

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 437 866**

51 Int. Cl.:

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 31/407 (2006.01)

A61K 31/4709 (2006.01)

A61K 31/704 (2006.01)

A61K 31/496 (2006.01)

A61K 31/545 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.07.2006 E 06787716 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2013 EP 1909759**

54 Título: **Liberación ininterrumpida de antiinfectivos aminoglucósidos**

30 Prioridad:

19.07.2005 US 185448

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

14.01.2014

73 Titular/es:

**INSMED INCORPORATED (100.0%)
Princeton Corporate Plaza, 9 Deer Park Drive,
Suite C
Monmouth Junction, NJ 08852, US**

72 Inventor/es:

**BONI, LAWRENCE T.;
MILLER, BRIAN S.;
MALININ, VLADIMIR y
LI, XINGONG**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 437 866 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

Liberación ininterrumpida de antiinfectivos aminoglicósidos

Introducción

5 En cierta tecnología de liberación ininterrumpida adecuada para administración por inhalación se emplean liposomas y complejos lipídicos para proporcionar un efecto terapéutico prolongado del fármaco en el pulmón y sistémicamente por liberación ininterrumpida, y la capacidad para dirigir y potenciar la incorporación del fármaco a sitios de la enfermedad. La presente invención comprende un agente antiinfectivo liposómico, y métodos para el tratamiento de infecciones pulmonares usando un agente antiinfectivo liposómico o lipídicamente complejado.

10 Como se informa en Goodman and Gilman's The Pharmaceutical Basis of Therapeutics, octava edición, "Puesto que la incidencia de nefrotoxicidad y ototoxicidad está relacionada con la concentración a la cual se acumula un aminoglicósido, es crítico reducir la dosificación de mantenimiento de estos fármacos en pacientes con función renal deteriorada". Puesto que los aminoglicósidos pueden producir disfunción vestibular o auditiva y nefrotoxicidad independientemente de las afecciones de un paciente, es generalmente importante reducir las dosificaciones de mantenimiento. La presente invención proporciona drásticas reducciones de toxicidad, permitiendo por ello dosis mayores que las habituales.

15 Los pacientes con fibrosis quística (CF; del inglés, cystic fibrosis) presentan secreciones mucosas espesas y/o esputos en los pulmones, frecuentes infecciones significativas, y biopelículas que resultan de colonizaciones bacterianas. Todos estos fluidos y materiales crean barreras al direccionamiento eficaz de agentes antiinfectivos contra las infecciones. La presente invención supera estas barreras, e incluso permite una dosificación reducida (en cantidad o frecuencia), reduciendo por ello la carga de fármaco en los pacientes. En general, para infecciones pulmonares, el programa de dosificación proporcionado por la invención proporciona un medio para reducir la carga de fármaco.

20 Para un sistema liposómico de suministro de fármacos, es a menudo deseable reducir la relación de lípido a fármaco (L/D; del inglés, lipid/drug) lo más posible para minimizar la carga lipídica con objeto de evitar efectos de saturación en el organismo. En el caso de suministro pulmonar por inhalación, esto puede ser particularmente cierto porque, para un uso crónico, la dosificación de liposomas podría superar a la supresión, lo que limitaría la administración y, por lo tanto, la eficacia del producto farmacológico. Una relación L/D menor permitiría que se administrara más fármaco antes de que se alcanzara el umbral de dosificación/supresión.

Sumario de la invención

30 La invención es como se expone en las reivindicaciones.

A través de los métodos de infusión descritos en esta memoria, se han creado liposomas sustancialmente exentos de lípidos aniónicos de tamaño moderado ($< 1 \mu\text{m}$) que encierran agentes antiinfectivos en una relación ponderal de lípido/agente antiinfectivo típicamente de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 0,5:1. Se han medido los volúmenes capturados de liposomas y, a partir de estos números, se puede calcular cuál debería ser el encerramiento teórico si el agente antiinfectivo se comportara como un soluto ideal (es decir, no interacciona con la membrana liposómica pero se encierra idealmente junto con agua). A partir de esta comparación, se observan cifras de encerramiento que son 3-5 veces mayores que las esperadas, lo que indica que se está produciendo una interacción especial que permite un encerramiento mayor que el esperado y relaciones de lípido/agente antiinfectivo menores que las esperadas. La disolución en que se forman los liposomas contiene una concentración de agente antiinfectivo. La concentración de agente antiinfectivo dentro de los liposomas debería ser aproximadamente igual a la concentración en la disolución. Sin embargo, se calcula que la concentración interna de agente antiinfectivo es al menos aproximadamente 3 veces mayor.

45 Se describe una formulación liposómica antiinfectiva que comprende una formulación lipídica y un agente antiinfectivo, en donde la formulación lipídica está sustancialmente exenta de lípidos aniónicos, y en donde la relación ponderal de lípido a agente antiinfectivo es de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 1:1. La relación ponderal de lípido a agente antiinfectivo puede ser de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 1:1, de 2:1 a aproximadamente 1:1, o aproximadamente 1:1.

50 La presente invención se refiere a una formulación lipídica que comprende un agente antiinfectivo, en donde la relación de lípido a agente antiinfectivo es 0,75:1 o menos, por ejemplo, aproximadamente 0,5:1 o menos, y el agente antiinfectivo es un aminoglicósido.

En ciertas realizaciones, la formulación lipídica antiinfectiva comprende un liposoma que tiene un diámetro medio de aproximadamente 0,2 μm a aproximadamente 1,0 μm . En ciertas realizaciones diferentes, el diámetro medio es de aproximadamente 0,2 μm a aproximadamente 0,5 μm . En ciertas realizaciones distintas, el diámetro medio es de

aproximadamente 0,2 µm a aproximadamente 0,3 µm.

El agente antiinfectivo es un aminoglicósido que incluye, pero no se limita a, amikacina, tobramicina o gentamicina, o una sal farmacéuticamente aceptable de las mismas.

5 La formulación lipídica comprende un fosfolípido y un estero. En ciertas realizaciones, la formulación lipídica comprende un lípido neutro. En ciertas realizaciones, la formulación lipídica está exenta de lípidos aniónicos. En ciertas realizaciones diferentes, el fosfolípido incluye, pero no se limita a, una fosfatidilcolina tal como dipalmitoilfosfatidilcolina o dioleoilfosfatidilcolina; o el estero incluye, pero no se limita a, colesterol; o el lípido puede ser una combinación de los mismos.

10 En parte, la presente invención presenta un método para preparar la formulación lipídica antiinfectiva antes descrita, que comprende infundir una disolución o mezcla acuosa o alcohólica del agente antiinfectivo con una disolución o mezcla de lípido-alcohol a una temperatura por debajo de la transición de fase de al menos uno de los componentes lipídicos del lípido neutro, en donde la infusión se realiza desde arriba. En ciertas realizaciones, el alcohol es etanol.

15 En ciertas realizaciones, la concentración de la disolución o mezcla de lípido-alcohol es de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 mg/ml. En ciertas realizaciones, la concentración de la disolución o mezcla acuosa u alcohólica de agente antiinfectivo es de aproximadamente 20 a aproximadamente 70 mg/ml. En ciertas realizaciones, la concentración de la disolución o mezcla de lípido neutro-alcohol es de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 mg/ml y la concentración de la disolución o mezcla acuosa u alcohólica de agente antiinfectivo es de aproximadamente 20 a aproximadamente 70 mg/ml. Sin embargo, quien tiene una experiencia normal en la técnica apreciará que las concentraciones pueden variar o, en cualquier caso, ser optimizadas dependiendo del lípido y/o el agente antiinfectivo implicados.

20 La presente invención se refiere a la formulación lipídica anteriormente mencionada, en donde el agente antiinfectivo es un aminoglicósido. En otra realización, el agente antiinfectivo es un aminoglicósido seleccionado de entre los siguientes: amikacina, gentamicina y tobramicina. En otra realización, el agente antiinfectivo es amikacina. En otra realización, el agente antiinfectivo es gentamicina. En otra realización, el agente antiinfectivo es tobramicina.

25 En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a la formulación lipídica anteriormente mencionada, en donde la formulación lipídica es un liposoma.

30 La presente invención se refiere a la formulación lipídica anteriormente mencionada, en donde la formulación lipídica comprende un fosfolípido y un estero. En ciertas realizaciones, la formulación lipídica comprende dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC). En ciertas realizaciones, la formulación lipídica comprende colesterol. En ciertas realizaciones, la formulación lipídica comprende DPPC y colesterol. En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a la formulación anteriormente mencionada, en donde la formulación lipídica comprende DPPC, dioleoilfosfatidilcolina (DOPC) y colesterol.

En ciertas realizaciones, la formulación lipídica comprende DPPC y colesterol en una relación molar de aproximadamente 20:1, 10:1, 5:1, 2:1 o 1:1.

35 En ciertas realizaciones, la formulación lipídica comprende DPPC, DOPC y colesterol en una relación molar de aproximadamente 5-20 : 1-20 : 0,5-1.

En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a la formulación lipídica anteriormente mencionada, en donde la formulación lipídica es un liposoma y el agente antiinfectivo es amikacina.

40 En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a la formulación lipídica anteriormente mencionada, en donde la formulación lipídica es un liposoma, el agente antiinfectivo es amikacina, y la formulación lipídica comprende un fosfolípido y un estero.

En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a la formulación lipídica anteriormente mencionada, en donde la formulación lipídica es un liposoma, el agente antiinfectivo es amikacina, y la formulación lipídica comprende una DPPC y un colesterol.

45 En otra realización, la presente invención se refiere a un método para preparar una formulación lipídica que comprende un agente antiinfectivo, que comprende: mezclar una corriente de una disolución o mezcla de lípido con una corriente de una disolución o mezcla de agente antiinfectivo, en donde las dos corrientes se mezclan en línea. En ciertas realizaciones, las dos corrientes entran en un conector en Y antes del mezclamiento en línea.

50 En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere al método anteriormente mencionado, en donde la corriente de una disolución o mezcla de lípido y la corriente de una disolución o mezcla de agente antiinfectivo se mezclan a un caudal total de aproximadamente 700 a aproximadamente 900 ml/min. En ciertas realizaciones, la corriente de una disolución o mezcla de lípido y la corriente de una disolución o mezcla de agente antiinfectivo se mezclan a un

- caudal total de aproximadamente 800 ml/min. En ciertas realizaciones, la corriente de una disolución o mezcla de lípido se añade a un caudal de aproximadamente 200 a aproximadamente 400 ml/min. En ciertas realizaciones, la corriente de una disolución o mezcla de lípido se añade a un caudal de aproximadamente 300 ml/min. En ciertas realizaciones, la corriente de una disolución o mezcla de agente antiinfectivo se añade a un caudal de aproximadamente 400 a aproximadamente 600 ml/min. En ciertas realizaciones, la corriente de una disolución o mezcla de agente antiinfectivo se añade a un caudal de aproximadamente 500 ml/min. En ciertas realizaciones, la corriente de una disolución o mezcla de lípido se añade a un caudal de aproximadamente 300 ml/min y la corriente de una disolución o mezcla de agente antiinfectivo se añade a un caudal de aproximadamente 500 ml/min.
- 5
- En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere al método anteriormente mencionado, en donde la temperatura de las corrientes combinadas es aproximadamente 30-40 °C. En ciertas realizaciones, la temperatura de la disolución o mezcla de lípido es aproximadamente 30 °C y la temperatura de la disolución o mezcla de agente antiinfectivo es aproximadamente 30 °C. En ciertas realizaciones, la temperatura de la disolución o mezcla de lípido es aproximadamente 50 °C y la temperatura de la disolución o mezcla de agente antiinfectivo es la temperatura ambiental.
- 10
- En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere al método anteriormente mencionado, en donde el método para preparar una formulación lipídica que comprenda un agente antiinfectivo comprende además la operación de diluir las corrientes combinadas con agua al menos aproximadamente 20 segundos después del mezclamiento.
- 15
- En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere al método anteriormente mencionado, en donde la concentración de la disolución o mezcla de agente antiinfectivo es de aproximadamente 30 a aproximadamente 50 mg/ml. En ciertas realizaciones, la concentración de la disolución o mezcla de agente antiinfectivo es de aproximadamente 40 a aproximadamente 50 mg/ml.
- 20
- En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere al método anteriormente mencionado, en donde la corriente de una disolución o mezcla de lípido se añade a un caudal de aproximadamente 300 ml/min y la corriente de una disolución o mezcla de agente antiinfectivo se añade a un caudal de aproximadamente 500 ml/min; la temperatura de las corrientes combinadas es aproximadamente 30-40 °C; las corrientes combinadas se diluyen con agua al menos aproximadamente 20 segundos después del mezclamiento; y la concentración de la disolución o mezcla de agente antiinfectivo es de aproximadamente 40 a aproximadamente 50 mg/ml.
- 25
- En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere al método anteriormente mencionado, en donde las disoluciones o mezclas son acuosas o alcohólicas. En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere al método anteriormente mencionado, en donde la formulación lipídica es un liposoma.
- 30
- La presente invención se refiere al método antes mencionado, en donde el agente antiinfectivo es un aminoglicósido. En ciertas realizaciones, el agente antiinfectivo es un aminoglicósido seleccionado de entre los siguientes: amikacina, gentamicina y tobramicina. En ciertas realizaciones, el agente antiinfectivo es amikacina. En ciertas realizaciones, el agente antiinfectivo es gentamicina. En ciertas realizaciones, el agente antiinfectivo es tobramicina.
- 35
- En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere al método anteriormente mencionado, en donde el lípido comprende un fosfolípido y un esteroil. En ciertas realizaciones, el lípido comprende DPPC. En ciertas realizaciones, el lípido comprende colesterol. En ciertas realizaciones, el lípido comprende DPPC y colesterol.
- En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere al método anteriormente mencionado, en donde la formulación lipídica es un liposoma y el agente antiinfectivo es amikacina.
- 40
- En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere al método antes mencionado, en donde la formulación lipídica es un liposoma, el agente antiinfectivo es amikacina, y el lípido comprende un fosfolípido y un esteroil.
- En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere al método anteriormente mencionado, en donde la formulación lipídica es un liposoma, el agente antiinfectivo es amikacina, y el lípido comprende DPPC y colesterol.
- 45
- La presente invención se refiere al método anteriormente mencionado, en donde la formulación lipídica tiene una relación de lípido a agente antiinfectivo de aproximadamente 0,75:1 o menos.
- En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere al método anteriormente mencionado, en donde la formulación lipídica es un liposoma, el agente antiinfectivo es amikacina, el lípido comprende DPPC y colesterol, y la relación de lípido a agente antiinfectivo es aproximadamente 0,75:1 o menos.
- 50
- En otra realización, la presente invención se refiere a la anteriormente mencionada formulación lipídica para uso en el tratamiento de infecciones pulmonares en un paciente que lo necesita, en donde una cantidad terapéuticamente eficaz de una formulación liposómica antiinfectiva que comprende una formulación lipídica y un agente antiinfectivo es para administración a un paciente, en donde la dosificación de agente antiinfectivo es aproximadamente 100

mg/día o menos. En otra realización, la cantidad de dosificación de agente antiinfectivo es de aproximadamente 30 mg a aproximadamente 50 mg cada dos días. En otra realización, la cantidad de dosificación de agente antiinfectivo es de aproximadamente 30 mg a aproximadamente 50 mg cada tres días.

