50 % en peso de la al menos una bicapa lipídica puede estar compuesto de una fosfatidilcolina (PC) que incorpora colina como grupo principal. La estructura de un lípido insaturado ejemplar no limitativo que tiene un grupo colina (por ejemplo POPC) se muestra a continuación.

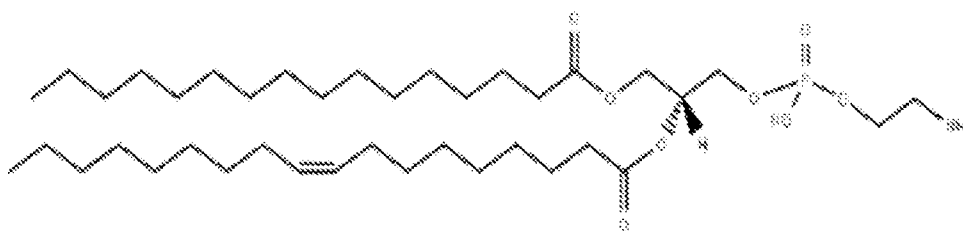


EggPC, tal como se utiliza en diversas formas de realización descritas en el presente documento, normalmente puede contener aproximadamente más del 50 % en peso o incluso aproximadamente el 95 % en peso de POPC y/u otras PC con colas insaturadas, junto con aproximadamente el 50 % en peso o menos, o incluso aproximadamente el 5 % en peso de esfingomielina que tiene una cola insaturada. A continuación se muestran las estructuras de algunos de los componentes principales posiblemente presentes en EggPC.

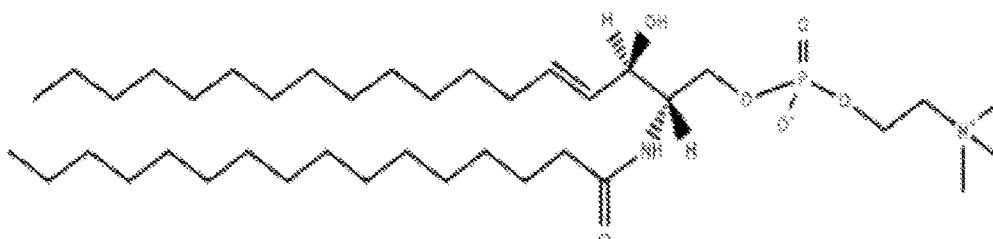
1-almitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC):



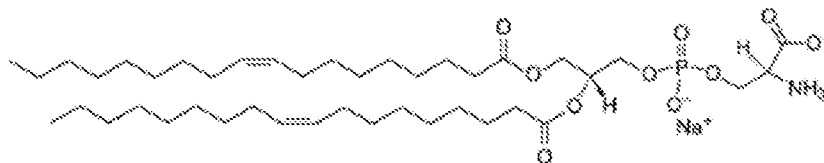
Fosfatidiletanolamina (PE):



Esfingomielina:

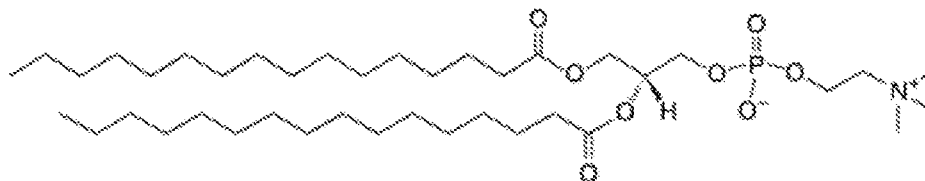


1,2 -dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC o dioleil):



5

Dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC):



10 A pesar de los diversos lípidos ilustrados, el perfil de liberación de fármacos de los nanoliposomas que consisten
en lípidos completamente saturados puede no ser ideal. Por lo tanto, los lípidos usados para formar
nanoliposomas pueden contener preferiblemente lípido(s) insaturado(s) o una mezcla de lípidos que tiene al
menos un lípido insaturado como componente principal. Los lípidos insaturados preferentes pueden incluir, pero
no se limitan a, POPC, DOPC, esfingolípidos, etc. Al mismo tiempo, los lípidos saturados pueden formar los
15 componentes menores del nanoliposoma. Es decir, los lípidos saturados en el nanoliposoma pueden estar
presentes en aproximadamente un 50 % en peso o menos del 50 % en peso.

Dependiendo del tipo de lípidos insaturados y/o saturados utilizados, el nanoliposoma puede tener diferentes
tamaños. El tamaño del nanoliposoma puede cambiar de manera insignificante después del almacenamiento.

20

En diversas formas de realización, el nanoliposoma puede tener un tamaño promedio de 80 nm a 150 nm, 85 nm
a 110 nm, 85 nm a 105 nm, 85 nm a 100 nm, 90 nm a 115 nm, 90 nm a 100 nm, 90 nm a 95 nm, o cualquier otro
tamaño promedio que se encuentre dentro de estos intervalos especificados. Pueden ser posibles otros tamaños
dependiendo de los lípidos utilizados. El nanoliposoma puede tener un tamaño que se encuentre dentro de estos
25 intervalos antes del almacenamiento, con o sin fármaco cargado. En diversos casos, los nanoliposomas pueden
tener cualquiera de estos tamaños promedio antes del almacenamiento a 4°C. Por ejemplo, los nanoliposomas
de EggPC pueden tener 89,64 nm $\pm$ 0,78 nm antes del almacenamiento (por ejemplo, almacenamiento a 4 °C).
En otro ejemplo, los nanoliposomas de DPPC pueden tener 106,37 nm $\pm$ 1,00 nm antes del almacenamiento (por
ejemplo, almacenamiento a 4 °C).

