

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 426 986**

51 Int. Cl.:

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 38/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2008** **E 08172770 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2013** **EP 2074987**

54 Título: **Composición de liposomas de colistina para su uso terapéutico por vía intravenosa, oral y cutánea, y procedimiento para su preparación**

30 Prioridad:

28.12.2007 IT RM20070681

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

28.10.2013

73 Titular/es:

TASCINI, CARLO (50.0%)

Via C. Battisti 26

55048 Torre del Lago-Viareggio (LU), IT y

TASCINI, GIOVANNI (50.0%)

72 Inventor/es:

TASCINI, CARLO y

TASCINI, GIOVANNI

74 Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

ES 2 426 986 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

Composición de liposomas de colistina para su uso terapéutico por vía intravenosa, oral y cutánea, y procedimiento para su preparación.

5

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una composición de liposomas que contiene la colistina antibiótica, que, gracias al hecho de portarse por los liposomas, puede administrarse por vía intravenosa a dosificaciones superiores con mayor eficacia clínica, alcanzando concentraciones tisulares mayores y sin determinar una toxicidad grave. En las formulaciones orales, la composición de liposomas de colistina puede usarse como un descontaminante intestinal, mientras que, en las formulaciones tópicas, tales como cremas o geles, puede usarse en el tratamiento de infecciones cutáneas o en la profilaxis de infecciones en pacientes afectados por quemaduras. También forma el objeto de la presente invención el procedimiento para la preparación de la composición de liposomas que contiene colistina que se ha mencionado anteriormente.

15

ESTADO DE LA TÉCNICA

La colistina antibiótica

20

La colistina o polimixina E es un antibiótico polipeptídico, que se aisló en Japón en 1947 a partir de *Bacillus Polymyxa* subesp. *Colistinus* y ha estado disponible para su uso clínico desde 1959.

La colistina tiene una estructura heptapeptídica y una cadena lateral N-terminal acetilada por un ácido graso para formar deca péptidos como se muestra en la figura 1A.

25

El conjunto de diferentes deca péptidos correlacionados estrictamente entre sí forma la colistina, cuyos dos componentes principales son colistina A a colistina B, que difieren entre sí por sus ácidos grasos: ácido 6-metil octanoico y ácido 6-metil heptanoico, respectivamente.

30

Se sabe que la colistina es un bactericida contra bacterias Gram-negativas con un mecanismo similar al de los detergentes en la membrana externa y en la membrana citoplasmática. De hecho, puede unirse a los lipopolisacáridos y los fosfolípidos de la membrana y quela también los cationes de los mismos, provocando de este modo un daño a la membrana, de lo que deriva la lisis osmótica del microorganismo.

35

La colistina administrada por vía intravenosa está generalmente en su forma metano-sulfonato, que, sin embargo, han demostrado ser de 4 a 8 veces menos activa que la colistina pero en cualquier caso presenta actividad bactericida.

El documento WO 2007/117550 desvela una formulación liposomal de antiinfecciosos similares a colistina.

40

El contexto clínico mundial

Actualmente, en entornos hospitalarios por todo el mundo, se ha descubierto que las infecciones resultantes de bacterias Gram-negativas han demostrado ser resistentes a la quimioterapia.

45

La más peligrosa de estas bacterias es *Pseudomonas aeruginosa* MDR (resistente a múltiples fármacos, *Multi Drug Resistant*).

P. aeruginosa es resistentes intrínsecamente a muchos antibióticos, incluyendo los betalactámicos, las antiguas quinolonas, cloramfenicol (CAF), tetraciclinas, macrólidos, sulfamidas y rifampicina, a pesar de que la rifampicina puede tener un efecto sinérgico si se asocia con las polimixinas.

50

Además, una permeabilidad reducida de la membrana externa y la presencia de numerosas bombas de eflujo permiten la resistencia de *P. aeruginosa* a numerosos antibióticos (quinolonas, tetraciclinas, CAF, macrólidos, sulfamidas, aminoglucósidos, y muchos betalactámicos). Si a estos mecanismos se les asocia las numerosas betalactamasas, entonces las herramientas terapéuticas contra estas bacterias se reducen a sólo unas pocas moléculas.