5 En otra realización, la presente invención se refiere al uso anteriormente mencionado, en donde el liposoma tiene un diámetro medio de aproximadamente 0,2 μm a aproximadamente 1,0 μm . En otra realización, el liposoma tiene un diámetro medio de aproximadamente 0,2 μm a aproximadamente 0,5 μm , o de aproximadamente 0,2 μm a aproximadamente 0,3 μm .

En otra realización, la presente invención se refiere al uso anteriormente mencionado, en donde la infección pulmonar es un resultado de una fibrosis quística.

10 En otra realización, la presente invención se refiere al uso anteriormente mencionado, en donde la relación ponderal de lípido a agente antiinfectivo es 0,75:1 o menos.

La presente invención se refiere al uso anteriormente mencionado, en donde el agente antiinfectivo es un aminoglicósido. En otra realización, el agente antiinfectivo es amikacina.

15 En otra realización, la presente invención se refiere al uso anteriormente mencionado, en donde la formulación lipídica comprende lípidos neutros. En otra realización, todos los lípidos que componen la formulación lipídica son lípidos neutros. En otra realización, el liposoma está exento de lípidos aniónicos. La formulación lipídica comprende un fosfolípido y un esteroles. En otra realización, la formulación lipídica comprende DPPC y colesterol.

En otra realización, la presente invención se refiere al uso anteriormente mencionado, en donde el agente antiinfectivo es amikacina y la formulación lipídica comprende DPPC y colesterol.

20 En otra realización, la presente invención se refiere al uso anteriormente mencionado, en donde el agente antiinfectivo es amikacina, la relación ponderal de lípido a agente antiinfectivo es 0,75:1 o menos, y la formulación lipídica comprende DPPC y colesterol.

25 En otra realización, la presente invención se refiere al uso anteriormente mencionado, en donde el agente antiinfectivo es amikacina, la relación ponderal de lípido a agente antiinfectivo es 0,75:1 o menos, la formulación lipídica comprende DPPC y colesterol, y la infección pulmonar es un resultado de una fibrosis quística.

30 En otra realización, la presente invención se refiere al uso anteriormente mencionado, en donde el agente antiinfectivo es amikacina, la relación ponderal de lípido a agente antiinfectivo es 0,75:1 o menos, la formulación lipídica comprende DPPC y colesterol, y el liposoma tiene un diámetro medio de aproximadamente 0,2 μm a aproximadamente 1,0 μm . En una realización más, el diámetro medio es de aproximadamente 0,2 μm a aproximadamente 0,5 μm , o de aproximadamente 0,2 μm a aproximadamente 0,3 μm .

35 En otra realización, la presente invención se refiere al uso antes mencionado, en donde el agente antiinfectivo es amikacina, la relación ponderal de lípido a agente antiinfectivo es 0,75:1 o menos, la formulación lipídica comprende DPPC y colesterol, la infección pulmonar es el resultado de una fibrosis quística, y el liposoma tiene un diámetro medio de aproximadamente 0,2 μm a aproximadamente 1,0 μm . En una realización más, el diámetro medio es de aproximadamente 0,2 μm a aproximadamente 0,5 μm , o de aproximadamente 0,2 μm a aproximadamente 0,3 μm .

Estas realizaciones de la presente invención, otras realizaciones, y sus rasgos y características, resultarán evidentes a partir de la descripción, los dibujos y las reivindicaciones que vienen a continuación.

Breve descripción de los dibujos

40 La **Figura 1** representa el diagrama en corte transversal del esputo/biopelícula que se ve en pacientes con fibrosis quística.

La **Figura 2** describe la representación gráfica del efecto de direccionamiento y depósito del fármaco de la presente invención.

Las **Figuras 3 y 4** describen representaciones gráficas de la bacteriología de la amikacina en diversas formas.

45 La **Figura 5** describe una representación gráfica de la liberación ininterrumpida para amikacina liposómica/complejada y tobramicina.

La **Figura 6** representa datos sobre ciprofloxacino libre o complejo.

La **Figura 7** describe una representación gráfica de la permanencia del fármaco en el pulmón para varios programas de dosificación dados.

La **Figura 8** representa gráficamente el proceso de infusión en línea de dos corrientes para preparar formulaciones liposómicas antiinfectivas.

La **Figura 9** representa la miscibilidad del sulfato de amikacina con etanol/agua. Las líneas representan la concentración máxima de amikacina (base) miscible con disolución etanólica a temperatura ambiental (RT; del inglés, room temperature) y 40 °C. A concentraciones mayores la amikacina forma una fase líquida separada (coacervados), que precipita más tarde en forma de cristales. Las líneas verticales muestran la concentración de etanol en la mezcla de infusión de lípido/amikacina (300/500 partes) y después de añadir 200 partes de agua.

Descripción detallada

La presente invención describe una formulación lipídica que comprende un agente antiinfectivo, en donde el tamaño y las relaciones de lípido a fármaco son menores que los previamente conocidos. La presente invención también describe un método para preparar estas formulaciones lipídicas.

1. Definiciones

Por conveniencia, antes de una descripción ulterior de la presente invención, se recogen aquí ciertos términos empleados en la memoria descriptiva, los ejemplos y las reivindicaciones adjuntas. Estas definiciones se deberían leer a la luz del resto de la descripción y se deberían entender como lo haría una persona con experiencia en la técnica. A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en esta memoria tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por una persona con experiencia normal en la técnica.

Los artículos "un" y "una" se usan en esta memoria para referirse a uno o a más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

El término "biodisponible" está reconocido en la técnica y se refiere a una forma de la invención objetivo que permite que ésta, o una porción de la cantidad administrada, sea absorbida por, se incorpore a, o, en cualquier caso, esté fisiológicamente disponible para, un sujeto o paciente al cual se administra.

Los términos "comprender" y "que comprende" se usan en el sentido abierto inclusivo, significando que pueden estar incluidos elementos adicionales.

Los términos "encapsulado" y "encapsulación" se refieren a la adsorción de agentes antiinfectivos en la superficie de una formulación de base lipídica, la asociación de agentes antiinfectivos en la región intersticial de bicapas o entre dos monocapas, la captura de agentes antiinfectivos en el espacio entre dos bicapas, o la captura de agentes antiinfectivos en el espacio rodeado por la bicapa o monocapa más interna.

La expresión "que incluye" se emplea en esta memoria para significar "que incluye pero no se limita a". "Que incluye" y "que incluye pero no se limita a" se usan indistintamente.

La expresión "formulación lipídica antiinfectiva", o "Lip-antiinfectivo" o "Lip-An" discutida en esta memoria es cualquier forma de composición antiinfectiva en que al menos aproximadamente el 1% en peso del agente antiinfectivo está asociado con el lípido, sea como parte de un complejo con el lípido o sea como un liposoma en que el antibiótico puede estar en la fase acuosa o en la fase hidrófoba de la bicapa o en la región interfacial de grupos de cabeza de la bicapa liposómica. Preferiblemente, puede estar así asociado al menos aproximadamente el 5%, o al menos aproximadamente el 10%, o al menos aproximadamente el 20% o al menos aproximadamente el 25%. La asociación puede ser medida por separación a través de un filtro en el que queda retenido el lípido y el agente antiinfectivo asociado con el lípido, quedando el agente antiinfectivo libre en el filtrado. Una "formulación liposómica antiinfectiva" es una formulación lipídica antiinfectiva en donde la formulación lipídica está en forma de un liposoma.

El término "mamífero" es conocido en la técnica, y los mamíferos ejemplares incluyen seres humanos, primates, animales bovinos, animales porcinos, animales caninos, animales felinos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas).

Un "paciente", "sujeto" o "huésped" que se va a tratar mediante el método objetivo puede significar un ser humano o un animal no humano.

La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" está reconocida en la técnica y se refiere a las sales relativamente atóxicas de compuestos por adición de ácidos inorgánicos y orgánicos, incluyendo, por ejemplo, las contenidas en composiciones de la presente invención.

La expresión "infusión en disolvente" es un proceso que incluye disolver uno o más lípidos en una cantidad pequeña, preferiblemente mínima, de un disolvente compatible con el proceso, para formar una suspensión o disolución lipídica (preferiblemente una disolución), y añadir luego la disolución a un medio acuoso que contiene agentes bioactivos. Típicamente, un disolvente compatible con el proceso es uno que puede ser eliminado por lavado en un proceso acuoso tal como la diálisis. La composición que está en ciclos de frío/calor se forma preferiblemente por

infusión en disolvente, prefiriéndose la infusión en etanol. Como disolventes se prefieren los alcoholes. La "infusión en etanol", un tipo de infusión en disolvente, es un proceso que incluye disolver uno o más lípidos en una cantidad pequeña, preferiblemente mínima, de etanol para formar una disolución lipídica, y añadir luego la disolución a un medio acuoso que contiene agentes bioactivos. Una cantidad "pequeña" de disolvente es una cantidad compatible con la formación de liposomas o complejos lipídicos en el proceso de infusión. La expresión "infusión en disolvente" también puede incluir un proceso de infusión en línea donde se mezclan primero en línea dos corrientes de componentes de formulación.

La expresión "sustancialmente exento" está reconocida en la técnica y se refiere a una cantidad insignificante o menos.

La expresión "agente terapéutico" está reconocida en la técnica y se refiere a cualquier componente químico que es una sustancia biológica, fisiológica o farmacológicamente activa que actúa local o sistémicamente en un sujeto. Los ejemplos de agentes terapéuticos, a los que también se hace referencia como "fármacos", se describen en referencias bibliográficas bien conocidas tales como "The Merck Index", "The Physicians Desk Reference" y "The Pharmacological Basis of Therapeutics", e incluyen, sin limitación, medicamentos; vitaminas; suplementos minerales; sustancias usadas para el tratamiento, la prevención, el diagnóstico, la curación o la mitigación de una enfermedad o un mal; sustancias que afectan a la estructura o función del organismo; y profármacos, que se vuelven biológicamente activos o más activos una vez que se han situado en un ambiente fisiológico.

La frase "cantidad terapéuticamente eficaz", como se emplea en esta memoria, significa la cantidad de un compuesto, material, o composición que comprende una formulación lipídica antiinfectiva de acuerdo con la presente invención, que es eficaz para producir cierto efecto terapéutico deseado al inhibir infecciones pulmonares.

El término "tratar" está reconocido en la técnica y se refiere a curar así como mejorar al menos un síntoma de cualquier estado o enfermedad. El término "tratar" también se refiere a un tratamiento profiláctico que actúa para defender de, o evitar, un estado o una enfermedad.

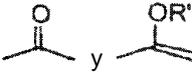
2. Agentes antiinfectivos

Los agentes antiinfectivos son agentes que actúan contra infecciones, tales como infecciones bacterianas, micobacterianas, fúngicas, víricas o protozoarias. Los agentes antiinfectivos abarcados por la invención son aminoglicósidos (por ejemplo, estreptomina, gentamicina, tobramicina, amikacina, netilmicina, kanamicina, y similares), tetraciclinas (tales como clortetraciclina, oxitetraciclina, metaciclina, doxiciclina, minociclina y similares), sulfonamidas (por ejemplo, sulfanilamida, sulfadiazina, sulfametoxazol, sulfisoxazol, sulfacetamida, y similares), ácido para-aminobenzoico, diaminopirimidinas (tales como trimetoprima, a menudo usada junto con sulfametoxazol, pirazinamida, y similares), quinolonas (tales como ácido nalidíxico, cinoxacino, ciprofloxacino y norfloxacino y similares), penicilinas (tales como penicilina G, penicilina V, ampicilina, amoxicilina, bacampicilina, carbenicilina, carbenicilina indanólica, ticarcilina, azlocilina, mezlocilina, piperacilina, y similares), penicilinas resistentes a penicilinas (tales como meticilina, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina, nafcilina y similares), cefalosporinas de primera generación (tales como cefadroxilo, cefalexina, cefradina, cefalotina, cefapirina, cefazolina, y similares), cefalosporinas de segunda generación (tales como cefaclor, cefamandol, cefonicid, cefoxitina, cefotetán, cefuroxima, cefuroxima-axetilo, cefmetazol, cefprozilo, loracarbef, ceforanida, y similares), cefalosporinas de tercera generación (tales como cefepima, cefoperazona, cefotaxima, ceftizoxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefixima, cefpodoxima, ceftibuteno, y similares), otras beta-lactamas (tales como imipenem, meropenem, aztreonam, ácido clavulánico, sulbactam, tazobactam, y similares), inhibidores de betalactamasas (tales como el ácido clavulánico), cloranfenicol, macrólidos (tales como eritromicina, azitromicina, claritromicina, y similares), lincomicina, clindamicina, espectinomicina, polimixina B, polimixinas [tales como las polimixinas A, B, C, D, E1 (colistina A) y E2, las colistinas B y C, y similares], colistina, vancomicina, bacitracina, isoniazida, rifampina, etambutol, etionamida, ácido aminosalicílico, cicloserina, capreomicina, sulfonas (tales como dapsona, sulfoxona sódica, y similares), clofazimina, talidomida, y cualquier otro agente antibacteriano que pueda ser lipídicamente encapsulado. Los agentes antiinfectivos pueden incluir agentes antifúngicos, incluyendo antifúngicos poliénicos (tales como anfotericina B, nistatina, natamicina, y similares), flucitosina, imidazoles (tales como n-ticonazol, clotrimazol, econazol, ketoconazol, y similares), triazoles (tales como itraconazol, fluconazol, y similares), griseofulvina, terconazol, butoconazol, ciclopirox, ciclopirox olamina, haloprogina, tolnaftato, naftifina, terbinafina, y cualquier otro compuesto antifúngico que pueda ser lipídicamente encapsulado o complejo. La discusión y los ejemplos se dirigen esencialmente hacia la amikacina, pero no se pretende que el alcance de la solicitud quede limitado a este agente antiinfectivo. Se pueden utilizar combinaciones de fármacos.