30

En varias otras formas de realización, los nanoliposomas pueden tener un tamaño promedio de 90 nm a 120 nm,
de 90 nm a 110 nm, de 90 nm a 100 nm, de 100 nm a 120 nm, de 110 nm a 120 o cualquier otro tamaño
promedio dentro de estos intervalos especificados después del almacenamiento. Pueden ser posibles otros
tamaños dependiendo de los lípidos utilizados. El nanoliposoma puede tener un tamaño que se encuentre dentro
35 de estos intervalos después del almacenamiento, con o sin fármaco cargado. En varios casos, los
nanoliposomas pueden tener cualquiera de estos tamaños promedio después de almacenarse (por ejemplo, a
4°C) durante un período determinado (días o meses). Por ejemplo, los nanoliposomas de EggPC pueden tener
90,67 nm $\pm$ 0,49 nm después del almacenamiento (por ejemplo, a 4 °C). En otro ejemplo, los nanoliposomas de
DPPC pueden tener 112,8 nm $\pm$ 1,05 nm después del almacenamiento (por ejemplo, a 4°C).

40

De acuerdo con el cambio de tamaño antes y después del almacenamiento (por ejemplo, a 4 °C), los
nanoliposomas pueden almacenarse de forma ventajosa durante períodos de tiempo prolongados, incluso con el
fármaco cargado, sin que se comprometa su integridad estructural y del fármaco. En varios casos, el tamaño de
un nanoliposoma puede referirse a su diámetro.

45

Además del tamaño, el tipo de lípidos utilizados puede influir en el índice de polidispersidad del nanoliposoma. La
polidispersidad del nanoliposoma puede cambiar de manera insignificante después del almacenamiento.

50

En diversas formas de realización, el nanoliposoma puede tener un índice de polidispersidad inferior a 0,3, 0,2 o
incluso 0,1 antes y después del almacenamiento. Puede ser posible otro índice de polidispersidad de acuerdo
con el tipo de lípidos utilizados. En algunos casos, los nanoliposomas de EggPC pueden tener un índice de
polidispersidad de 0,052 $\pm$ 0,018 antes del almacenamiento, mientras que los nanoliposomas de DPPC pueden
tener un índice de polidispersidad de 0,28 $\pm$ 0,016 antes del almacenamiento. Después del almacenamiento (por
ejemplo, a 4°C), los nanoliposomas de EggPC pueden tener un índice de polidispersidad de 0,014 $\pm$ 0,007,

mientras que los nanoliposomas de DPPC pueden tener un índice de polidispersidad de $0,218 \pm 0,036$ según diversos casos. Basándose en el índice de polidispersidad antes y después del almacenamiento (por ejemplo, a 4°C), esto demuestra nuevamente que los presentes nanoliposomas pueden almacenarse durante periodos de tiempo prolongados, incluso con el fármaco cargado, sin comprometer la integridad del nanoliposoma y el fármaco.

De acuerdo con diversas formas de realización, el nanoliposoma tal como se ha descrito anteriormente puede ser una vesícula multilaminar o una vesícula unilaminar.

Tal como se ha mencionado anteriormente, la presente descripción se refiere a un nanoliposoma para uso en la profilaxis y/o tratamiento de enfermedades oculares del segmento anterior, en donde el nanoliposoma comprende una pluralidad de lípidos insaturados y saturados que forman al menos una bicapa lipídica, en que cada uno de ellos encapsula un fármaco hidrófobo que comprende tacrolimus, y en que el fármaco hidrófobo y la pluralidad de lípidos saturados e insaturados tienen una relación en peso de hasta 0,2. Las formas de realización relacionadas con el nanoliposoma se han descrito anteriormente y se reiteran a continuación.

El nanoliposoma tiene una carga de fármaco de hasta 1 mg/ml. El fármaco hidrófobo puede ser una mezcla de uno o más fármacos hidrófobos. El fármaco hidrófobo comprende o consiste en tacrolimus.

El fármaco hidrófobo está encapsulado en el nanoliposoma, en el que el nanoliposoma tiene al menos una bicapa lipídica formada a partir de la pluralidad de lípidos insaturados y saturados. Por consiguiente, el fármaco o fármacos hidrófobos están encapsulados en la bicapa lipídica. Por ejemplo, el tacrolimus puede encapsularse entre las colas hidrófobas de los lípidos que forman la bicapa o cualquier otro lugar dentro de la bicapa.

La pluralidad de lípidos insaturados y saturados se puede seleccionar del grupo que consiste en fosfocolinas y esfingolípidos. Las fosfocolinas se pueden seleccionar del grupo que consiste en fosfatidilcolina de yema de huevo (EggPC), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC) y dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC). Los componentes de EggPC se han descrito anteriormente. Se pueden usar otras fosfocolinas adecuadas para formar la al menos una bicapa del nanoliposoma. Por su parte, los esfingolípidos pueden incluir esfingomielinas, esfingosinas, ceramidas, etc.

La pluralidad de lípidos insaturados y/o saturados comprende o consiste en al menos un lípido insaturado que constituye más del 50 % en peso de la al menos una bicapa lipídica.

