



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 212 904**

② Número de solicitud: 200300089

⑤ Int. Cl.

A61K 9/16 (2006.01)

A61K 31/7048 (2006.01)

A61P 31/10 (2006.01)

A61P 33/02 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

⑫ Fecha de presentación: **15.01.2003**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.08.2004**

Fecha de la concesión: **22.12.2005**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:
25.11.2005

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **16.02.2006**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.02.2006

⑰ Titular/es: **Universidad Complutense de Madrid
Rectorado, Avenida de Séneca, 2
28040 Madrid, ES**

⑱ Inventor/es: **Torrado Durán, Juan José;
Torrado Durán, Santiago;
Sánchez-Brunete, José Antonio;
Bolas Fernández, Francisco;
Dea-Ayuela, M^ª Auxiliadora;
Rama-Iñiguez, Sara y
Aluda Rodríguez, José María**

⑳ Agente: **No consta**

㉑ Título: **Microesferas de anfotericina B.**

㉒ Resumen:

Microesferas de anfotericina B.

Se describe un nuevo proceso de obtención de microesferas hidrodispersables de albúmina que contengan anfotericina B. El proceso se basa en la atomización de la albúmina con el fármaco a microencapsular. No se necesita la formación previa de una emulsión por lo que el proceso es industrialmente muy interesante ya que se puede evitar la utilización de disolventes orgánicos y aceites. La atomización es un proceso continuo y rápido que se puede realizar en condiciones de asepsia lo que permite obtener productos aptos para la administración parenteral. Las microesferas obtenidas tienen un tamaño de partícula pequeño (generalmente menores a 5 micrómetros) y son hidrodispersables, por lo que se pueden administrar por vía intravenosa. Estudios realizados en animales de experimentación han demostrado que la nueva formulación de anfotericina B es menos tóxica que la actualmente comercializada de Fungizona y más eficaz para el tratamiento de leishmaniosis experimental en cricetos.

ES 2 212 904 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Microesferas de anfotericina B.

5 **Objeto de la invención**

Nueva formulación de anfotericina B obtenida mediante atomización de microesferas hidrodispersables constituidas por albúmina y conteniendo el fármaco anfotericina B para su aplicación en el tratamiento de micosis y de enfermedades parasitarias como leishmaniosis.

10 **Estado de la técnica**

15 La anfotericina B es el ácido (19E,21E,23E,25E,27E,29E,31E)-(1R,3S,5R, 6R,9R,11R,15S,16R,17R,18S,33R,35S, 36R,37S)-33 [(3-amino-3,6-didesoxi-β-D-manopixranosil)oxi]-1,3,5,6,9,11,17,37-octahidroxi-15,16,18-trimetil-13-oxo-14,39-dioxabicyclo-[33.3.1]-nonatriaconta-19,21,23,25,27,29,31-heptaeno-36-carboxílico. Su fórmula empírica es C₄₇H₇₃NO₁₇ (*Real Farmacopea Española, 2ª edición, 2002*).

20 La anfotericina B es un fármaco utilizado en la práctica clínica, tanto en seres humanos como en animales, con dos indicaciones fundamentales (*Catálogo de Especialidades Farmacéuticas, 2002*):

- En el tratamiento de cuadros de leishmaniosis, tanto mucocutánea como visceral
- Como antimicótico, en el tratamiento de infecciones fúngicas.

25 Se administra principalmente por vía parenteral. No obstante, también se emplea en el tratamiento local de piel, mucosas y tracto digestivo, para lo cual se aplica por medio de formas farmacéuticas diversas como comprimidos, suspensiones, emulsiones, colirios o aerosoles.

30 La diana farmacológica de la anfotericina B es el episterol y el 5-dehidroepisterol presente en las membranas celulares de algunos protozoos, entre ellos los del género *Leishmania*, así como el ergosterol existente en las membranas celulares de los hongos.

35 La molécula de anfotericina B tiene la capacidad de asociarse al ergosterol, al episterol y al 5-dehidroepisterol. Cuando se forma el complejo anfotericina-esterol, se produce una alteración en la estructura de la membrana celular. Como consecuencia de esa desestructuración, y de la naturaleza parcialmente hidrofóbica y parcialmente hidrofílica del fármaco, se altera la permeabilidad de la membrana y se forman en ella una serie de poros, cráteres y canales a través de los cuales salen al espacio extracelular iones y elementos imprescindibles para el mantenimiento de la vida celular (*A.B.Mullen et al, Antimicrob. Agents Chemother. 41, 2089-92, 1997*). Semejante alteración de la permeabilidad de la membrana y pérdida de componentes vitales conducen a la muerte de la célula. Por otra parte, se aprecia en 40 ocasiones que la administración de la anfotericina B produce un efecto estimulante sobre el sistema inmunitario (*J.E. Wolf et al, Infect. Immun. 5, 1296-300, 1990*).