También se describen sales y complejos farmacéuticamente aceptables de agentes antiinfectivos por adición como adecuados agentes antiinfectivos empleados en las formulaciones lipídicas antiinfectivas. En los casos en que los compuestos pueden tener uno o más centros quirales, a menos que se especifique otra cosa, se incluyen cada compuesto racémico único así como cada compuesto no racémico único.

En los casos en que los agentes antiinfectivos tienen dobles enlaces carbono-carbono insaturados, se incluyen tanto

el isómero cis (Z) como el trans (E). En los casos en que los agentes antiinfectivos pueden existir en formas

tautómeras, tales como tautómeros ceto-enólicos, tales como , se considera incluida cada forma tautómera, ya exista en equilibrio o ya esté bloqueada en una forma por una apropiada sustitución con R'. El significado de cualquier sustituyente en un caso cualquiera es independiente de su significado, o del significado de cualquier otro sustituyente, en otro caso cualquiera.

Como agentes antiinfectivos adecuados también se incluyen profármacos de los compuestos de platino. Se considera que los profármacos son cualesquier vehículos covalentemente enlazados que liberan el compuesto parental activo *in vivo*.

3. Infecciones pulmonares

- Entre las infecciones pulmonares (tales como en pacientes con fibrosis quística) que se pueden tratar de acuerdo con la invención están las infecciones por pseudomonas (por ejemplo, *P. aeruginosa*, *P. paucimobilis*, *P. putida*, *P. fluorescens* y *P. acidovorans*), estafilococos, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA; del inglés, methicillin resistant Staphylococcus aureus), estreptococos (incluyendo *Streptococcus pneumoniae*), *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Haemophilus*, *Yersinia pestis*, *Burkholderia pseudomallei*, *B. cepacia*, *B. gladioli*, *B. multivorans*, *B. vietnamiensis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium complex* (MAC) (*M. avium* y *M. intracellulare*), *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. marinum*, *M. ulcerans*, y *M. fortuitum complex* (*M. fortuitum* y *M. chelonae*).

4. Métodos de tratamiento

En una realización, la presente invención comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una formulación lipídica antiinfectiva para uso en medicina.

- Cuando más adelante no se proporciona una dosificación específica, la dosificación preferida de la invención es el 50% o menos, el 35% o menos, el 20% o menos, o el 10% o menos, de la cantidad mínima de fármaco libre (que, por supuesto, puede ser una sal) que es eficaz, si se suministra a los pulmones por medio de un nebulizador, para reducir la cuenta de CFUs en los pulmones en un orden de magnitud a lo largo del curso de un tratamiento de 14 días. La cantidad comparativa de fármaco libre es la cantidad acumulada que se utilizaría en el periodo de dosificación aplicado con la administración de fármaco de la invención. El fármaco libre mínimo comparativo definido en este párrafo es una "cantidad comparativa de fármaco libre".

Las realizaciones de la invención para tratar estados que no son CF se pueden utilizar con cualquier animal, aunque preferiblemente con seres humanos. Las cantidades relativas en un animal dado se miden con respecto a dicho animal.

- El programa de dosificación es preferiblemente una vez al día o menos. En realizaciones preferidas, el programa de dosificación es una vez cada dos días, una vez cada tres días, una vez a la semana, o menos. Por ejemplo, el programa de dosificación puede ser cada dos días o menos usando el 50% o menos de la cantidad comparativa de fármaco libre; o, por ejemplo, la dosificación puede ser diaria usando el 35% o menos de la cantidad comparativa de fármaco libre. Véanse las Figuras 3 y 4 para datos con animales que muestran que las formulaciones lipídicas antiinfectivas de la presente invención son más eficaces que el fármaco libre.

- Para tratar infecciones, la cantidad eficaz del agente antiinfectivo será reconocida por los clínicos pero incluye una cantidad eficaz para tratar, reducir, mejorar, eliminar o prevenir uno o más síntomas de la enfermedad que se procura tratar o el estado que se procura evitar o tratar, o para, en cualquier caso, producir un cambio clínicamente reconocible en la patología de la enfermedad o el estado. La mejora incluye reducir la incidencia o gravedad de las infecciones en animales tratados profilácticamente. En ciertas realizaciones, la cantidad eficaz es una cantidad eficaz para tratar o mejorar después de que han surgido síntomas de infección pulmonar. En ciertas realizaciones distintas, la cantidad eficaz es una cantidad eficaz para tratar o mejorar la incidencia o gravedad media de las infecciones en animales tratados profilácticamente (según se mide mediante estudios estadísticos).

- Se pueden administrar liposomas u otros sistemas de suministro lipídicos por inhalación en forma de una composición pulverizable, un polvo o un aerosol nebulizados, o mediante administración intratecal. Se prefieren las administraciones por inhalación. El resultado global es una administración menos frecuente y un índice terapéutico potenciado en comparación con el fármaco libre o la forma parenteral del fármaco. Los liposomas u otras formulaciones lipídicas son particularmente ventajosos a causa de su capacidad para proteger el fármaco mientras son compatibles con el revestimiento del pulmón o el agente tensioactivo pulmonar.

- La presente invención incluye la formulación anteriormente mencionada para uso en el tratamiento de infecciones pulmonares por bacterias Gram negativas. Una infección útilmente tratada es la infección crónica por pseudomonas en pacientes con CF. Los tratamientos conocidos de infecciones pulmonares (tales como en pacientes con CF) con

aminoglicósido comprenden generalmente administrar aproximadamente 200 - 600 mg de amikacina o tobramicina al día por medio de inhalación. La presente invención permite el tratamiento administrando, en una realización preferida, 100 mg o menos de amikacina al día (o normalizado a 100 mg al día o menos si la dosificación es menos frecuente). En aún otra realización, se lleva a cabo la administración de 60 mg o menos de amikacina cada día. Y en aún otra realización, se lleva a cabo la administración de aproximadamente 30 a 50 mg no más de una vez cada 2 días. La realización más preferida comprende la administración de aproximadamente 30 a 50 mg cada dos días o cada tres días.

5. Lípidos y liposomas

Los lípidos usados en las composiciones de la presente invención pueden ser lípidos sintéticos, semisintéticos o de origen natural, incluyendo fosfolípidos, tocoferoles, esteroides, ácidos grasos, glicoproteínas tales como la albúmina, lípidos aniónicos y lípidos catiónicos. Los lípidos pueden ser aniónicos, catiónicos o neutros. En una realización, la formulación lipídica está sustancialmente exenta de lípidos aniónicos. En una realización, la formulación lipídica sólo comprende lípidos neutros. En otra realización, la formulación lipídica está exenta de lípidos aniónicos. La formulación lipídica de la invención comprende un fosfolípido y un esteroil. Los fosfolípidos incluyen fosfatidilcolina de huevo (EPC; del inglés, egg phosphatidylcholine), fosfatidilglicerol de huevo (EPG; del inglés, egg phosphatidylglycerol), fosfatidilinositol de huevo (EPI; del inglés, egg phosphatidylinositol), fosfatidilserina de huevo (EPS; del inglés, egg phosphatidylserine), fosfatidiletanolamina de huevo (EPE; del inglés, egg phosphatidylethanolamine) y ácido fosfatídico de huevo (EPA; del inglés, egg phosphatidic acid); los compuestos equivalentes de soja: fosfatidilcolina de soja (SPC; del inglés, soy phosphatidylcholine), SPG, SPS, SPI, SPE y SPA; los compuestos equivalentes de huevo y soja hidrogenados [por ejemplo, HEPC (del inglés, hydrogenated EPC) y HSPC]; otros fosfolípidos constituidos por enlaces éster de ácidos grasos en las posiciones 2 y 3 del glicerol que contienen cadenas de 12 a 26 átomos de carbono, y diferentes grupos de cabeza en la posición 1 del glicerol que incluyen colina, glicerol, inositol, serina, etanolamina así como los correspondientes ácidos fosfatídicos. Las cadenas de estos ácidos grasos pueden ser saturadas o insaturadas, y el fosfolípido puede estar compuesto por ácidos grasos con cadenas de longitudes diferentes y diferentes grados de insaturación. En particular, las composiciones de las formulaciones pueden incluir dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), un componente fundamental del agente tensioactivo pulmonar de origen natural, así como dioleoilfosfatidilcolina (DOPC). Otros ejemplos incluyen dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) y dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) y dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), diestearoilfosfatidilcolina (DSPC) y diestearoilfosfatidilglicerol (DSPG), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) y fosfolípidos mixtos como palmitoilestearoilfosfatidilcolina (PSPC) y palmitoilestearoilfosfatidilglicerol (PSPG), triacilglicerol, diacilglicerol, ceramida, esfingosina, esfingomielina y fosfolípidos monoacilados como monooleoil-fosfatidiletanolamina (MOPE).

Los lípidos empleados pueden incluir sales amónicas de ácidos grasos, fosfolípidos y glicéridos, esteroides, fosfatidilglicérols (PGs), ácidos fosfatídicos (PAs), fosfatidilcolinas (PCs), fosfatidilinositols (PIs) y fosfatidilserinas (PSs). Los ácidos grasos incluyen ácidos grasos con longitudes de cadena carbonada de 12 a 26 átomos de carbono, que son saturados o insaturados. Algunos ejemplos específicos incluyen: miristilamina, palmitilamina, laurilamina y estearilamina, dilauoil-etilfosfocolina (DLEP), dimiristoil-etilfosfocolina (DMEP), dipalmitoil-etilfosfocolina (DPEP) y diestearoil-etilfosfocolina (DSEP), cloruro de N-{2,3-di-[9(Z)-octadeceniloxi]-prop-1-il}-N,N-trimetilamonio (DOTMA) y 1,2-bis(oleoiloxi)-3-(trimetilamonio)propano (DOTAP). Los ejemplos de esteroides incluyen colesterol y ergosterol. Los ejemplos de PGs, PAs, PIs, PCs y PSs incluyen DMPG, DPPG, DSPG, DMPA, DPPA, DSPA, DMPI, DPPI, DSPI, DMPS, DPPS y DSPS, DSPC, DPPG, DMPC, DOPC y PC de huevo.

Los liposomas o formulaciones lipídicas antiinfectivas compuestos de fosfatidilcolinas, tales como DPPC, facilitan la incorporación por las células del pulmón, tales como los macrófagos alveolares, y ayudan a la liberación ininterrumpida del agente antiinfectivo en el pulmón [Gonzales-Rothi et al. (1991)]. Los lípidos negativamente cargados tales como los PGs, PAs, PSs y PIs, además de reducir la agregación de partículas, pueden desempeñar un papel en las características de liberación ininterrumpida de la formulación para inhalación así como en el transporte de la formulación a través del pulmón (transcitosis) para su incorporación sistémica. Se cree que los compuestos de esteroil afectan a las características de liberación y filtración de la formulación.

Los liposomas son membranas de bicapa lipídica completamente cerradas que contienen un volumen acuoso encerrado. Los liposomas pueden ser vesículas unilaminares (que poseen una sola bicapa de membrana) o vesículas multilaminares (estructuras de tipo cebolla caracterizadas por múltiples bicapas de membrana, cada una separada de la siguiente por una capa acuosa). La bicapa está compuesta de dos monocapas lipídicas que tienen una región hidrófoba de "cola" y una región hidrófila de "cabeza". La estructura de la bicapa de membrana es tal que las "colas" hidrófobas (apolares) de las monocapas lipídicas se orientan hacia el centro de la bicapa mientras las "cabezas" hidrófilas se orientan hacia la fase acuosa. Las formulaciones lipídicas antiinfectivas son asociaciones de lípido y el agente antiinfectivo. Esta asociación puede ser covalente, iónica, electrostática, no covalente, o estérica. Estos complejos no son liposómicos y son incapaces de encerrar solutos adicionales solubles en agua. Los ejemplos de tales complejos incluyen complejos lipídicos de anfotericina B (Janoff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 6122-6126, 1988) y cardioplipina complejada con doxorubicina.

Un clatrato lipídico es una estructura tridimensional de tipo jaula en que se emplean uno o más lípidos, en donde la estructura encierra un agente bioactivo. Tales clatratos están incluidos en el alcance de la presente invención.

Los proliposomas son formulaciones que se pueden convertir en liposomas o complejos lipídicos tras entrar en contacto con un líquido acuoso. Puede ser necesaria una agitación u otro mezclado. Dichos proliposomas están incluidos en el alcance de la presente invención.