Las formas de realización preferentes de nanoliposomas que muestran una mejor liberación sostenida de fármaco(s) hidrófobo(s) (por ejemplo, tacrolimus) durante periodos prolongados (por ejemplo, varios días) pueden comprender o consistir en una cola de lípidos insaturados unida a una "cabeza" de PC como constituyente principal. Ello significa que el al menos un lípido insaturado que constituye más del 50% en peso de la al menos una bicapa lipídica puede estar compuesto de una fosfatidilcolina (PC) que incorpora colina como grupo principal.

En función del tipo de lípidos saturados o insaturados utilizados, el nanoliposoma puede tener diferentes tamaños antes o después del almacenamiento. El tamaño del nanoliposoma puede cambiar de manera insignificante después del almacenamiento.

El nanoliposoma tiene un tamaño promedio de 80 nm a 150 nm, antes del almacenamiento (por ejemplo, a 4°C).

El nanoliposoma tiene un tamaño promedio de 90 nm a 120 nm después del almacenamiento (por ejemplo, a 4°C).

Tal como se ha explicado anteriormente, el tipo de lípidos utilizados puede influir en el índice de polidispersidad del nanoliposoma. La polidispersidad del nanoliposoma puede cambiar de manera insignificante después del almacenamiento. En diversas formas de realización, el nanoliposoma tiene un índice de polidispersidad inferior a 0,3, antes y después del almacenamiento.

El nanoliposoma es una vesícula multilaminar o una vesícula unilaminar.

Tal como se ha mencionado anteriormente, la presente descripción se refiere además a un método para prevenir y/o tratar enfermedades oculares del segmento anterior mediante la administración de un nanoliposoma que comprende una pluralidad de lípidos insaturados y/o saturados que forman al menos una bicapa lipídica que encapsula un fármaco hidrófobo que comprende tacrolimus, en el que el fármaco hidrófobo y la pluralidad de lípidos saturados y/o insaturados tienen una relación en peso de hasta 0,2.

El presente método resulta ventajoso ya que mitiga el riesgo de inyección intravítrea dado que el presente nanoliposoma puede administrarse mediante un procedimiento menos arriesgado de inyección subconjuntival.

De manera ventajosa, la inyección subconjuntival es capaz de mantener la liberación de los fármacos hidrófobos del presente nanoliposoma, lo que a continuación evita la necesidad de una administración tópica frecuente de gotas para los ojos de tacrolimus y evita así los efectos secundarios de la administración tópica frecuente de gotas para los ojos. Las formas de realización tal como se han descrito anteriormente con respecto al nanoliposoma y sus usos son aplicables al presente método de tratamiento de enfermedades oculares del segmento anterior.

En diversas formas de realización, el nanoliposoma administrado puede tener una carga de fármaco de hasta 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,1 mg/ml o cualquier otra carga dentro de estos intervalos. El fármaco hidrófobo puede ser una mezcla de uno o más fármacos hidrófobos. El fármaco hidrófobo puede comprender o consistir en tacrolimus.

El fármaco hidrófobo puede estar encapsulado en el nanoliposoma, en el que el nanoliposoma tiene al menos una bicapa lipídica del nanoliposoma en la que el fármaco hidrófobo (por ejemplo, tacrolimus) está encapsulado tal como se ha descrito anteriormente.

La pluralidad de lípidos insaturados y/o saturados del nanoliposoma administrado se pueden seleccionar del grupo que consiste en fosfolípidos y esfingolípidos. Las fosfolípidos se pueden seleccionar del grupo que consiste en fosfatidilcolina de yema de huevo (EggPC), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfolípidos (POPC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfolípidos (DOPC) y dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC). Los componentes de EggPC se han descrito anteriormente. Se pueden utilizar otras fosfolípidos adecuadas para formar la al menos una bicapa lipídica del nanoliposoma. Por su parte, los esfingolípidos pueden incluir esfingomielinas, esfingosinas, ceramidas, etc.

En formas de realización preferentes, la pluralidad de lípidos insaturados y/o saturados puede comprender o consistir en al menos un lípido insaturado que constituye más del 50 % en peso de la al menos una bicapa lipídica.

Tal como se ha descrito anteriormente, los nanoliposomas de formas de realización preferentes muestran una mejor liberación sostenida de fármaco(s) hidrófobo(s) (por ejemplo, tacrolimus) durante periodos prolongados (por ejemplo, varios días) cuando poseen una cola de lípidos insaturados unida a una "cabeza" de PC como constituyente principal. En otras palabras, el al menos un lípido insaturado que constituye más del 50% en peso de la al menos una bicapa lipídica puede estar compuesto de una fosfatidilcolina (PC) que incorpora colina como grupo de cabeza.

Dependiendo del tipo de lípidos saturados o insaturados utilizados, el nanoliposoma administrado puede tener diferentes tamaños antes o después del almacenamiento. El tamaño del nanoliposoma puede cambiar de manera insignificante después del almacenamiento.

El nanoliposoma administrado puede tener un tamaño promedio de 80 nm a 150 nm, de 85 nm a 110 nm antes del almacenamiento (por ejemplo, almacenamiento a 4°C). Anteriormente se han descrito formas de realización relativas a otros tamaños o intervalos de tamaños antes del almacenamiento. También se describen anteriormente formas de realización no limitativas basadas en liposomas de EggPC y DPPC.

El nanoliposoma administrado puede tener un tamaño promedio de 90 nm a 120 nm después del almacenamiento (por ejemplo, a 4°C). Anteriormente se han descrito formas de realización relativas a otros tamaños o intervalos de tamaños después del almacenamiento (por ejemplo, a 4° C). También se han descrito anteriormente formas de realización no limitativas basadas en liposomas de EggPC y DPPC.