Desde el punto de vista terapéutico, la anfotericina B presenta el inconveniente importante de tener propensión a unirse también al colesterol de las membranas celulares de mamíferos, con las mismas consecuencias que cuando se asocia al ergosterol y a los episteroles. La afinidad por el colesterol es mucho menor que por estos últimos, y por ello es un fármaco válido para la práctica clínica (*I.Gruda et al, Biochem. Cell Biol. 65, 234-8, 1987*), pero desafortunadamente las concentraciones óptimas eficaces para combatir las infecciones fúngicas o protozoarias pueden ocasionar una notable toxicidad al hospedador.

50 Las reacciones adversas ocasionadas por la anfotericina B son frecuentes e importantes, tanto a corto como a largo plazo. A corto plazo, las reacciones adversas más frecuentes son de diversa índole: digestivas (náuseas, vómitos, anorexia, dispepsia, calambres abdominales y dolor abdominal), sanguíneas (anemia), urinarias (insuficiencia renal, acidosis tubular renal, nefrocalcinosis y anuria), metabólicas (hipopotasemia), neuropsiquiátricas (cefalea y malestar general), osteomusculares (mialgia y artralgia), alérgicas, y febriles.

55 Raramente pueden aparecer otros efectos adversos, que van asociados generalmente a una sobredosificación y que pueden ser de extrema gravedad: hepatobiliares (hepatitis, ictericia colestática e incremento de los valores sanguíneos de transaminasas y de fosfatasa alcalina), cardiovasculares (arritmias, cambios bruscos en la tensión arterial, sofocos e incluso paro cardíaco), respiratorios (disnea, edema pulmonar y espasmos bronquiales), oculares (visión borrosa y 60 diplopía), y otorrinolaringológicos (sordera, alteraciones del equilibrio y tinnitus).

El tratamiento prolongado con anfotericina B conduce en un porcentaje muy elevado de casos a los efectos secundarios siguientes:

- 65 - Nefrotoxicidad, que a veces deriva en insuficiencia renal: a medida que se prolonga el tratamiento se va produciendo un daño glomerular y tubular progresivo, y como consecuencia aumenta la excreción urinaria de sodio, potasio y magnesio, con el consiguiente riesgo de hipopotasemia, hipomagnesemia e hiponatremia. Por ello conviene que exista un control periódico de los valores de nitrógeno ureico y de creatinina sérica.

- Anemia normocítica normocrómica: suele ser reversible, y posiblemente debida a la rotura de membranas de los glóbulos rojos y a una disminución en la producción de eritropoyetina.

Con frecuencia, las dosis de anfotericina B administradas son inferiores a las óptimas con el fin de prevenir la aparición de reacciones adversas excesivamente graves, tanto a corto como a medio plazo (*V.Yardley et al, Antimicrob. Agents Chemother. 41, 752-6, 1997*).

Los efectos adversos ocasionados por el tratamiento con anfotericina B han incitado a buscar alternativas con el fin de mejorar la relación entre su actividad farmacodinámica y la toxicidad que produce.

El tratamiento clásico con anfotericina B, tanto en cuadros de leishmaniosis como de micosis sistémicas, se realiza por infusión endovenosa de dispersiones del fármaco estabilizadas con agentes suspensores. Es de este tipo la especialidad farmacéutica Fungizona[®], autorizada en España desde 1974, que es una suspensión estabilizada con desoxicolato de sodio. En los últimos años, se han autorizado en España nuevas formulaciones que mejoran la relación beneficio/riesgo del principio activo: Ambisome[®] (comercializada en España por Nextar Farmacéutica desde 1996), Abelcet[®] (Elan Farma, desde 1996), Amphocil[®] (Almirall Prodesfarma, desde 1999), y Anfotericina B Combinopharm[®] (Combinopharm, desde 2002).

En la especialidad farmacéutica Ambisome[®], el fármaco se encuentra atrapado en liposomas unilaminares compuestos por fosfatidilcolina hidrogenada de soja, colesterol, diestearoilfosfatidilglicerol y α -tocoferol. En Abelcet[®], el principio activo está en suspensión formando un complejo lipídico con fosfatidilcolina y fosfatidilglicerol. En Amphocil[®] y Anfotericina B Combinopharm[®], se forma una suspensión estabilizada por asociación de la anfotericina B con sulfato sódico de colesterilo.