55

Las cepas "pan-resistentes" son más y se informan con más frecuencia, a pesar de que rara vez se informa de sensibilidad a polimixina.

En consecuencia, la colistina ha vuelto a adquirir una importancia considerable debido al desarrollo de cepas que son resistentes a todos los antibióticos, excepto a polimixina.

A este respecto, la colistina ha demostrado ser un fármaco que puede estar asociado a diferentes moléculas con una eficacia bastante buena a pesar de que presenta efectos secundarios renales graves que limitan el uso de la misma.

10

La colistina puede asociarse también a antibióticos betalactámicos, en particular carbapenémicos, que tienen mecanismos de resistencia en la pared externa del microorganismo (es la diana de la colistina que actúa en la misma en forma de agente tensioactivo).

15 La farmacocinética de la colistina se ve afectada por su hidrofilia, que no permite alcanzar suficientes concentraciones en ciertos tejidos; de hecho, no penetra muy lejos en el pulmón, en el hueso o en el SNC.

Descripción de la invención

20 La descripción de la invención se entenderá más fácilmente con referencia a las láminas adjuntas de dibujos, en los que:

La figura 1A muestra la estructura química de la colistina, donde α y γ indican $-NH_2$ en el enlace peptídico, Dab es ácido diaminobutírico, Leu es leucina, y Thr es treonina;

25

la figura 1B muestra la estructura química de un derivado de la misma, tal como colistimetato sódico;

la figura 2 es un diagrama de bloques del procedimiento de preparación de la colistina en liposomas de acuerdo con la invención.

Por el término "colistina" en la presente invención se refiere a todas las formas salificadas y/o los derivados conocidos de la colistina antibiótica, tal como el colistimetato sódico ilustrado en la figura 1B.

30

Se sabe que los vehículos coloidales, tales como los liposomas, son capaces de modificar la farmacocinética de los fármacos y su toxicidad. En general, la asociación a los liposomas no conduce a ninguna pérdida de la capacidad antimicrobiana.

35

De acuerdo con la presente invención, se prevé transportar la colistina a través de los liposomas para ponerla en altas concentraciones en los sitios tisulares de infección sin tener ningún efecto secundario a nivel renal.

Los liposomas son microesferas huecas formadas por una o más capas lipídicas dobles. Desde los setenta se han usado (de forma experimental) como vehículos de fármacos, y el entendimiento de su comportamiento *in vivo* ha permitido la realización de estudios dirigidos sobre el tratamiento específico de determinadas afecciones patológicas. Actualmente, varias firmas farmacéuticas implicadas en biotecnología trabajan exclusivamente con liposomas para el desarrollo de diferentes tratamientos: tratamientos antibióticos, tratamientos antitumorales, tratamientos de sensibilización alérgica, terapia génica, etc.

45

El interés de los liposomas considera su membrana (constituida por colesterol y fosfolípidos, tal como fosfatidil colina y diacetilfosfato), la estructura, la composición, y cuyas proporciones son prácticamente idénticas a las de la membrana de las células huésped.

Los fosfolípidos son ésteres de glicerol con ácidos grasos en las posiciones 1 y 2 y con ácido fosfórico en la posición 3. A su vez, el último se une a bases amina de bajo peso molecular. Son componentes fundamentales de las membranas celulares y de los complejos de lipoproteínas implicados en la absorción y transporte de lípidos, y tienen una cola hidrófoba y una cabeza hidrófila que, mediante disolución en agua, se reorganizan de la siguiente manera: las colas hidrófobas se atraen entre sí, mientras que las cabezas hidrófilas se colocan en contacto con el exterior y con el entorno acuoso interno (la disposición es similar a la de las micelas). Como resultado, se forman capas lipídicas dobles, que se cierran para formar pequeñas vesículas similar a las células del microorganismo y a sus organelos.