Se pueden producir liposomas mediante una diversidad de métodos [véase, por ejemplo, Bally, Cullis et al., *Biotechnol. Adv.* 5 (1): 194, 1987]. El procedimiento de Bangham [*J. Mol. Biol.* 13 (1): 238-52, 1965] permite producir vesículas multilaminares (MLVs; del inglés, multilamellar vesicles) ordinarias. Lenk et al. (Patentes de EE.UU. números 4.522.803, 5.030.453 y 5.169.637), Fountain et al. (Patente de EE.UU. nº 4.588.578) y Cullis et al. (Patente de EE.UU. nº 4.975.282) describen métodos para producir liposomas multilaminares que tienen una distribución interlaminar de solutos sustancialmente igual en cada uno de sus compartimentos acuosos. Paphadjopoulos et al., Patente de EE.UU. nº 4.235.871, describen la preparación de liposomas oligolaminares mediante evaporación de fase inversa.

Se pueden producir vesículas unilaminares a partir de MLVs mediante una diversidad de técnicas, tales como, por ejemplo, las extrusiones de Cullis et al. (Patente de EE.UU. nº 5.008.050) y Loughrey et al. (Patente de EE.UU. nº 5.059.421). Se pueden utilizar la sonicación y la homogeneización para producir liposomas unilaminares más pequeños a partir de liposomas más grandes (véanse, por ejemplo, Paphadjopoulos et al., *Biochim. Biophys. Acta* 135: 624-638, 1967; Deamer, Patente de EE.UU. nº 4.515.736; y Chapman et al., *Liposome Technol.*, 1984, páginas 1-18).

La preparación original de liposomas de Bangham et al. (*J. Mol. Biol.*, 1965, 13: 238-252) implica suspender fosfolípidos en un disolvente orgánico que es luego evaporado hasta sequedad para dejar una película de fosfolípido en el recipiente de reacción. A continuación, se añade una cantidad apropiada de fase acuosa, se deja que la mezcla se "hinche" y se dispersan por medios mecánicos los liposomas resultantes que consisten en vesículas multilaminares (MLVs). Esta preparación proporciona la base para el desarrollo de las pequeñas vesículas unilaminares sometidas a sonicación descritas por Paphadjopoulos et al. (*Biochim. Biophys. Acta*, 1967, 135: 624-638) y las vesículas unilaminares grandes.

Para producir liposomas se pueden utilizar técnicas para producir vesículas unilaminares grandes (LUVs; del inglés, large unilamellar vesicles), tales como evaporación de fase inversa, procedimientos de infusión, y dilución con detergente. En el texto "Liposomes", redactado por Marc Ostro, Marcel Dekker, Inc., New York, 1983, capítulo 1, se puede hallar una revisión de estos y otros métodos para producir liposomas. Véase también Szoka, Jr. et al. (1980, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9: 467).

Otras técnicas que se utilizan para preparar vesículas incluyen aquellas que permiten formar vesículas por evaporación de fase inversa (REV; del inglés, reverse-phase evaporation vesicles) (Paphadjopoulos et al., Patente de EE.UU. nº 4.235.871). Otra clase de liposomas que se puede utilizar es la de aquellos caracterizados por tener una distribución laminar de solutos sustancialmente igual. Esta clase de liposomas es denominada vesículas plurilaminares estables (SPLV; del inglés, stable plurilamellar vesicles), como se define en la Patente de EE.UU. nº 4.522.803, concedida a Lenk et al., e incluye vesículas monofásicas como las descritas en la Patente de EE.UU. nº 4.588.578, concedida a Fountain et al., y vesículas multilaminares congeladas y descongeladas (FATMLV; del inglés, frozen and thawed multilamellar vesicles) como las anteriormente descritas.

Para formar liposomas se ha empleado una diversidad de esteroides y sus derivados solubles en agua, tal como el hemisuccinato de colesterol; véase específicamente Janoff et al., Patente de EE.UU. nº 4.721.612, expedida el 26 de enero de 1988, titulada "Steroidal Liposomes". Mayhew et al. describieron un método para reducir la toxicidad de agentes antibacterianos y agentes antivirales encapsulándoles en liposomas que comprendían alfa-tocoferol y ciertos derivados del mismo. Además, para formar liposomas se ha empleado una diversidad de tocoferoles y sus derivados solubles en agua; véase Janoff et al., Patente de EE.UU. nº 5.041.278.

6. Métodos de preparación

Un proceso para formar liposomas o formulaciones lipídicas antiinfectivas implica un proceso de "infusión en disolvente". Éste es un proceso que incluye disolver uno o más lípidos en una cantidad pequeña, preferiblemente mínima, de un disolvente compatible con el proceso, para formar una suspensión o disolución lipídica (preferiblemente una disolución), e infundir luego la disolución en un medio acuoso que contiene el agente antiinfectivo. Típicamente, un disolvente compatible con el proceso es uno que puede ser eliminado por lavado en un proceso acuoso tal como la diálisis o la diafiltración. La "infusión en etanol", un tipo de infusión en disolvente, es un proceso que incluye disolver uno o más lípidos en una cantidad pequeña, preferiblemente mínima, de etanol para formar una disolución lipídica, e infundir luego la disolución en un medio acuoso que contiene el agente antiinfectivo. Una cantidad "pequeña" de disolvente es una cantidad compatible con la formación de liposomas o complejos lipídicos en el proceso de infusión. Dichos procedimientos se describen en Lee et al., Solicitud de Patente de EE.UU.

nº 10/634.144, presentada el 4 de agosto de 2003; Pilkiewicz et al., Solicitud de Patente de EE.UU. nº 10/383.173, presentada el 5 de marzo de 2003; y Boni et al., Solicitud de Patente de EE.UU. nº 10/383.004, presentada el 5 de marzo de 2003.

5 La operación de infundir la disolución de lípido-alcohol en la disolución o mezcla acuosa u alcohólica que contiene el agente antiinfectivo puede ser llevada a cabo por encima o por debajo de la superficie de la disolución o mezcla acuosa u alcohólica que contiene el agente antiinfectivo. Preferiblemente, la operación se lleva a cabo por encima de la superficie de la disolución o mezcla.

10 También se pueden preparar liposomas mediante los métodos descritos en las Solicitudes de Patente de EE.UU. en tramitación con la presente: 10/383.004, presentada el 5 de marzo de 2003; 10/634.144, presentada el 4 de agosto de 2003; 10/224.293, presentada el 20 de agosto de 2002; y 10/696.389, presentada el 29 de octubre de 2003.

15 Se puede ajustar el tamaño de los liposomas o las formulaciones lipídicas mediante una diversidad de métodos, tal como mediante técnicas de extrusión, sonicación y homogeneización que son bien conocidas y fácilmente llevadas a la práctica por los técnicos normalmente expertos. La extrusión implica hacer pasar los liposomas, bajo presión, una o más veces a través de filtros que tienen tamaños de poro definidos. Los filtros están generalmente hechos de policarbonato, pero los filtros pueden estar hechos de cualquier material duradero que no interaccione con los liposomas y que sea lo suficientemente fuerte para permitir la extrusión bajo una presión suficiente. Los filtros preferidos incluyen los filtros de "paso recto" porque, en general, pueden resistir la mayor presión de los procesos de extrusión preferidos de la presente invención. También se pueden utilizar filtros de "paso tortuoso". En la extrusión también se pueden utilizar filtros asimétricos, tales como filtros Anopore™, lo que implica extruir los liposomas a través de un filtro poroso de óxido de aluminio de tipo poro ramificado.

20 También se puede reducir el tamaño de los liposomas o las formulaciones lipídicas mediante sonicación, en la que se emplea energía sónica para alterar o fragmentar los liposomas, los cuales se reformarán espontáneamente hasta liposomas más pequeños. La sonicación se lleva a cabo sumergiendo un tubo de vidrio que contiene la suspensión de liposomas en el epicentro sónico producido en un sonicador de tipo baño. Alternativamente, se puede utilizar un sonicador de tipo sonda, en el cual se genera energía sónica por vibración de una sonda de titanio en contacto directo con la suspensión de liposomas. También se pueden utilizar aparatos para homogeneización y trituración, tales como el homogeneizador Gifford Wood, Polytron™ o Microfluidizer, para romper los liposomas o las formulaciones lipídicas más grandes hasta liposomas o formulaciones lipídicas más pequeñas.

25 Las formulaciones liposómicas resultantes pueden ser separadas en poblaciones homogéneas usando métodos bien conocidos en la técnica, tal como la filtración en flujo tangencial. En este procedimiento, se hace pasar una población de liposomas o formulaciones lipídicas de tamaño heterogéneo a través de filtros de flujo tangencial, lo que da lugar a una población de liposomas con unos límites superior y/o inferior. Cuando se emplean dos filtros de tamaños diferentes, es decir, que tienen diámetros de poro diferentes, los liposomas más pequeños que el primer diámetro de poro atraviesan el filtro. Este filtrado puede ser luego sometido a filtración en flujo tangencial a través de un segundo filtro que tiene un tamaño de poro más pequeño que el del primer filtro. El producto de retención de este filtro es una población liposómica/complejada que tiene tamaños con límites superior e inferior definidos por los tamaños de poro de los filtros primero y segundo, respectivamente.

30 Mayer et al. hallaron que los problemas asociados con el encerramiento eficaz de agentes bioactivos ionizables lipófilos tales como agentes antineoplásicos, por ejemplo, antraciclinas o alcaloides de *Vinca*, pueden ser mitigados empleando gradientes iónicos transmembranales. Aparte de inducir una mayor incorporación, dichos gradientes transmembranales pueden actuar también para aumentar la retención de agente antiinfectivo en la formulación liposómica.

35 Las formulaciones lipídicas antiinfectivas presentan un efecto antiinfectivo ininterrumpido y una menor toxicidad, lo que permite una administración menos frecuente y un índice terapéutico potenciado. En estudios preclínicos con animales y en comparación con la tobramicina inhalada (de base no liposómica ni lipídica) en el nivel de dosis equivalente, se mostró que la amikacina liposómica presentaba, durante el período de tiempo que va desde poco después de la administración hasta más de 24 horas más tarde, unos niveles de fármaco en el pulmón que variaban de dos a varios cientos de veces los de la tobramicina. Además, la amikacina liposómica se mantenía en estos niveles durante más de 24 horas. En un modelo animal diseñado para remedar la infección por pseudomonas que se ve en pacientes con CF, se mostró que la amikacina liposómica elimina significativamente la infección en los pulmones de los animales en comparación con los aminoglicósidos libres.

40 El agente tensioactivo pulmonar permite la expansión y compresión de los pulmones durante la respiración. Esto se lleva a cabo revistiendo el pulmón con una combinación de lípido y proteína. El lípido se presenta como una monocapa con las cadenas hidrófobas dirigidas hacia fuera. El lípido representa el 80% del agente tensioactivo pulmonar, siendo fosfatidilcolina la mayoría del lípido, el 50% de la cual es dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) (Veldhuizen et al., 1998). Las proteínas tensioactivas (SP; del inglés, surfactant proteins) que están presentes actúan para mantener la estructura y facilitar tanto la expansión como la compresión del agente tensioactivo

pulmonar, como ocurre durante la respiración. De estas proteínas, SP-B y SP-C tienen específicamente un comportamiento lítico y pueden lisar liposomas (Hagwood et al., 1998; Johansson, 1998). Este comportamiento lítico podría facilitar la rotura gradual de los liposomas. Los liposomas pueden ser también directamente ingeridos por macrófagos por medio de fagocitosis (Couveur et al., 1991; Gonzales-Roth et al., 1991; Swenson et al., 1991). La absorción de liposomas por macrófagos alveolares es otro medio mediante el cual se pueden suministrar fármacos al sitio morbosos.

Los lípidos preferiblemente empleados para formar formulaciones liposómicas o lipídicas para inhalación son comunes a los lípidos endógenos hallados en el agente tensioactivo pulmonar. Los liposomas están compuestos por bicapas que encierran el producto farmacéutico deseado. Estos pueden ser configurados como vesículas multilaminares de bicapas concéntricas con el producto farmacéutico encerrado dentro del lípido de las diferentes capas o dentro del espacio acuoso entre las capas. En la presente invención se utilizan procesos únicos para crear formulaciones liposómicas o lipídicas antiinfectivas únicas. Tanto los procesos como el producto de estos procesos son parte de la presente invención.

6.1. Método de infusión en línea

En una realización particularmente preferida, las formulaciones liposómicas antiinfectivas de la presente invención se preparan mediante un método de infusión en línea en el que una corriente de disolución de lípido se mezcla en línea con una corriente de disolución de agente antiinfectivo. Por ejemplo, las dos disoluciones se pueden mezclar en línea dentro de un tubo de mezclamiento precedido por un conector en Y, como se representa en la Figura 8. De esta manera, el método de infusión en línea difiere del método de infusión anteriormente descrito, en el que la disolución de lípido se infunde como una corriente en un volumen de disolución de agente antiinfectivo. Sorprendentemente, este método de infusión da lugar a menores relaciones de lípido a fármaco y mayores eficacias de encapsulación. El proceso puede ser adicionalmente mejorado optimizando parámetros tales como el caudal, la temperatura, la concentración de agente antiinfectivo, y la adición de sal después de la operación de infusión.

6.1.a. Efecto de los caudales

Se variaron los caudales individuales mientras se mantenía el caudal total a 800 ml/min. Para hacer esto se utilizaron dos bombas distintas ajustadas a diferentes velocidades de bombeo. Las disoluciones mixtas fueron infundidas durante 10 segundos en un vaso de precipitados que contenía una disolución de NaCl tal que la concentración final de NaCl era 1,5% y la concentración final de etanol no excedía de 30%. Después de el mezclamiento, se desarrolló una parte alícuota de 1 ml a través de una columna de Sephadex-G75 para filtración en gel, para separar la amikacina libre de la encapsulada. Para un análisis ulterior se recogió una fracción de 1 ml con la máxima densidad (determinada visualmente por la turbiedad). Los resultados se presentan en la Tabla 1. El aumento de la relación de caudales de lípido/amikacina dio lugar a una relación L/D casi constante hasta 300/500 ml/min. Con más aumento del caudal de lípido, la relación L/D comenzó a aumentar y el tamaño de partícula también comenzó a hacerse más grande. Al mismo tiempo, mayores caudales de lípido proporcionaron una mejor recuperación de amikacina (eficacia de encapsulación) ya que se añadía más masa de lípido.