Pero estos nuevos medicamentos, tan ventajosos desde el punto de vista terapéutico, presentan el inconveniente de su elevado coste económico (*C.Prieto et al Revista Española de Salud Pública 74, 351-9, 2000*). Hay estudios farmacoeconómicos que indican que el tratamiento de un ser humano de 70 kilogramos de peso con la dosis media de anfotericina B cuesta entre 10 y 50 veces más con estas especialidades que con la Fungizona, y esto limita su uso (*A. Wong-Beringer et al, Clin. Infect. Dis. 27, 603-18, 1998*). Hay países desarrollados que no los reconocen como tratamientos de primera línea si no es para personas que son intolerantes a la Fungizona o cuyas condiciones las hacen especialmente vulnerables (*J.H.Rex et al, Clin. Infect. Dis. 29, 1408-10, 1999*). En los países en vías de desarrollo, los tratamientos con ese precio no pueden ser siempre administrados (*S.Sundar et al, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg 94, 200-4, 2000*). En la leishmaniosis canina el empleo de anfotericina B liposoma ha producido inconsistentes (*Oliva, 2000, Canine leishmaniosis: treatment and follow-up, DG-EC*), además de la nefrotoxicidad asociada al empleo de anfotericina B libre.

Con el objeto de obtener una nueva formulación de anfotericina B con baja toxicidad, fácil de realizar industrialmente y eficaz para el tratamiento de la leishmaniosis visceral, se ha desarrollado un proceso de microencapsulación de anfotericina B en albúmina obteniéndose microesferas hidrodispersables para administración intravenosa.

Descripción de la invención

Microesferas de anfotericina B

La presente invención se refiere a un nuevo procedimiento de vehiculización de la anfotericina B en albúmina. El sistema propuesto se basa en la formación de microesferas de albúmina que tengan incorporada en su estructura la anfotericina B. La fabricación de estas microesferas se realiza por un proceso de secado continuo mediante atomización. Este es un proceso industrial muy rentable que además permite trabajar en condiciones asépticas, requisito éste muy importante para la preparación de medicamentos para aplicación parenteral.

El proceso que se propone se basa en la preparación de una suspensión de anfotericina B en una solución de albúmina. Esta mezcla se atomiza, y por este proceso se obtienen pequeñas partículas, de tamaño generalmente menor de 5 micrómetros, y fácilmente hidrodispersables, lo que permite la administración parenteral. Es importante resaltar que el proceso propuesto permite la obtención de las microesferas sin necesidad de utilizar disolventes orgánicos en los procesos de lavado o extracción, ni aceites para la elaboración de emulsiones, características estas frecuentes en otros procedimientos de microencapsulación, por lo que el proceso es fácil de realizar industrialmente y sin riesgo de accidentes.

La formulación de anfotericina B en el seno de microesferas de albúmina ha demostrado ser de interés en el tratamiento de la leishmaniosis visceral. Aunque todavía no se han llevado a cabo estudios de la relación entre eficacia y aparición de efectos adversos en el tratamiento de leishmaniosis mucocutánea y de infecciones fúngicas sistémicas, es posible que también pueda ofrecer ventajas en el tratamiento de estas afecciones.

La formulación objeto de patente ha demostrado tener una mayor eficacia y una menor toxicidad que la Fungizona[®], que es la especialidad farmacéutica clásicamente utilizada en el tratamiento con anfotericina B de la leishmaniosis visceral. A igual dosis (2 miligramos de anfotericina B por kilogramo de peso), ha demostrado ser mucho más eficaz en el tratamiento de cricetos infectados experimentalmente. De igual modo, ha demostrado menor toxicidad aguda, dado que dosis de 5 mg./Kg. de Fungizona[®] administrada por vía endovenosa "en bolus" producen la muerte en pocos

minutos de los animales enfermos tratados, los cuales aguantan, sin ningún signo aparente de alteración, tratamientos realizados también por vía endovenosa y con igual velocidad de inyección, de microesferas de albúmina con anfotericina B en cantidad equivalente a 20 mg/Kg. de anfotericina B, y sobreviven a dosis de 40 mg./Kg. de peso.