Tal como se ha descrito anteriormente, el tipo de lípidos utilizados puede influir en el índice de polidispersidad del nanoliposoma que se va a administrar. La polidispersidad del nanoliposoma puede cambiar de manera insignificante después del almacenamiento. En diversas formas de realización, el nanoliposoma administrado puede tener un índice de polidispersidad inferior a 0,3, 0,2 o incluso 0,1 antes y después del almacenamiento. Anteriormente se han descrito formas de realización no limitativas basadas en nanoliposomas de EggPC y nanoliposomas de DPPC antes y después del almacenamiento.

El nanoliposoma administrado puede ser una vesícula multilaminar o una vesícula unilaminar de acuerdo con diversas formas de realización tal como se ha descrito anteriormente.

En todas las formas de realización descritas en el presente documento, las enfermedades oculares del segmento anterior pueden referirse a enfermedades inflamatorias oculares, enfermedades de la superficie ocular y enfermedades o trastornos asociados con la falta de inmunosupresión (por ejemplo, rechazo de injerto ocular).

En resumen, la presente descripción se refiere a nanoliposomas para su utilización en la administración de tacrolimus para tratar diversas enfermedades o trastornos inflamatorios del ojo, enfermedades de la superficie ocular y en inmunosupresión para prevenir el rechazo de injertos oculares (por ejemplo, posinjerto de córnea).

Los nanoliposomas se pueden preparar a partir de lípidos como por ejemplo, pero sin limitarse a, fosfolípidos y esfingolípidos. Más específicamente, los nanoliposomas que contienen tacrolimus en las concentraciones de carga deseadas pueden prepararse mediante técnicas de carga pasiva.

De manera ventajosa, los nanoliposomas cargados con fármaco se pueden aplicar mediante inyecciones subconjuntivales y pueden sostener la liberación de fármacos durante un período prolongado (de días a meses). Ello mejora drásticamente el cumplimiento del paciente a la vez que minimiza los efectos secundarios asociados con las instilaciones tópicas frecuentes (por ejemplo, gotas para los ojos) con el fin de detener la progresión de las enfermedades.

Se puede hacer referencia a los nanoliposomas como una composición de materia liposomal que comprende o consiste en lípidos saturados y/o insaturados. La carga de fármaco encapsulado en cada uno de los liposomas puede ser de hasta 1 mg/ml y la relación en peso de fármaco/lípido puede ser de hasta 0,2. Esta composición sostiene de manera ventajosa la liberación de tacrolimus más allá de dos semanas.

Si bien los métodos descritos anteriormente se ilustran y describen como una serie de pasos o eventos, se apreciará que cualquier orden de dichos pasos o eventos no debe interpretarse en un sentido limitativo. Por ejemplo, algunos pasos pueden ocurrir en diferentes órdenes y/o simultáneamente con otros pasos o eventos aparte de los ilustrados y/o descritos en el presente documento. Además, es posible que no se requieran todos los pasos ilustrados para implementar una o más de las formas de realización descritas en el presente documento. Asimismo, uno o más de los pasos descritos en el presente documento se pueden llevar a cabo en uno o más actos y/o fases separados.

Ejemplos

La presente invención se refiere a nanoliposomas para la administración y/o liberación sostenida de tacrolimus para el tratamiento de enfermedades oculares. De acuerdo con los ejemplos que se describen a continuación, se lograron altas concentraciones de carga de tacrolimus en nanoliposomas utilizando una técnica de carga pasiva. Además, se logró una liberación controlada y sostenida de tacrolimus de los nanoliposomas en una diálisis in vitro. Los ejemplos demostraron que la liberación del fármaco se sostuvo más allá de dos semanas de acuerdo con la diálisis in vitro.

Además, los ejemplos siguientes ejemplifican la encapsulación de tacrolimus en altas concentraciones de carga en los nanoliposomas, en que se logra una proporción en peso de fármaco/lípido (D/L) deseablemente alta de hasta 0,2 para liposomas tanto no saturados como saturados. Cuando la relación D/L excede 0,2, la eficiencia de encapsulación del fármaco disminuye, lo que tiene como resultado la pérdida de fármacos de los nanoliposomas. En la FIG. 5 se muestra un ejemplo de cómo el tacrolimus se encapsula en nanoliposoma.

Ejemplo 1: Preparación de liposomas cargados con tacrolimus

Los lípidos se pesaron y se colocaron en un desecador de vacío durante 1 hora para eliminar la humedad residual antes de pesarlos. El fármaco, tacrolimus, también se desecó antes de pesarlo. Cada lote de liposomas se preparó en 5 ml, con una concentración lipídica inicial de 18 milimolar (mM).

A continuación, los lípidos pesados y el fármaco se mezclaron en un matraz de fondo redondo y se disolvieron en una mezcla de fase orgánica que contenía metanol y cloroformo en una proporción de 1:2. Seguidamente se mantuvo el matraz en un baño de agua a una temperatura de 40°C y se hizo girar en un operador rotatorio bajo presión reducida durante 1 hora para eliminar la fase orgánica, dejando finalmente una fina película lipídica cargada con fármaco que cubría el fondo del matraz. A la fina película lipídica se le añadieron 5 ml de solución tampón de fosfato (PBS de pH 7,4) para formar instantáneamente vesículas multilaminares cargadas de fármaco (MLV).