50

Las esferas o liposomas que se han mencionado anteriormente constituyen pequeños depósitos que pueden

contener un antígeno, un antibiótico, un alérgeno, un fármaco o un gen (terapia génica) y pueden introducirse en el organismo sin causar reacciones inmunes de rechazo.

Las características de los liposomas pueden modificarse de acuerdo con los diferentes fármacos transportados. Por ejemplo, para reducir la velocidad de degradación del liposoma y ralentizar la liberación de su contenido, se modifican la composición y las dimensiones del mismo. Esto también es posible para aumentar la afinidad de los liposomas para un determinado tejido modificando su composición, la carga eléctrica (añadiendo estearilamina, se obtienen vesículas con carga positiva; con fosfato de diacetilo, se obtienen cargas negativas) o también añadiendo receptores o antígenos adhesivos, lo que aumenta la concentración del fármaco en el órgano diana.

Dado que los liposomas pueden encapsular fármacos, proteínas y enzimas, los sistemas pueden administrarse por vía intravenosa, oral o intramuscular. Por otro lado, los liposomas presentan diversas desventajas como vectores para la liberación de fármacos en la medida en que se someten a degradación de oxidación y deben conservarse y manipularse en una atmósfera de nitrógeno.

La colistina antibiótica (o polimixina E) puede quimioadsorberse en un sustrato de liposomas, en un autoclave. La composición de liposomas que se obtiene forma el objeto de la presente invención y puede prepararse en forma de polvo para su administración, después de una reconstitución apropiada previa, por vía intravenosa al paciente, o bien en forma de jarabe para su uso oral o en forma de una pomada para su uso dermatológico.

Se ha descubierto sorprendentemente que el sustrato de liposomas de colistina, mediante la reducción del contacto renal del antibiótico, puede prevenir los efectos secundarios asociados, en particular la toxicidad renal, manteniendo sus características antibacterianas intactas.

La composición de liposomas de acuerdo con la presente invención puede comprenderse obviamente en composiciones farmacéuticas apropiadas para su uso clínico, que tienen, por ejemplo, la forma técnica de polvo que se reconstituirá para su uso intravenoso, jarabes para su uso oral, o cremas para su uso dermatológico, de acuerdo con modos de producción conocidos por el experto en el sector.

En particular, la composición de liposomas que forma el objeto de la invención, puede usarse para la preparación de composiciones farmacéuticas para el tratamiento clínico contra gérmenes multirresistentes Gram-negativos tanto en una formulación intravenosa como en una formulación oral y tópica. Las cremas o geles con una base de la composición de liposomas de colistina han demostrado ser extremadamente eficaces en el tratamiento clínico de infecciones cutáneas y en la profilaxis de infecciones en pacientes afectados por quemaduras.

El procedimiento de preparación

También forma parte del objeto de la presente invención el procedimiento de preparación de la colistina en liposomas.

El procedimiento que se describe es un tipo discontinuo (por lotes). Las operaciones individuales usadas son, en orden:

- i) Dosificación
- ii) Mezcla
- iii) Destilación
- iv) Secado
- v) Homogeneización (por medio de agitación)
- vi) Quimioadsorción (por medio de refrigeración y centrifugación forzada)

En cada una de las etapas de procesamiento es necesario soplar con nitrógeno para impedir la degradación de los fosfolípidos.

A modo de ejemplo no limitante, se proporciona una descripción detallada del procedimiento de preparación, en base al diagrama de bloques de la figura 2. Los parámetros y composiciones pueden modificarse de forma apropiada.

- i) En un reactor con fondo hemiesférico se dosifican en orden: el disolvente (constituido por una mezcla de cloroformo y etanol, respectivamente al 70% en peso y al 30% en peso) en una cantidad 20 veces en

exceso con respecto a los fosfolípidos que se van a usar, los fosfolípidos (dimiristoil fosfatidilglicerol), con una proporción en peso de 5:1 con respecto a la colistina que se va a producir, con la adición de tensioactivos no iónicos según sea necesario.