5 La otra especialidad farmacéutica a base de anfotericina B comercializada y que tiene entre sus indicaciones el tratamiento de la leishmaniosis es el Ambisome[®]. Aún no se han comparado la eficacia y la toxicidad con respecto a este medicamento. No obstante, hay ocasiones en las que no se emplea el Ambisome[®] por su coste económico, recurriéndose a Fungizona[®] o a otros medicamentos a base de otros principios activos. El coste económico de la fabricación de las microesferas puede ser muy inferior al de la fabricación de los liposomas (que es la forma farmacéutica de Ambisome[®]), lo que permitiría disponer de una alternativa terapéutica mejor que Fungizona[®] y con menores costes que Ambisome[®]. Por otro lado, las microesferas al ser formulaciones sólidas tendrán mejor estabilidad que las formulaciones semisólidas de liposomas.

15 Las demás especialidades farmacéuticas con anfotericina B comercializadas no incluyen actualmente entre sus indicaciones el tratamiento de la leishmaniosis visceral, pero presentan los mismos inconvenientes que Ambisome[®].

Modo de realización de la invención

20 El proceso de fabricación de microesferas de albúmina con anfotericina B incorporada en su molécula consiste en un proceso de secado continuo mediante atomización.

A continuación se ilustra la invención mediante los siguientes ejemplos de preparación de microesferas de anfotericina B y de los resultados concretos de eficacia y toxicidad obtenidos con estas partículas. Estos ejemplos son simplemente ilustrativos pero no limitativos del alcance de la invención.

25 Ejemplo 1

30 Para preparar microesferas de anfotericina B con albúmina humana en proporción 1:5, se atomiza una suspensión de anfotericina B en una solución acuosa estéril de albúmina (Behring de laboratorios Aventis) en un atomizador Büchi (modelo B191). El proceso de atomización y la desnaturalización térmica de la albúmina se realiza en las siguientes condiciones:

- Temperatura de secado en cámara: $165 \pm 1^\circ\text{C}$.
- 35 - Temperatura de salida de la cámara de secado: $99 \pm 2^\circ\text{C}$.
- Presión de nebulización: 800 NI/h.
- Flujo de alimentación: 3,2 ml/min.
- 40 - Aspiración de aire: 75%

45 Las partículas así obtenidas tienen un diámetro medio de 2,2 micrómetros, superficie lisa y son fácilmente hidrodispersables.

Ejemplo 2

50 Se realizó un estudio de la eficacia de la nueva formulación en cricetos dorados, del tipo *Syrian golden*, todos ellos de sexo masculino y de edad similar, los cuales fueron infectados mediante inyección por vía intracardíaca con 10^7 promastigotes de *Leishmania infantum* M/CAN/ES/96/BCN 150. Los animales se mantuvieron en todo momento con disponibilidad total de alimento y de bebida. En la sexta semana después de la infección, se tomaron muestras de sangre por sangrado retroorbital para determinar el nivel de anticuerpos en suero y, a partir de los datos obtenidos, se clasificaron en lotes uniformes en función del título de anticuerpos. Uno de los lotes no recibió tratamiento alguno y se mantuvo como control, mientras que un segundo lote fue tratado con Fungizona endovenosa y el tercero con microesferas de albúmina con anfotericina B en los días 69, 71 y 73 post-infección. En cada uno de estos días, se administró la formulación correspondiente a través de inyección por vía intracardíaca. Pasados 77 días desde el último día de tratamiento (día 150 post-infección), los cricetos fueron eutanasiados y se contabilizó el número de formas parasitarias presentes en el hígado y en el bazo. Los resultados se resumen en la Tabla I:

60

65

ES 2 212 904 B2

TABLA I

Tratamiento	Control no tratado	Fungizona, 2 mg/Kg de anfotericina B	Formulación, 2 mg/Kg de anfotericina B
Nº de parásitos por mg. de bazo	$11,2 \times 10^8 \pm 3,9 \times 10^8$	$4,0 \times 10^8 \pm 1,5 \times 10^8$	$1,1 \times 10^8 \pm 2,2 \times 10^8$
Nº de parásitos por mg. de hígado	$69,0 \times 10^8 \pm 3,1 \times 10^8$	$27,5 \times 10^8 \pm 4,0 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8 \pm 4,9 \times 10^8$
Reducción del nº de parásitos en bazo respecto al control		64,3%	89,9%
Reducción del nº de parásitos en hígado respecto al control		60,1%	95,9%

Ejemplo 3

Se desarrolló un segundo estudio de eficacia igual que el estudio de eficacia del ejemplo 2 con la única salvedad de que uno de los lotes recibió la formulación de microesferas de albúmina con anfotericina B en una cantidad equivalente a 40 miligramos de anfotericina B por kilogramo de peso del animal (dosis que con la nueva formulación propuesta es tolerable por el animal, mientras que con la formulación convencional de Fungizona el límite de toxicidad aceptable está en 2 mg/kg). Los resultados se muestran en la Tabla II:

TABLA II

Tratamiento	Control no tratado	Control microesferas vacías	Fungizona, 2 mg/Kg de anfotericina B	Formulación, 40 mg/Kg de anfotericina B
Nº de parásitos por mg. De bazo	$8,5 \times 10^4 \pm 11,7 \times 10^4$	$12,0 \times 10^4 \pm 10,3 \times 10^4$	$0,7 \times 10^4 \pm 1,0 \times 10^4$	0 ± 0
Nº de parásitos por mg. De hígado	$5,1 \times 10^4 \pm 7,7 \times 10^4$	$4,6 \times 10^4 \pm 1,6 \times 10^4$	$1,9 \times 10^4 \pm 2,7 \times 10^4$	296 ± 363
Reducción del nº de parásitos en bazo respecto al control		0%	77,4%	100,0%
Reducción del nº de parásitos en hígado respecto al control		9,09%	71,1%	99,9%

Ejemplo 4

Se realizó un estudio de toxicidad aguda de la formulación obtenida en cricetos dorados, todos ellos de sexo masculino y de edad similar, los cuales fueron infectados mediante inyección por vía intracardíaca con 10^7 promastigotes de *Leishmania infantum BCN 150*. Los animales se mantuvieron en todo momento con disponibilidad total de alimento y de bebida. En la sexta semana después de la infección, se tomaron muestras de sangre por sangrado retroorbital para determinar el nivel de anticuerpos en suero y, a partir de los datos obtenidos, se clasificaron en lotes uniformes de 6 unidades en función del título de anticuerpos.

En el día 69 post-infección, cada lote recibió uno de los tratamientos indicados en la tabla recogida a continuación y se valoró la mortalidad (si los animales resistían o morían) en las 24 horas siguientes a la inyección.

Los resultados de este estudio se muestran en la Tabla III donde se observa que para la Fungizona una dosis de 5 mg/kg resulta mortal después de 24 horas mientras que para la anfotericina B microencapsulada la supervivencia es del 100% con dosis hasta 40 mg/kg.

ES 2 212 904 B2

TABLA III

	Tratamiento	Dosis	Nº de cricetos	Nº de supervivientes	% de supervivencia
5	Fungizona®	1 mg/Kg	6	6	100%
		2 mg/Kg	6	6	100%
		5 mg/Kg	6	0	0%
10	Formulación	1 mg/Kg	6	0	100%
		2 mg/Kg	6	0	100%
		5 mg/Kg	6	0	100%
		10 mg/Kg	6	0	100%
15		20 mg/Kg	6	0	100%
		40 mg/Kg	6	0	100%

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 212 904 B2

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de vehiculización de anfotericina B en albúmina **caracterizado** porque se realiza mediante secado continuo por atomización.

5

2. Micropartículas hidrodispersables de anfotericina B en albúmina obtenidas según el procedimiento reivindicado.

3. Uso de las micropartículas hidrodispersables de anfotericina B reivindicadas en la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de micosis y enfermedades parasitarias como la leishmaniosis.

10

4. Uso de las micropartículas hidrodispersables de anfotericina B, según reivindicación 3, donde el medicamento es administrado por vía parenteral.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 212 904

② Nº de solicitud: 200300089

③ Fecha de presentación de la solicitud: 15.01.2003

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: A61K 9/16, 31/7048, A61P 31/10, 33/02

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	WO 200047187 A (KINETANA INC.) 17.08.2000, página 1, línea 1 - página 7, línea 18; reivindicaciones 1,2,5-7,9,10,13.	1-5
Y	TORRADO DURÁN, J.J. "Microcápsulas, microesferas y nanopartículas de albúmina como nuevos sistemas de administración de medicamentos". Farmacia Clínica, 1989, 6 (10), páginas 724-733, ISSN 0212-6583, todo el documento.	1-5
A	PAVANETTO, F. y otros "Spray-dried albumin microspheres for the intra-articular delivery of dexamethasone". Journal of Microencapsulation, 1994, 11 (4), páginas 445-454, ISSN 0265-2048.	1-5
A	LI, F.Q. y otros Ciprofloxacin-loaded bovine serum albumin microspheres: preparation and drug-release in vitro". Journal of Microencapsulation, 2001, 18 (6), páginas 825-829, ISSN 0265-2048.	1-5

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

01.07.2004

Examinador

N. Vera Gutiérrez

Página

1/1