Tabla 1. Efecto de los caudales sobre la encapsulación de amikacina* (ejemplos comparativos).

Tanda	Caudales ml/min		AMK total mg/ml	AMK libre %	Lípido mg/ml	L/D	Tamaño VOL	Recuperación de AMK %
	AMK	Lípido						
1	600	200	1,38	5,3	1,25	0,91	289	14,7
2	550	250	1,80	5,1	1,90	1,06	305	17,2
3	500	300	2,18	5,2	2,29	1,05	314	22,8
4	450	350	1,27	5,8	1,47	1,16	388	26,8
5	400	400	1,05	6,1	1,69	1,61	471	24,9

*Las disoluciones de lípido y de amikacina se mantuvieron a 40 °C. La disolución madre de amikacina tenía una concentración de 50 mg/ml. Se añadió una disolución de NaCl al 10% antes de la infusión para obtener una concentración final de 1,5%. Se ajustó el tiempo de infusión a 10 segundos. Tubo de mezclamiento de 10 cm; mezcladora en línea de 6 elementos situada a 0 cm.

La tanda 3 con los caudales de lípido/amikacina de 300/500 ml/min mostró la relación L/D y el tamaño de partícula mejores, combinados con una recuperación de amikacina razonablemente elevada. Por lo tanto, se decidió usar estos caudales para todos los experimentos ulteriores.

Con objeto de reproducir los resultados en las condiciones elegidas, se preparó una tanda totalmente lavada (tanda 6) usando diafiltración, como se presenta en la Tabla 2. Se añadió una disolución de NaCl al 10% al vaso de

precipitados antes de la infusión para alcanzar una concentración final de 2% (en comparación con el 1,5% en las tandas de la Tabla 1). La relación L/D resultante (1,71) no fue tan buena como en la tanda 3 de la Tabla 1 y el tamaño de partícula fue mayor. Esto puede ser debido a un efecto negativo de la elevada concentración de NaCl que entra en contacto con los liposomas en las primeras fases de la formación de los liposomas. Las muestras sometidas a separación (lavadas) usando columnas para filtración en gel tienden a tener mejores relaciones L/D que las lavadas mediante diafiltración. Esto puede tener que ver con el diferente grado de estrés que experimentan los liposomas o, simplemente, las muestras sometidas a separación en la columna para filtración en gel contenían una fracción de liposomas con mejor relación L/D que no representa a la población completa.

Tabla 2. Sumario de las tandas completamente lavadas*. Los parámetros de procesamiento variados fueron: temperaturas, concentración de la disolución madre de amikacina y otros (véase más adelante la Tabla 3). Todas las tandas se concentraron hasta un grado casi máximo, hasta que la presión de entrada alcanzó un valor de 68,95 kPa.

Tanda	Temp., °C L/AMK/W	Disolución madre de AMK mg/ml	AMK total mg/ml	AMK libre %	Lípido mg/ml	L/D	Tamaño VOL nm	Tamaño SD %
6	40/40/30	50	36,1	2,7	61,8	1,71	392	43,4
8	50/RT/30	50	48,5	9,6	49,3	1,02	332	32,0
9	50/RT/30	50	41,6	5,1	43,2	1,04	359	34,4
10	50/RT/30	50	53,1	10,2	34,4	0,65	350	28,6
11	50/RT/30	40	20,7	4,8	46,9	2,27	407	35,9
12	50/RT/30	40	81,0	1,9	49,4	0,61	341	33,0
13	50/RT/30	30	68,6	1,7	62,5	0,91	311	22,4
14	50/RT/30	40	79,6	1,6	47,8	0,60	346	37,2
15	50/RT/30	40	71,3	2,0	42,3	0,59	353	33,4
16	30/30/30	40	61,9	6,1	51,5	0,83	369	28,4
17	30/30/30	40	73,8	2,4	57,2	0,77	362	32,6
18	30/30/30	40	74,4	2,3	54,0	0,73	549	61,7

*La segunda columna representa las temperaturas de las disoluciones de Lípido y de Amikacina justo antes de la infusión, y la temperatura durante el lavado (W; del inglés, washing) (diafiltración). RT = temperatura ambiental. "Tamaño VOL" es el tamaño de partícula volúmicamente ponderado.

Tabla 3. Condiciones de procesamiento para las tandas 1-18*.

Tanda	Tubo de mezclamiento cm	Posición de la mezcladora cm	NaCl añadido			Condiciones de lavado	
			Disolución madre %	Volumen partes	Momento respecto a la infusión	NaCl %	1 ^{er} lavado
1-5	10	0	VAR	VAR	antes	1,5	(columna de Seph.)
6	10	0	10	200	antes	1,5	diafiltración
7	10	5	10	100	antes	1,5	(columna de Seph.)
8	10	5	10	150	durante	1,5	diafiltración
9	10	5	10	150	durante	1,5	diafiltración
10	10	5	10	100	5' después	1,5	dilución 2x
11	10	5	10	150	después inm.	1,5	dilución 2x
12	10	5	H ₂ O	180	20" después	1,5	dilución 2x
13	10	5	H ₂ O	180	30" después	1,5	dilución 2x
14	10	5	H ₂ O	180	30" después	1,5	diafiltración
15	10	5	1,5	180	30" después	1,5	diafiltración
16	60	NO	0,9	180	durante	0,9	diafiltración
17	60	NO	1,5	180	durante	1,5	diafiltración
18	60	0	1,5	180	durante	1,5	diafiltración

*Las disoluciones de lípido y de amikacina se infundieron a caudales de 300/500 ml/min durante 30 segundos (Ejemplos 6-10) o 20 segundos (Ejemplos 11-18). Se añadió una disolución acuosa adicional (NaCl o agua) (como partes relativas a 500 partes de volumen de amikacina).

6.1.b. Efectos de la temperatura de procesamiento

Se mantuvieron los mismos ajustes que en la tanda 3 salvo por que la cantidad de disolución de NaCl añadida fue menor, haciendo que la concentración final fuera 1,0%. De nuevo se añadió la disolución antes de que se iniciara la infusión porque con el corto tiempo de infusión era difícil realizar la adición durante la infusión. Además, durante la infusión, la mezcladora en línea se desplazó al extremo del tubo de mezclado bajo la presión del flujo. La posición de la mezcladora fue 5 cm desde el extremo delantero del tubo en lugar de los 0 cm para la tanda 3. Esto puede ser importante ya que la relación L/D obtenida en la misma condición de temperaturas de 40/40 °C fue 0,55 en la tanda 20, casi la mitad de la relación en la tanda 3. Comparando la encapsulación de amikacina a diferentes temperaturas de infusión, se puede ver que, sorprendentemente, temperaturas más bajas proporcionaron mejores relaciones L/D. De las temperaturas ensayadas, las temperaturas de lípido/amikacina de 30/30 °C y 50 °C/RT proporcionaron relaciones L/D similares, de 0,32 y 0,37. De nuevo, como en las tandas 1-5, los números de estas muestras lavadas mediante filtración en gel fueron bajos, quizá menores que si las tandas hubieran sido lavadas por diafiltración.

Tabla 4. Efecto de la temperatura sobre la encapsulación de amikacina*.

Tanda	Temperatura, °C		AMK total mg/ml	AMK libre %	Lípido mg/ml	L/D	Tamaño VOL nm
	Lípido	AMK					
19	30	30	4,88	2,8	1,54	0,32	278
20	40	40	3,62	1,5	1,98	0,55	335
21	50	50	3,50	1,8	2,74	0,78	309
22	50	RT	5,27	2,9	1,93	0,37	342

*Las disoluciones de lípido y de amikacina se infundieron a caudales de 300/500 ml/min durante 10 segundos. La disolución madre de amikacina tenía una concentración de 50 mg/ml. Se añadió una disolución de NaCl al 10% antes de la infusión para obtener una concentración final de 1,0%. Tubo de mezclado de 10 cm; mezcladora en línea de 6 elementos situada a 5 cm.

En experimentos independientes, se halló que los mezclamientos de etanol al 90% y agua a 30 °C y 30 °C o a 50 °C y 22 °C, respectivamente, daban lugar a una temperatura final similar de casi 36 °C. Esto sugiere que para la encapsulación de amikacina es importante la temperatura de la mezcla final en lugar de las temperaturas de los componentes individuales. En los ejemplos 6-15 se usaron las temperaturas de 50 °C/RT. En los ejemplos 16-18 se usaron las temperaturas de 30 °C y 30 °C para las dos corrientes con resultados comparables, aunque se observó una encapsulación de amikacina un poco menor.

6.1.c. Efecto de la adición de un volumen acuoso después de la infusión

A continuación se centró la atención en las operaciones de adición de disolución de NaCl y en el proceso de lavado. Se variaron los parámetros de procesamiento en diferentes direcciones. Justo después de la operación de infusión a caudales de 300/500, la concentración de etanol en la mezcla alcanza el 34%. La amikacina tiene una solubilidad limitada en esta concentración (véase la Figura 9).

Si se comienza con una disolución madre de amikacina de 50 mg/ml, después del mezclado con la disolución de lípido habrá más de 30 mg/ml de amikacina total de los que al menos la mitad (15 mg/ml) serán de amikacina libre, suponiendo una eficacia de encapsulación del 50%. Esto es mayor que el límite de solubilidad en etanol al 34%. Una posible solución a este problema es añadir más agua al recipiente con la mezcla de lípido/amikacina, reduciendo por ello la concentración tanto de etanol como de amikacina. Por ejemplo, la adición de 200 partes de agua (o disolución de NaCl) a 800 partes de lípido/amikacina reduciría la concentración de etanol a 27% (Figura 9). Esto hace que la amikacina sea soluble en 15 mg/ml o incluso más dependiendo de la temperatura.

Además, la adición de NaCl puede estabilizar las condiciones osmóticas. Cuando se forman liposomas y se encapsula amikacina en una concentración interna de 200-300 mg/ml, sólo hay ~15 mg/ml o así de amikacina no encapsulada. En ausencia de disolución salina esto crearía un desequilibrio osmótico que, a su vez, podría conducir a fugas de amikacina. La adición de 150 partes de NaCl al 10% a 800 partes de lípido/amikacina dará lugar a una concentración final de NaCl de aproximadamente 1,5% (fuera de los liposomas).

Se generaron diversas tandas en las que se añadieron cantidades diferentes de disolución de NaCl (o agua en algunas tandas) en diferentes momentos con respecto al proceso de infusión (véase la Tabla 5, compilada de las Tablas 2 y 3). En la tabla se puede ver una tendencia general que conduce a las conclusiones siguientes:

- Se requiere cierto intervalo de tiempo entre la infusión y la adición del volumen acuoso para obtener una menor relación L/D (si se utiliza un corto tubo de mezclado). De las tandas 6-15, aquellas con un intervalo de 20 segundos o más tenían una menor relación L/D. Una posible explicación es que no se forman

completamente los liposomas inmediatamente después del mezclamiento de las dos corrientes. Cuando se utiliza un tubo más largo de mezclamiento (tandas 16-18), que permite un mayor tiempo de mezclamiento, no se requiere el intervalo de tiempo.

- 5 - La adición de una disolución de NaCl de alta concentración para equilibrar la osmolalidad no ayuda realmente a retener la amikacina. En realidad, la adición de agua pura en un apropiado intervalo de tiempo dio lugar a la relación L/D y la concentración total de amikacina más bajas.
- 10 - La adición de 100 partes de NaCl al 10% (lote 9) 5 minutos después de la infusión proporcionó una relación L/D competitiva pero no proporcionó una concentración total de amikacina tan buena. Puede ser que el NaCl, cuando está presente en las primeras fases con concentraciones de etanol relativamente elevadas, conduzca a una agregación y una viscosidad aumentadas.

Tabla 5. Papel del volumen acuoso y la concentración de NaCl añadidos a la mezcla de lípido/amikacina para ajustar la concentración de etanol. No se muestran todas las variables; véanse las Tablas 2 y 3.

Tanda	Disolución madre de AMK mg/ml	NaCl añadido			AMK total mg/ml	L/D	Tamaño VOL nm
		Disolución madre %	Volumen partes	Momento respecto a la infusión			
6	50	10	200	antes	36,1	1,71	392
8	50	10	150	durante	48,5	1,02	332
9	50	10	150	durante	41,6	1,04	359
10	50	10	100	5' después	53,1	0,65	350
11	40	10	150	después inm.	20,7	2,27	407
12	40	H ₂ O	180	20" después	81,0	0,61	341
13	30	H ₂ O	180	30" después	68,6	0,91	311
14	40	H ₂ O	180	30" después	79,6	0,60	346
15	40	1,5	180	30" después	71,3	0,59	353
16	40	0,9	180	durante	61,9	0,83	369
17	40	1,5	180	durante	73,8	0,77	362
18	40	1,5	180	durante	74,4	0,73	549

6.1.d. Efecto de la disolución madre de agente antiinfectivo

- 15 Se halló previamente que la utilización de una disolución madre de amikacina de 50 mg/ml producía el mejor encerramiento. La reducción de la concentración de la disolución madre de amikacina a 40 mg/ml aumentó la relación L/D cuando se utilizó en procesos convencionales. Con el proceso de infusión en línea de dos corrientes, la concentración de etanol alcanza niveles más elevados, por lo que la concentración actual de amikacina de 50 mg/ml no puede ser la concentración óptima.
- 20 En la Tabla 6 se resume el efecto de la utilización de diversas concentraciones de disolución madre de amikacina. Una concentración de 40 mg/ml proporcionó valores de L/D comparables o mejores, e incluso una recuperación mejorada de amikacina. Utilizando menos amikacina con respecto a una cantidad constante de lípido y proporcionando una relación L/D similar, se obtuvo un mayor porcentaje de encapsulación (tanda 12). Una disminución adicional de la concentración de la disolución madre de amikacina hasta 30 mg/ml dio lugar a una
- 25 relación L/D ligeramente aumentada, aunque la recuperación todavía fue impresionante (tanda 13).