Los tamaños de los liposomas (MLV) se redujeron mediante extrusión a través de membranas de filtro de policarbonato en la secuencia de tamaño correspondiente de 0,2 µm (5 veces) y 0,08 µm (10 veces) utilizando una extrusora de mesa adquirida en Northern Lipids Inc, Canadá. Después de estos pasos de extrusión, se formaron grandes vesículas unilamelares (LUV) cargadas con el fármaco con una distribución de tamaño de aproximadamente 100 ± 20 nm.

Ejemplo 2: Mediciones del coeficiente de partición

Los fármacos hidrófobos, como por ejemplo el tacrolimus, se distribuyen entre la bicapa lipídica y la fase continua del tampón de acuerdo con la solubilidad de los fármacos. El coeficiente de partición se calculó basándose en la relación de concentraciones medidas entre estas dos fases. Los valores del coeficiente de partición se estimaron a partir de los MLV antes del paso de extrusión.

Brevemente, las MLV en tubos de microcentrífuga se centrifugaron a 13000 rotaciones por minuto (rpm) o 16249 de fuerza centrífuga relativa (rcf) durante media hora. Fue posible una clara separación del sedimento lípido del sobrenadante gracias a las vesículas de tamaño micrométrico. El sobrenadante era visualmente claro y esto

La cantidad total de fármaco(s) en las MLV y la cantidad de fármaco(s) en el sobrenadante se estimaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se calculó una cantidad de fármaco(s) en fase continua (tampón) a partir del fármaco medido en el sobrenadante. La cantidad de fármaco dividida en la bicapa se calcula restando el fármaco medido en el sobrenadante de la cantidad total de fármaco. A continuación se estimó el coeficiente de partición del fármaco (P.C.) en MLV utilizando la siguiente expresión que se proporciona a continuación.

$$P.C. = \frac{\text{Cantidad total de fármaco} - \text{cantidad de fármaco en el tampón}}{\text{Cantidad de fármaco en el tampón}}$$

Ejemplo 3: Medición de la concentración de fármaco atrapado

En general, las diversas muestras de liposomas se rompieron con alcohol isopropílico (IPA) en una proporción de volumen de 1:5 (liposoma:IPA) y a continuación se diluyeron con PBS de pH 7,4. Se utilizó el método HPLC para medir la concentración de fármaco de los liposomas teniendo en cuenta el factor de dilución y comparándolo con el estándar de tacrolimus en PBS de pH 7,4.

Ejemplo 4: Estudio de liberación de fármaco in vitro y liberación real de fármaco por día

Se utilizó un método de diálisis para evaluar la liberación de tacrolimus a partir de nanoportadores liposomales. En los ejemplos, el medio receptor se separó físicamente de los liposomas cargados con el fármaco mediante una membrana de diálisis. La concentración del fármaco liberado se evaluó a partir del medio receptor a lo largo del tiempo mediante HPLC. Para este ejemplo, se introdujeron 1 ml de liposomas cargados con fármaco en una bolsa de diálisis de éster de celulosa (con un corte de peso molecular (MWCO) de 100 kD) y se sujetaron con clips de diálisis en ambos extremos. Se midieron 40 ml de tampón PBS a un pH de 7,4 (NaCl 137 mM, KCl 2,68 mM, KH₂PO₄ 1,76 mM, Na₂HPO₄ 10,14 mM) y se tomaron en una botella de color ámbar. Las bolsas de diálisis se suspendieron en tampón PBS y se colocaron en una incubadora a una temperatura de 37°C. Se tomaron muestras de 2 ml de medio de diálisis cada día y se repuso diariamente todo el medio PBS. La cantidad de fármaco(s) liberado(s) a lo largo del tiempo se midió mediante HPLC y se presentó como un porcentaje de liberación acumulativo representado en función del tiempo.

Ejemplo 5: Caracterización de liposomas cargados con fármaco: estudios de estabilidad de tamaño

El tamaño medio así como la distribución de tamaños (índice de polidispersidad) de los liposomas se caracterizaron utilizando Malvern Zetasizer Nano ZS. Los tamaños de partículas se midieron después de la preparación y se monitorearon continuamente durante el almacenamiento (4°C).

Ejemplo 6a: Resultados - Estabilidad del tamaño in vitro de tacrolimus en liposomas insaturados (liposomas de EggPC)

Los liposomas insaturados se basaron en liposomas de fosfatidilcolina de yema de huevo (EggPC). EggPC contiene, pero sin quedar limitado a, POPC, fosfatidiletanolamina, DPPC, DOPC y esfingomielinas, etc. Los liposomas de EggPC tienen una relación en peso D/L de 0,2 con una concentración de carga de fármaco (tacrolimus) de 1 mg/ml. La concentración de carga puede depender de lo que se requiere para administrar cantidades diarias adecuadas durante varios días.

Los cambios en el tamaño de los liposomas en el momento de y durante el almacenamiento se monitorearon continuamente con Zetasizer (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido). Tal como se muestra en la Tabla 1 a continuación, se encontró que los liposomas de EggPC cargados con tacrolimus eran estables durante al menos un mes en almacenamiento a 4°C y se encontró que el tamaño promedio (Z_{avg}) de los liposomas era de aproximadamente 90 nm con un índice de polidispersidad estrecho (PDI) inferior a 0,1.