5 ii) La solución anterior se mezcla por agitación, pero sin el uso de agitadores de palas; duración de la mezcla: al menos 2 horas.

iii) A continuación, el disolvente se destila en un evaporador rotatorio de película descendente. Debe observarse el límite máximo de la temperatura que puede tolerar el producto, que es de 40 °C.

10 iv) La torta obtenida de esta manera debe secarse de las trazas residuales de disolvente por medio de destilación en condiciones de vacío. En esta etapa, ha de observarse el límite máximo de temperatura de 35 °C. El tiempo de esta operación es aproximadamente 2-3 horas, lo que puede optimizarse. Se obtiene de esta manera el sustrato de fosfolípidos con una estructura de película.

15 v) En este punto, se añade la solución fisiológica de colistina, con una concentración de 10 mg/ml de agua desmineralizada. El producto se homogeneiza por medio de agitación, sin el uso de palas, durante un tiempo suficiente para dispersar el soluto por completo (típicamente durante 1 h a 150 r.p.m.). La dispersión que se obtiene de esta manera tiene una composición típica en peso de:

colistina 1/fosfolípidos 5/agua 100.

20 vi) Con el fin de obtener la quimioadsorción de la colistina en el sustrato de liposomas se recurre a la refrigeración, a una temperatura mínima de 4 °C, y al mismo tiempo, el agua se elimina por medio de centrifugación forzada con una aceleración centrípeta equivalente a al menos 20.000 g, durante un tiempo suficiente para expulsar todo el agua (típicamente durante 90-120 minutos). El producto final se extrae por centrifugación: colistina en el sustrato de liposomas en forma de polvo.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la preparación de una composición de liposomas que contiene colistina para su uso terapéutico por vía intravenosa, oral y tópica, **caracterizado porque** prevé las siguientes etapas:
- 5 I) una etapa de dosificación, en la que una cantidad apropiada de fosfolípidos se disuelve en una mezcla de cloroformo y etanol, en un reactor de fondo redondo;
- II) una etapa de mezcla, en la que la solución obtenida se mezcla por agitación;
- 10 III) una etapa de destilación, en la que dicha solución se procesa en un evaporador rotatorio, destilando el disolvente para obtener una torta de fosfolípidos;
- IV) una etapa de secado, en la que la torta obtenida de esta manera se seca de las trazas residuales de disolvente por medio de destilación en condiciones de vacío a una temperatura no superior a 35 °C para obtener un sustrato de fosfolípidos con una estructura de película;
- 15 V) una etapa de homogeneización, en la que añadido a dicho sustrato de fosfolípidos se encuentra una solución fisiológica de colistina, para obtener una dispersión que se homogeneiza por agitación durante un tiempo suficiente para dispersar el soluto por completo;
- VI) una etapa de quimioadsorción de colistina en el sustrato de liposomas, en la que la dispersión homogeneizada se enfría a una temperatura mínima de 4 °C y finalmente se centrifuga con una aceleración de al menos 20.000 g, durante un tiempo suficiente para expulsar todo el agua, con el fin de extraer de la
- 20 centrífuga dicha colistina en el sustrato de liposomas en forma de polvo.
2. El procedimiento para la preparación de una composición de liposomas de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** los fosfolípidos que se disuelven en la mezcla de cloroformo y etanol tienen una proporción en peso de 5:1 con respecto a la colistina que se producirá y **porque** añadidos a dichos fosfolípidos se encuentran tensioactivos no iónicos según sea necesario.
- 25 3. El procedimiento para la preparación de una composición de liposomas de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** en la etapa de dosificación, la cantidad de disolvente, constituido por la mezcla de cloroformo y etanol, es al menos 20 veces en exceso con respecto a los fosfolípidos que se usarán.
- 30 4. El procedimiento para la preparación de una composición de liposomas de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** la duración de la etapa de mezcla es de al menos 2 horas.
5. El procedimiento para la preparación de una composición de liposomas de acuerdo con la
- 35 reivindicación 1, en el que el evaporador usado en la etapa de destilación es un evaporador rotatorio de película descendente y la temperatura operativa máxima se mantiene por debajo de 40 °C.
6. El procedimiento para la preparación de una composición de liposomas de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa de secado tiene una duración de aproximadamente 2-3 horas.
- 40 7. El procedimiento para la preparación de una composición de liposomas de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la solución fisiológica de colistina que se añade en la etapa de homogeneización tiene una concentración de 10 mg/ml de agua desmineralizada.
- 45 8. Uso de una composición de liposomas obtenida mediante el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 para la preparación de composiciones farmacéuticas en el tratamiento clínica contra bacterias multirresistentes (MDR) Gram-negativas, en una formulación intravenosa.
9. Uso de una composición de liposomas obtenida mediante el procedimiento de acuerdo con la
- 50 reivindicación 1, para la preparación de composiciones farmacéuticas en el tratamiento clínico contra bacterias multirresistentes (MDR) Gram-negativas, en una formulación oral.
10. Uso de una composición de liposomas obtenida mediante el procedimiento de acuerdo con la
- reivindicación 1, para la preparación de composiciones farmacéuticas en el tratamiento clínico contra bacterias
- 55 multirresistentes (MDR) Gram-negativas, en formulaciones tópicos.
11. Composición de liposomas obtenidas mediante el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, para la preparación cremas o geles que pueden usarse en el tratamiento clínico para infecciones cutáneas.