Tabla 6. Se puede reducir la concentración de la disolución madre de amikacina mientras se mejora la eficacia. La recuperación de amikacina se calcula basándose en la relación L/D obtenida y suponiendo una recuperación de lípido del 100%.

Tanda	disolución madre de AMK mg/ml	AMK total mg/ml	AMK libre %	Lípido mg/ml	L/D	Tamaño VOL nm	Recuperación de AMK %
10	50	53,1	10,2	34,4	0,65	350	37,0
12	40	81,0	1,9	49,4	0,61	341	51,2
13	30	68,6	1,7	62,5	0,91	311	45,7
14	40	79,6	1,6	47,8	0,60	346	52,0

5 La reducción de la concentración de la disolución madre de amikacina tiene otra implicación: reduce la concentración de amikacina libre en una mezcla de lípido/amikacina después de la infusión, lo que permite que permanezca soluble en una mayor concentración de etanol. Suponiendo que el lípido y la amikacina se mezclan en una relación 300/500, la concentración de la disolución madre de amikacina es 50 mg/ml y la eficacia de encapsulación es 37%, la concentración inicial de amikacina libre sería ~20 mg/ml. Similarmente, una disolución madre de 40 mg/ml de amikacina con un 52% de encapsulación darían lugar a ~12 mg/ml de amikacina libre. Una disolución madre de 30 mg/ml de amikacina con un 46% de encapsulación darían lugar a ~10 mg/ml de amikacina libre.

7. Relación de lípido a fármaco

15 Hay varios modos de aumentar el encerramiento de agentes antiinfectivos (por ejemplo, aminoglicósidos tales como amikacina, tobramicina y gentamicina) en liposomas. Un modo es preparar liposomas muy grandes (> 1 µm), donde el volumen encerrado por cantidad de lípido es grande. Esta estrategia para alcanzar una relación L/D más pequeña no es práctica para la inhalación (nebulización) de liposomas porque 1) el esfuerzo cortante durante la nebulización tiende a romper los liposomas de una manera dependiente del tamaño, donde los liposomas más grandes (> 0,5 µm) experimentan una mayor liberación, y 2) los más pequeños tamaños de gotita necesarios para un buen depósito en los pulmones son inferiores a aproximadamente ~3 µm. Por lo tanto, para inhalación, es deseable mantener el tamaño del liposoma lo más pequeño posible para evitar demasiada liberación. Actualmente, el diámetro medio de los liposomas descritos en esta memoria es inferior a aproximadamente 0,4 µm (véase la Tabla 4).

20 Otra estrategia para disminuir la relación L/D es utilizar lípidos negativamente cargados. Los aminoglicósidos anteriormente enumerados están muy positivamente cargados con de 4 a 5 aminas por compuesto. Normalmente se usan sales sulfato de estos aminoglicósidos en formulaciones terapéuticas. Junto con el carácter multicatiónico viene una fuerte unión a liposomas negativamente cargados. Esto da lugar a un mayor encerramiento durante la formación de los liposomas. La finalidad de las formulaciones antiinfectivas es proporcionar una liberación ininterrumpida en el entorno pulmonar. La rápida supresión de los liposomas mediante absorción por macrófagos iría en contra de esto. Se ha documentado bien que los liposomas negativamente cargados experimentan un grado mucho mayor de absorción por macrófagos que los liposomas neutros. Por lo tanto, es deseable utilizar liposomas neutros.

25 Un grupo de tecnologías que permiten un encerramiento de fármacos muy elevado en liposomas pequeños se basa en la carga en gradiente, donde se usa un gradiente de pH, un gradiente de sulfato amónico o un gradiente de sulfato-Mg para cargar fármacos amínicos en liposomas. Véanse las Patentes de EE.UU. números 5.578.320, 5.736.155, 5.837.279 y 5.922.350 (gradiente de pH); 5.837.282 y 5.785.897 (gradiente de sulfato-Mg); y 5.316.771 (gradiente de sulfato amónico). Estas técnicas sólo funcionan con aminas capaces de permear la membrana (monoaminas cuya forma neutra es capaz de permear, como la doxorubicina y la daunorubicina). La carga en gradiente no actuará con ciertos agentes antiinfectivos tales como los aminoglicósidos, ya que no son capaces de permear (demasiado grandes y demasiado cargados).

30 Todos los procesos descritos en esta memoria pueden ser fácilmente adaptados a una fabricación aséptica a gran escala. Se puede ajustar el tamaño final de los liposomas modificando la composición lipídica, la concentración, los excipientes y los parámetros de procesamiento.

La relación de lípido a fármaco usando los procesos de la presente invención es 0,75:1 o menos, o aproximadamente 0,5:1 o menos. Además, se disminuye el porcentaje de agente antiinfectivo libre, presente después de que se somete el producto a diálisis durante un tiempo concreto.

45 8. Resultados

8.1. Barreras de biopelículas de las infecciones pulmonares

Un obstáculo a la hora de tratar enfermedades infecciosas tales como aquéllas por *Pseudomonas aeruginosa*, la causa principal de enfermedad crónica en los pacientes con fibrosis quística, es la penetración del fármaco dentro de la barrera de esputo/biopelícula presente sobre las células epiteliales (Figura 1). En la Figura 1, las formas de rosquilla representan una formulación liposómica antiinfectiva, el símbolo "+" representa agente antiinfectivo libre, el símbolo "-" representa mucina, alginato y DNA, y la barrita negra representa *Pseudomonas aeruginosa*. Esta barrera está compuesta de *P. aeruginosa* tanto colonizada como planctónica embebida en alginato o exopolisacáridos de bacterias, así como DNA de leucocitos dañados, y mucina de células epiteliales de pulmón, todos los cuales poseen una carga negativa neta (Costerton et al., 1999). Esta carga negativa se une a, y evita la penetración de, fármacos positivamente cargados tales como aminoglicósidos, haciéndoles biológicamente ineficaces (Mendelman et al., 1985). El encerramiento de agentes antiinfectivos dentro de formulaciones liposómicas o lipídicas podría proteger o proteger parcialmente a los agentes antiinfectivos de la unión inespecífica al esputo/biopelícula, lo que permitiría la penetración de formulaciones liposómicas o lipídicas (con aminoglicósido encerrado).

Se ha mostrado que la amikacina presenta un alto grado de resistencia a enzimas bacterianas, lo que proporciona un porcentaje de productos de aislamiento clínicos susceptibles mayor que el hallado para otros aminoglicósidos, incluyendo la tobramicina y la gentamicina (Price et al., 1976). En particular, los productos de aislamiento de *P. aeruginosa* son mucho más sensibles a la amikacina que a otros aminoglicósidos, sin presentar resistencia cruzada (Dámaso et al., 1976).

En la Figura 2 se ven claramente la liberación ininterrumpida y el efecto de depósito de las formulaciones liposómicas de amikacina. En este estudio, se administró tobramicina a ratas mediante administraciones intratraqueal e intravenosa. Las ratas también recibieron intratraquealmente formulaciones liposómicas de amikacina en la misma dosis (4 mg/rata). Los datos muestran que sólo se alcanzan una liberación ininterrumpida y un efecto de depósito con la formulación liposómica de amikacina. De hecho, 24 horas después de la administración, sólo las formulaciones liposómicas de amikacina muestran niveles significativos del fármaco en los pulmones del animal, mientras que ambas formulaciones de tobramicina revelaron niveles insignificantes, se cree que debido principalmente a una rápida absorción sistémica. Este aumento de aminoglicósido de más de cien veces en el pulmón con formulaciones liposómicas antiinfectivas sustenta la idea de un agente antiinfectivo en formulación liposómica de liberación ininterrumpida que puede ser tomado significativamente menos frecuentemente que la formulación TOBI[®] actualmente aprobada (una disolución de tobramicina para inhalación, preparada por Chiron Corporation, Ameryville, California, EE.UU.).

Además, la presencia de un esputo/biopelícula evita la penetración de los aminoglicósidos libres a causa de la unión de los agentes antiinfectivos a su superficie (Figura 1). Por lo tanto, se necesitan dosis superiores a 1000 g de tobramicina/gramo de tejido pulmonar para que aparezca un efecto terapéutico en pacientes con CF. Esto se solventa con formulaciones liposómicas de amikacina. De este modo, con las formulaciones liposómicas de amikacina el nivel terapéutico de fármaco se mantiene durante un período de tiempo mayor que con la tobramicina libre. Esta facilitación de la unión y la penetración también podría ser un medio mediante el cual las formulaciones liposómicas de amikacina pudieran reducir significativamente la resistencia bacteriana que habitualmente se ve que se desarrolla cuando están presentes productos antibacterianos *in vivo* a niveles por debajo de la concentración inhibitoria mínima.

8.2. Farmacocinética

Se determinó la farmacocinética de la amikacina en ratas después de la administración intratraqueal (IT) de tobramicina libre o de formulaciones liposómicas de amikacina. Estos datos fueron comparados con la distribución obtenida en los pulmones después de una inyección de tobramicina libre en la vena de la cola. En todos los casos se administró una dosis de 4 mg/rata. Como se puede ver en la Figura 2, se puede suministrar un depósito mucho mayor de aminoglicósido por IT que por inyección. El efecto de depósito de la tecnología liposómica antiinfectiva también se demuestra en que, en comparación con la tobramicina administrada IT o IV, con las formulaciones liposómicas de amikacina aún queda en los pulmones un aumento de fármaco de más de cien veces veinticuatro horas después de la administración. De este modo, con las formulaciones liposómicas de amikacina el nivel terapéutico de fármaco se mantiene durante un período de tiempo mayor que con la tobramicina libre.

La unión de aminoglicósidos a esputos de pacientes con CF es un problema, particularmente si esta unión reduce la bioactividad del agente antiinfectivo (Hunt et al., 1995). Para determinar si las formulaciones liposómicas de amikacina pueden conservar su actividad biológica a lo largo de un periodo prolongado de tiempo, se administraron formulaciones liposómicas de amikacina a ratas normales mediante instilación intratraqueal. Esto fue seguido de su extracción a las 2 o 24 horas por medio de un lavado broncoalveolar (BAL; del inglés, *bronchial alveolar lavage*) para determinar la actividad biológica. Las muestras fueron concentradas mediante ultrafiltración seguida de filtración (0,2 µm) para eliminar microbios pulmonares contaminantes. Se determinó la concentración de amikacina empleando un instrumento TDx y se determinó la actividad biológica usando un ensayo de dilución en caldo Mueller Hinton (*Pseudomonas aeruginosa*). Los resultados se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Resultados que muestran que las formulaciones liposómicas de amikacina conservan su actividad biológica a lo largo de un periodo prolongado de tiempo.

Tiempo (horas)	Amikacina en el BAL (µg/ml)	Amikacina en el filtrado (µg/ml)	MIC (µg/ml)
2	160	119	1,9
24	73	32	4,0

5 Como se muestra en la tabla anterior, la formulación liposómica filtrada y recuperada de amikacina era capaz de matar *P. aeruginosa* en el ensayo en caldo Mueller Hinton incluso después de 24 horas, con una MIC de 4. A las 2 horas se obtuvo una MIC de 2, que es similar a la obtenida con la disolución madre filtrada de amikacina liposómica/complejada. Por lo tanto, la formulación liposómica de amikacina aún era activa después de 24 horas en el pulmón. A las 24 horas, la tobramicina libre en la misma dosis era indetectable en un BAL. Esto indica que la formulación liposómica antiinfectiva no sólo queda retenida en el pulmón sino que también está libremente disponible para penetrar en un esputo/biopelícula a lo largo del tiempo. Estos datos combinados con los hechos que se evidencian en la Figura 2 y la Tabla 9 (más adelante), que las formulaciones liposómicas de amikacina liberan el agente antiinfectivo libre a lo largo del tiempo mientras mantienen niveles elevados del agente antiinfectivo en los pulmones, apoyan el fundamento de que este sistema puede producir un efecto antiinfectivo ininterrumpido a lo largo del tiempo. Este efecto debería demostrar su significación en cuanto a reducir tanto la carga biológica de las pseudomonas como el desarrollo de resistencia debida a unos niveles deprimidos de agente antiinfectivo.

10 Como una demostración *in vitro* de la liberación lenta de la formulación liposómica de amikacina y de su efecto antiinfectivo ininterrumpido, se incubó la formulación en esputo de pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD; del inglés, *chronic obstructive pulmonay disease*) que contenía pseudomonas mucoides PAO1. También se incubó la formulación liposómica de amikacina en alginato que contenía pseudomonas mucoides PAO1. En ambos casos, como se muestra en la Tabla 8, se observó la muerte ininterrumpida y potenciada de las pseudomonas a lo largo del tiempo.

Tabla 8. Muerte *in vitro* de *Pseudomonas* a lo largo del tiempo.

Ensayo de esputo/alginato <i>in vitro</i> (% de supervivencia de pseudomonas mucoides PAO1)						
		Tiempo de incubación a 37 °C				Concentración de amikacina (µg/ml)
		1 h	3 h	6 h	24 h	
Lip-An-15	Esputo	81	15	22	< 1	8
Lip-An-15	Alginato	100	59	1	< 1	10

25 Las curvas de muerte clásicas no son aplicables a la tecnología de formulaciones liposómicas antiinfectivas porque las formulaciones liposómicas presentan una liberación lenta de agente antiinfectivo con un efecto antiinfectivo potenciado. La formulación liposómica protege a la amikacina frente al esputo y/o el alginato hasta su liberación. Con el tiempo se observa una muerte completa, lo que es coherente con el modelo de efecto antiinfectivo ininterrumpido y de liberación lenta sin interferencia ni inactivación del agente antiinfectivo.