Tabla 1 - Medidas de tamaño de liposomas de EggPC cargados con tacrolimus inmediatamente después de la extrusión y un mes después del almacenamiento a 4°C.

EggPC/Tacrolimus LUV		
Relación de peso D/L de 0.2		
Concentración inicial de fármaco de 1 mg/ml		
Días	Tamaño de Z_{avg} – Zeta (promedio) (nm)	PDI
0	89.64 ± 0.78	0.052 ± 0.018
30	90.67 ± 0.49	0.014 ± 0.007

5

Ejemplo 6b: Resultados - Estudio de liberación de fármaco in vitro de tacrolimus en liposomas insaturados (liposomas de EggPC)

10 La liberación de tacrolimus de los liposomas de EggPC se evaluó mediante una técnica de diálisis y se expresó en términos de liberación acumulada del fármaco (%) a lo largo del tiempo tal como se muestra en la FIG. 1. En la Fig. 1, se muestran los estudios de liberación del fármaco in vitro (1 ml de liposomas dializados en relación con 40 ml de PBS con pH de 7,4) para tres muestras independientes de liposomas de EggPC cargados con tacrolimus tal como se llevaron a cabo. Las tres muestras tenían la misma carga de fármaco y relación D/L.

15

La liberación de tacrolimus de los liposomas se mantuvo más allá de dos semanas in vitro (aproximadamente 60%), si bien se observó una liberación rápida en los primeros días.

20 Ejemplo 6c: Resultados - Estudio de liberación de fármaco in vitro de tacrolimus en liposomas insaturados (liposomas de POPC)

25 Los liposomas insaturados en este ejemplo se basaron en 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfolina (POPC). La liberación de tacrolimus de estos liposomas se evaluó mediante la técnica de diálisis tal como se ha descrito anteriormente y se expresó en términos de liberación acumulada de fármaco (%) a lo largo del tiempo tal como se muestra en la FIG. 2. En la Fig. 2, se muestran los estudios de liberación de fármaco in vitro para tres muestras independientes de liposomas de POPC cargados con tacrolimus (1 ml de liposomas dializados por 40 ml de PBS con pH de 7,4) tal como se llevaron a cabo. A continuación se representó gráficamente el porcentaje acumulado de liberación de tacrolimus en relación con el tiempo (días). La liberación casi completa de tacrolimus del POPC se mantuvo durante 42 días in vitro, observándose un estallido suprimido en los primeros días. Las concentraciones de carga de fármaco y las relaciones D/L para los liposomas de POPC son las mismas que las de EggPC.

30

35 En la FIG. 3 se muestra una comparación de perfiles de liberación de tacrolimus entre gota(s) para los ojos de tacrolimus y liposoma de POPC de tacrolimus. En la FIG. 3, se muestran los estudios de liberación de fármaco in vitro para tres muestras independientes de liposomas de POPC cargados con tacrolimus (1 ml de liposomas dializados frente a 40 ml de PBS con pH 7,4) tal como se llevaron a cabo. El perfil de liberación masiva diaria (calculada) de tacrolimus se representó en relación con el tiempo (días) tal como se muestra en la FIG. 3. En la FIG. 3 también se incluye el perfil de liberación de tacrolimus a base de colirio tal como se representa por medio de la línea sólida y continua.

40

45 En comparación con el régimen o los regímenes convencionales para gotas de tacrolimus para los ojos en los que se necesita una tasa de liberación diaria de 0,72 µg/día (representada como una línea plana continua en la Figura 3), se puede observar que la liberación de tacrolimus in vitro a partir de los liposomas de la presente descripción cumple o incluso supera el objetivo de liberación convencional durante toda la duración de la liberación sostenida. De acuerdo con estos resultados, los presentes liposomas no sólo evitan los problemas asociados con las gotas de tacrolimus para los ojos, sino que también proporcionan una duración mejorada de la administración sostenida del fármaco.

Ejemplo 7a: Resultados - Estabilidad del tamaño in vitro de tacrolimus en liposomas saturados (liposomas de DPPC)

Los liposomas saturados se basaron en liposomas de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) preparados de acuerdo con el ejemplo 1. Los liposomas de DPPC tienen una relación en peso D/L de 0,2 con una concentración de carga del fármaco (tacrolimus) de 1 mg/ml. Tal como se muestra en la Tabla 2 a continuación, los liposomas de DPPC cargados con fármaco tuvieron un tamaño estable durante al menos 1 mes de almacenamiento a 4°C.

Tabla 2 - Mediciones de tamaño de liposomas de DPPC cargados con tacrolimus inmediatamente después de la extrusión y un mes después del almacenamiento a 4°C.

DPPC/Tacrolimus LUV		
Relación de peso D/L de 0.2		
Concentración inicial de fármaco de 1 mg/ml		
Días	Tamaño de Z_{avg} - Zeta (promedio) (nm)	PDI
0	106.37 ± 1.00	0.28 ± 0.016
30	112.8 ± 1.05	0.218 ± 0.036

A partir de la Tabla 2, se encontró que el tamaño promedio (Z_{avg}) de los liposomas era de aproximadamente 110 nm con un índice de polidispersidad (PDI) estrecho de menos de 0,3.