12. Composición de liposomas obtenida mediante el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, para la preparación de cremas o geles que pueden usarse en la profilaxis de infecciones en pacientes afectados por quemaduras.

COLISTINA

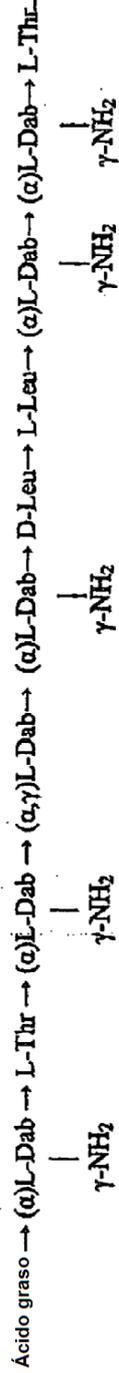


FIG. 1A

COLISTIMETATO SÓDICO

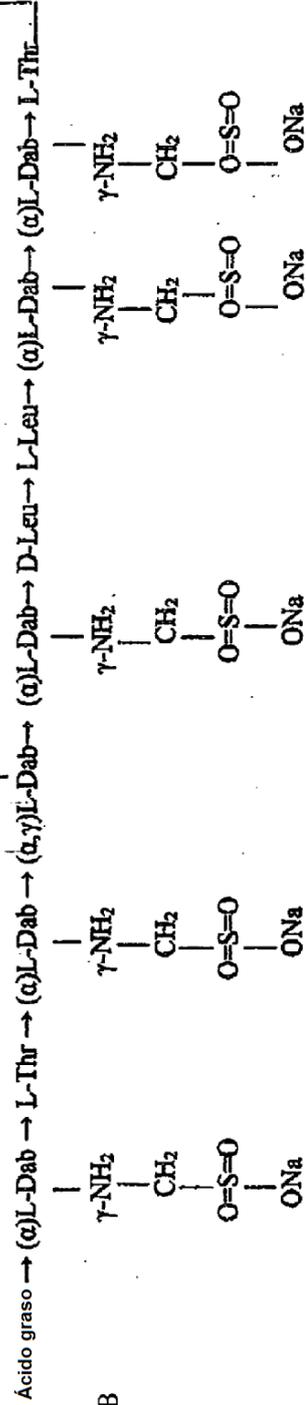


FIG. 1B

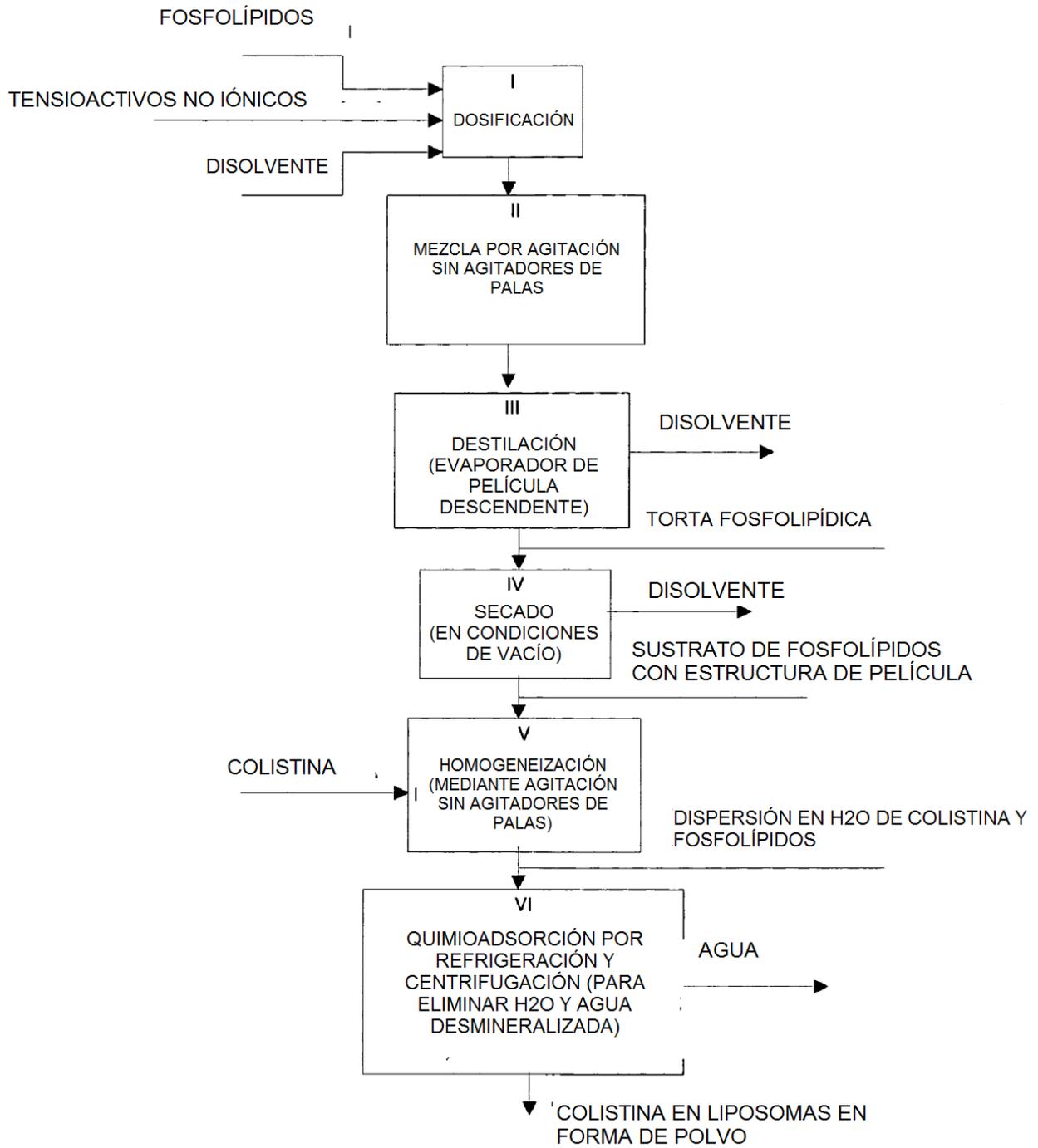


FIG. 2