30 Se estudió la eficacia de las formulaciones liposómicas de amikacina usando un modelo de infección pulmonar crónica (Cash et al., 1979) en el que se instila *P. aeruginosa*, embebida en una matriz de glóbulos de agarosa, en las tráqueas de ratas. Este modelo animal con pseudomonas mucoides se desarrolló para que se pareciera a las infecciones por pseudomonas que se ven en pacientes con CF. Algunas de las correlaciones clínicas con la CF incluyen: una similar patología pulmonar, el desarrollo de trastornos por complejos inmunes, y una conversión al fenotipo mucoide por cepas de *P. aeruginosa* (Cantin y Woods, 1999). Se infectaron pulmones de rata con más de 10^7 CFUs de una pseudomona mucoide (cepa PAO1) tomada de un producto de aislamiento de un paciente con CF, y se trataron posteriormente con (a) aminoglicósido libre, (b) el vehículo lipídico solo como un testigo no farmacológico, y (c) la formulación liposómica de amikacina. Además, se exploraron primero las formulaciones en cuanto a su capacidad para matar *P. aeruginosa in vitro* en placas de Kirby-Bauer modificadas.

40 Se probaron diversas formulaciones liposómicas de amikacina basándose en diferentes composiciones lipídicas o parámetros de fabricación que daban lugar a diferentes zonas de muerte en experimentos *in vitro*. Este experimento fue diseñado para determinar el aumento de eficacia obtenido con formulaciones liposómicas de aminoglicósido con

respecto al aminoglicósido libre. Se compararon composiciones lipídicas testigo vacías, dos diferentes formulaciones liposómicas de amikacina, y amikacina libre y tobramicina libre en las mismas concentraciones de aminoglicósido que las formulaciones liposómicas antiinfectivas. Además, también se administraron una dosis 10 veces mayor de amikacina libre y una dosis 10 veces mayor de tobramicina libre. La administración fue IT y diaria durante siete días. Los resultados (Figura 3) indican que la amikacina liposómica de las dos formulaciones (que diferían en composición lipídica) mostraba una reducción significativa de los niveles de CFUs y era mejor en cuanto a reducir CFUs que la amikacina libre o la tobramicina libre en dosis 10 veces mayores. En la Figura 3, Lip-An-14 es DPPC/colesterol/DOPC/DOPG (42:45:4:9) y 10 mg/ml de amikacina, y Lip-An-15 es DDPC/colesterol (1:1) también en una concentración de 10 mg/ml. Todas las relaciones de lípido-lípido y lípido-fármaco de esta memoria son en peso a peso.

El siguiente experimento (Figura 4) se diseñó para demostrar las capacidades antiinfectivas ininterrumpidas y de liberación lenta de las formulaciones liposómicas de amikacina. La administración fue cada dos días durante 14 días, a diferencia de cada día durante siete días en los experimentos previos. Los resultados indican que la amikacina liposómica de las dos formulaciones (que diferían en composición lipídica) era de 10 a 100 veces más potente (mayor capacidad para reducir los niveles de CFUs) que la amikacina libre o la tobramicina libre. Una dosis diaria de 600 mg de TOBI® (una disolución de tobramicina para inhalación, preparada por Chiron Corporation, Ameryville, California, EE.UU.) en ser humano, o aproximadamente 375 mg/m², corresponde a una dosis diaria de 9,4 mg en rata. De este modo, los datos pueden ser directamente correlacionados con una mejora de eficacia de 10 a 100 veces en seres humanos. Se debería advertir que una reducción logarítmica de dos es la mejor que se puede observar en este modelo. Una reducción de *P. aeruginosa* de 100 veces en ensayos con esputos ha sido correlacionada con una función pulmonar mejorada (Ramsey et al., 1993). La liberación ininterrumpida de las formulaciones liposómicas de amikacina indica que se pueden emplear una dosis menor y/o una administración menos frecuente para obtener una reducción de crecimiento bacteriano mayor que la que se puede obtener con aminoglicósido libre.

Se estudió la eficacia de la formulación liposómica de amikacina en un modelo de infección pulmonar crónica en el que se embebió *P. aeruginosa* en una matriz de glóbulos de agarosa que fue instilada a través de la tráquea de ratas Sprague/Dawley. Tres días más tarde, se administró amikacina libre o amikacina liposómica cada día (Figura 3) o cada dos días (Figura 4) en una cantidad de 1 mg/rata o 10 mg/rata del aminoglicósido dado o de 1 mg/rata de amikacina liposómica, así como liposomas vacíos (vehículo lipídico) como testigo, con cinco ratas por grupo.

Se analizaron los pulmones (congelados) homogeneizados de rata en cuanto a actividad y contenido de aminoglicósido después del experimento de 14 días. El ensayo químico clínico se llevó a cabo usando un instrumento TDx, mientras que el bioensayo se llevó a cabo midiendo zonas de inhibición en placas de agar con *Bacillus subtilis* embebido. Los resultados se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Resultados de pulmones de rata infectados con *P. aeruginosa* y tratados con formulación liposómica de amikacina.

Formulación	Bioensayo (µg/ml)	Ensayo clínico (µg/ml)
Lip-An-14 (1 mg/rata)	9,5	9,1
Lip-An-15 (1 mg/rata)	21,5	18,4
Amikacina libre (10 mg/rata)	nd	2,0
Tobramicina libre (10 mg/rata)	nd	1,4

Los pesos de fármaco son para el fármaco normalizado en cuanto a la ausencia de cualquier forma salina.

Los resultados de la Tabla 10 indican que el aminoglicósido está presente y activo para ambas formulaciones liposómicas antiinfectivas, mientras que poco se puede detectar del aminoglicósido libre incluso con la dosis 10 veces mayor. Estos resultados adicionales establecen las características de liberación ininterrumpida de las formulaciones liposómicas antiinfectivas y también confirman que el agente antiinfectivo que permanece es aún activo. De las formulaciones anteriores, sólo la tobramicina libre (0,1 µg/ml) presentaba niveles detectables de aminoglicósido en los riñones.

La liberación ininterrumpida y el efecto de depósito de la formulación liposómica de amikacina se demuestran adicionalmente en la Figura 5. Se produjo una infección pulmonar crónica en ratas embebiendo *P. aeruginosa* en una matriz de glóbulos de agarosa que fue instilada a través de la tráquea, usando los mismos glóbulos empleados en los estudios de eficacia. Luego se suministró a las ratas tobramicina libre o amikacina liposómica (formulación Lip-An-14) por medio de administración intratraqueal en la misma dosis (2 mg/rata). Los datos, medidos en microgramos de agente antiinfectivo por gramo de tejido pulmonar a lo largo del tiempo, muestran que el agente

antiinfectivo liposómico presenta una liberación ininterrumpida y un efecto de depósito mientras que la tobramicina libre presenta niveles insignificantes en los pulmones en 24 horas, se cree que debido principalmente a una rápida absorción sistémica. Este aumento de agente antiinfectivo de más de cien veces en el pulmón con formulaciones liposómicas de amikacina en una rata infectada sustenta la idea de un agente antiinfectivo liposómico de liberación ininterrumpida que puede ser tomado significativamente menos frecuentemente que la formulación TOBI® actualmente aprobada (una disolución de tobramicina para inhalación, preparada por Chiron Corporation, Ameryville, California, EE.UU.).

Se determinó la farmacocinética de la amikacina en ratas después de la administración intratraqueal (IT) de tobramicina libre o amikacina liposómica. Se administró una dosis de 2 mg/rata. El efecto de depósito de la tecnología liposómica antiinfectiva se demuestra en que, en comparación con la tobramicina libre administrada IT, con la amikacina liposómica aún queda en los pulmones infectados un aumento de fármaco de más de cien veces veinticuatro horas después de la administración. De este modo, con las formulaciones liposómicas el nivel terapéutico de fármaco se mantiene durante un período de tiempo mayor que con la tobramicina libre.

La Figura 7 muestra un notable tiempo de permanencia y la acumulación de cantidades eficaces de agente antiinfectivo en los pulmones, un resultado que establece que se pueden utilizar administraciones relativamente infrecuentes. Cada dosis es por inhalación (en rata, 3 ratas por grupo, como antes) de formulaciones liposómicas nebulizadas de amikacina (DPPC/colesterol, 1:1) durante 4 horas, en una cantidad de 15 mg/ml de amikacina. La administración fue en cualquier día uno; los días uno, tres y cinco; o los días uno, dos, tres, cuatro y cinco. Las ratas que proporcionan una barra de datos dada fueron sacrificadas después de la respectiva administración de la barra de datos. La formulación se prepara como en el Ejemplo.

Se pueden utilizar agentes antiinfectivos similares para el tratamiento de infecciones intracelulares como el ántrax y la tularemia pulmonares. En el ántrax pulmonar, las esporas de ántrax alcanzan los alveolos en un aerosol. Las esporas inhaladas son ingeridas por macrófagos pulmonares en los alveolos y son transportadas a los ganglios linfáticos mediastinales o ganglios linfáticos traqueobronquiales regionales a través de los vasos linfáticos (Pile et al., 1998; Gleiser et al., 1968). El macrófago es esencial en ambas rutas infectivas y es el principal contribuyente a la autodestrucción del huésped en el ántrax sistémico (inhalación). Además de sus características de liberación ininterrumpida y direccionamiento, la tecnología de formulaciones liposómicas antiinfectivas puede potenciar la incorporación celular y puede usar los macrófagos alveolares y las células epiteliales del pulmón en el direccionamiento y suministro de fármacos. Se cree que la posesión de estas características facilita el tratamiento de estas infecciones intracelulares, infecciones que se producen en los pulmones y son transportadas por macrófagos. Resulta más importante que estas características deberían hacer más eficaz al agente antiinfectivo ya que el agente antiinfectivo liposómico debería ser fagocitado por las muchas células que contienen la enfermedad. El agente antiinfectivo sería liberado intracelularmente de un modo dirigido, atacando por ello a la infección antes de que se diseminara. El fármaco encapsulado puede ser un producto farmacéutico ya aprobado, tal como ciprofloxacino, tetraciclina, eritromicina o amikacina. Se han desarrollado formulaciones liposómicas de ciprofloxacino.

En un estudio, se administró este compuesto a ratones y se comparó tanto con ciprofloxacino libre administrado intratraquealmente como con ciprofloxacino libre administrado oralmente, administrándose los tres compuestos en la misma dosis (Figura 6). La dosis para cada ratón fue 15 mg/kg, con tres ratones por grupo. El ciprofloxacino liposómico estaba en DPPC/colesterol (9:1), en una cantidad de 3 mg/ml de ciprofloxacino, con la formulación producida como en el Ejemplo. La relación de lípido a fármaco era 12,5:1 en peso. En comparación con el ciprofloxacino oralmente administrado, el ciprofloxacino liposómico estaba presente en los pulmones de los ratones en cantidades por encima de dos órdenes de magnitud mayores que en el caso del ciprofloxacino libre. Además, sólo el ciprofloxacino liposómico mostraba niveles de fármaco en el pulmón después de 24 horas, mientras que el fármaco oralmente administrado era indetectable en menos de dos horas. Estos datos apoyan el uso de formulaciones liposómicas de ciprofloxacino y otros agentes antiinfectivos tales como aminoglicósidos, tetraciclinas y macrólidos para el tratamiento y la prevención profiláctica de enfermedades intracelulares usadas por bioterroristas.

8.3. Parámetros de los liposomas

Los lípidos que se van a emplear se disuelven en etanol para formar una disolución de lípido-etanol. La disolución de lípido-etanol se infunde en una disolución acuosa o etanólica que contiene la molécula del agente bioactivo que se va a encerrar. Los lípidos forman espontáneamente vesículas.

En la Tabla 10 se describen parámetros de formulaciones liposómicas antiinfectivas en que los lípidos son DPPC y colesterol.

Tabla 10. Parámetros adicionales de formulaciones liposómicas antiinfectivas.

Liposomas de amikacina (DPPC/colesterol)					
Nº de tanda	[Amikacina total] mg/ml	[Lípido total]* mg/ml	% de la amikacina total que es encerrado	L/D (peso/peso)**	Diámetro medio de los liposomas (µm)
1	14,7	44,8	96,7	3,2	–
2	21,4	71,3	98,1	3,4	0,36
3	18,5	46,6	90,2	2,8	0,27
4	9,4	40,6	95,0	4,5	0,34
5	15,8	52,3	97,7	3,4	0,27
6	20,7	31,8	95,5	1,6	0,25
7	20,6	40,0	98,6	2,0	0,25
8	19,9	40,7	98,3	2,1	0,28
9	20,9	40,5	98,1	2,0	0,28

*Liposomas de DPPC/colesterol en que la relación molar de DPPC/colesterol es aproximadamente 1:1.

**Para calcular la relación L/D sólo se consideró la cantidad de amikacina encerrada.

5 En el documento PCT/US03/06847, presentado el 5 de marzo de 2003, se puede hallar información adicional sobre la formación de formulaciones liposómicas antiinfectivas.

10 El volumen encerrado es una característica básica de una formulación liposómica y se determina como el volumen de fase acuosa intraliposómica por unidad de lípido. Se expresa generalmente en unidades de microlitros/micromol. Se supone a menudo que, cuando se forman los liposomas, la concentración del soluto dentro de los liposomas es igual a la concentración fuera, en la disolución global. Un mayor volumen encerrado conduciría entonces a una mayor relación de fármaco/lípido, es decir, una mayor concentración global de fármaco para la formulación final.

Sin embargo, al formularse la amikacina liposómica, se ha hallado que la relación real de fármaco/lípido que se puede producir es más de tres veces mayor que la que se esperaría basándose en el volumen encerrado. En la Tabla 11 se muestran los resultados para 4 preparaciones de muestra diferentes de formulaciones lipídicas antiinfectivas (véase el Ejemplo 2 en la sección Ejemplificación).

15 **Tabla 11.** Carga de amikacina en liposomas preparados mediante diferentes métodos.