Ejemplo 7b: Resultados - Estudio de liberación de fármaco in vitro de tacrolimus en liposomas saturados (liposomas de DPPC)

La liberación de tacrolimus de los liposomas de DPPC se evaluó mediante la técnica de diálisis tal como se ha descrito anteriormente y se expresó en términos de liberación acumulada de fármaco (%) a lo largo del tiempo tal como se muestra en la FIG. 4. En la FIG. 4, se muestran los estudios de liberación de fármaco in vitro (1 ml de liposomas dializados por 40 ml de PBS con pH de 7,4) para tres muestras independientes de liposomas de DPPC cargados con tacrolimus tal como se llevaron a cabo. La liberación acumulada de tacrolimus (%) se representó gráficamente en relación con el tiempo (días). Para cada. La liberación de tacrolimus de los liposomas se mantuvo más allá de dos semanas in vitro (alrededor del 35%), si bien se observó un aumento menor en los primeros días. En comparación con los liposomas de EggPC, los liposomas de DPPC tienen una explosión inicial más pequeña y solo alrededor del 35% del fármaco se libera al final de dos semanas en comparación con los liposomas de EggPC (alrededor del 60%).

REIVINDICACIONES

1. Un nanoliposoma para uso en la profilaxis y/o en el tratamiento de enfermedades oculares del segmento anterior, en que el nanoliposoma comprende una pluralidad de lípidos insaturados y saturados que forman al menos una bicapa lípida que encapsula un fármaco hidrófobo que comprende tacrolimus, y en que el fármaco hidrófobo y la pluralidad de lípidos insaturados y saturados tienen una relación en peso de hasta 0,2, en que la pluralidad de lípidos insaturados y saturados (i) comprenden al menos un lípido insaturado que constituye más del 50% en peso de la al menos una bicapa lípida, y (ii) tienen el fármaco hidrófobo encapsulado en la al menos una bicapa lípida, en que el nanoliposoma se administra por inyección subconjuntival y sostiene la liberación diaria del fármaco hidrófobo durante al menos 2 semanas, tal como se mide por medio de un método de diálisis, y en que el al menos un lípido insaturado comprende fosfatidilcolina de yema de huevo (EggPC), y/o 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC), en que el método de diálisis comprende (i) colocar el nanoliposoma en una bolsa de diálisis, (ii) incubar la bolsa de diálisis suspendida en una solución tampón de fosfato a un pH de 7.4 y 37° C, y (iii) realizar un muestreo de una parte de un medio de diálisis de forma diaria para que la cromatografía líquida de alta resolución mida la cantidad del fármaco hidrófobo que se ha liberado.
2. El nanoliposoma para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en que el nanoliposoma tiene una carga de fármaco de hasta 1 mg/ml.
3. El nanoliposoma para uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en que el al menos un lípido insaturado comprende además un esfingolípido y/o 1,2-dioleoil -sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC).
4. El nanoliposoma para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en que el nanoliposoma tiene un tamaño medio de 80 nm a 150 nm antes del almacenamiento a 4° C.
5. El nanoliposoma para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en que el nanoliposoma tiene un tamaño medio de 90 nm a 120 nm después del almacenamiento a 4° C.
6. El nanoliposoma para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en que el nanoliposoma tiene un índice de polidispersidad inferior a 0,3 antes y después del almacenamiento.
7. El nanoliposoma para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en que el nanoliposoma es una vesícula multilaminar o una vesícula unilaminar.

FIG. 1

Perfil de liberación para EggPC con un D/L de 0.2

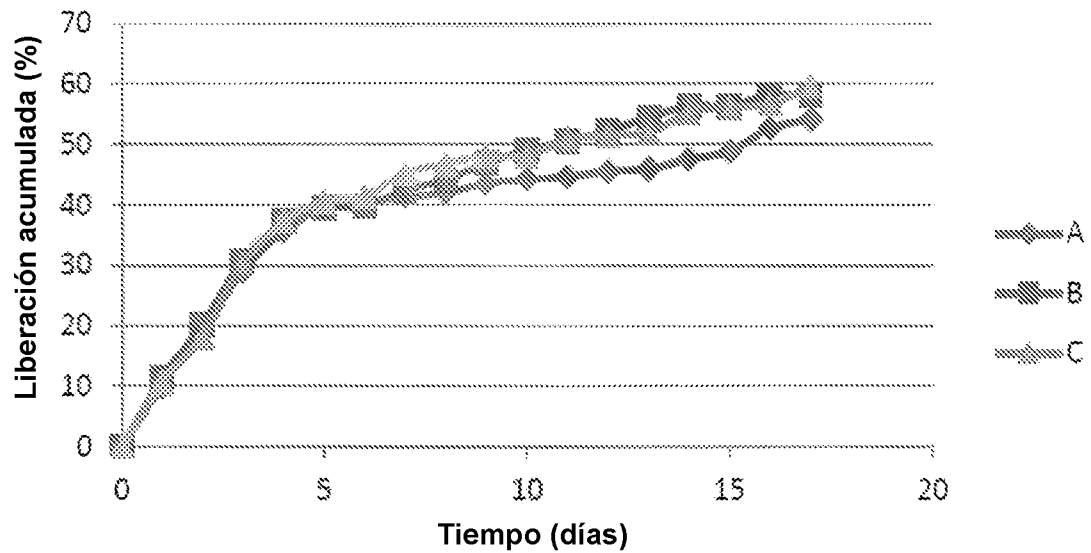


FIG. 2

Perfil de liberación para liposomas de POPC

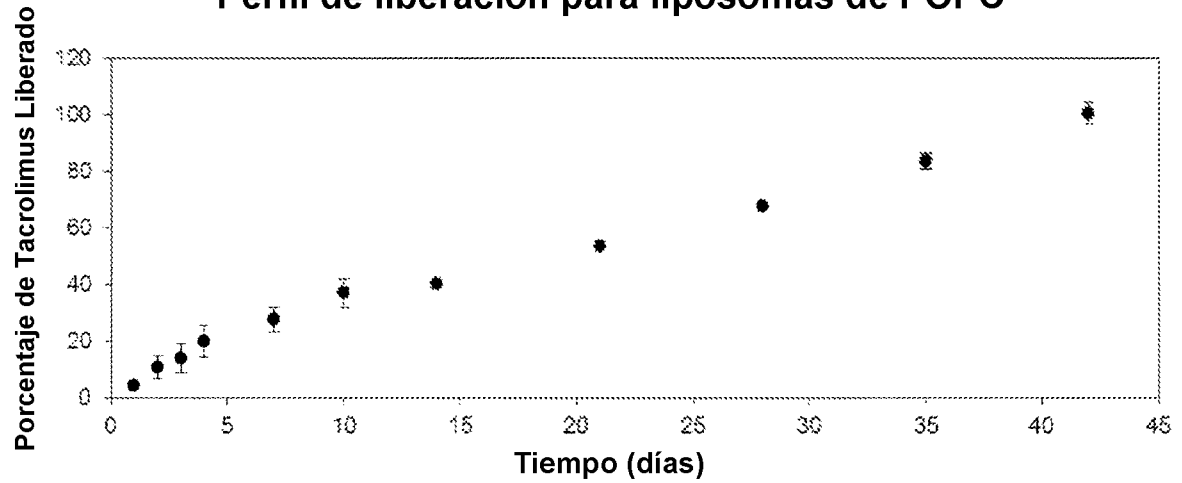


FIG. 3

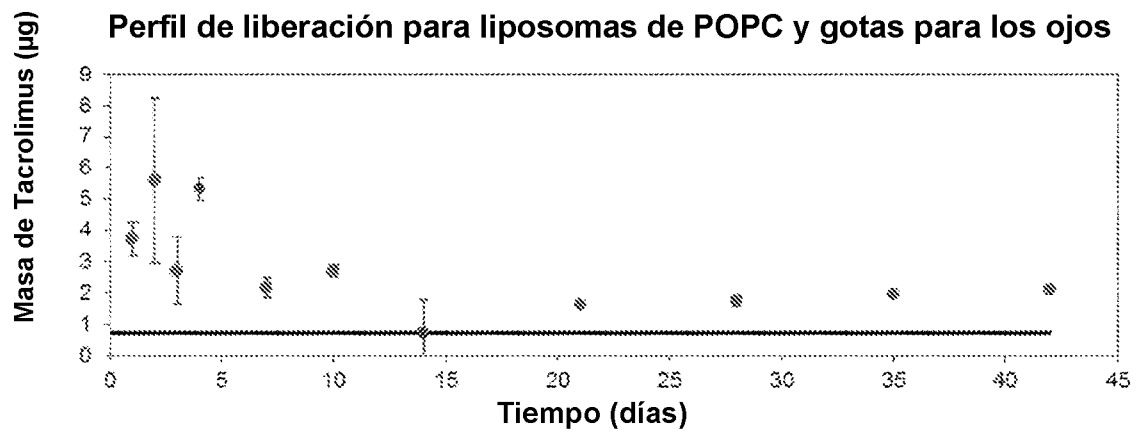


FIG. 4

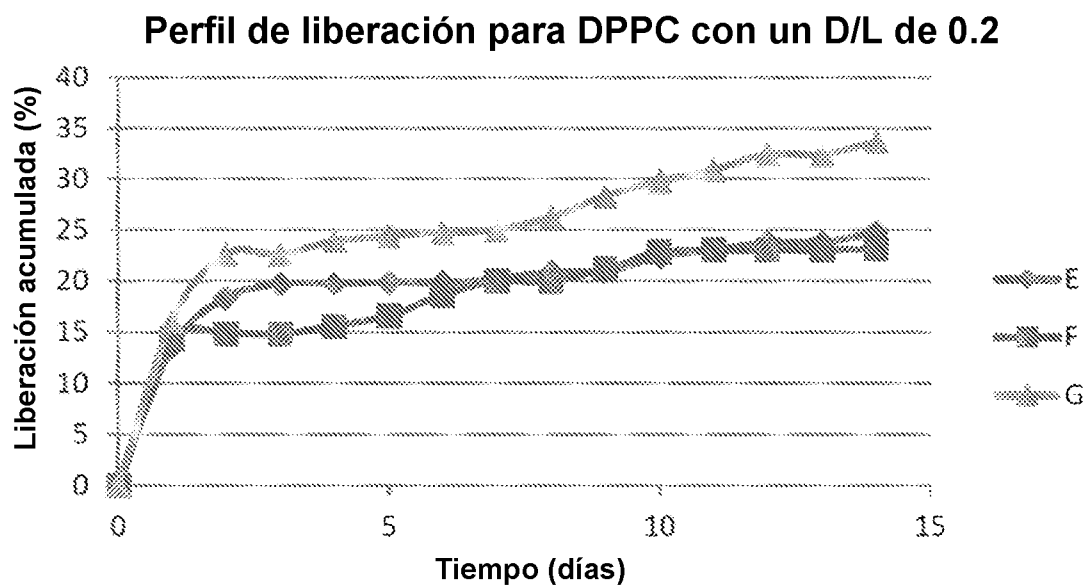


FIG. 5