Parámetro medido	Nº de muestra			
	1	2	3	4
Concentración de lípidos (mg/ml)	35,1	39,5	50,4	45,0
Concentración de AMK (mg/ml)	19,9	20,7	10,5	5,0
Relación real de lípido/fármaco (peso/peso)	1,8	1,9	4,8	9,0
Volumen encerrado (µl/micromol)	2,4	2,5	2,9	1,6
Relación esperada de lípido/fármaco (peso/peso)	5,6	6,0	4,1	8,1
Relación L/D esperada/real	3,19	3,17	0,85	0,90
Tamaño de los liposomas (µm)	0,230	0,217	4,65	3,96

Las Muestras 1 y 2 se prepararon mediante el procedimiento de infusión en etanol descrito en esta memoria, y las Muestras 3 y 4 se prepararon mediante técnicas de formación de liposomas conocidas en este campo técnico.

20 Las concentraciones de amikacina se midieron mediante un ensayo de inmunofluorescencia usando el reactivo INNOFLUO Seradyn dispuesto en un analizador TDx. Los lípidos se midieron mediante HPLC en fase inversa usando una columna C-8 y un detector de dispersión lumínica.

25 El volumen liposómico (volumen ocupado por los liposomas por unidad de volumen total) en las muestras números 1-3 se determinó midiendo la concentración de la sonda fluorescente (sulforrodamina 101 o carboxifluoresceína) en el volumen total y en el volumen del filtrado de la formulación obtenido por centrifugación en un dispositivo filtrante CentriSart. La concentración de la sonda en el filtrado es mayor que la media debido a la exclusión de la sonda del volumen ocupado por los liposomas.

En la muestra número 4, el volumen liposómico se determinó midiendo la concentración de ion potasio en una muestra después de la adición de una cantidad fija de él, 250 µl de KCl (V_{add}) en 10 ml de suspensión liposómica (V_o). Luego se centrifugaron las muestras 30 minutos a 4000 rpm y se tomó un sobrenadante para medir el ion potasio (K) mediante un electrodo Cole-Parmer sensible al potasio. La concentración de potasio medida era siempre mayor que la esperada debido a la exclusión de iones potasio del volumen ocupado por los liposomas. En el testigo, se añadió una cantidad igual de KCl en 10 ml de disolución salina. Se midió la concentración de potasio en el testigo K_c . Luego se estimaron los volúmenes acuoso y liposómico del modo siguiente:

$$v_a = \frac{K_c}{K} (V_o + V_{add}) - V_{add}, \quad v_L = 1 - v_a$$

Conociendo el volumen liposómico y la concentración de lípido se puede determinar el volumen encerrado: $v_{ent} = \frac{v_L - L_w}{L_m}$, donde L_w y L_m son las concentraciones ponderal y molar de lípido, respectivamente. Se

supone que la densidad del lípido es próxima a 1 mg/ml. En consecuencia, se puede estimar la relación esperada de lípido/fármaco que tendría la muestra si el fármaco se distribuyera idealmente en los espacios acuosos dentro y fuera de los liposomas:

$$\left(\frac{L}{D}\right)_{ex} = \frac{L_w}{D_o (v_L - L_w)} = \frac{M_L}{D_o v_{ent}}$$

liposomas y M_L es el peso molecular medio de los lípidos.

Como se puede ver, las relaciones L/D reales para las muestras número 1 y número 2 (1,8 y 1,9) son consistentemente menores que las que se esperarían a partir de una distribución uniforme de amikacina (5,6 y 6,0), mientras que las relaciones L/D para las muestras número 3 y número 4 son más próximas a los valores teóricos.

Se realizó una comparación similar entre 2 preparaciones de muestra de unas formulaciones lipídicas antiinfectivas en que el agente antiinfectivo era sulfato de gentamicina (véase el Ejemplo 3 en la sección Ejemplificación). Los datos de la Tabla 12 indican que el método descrito en esta memoria proporciona un encerramiento inesperadamente elevado de gentamicina. En ambas muestras, número 5 y número 6, las relaciones reales de lípido/fármaco eran casi dos veces el valor teóricamente esperado.

Tabla 12. Carga de gentamicina en liposomas preparados mediante diferentes métodos.

Parámetro medido	Nº de muestra	
	5	6
Concentración de lípidos (mg/ml)	44,8	41,8
Concentración de fármaco (mg/ml)	14,2	14,9
Relación real de lípido/fármaco (peso/peso)	3,2	2,8
Volumen encerrado (µl/micromol)	2,3	2,7
Relación esperada de lípido/fármaco (peso/peso)	5,7	5,4
Relación L/D esperada/real	1,82	1,92
Tamaño de los liposomas (µm)	0,226	0,236

8.4. Liberación de fármaco mediada por una infección por *P. aeruginosa*

La liberación del fármaco en forma activa en las inmediaciones de las infecciones es un aspecto importante de la acción de la formulación liposómica de fármaco de la presente invención. Se examinó el potencial de dicha liberación dirigida controlando la liberación del fármaco tras la incubación con esputo de un paciente con CF, la liberación en los pulmones de ratas a las que se había inoculado previamente *P. aeruginosa*, así como la actividad frente a cultivos de *P. aeruginosa*.

Se discutió previamente la liberación de amikacina por incubación directa de un cultivo de *P. aeruginosa* con una formulación liposómica de amikacina de la presente invención. Para investigar adicionalmente este fenómeno, se incubó una formulación liposómica de amikacina con una preparación de esputo de un paciente con fibrosis quística con infección por *P. aeruginosa*. El esputo expectorado se licuó con DNasa I bovina y alginato liasa durante 2 horas a 37 °C. Se mezcló 1:1 amikacina soluble o una formulación liposómica de amikacina (1 mg/ml de amikacina) con

esputo licuado o con testigo y se realizó una incubación a 37 °C con un suave sacudimiento. Se analizaron partes alícuotas en cuanto a concentración de amikacina mediante un analizador Abbott TDx. Los liposomas intactos fueron lisados en una parte alícuota independiente de cada muestra usando un detergente, Triton X-100 al 1%. Se usaron los sobrenadantes de cada muestra para el análisis. A lo largo del periodo de 48 horas, el 80-90% de la amikacina se liberó de la composición lipídica de un modo dependiente del tiempo bajo estas condiciones, lo que indica que se puede producir liberación de fármaco en los sitios de infección del pulmón de los pacientes con CF.

Se comparó *in vivo* la liberación de fármaco libre de los liposomas en ratas a las que se habían instilado glóbulos de agar que contenían *P. aeruginosa* ($3,5 \times 10^4$ CFU/rata), con la liberación en ratas a las que no se había instilado nada. Tres días después de la instilación de los glóbulos, se dejó que las ratas inhalaran formulaciones liposómicas de amikacina de la presente invención (dosis diaria de aproximadamente 6 mg/kg) cada día (grupo sin bacterias) o cada dos días (grupo con instilación de glóbulos) durante 14 días. 24 horas después del último tratamiento, se midieron la amikacina total y la amikacina libre del modo anteriormente descrito. En las ratas que habían recibido bacterias, una media de aproximadamente el 50-70% de la amikacina detectada estaba en forma libre, es decir, liberada del liposoma. En las ratas que no habían recibido bacterias, aproximadamente el 20-25% del fármaco estaba en forma libre. Estos datos sugieren acusadamente que la liberación de amikacina libre del liposoma puede ser mediada por la presencia de *P. aeruginosa in vivo*.

Se llevó a cabo un ensayo *in vitro* de liberación y actividad bajo unas condiciones similares a las de la farmacocinética en el pulmón, donde se ha mostrado previamente que el antibiótico libre resulta suprimido en una escala temporal de pocas horas. Se incubó amikacina libre o una formulación liposómica de amikacina, en varias concentraciones de fármaco, con *P. aeruginosa* PAO1 ($\sim 10^8$ /ml) en cartuchos Slide-A-Lyzer estériles de 0,5 ml de capacidad. Bajo estas condiciones, el fármaco libre sale de los cartuchos por diálisis en una escala temporal de horas. Después de 24 horas, las muestras fueron retiradas de los cartuchos y fueron sembradas para medir CFUs. En los estudios preliminares, la amikacina libre sólo redujo ligeramente las CFUs de estas muestras, mientras que se observó una reducción logarítmica de CFUs de dos unidades con las composiciones lipídicas que comprendían amikacina con la misma concentración de amikacina (50 µg/ml). Estos datos sugieren que la amikacina es realmente liberada en forma activa en presencia de bacterias y que la liberación lenta proporcionada por la formulación hace más eficaz el uso del fármaco.

La interacción de las formulaciones liposómicas de amikacina de la presente invención con *P. aeruginosa* o sus factores de virulencia conduce a la liberación de amikacina, liberación que se dirige posiblemente al sitio de la infección. Cuando se libera amikacina, es activa frente a *P. aeruginosa*, y la liberación lenta en las inmediaciones de las bacterias puede tener una ventaja sobre la distribución inespecífica y la rápida supresión del fármaco libre inhalado.

8.5. Efecto de formulaciones liposómicas de fármaco inhaladas sobre la función de los macrófagos alveolares

Las formulaciones liposómicas de amikacina de la presente invención son, en una realización, una forma de amikacina encapsulada en liposomas a nanoescala (200-300 nm) que se formula para tratar infecciones crónicas por *P. aeruginosa* en pacientes con fibrosis quística. Se diseña para inhalación con liberación ininterrumpida de amikacina en el pulmón. Puesto que se sabe que los macrófagos alveolares atrapan ávidamente partículas con tamaños en este intervalo, el efecto de las formulaciones liposómicas sobre estas células es particularmente interesante. Se estudiaron las funciones basales y estimuladas de los macrófagos alveolares de rata obtenidos por lavado, con y sin administración de formulaciones liposómicas de amikacina, y se compararon con las de diversos testigos.

Con un nebulizador PARI LC Star se generaron aerosoles de las formulaciones liposómicas de amikacina, amikacina, liposomas de placebo, y disolución salina, que fueron inhalados por hembras de rata CD¹IGS en una cámara de inhalación sólo para nariz. La terapia de inhalación se llevó a cabo durante 4 horas en 14 días consecutivos, de modo que la dosis pulmonar diaria estimada de lípido total era aproximadamente 12 mg/kg para el grupo de amikacina liposómica y 11 mg/kg para el grupo de liposomas de placebo. La mitad de las ratas fueron sacrificadas el día 15. Las ratas restantes fueron sacrificadas el día 43. Se recogió fluido de lavado broncoalveolar (BALF; del inglés, *bronchial alveolar lavage fluid*) de cada rata y se guardó a -80 °C para el subsiguiente ensayo de óxido nítrico (según viene representado por los nitratos totales) y factor alfa de necrosis tumoral (TNF- α ; del inglés, *tumor necrosis factor α*). Las células del BALF fueron recogidas por centrifugación, contadas y cultivadas en un medio con y sin lipopolisacárido (LPS) durante 24 horas. Los sobrenadantes de estos cultivos fueron recogidos por centrifugación y examinados en cuanto a óxido nítrico y TNF- α . Se examinó la función fagocítica de los macrófagos de BAL [(10^6)/ml] midiendo la incorporación de microesferas fluorescentes opsonizadas [0,2 µm, $2(10^9)$ /ml] durante la noche.

La inhalación de la formulación liposómica de amikacina, los liposomas vacíos, la amikacina soluble o la disolución salina durante 14 días consecutivos no produjo una significativa respuesta inflamatoria aguda ni retardada en los pulmones de las ratas, como evidenciaron los niveles de óxido nítrico (nitratos) y TNF- α en el BALF, que no fueron

significativamente diferentes de los niveles de los testigos, aunque hubo una tendencia prematura hacia niveles mayores de NO en todos los grupos que habían recibido inhalantes, incluidos los testigos. La recuperación total de células no fue significativamente diferente en todos los grupos, con una tendencia prematura hacia más leucocitos polimorfonucleares en todos los grupos que habían recibido inhalantes. Los macrófagos alveolares de rata presentaban funciones normales después de la exposición a los aerosoles de los anteriores productos de ensayo a pesar del hecho de que aparecían agrandados el día 15 en los grupos que habían inhalado liposomas. Las concentraciones de nitratos y TNF- α detectadas tras el cultivo de los macrófagos alveolares en un medio no fueron significativamente diferentes de las concentraciones de los testigos el día 15 ni el 43 del estudio. Los macrófagos respondían normalmente cuando eran estimulados mediante LPS, produciendo concentraciones sustanciales de óxido nítrico (20-40 nanomoles/10⁶ células) y TNF- α (5-20 ng/10⁶ células). Estos macrófagos también presentaban funciones fagocíticas normales, como era mostrado por una idéntica incorporación de glóbulos fluorescentes en comparación con los testigos no tratados.

La inhalación de las formulaciones liposómicas de amikacina durante 14 días consecutivos no afectó sustancialmente a la función de los macrófagos alveolares en términos de fagocitosis de glóbulos opsonizados ni de producción de los mediadores inflamatorios TNF y NO.

9. Dosificaciones

La dosificación de cualesquier composiciones de la presente invención variará dependiendo de los síntomas, la edad y el peso corporal del paciente, la naturaleza y la gravedad del trastorno que se va a tratar o prevenir, la vía de administración y la forma de la composición objetivo. Cualquiera de las formulaciones objetivo puede ser administrada en una sola dosis o en dosis divididas. Las dosificaciones para las composiciones de la presente invención pueden ser fácilmente determinadas mediante técnicas conocidas por quienes tienen experiencia en este campo técnico o como se enseña en esta memoria.

En ciertas realizaciones, la dosificación de los compuestos objetivo estará generalmente en el intervalo de aproximadamente 0,01 ng a aproximadamente 10 g por kg de peso corporal, específicamente en el intervalo de aproximadamente 1 ng a aproximadamente 0,1 g por kg, y más específicamente en el intervalo de aproximadamente 100 ng a aproximadamente 50 mg por kg.

Puede que sea necesario identificar una dosis o cantidad eficaz, y cualesquier posibles efectos sobre la regulación temporal de la administración de la formulación, para cualquier composición particular de la presente invención. Esto puede ser llevado a cabo mediante un experimento rutinario como se describe en esta memoria, usando uno o más grupos de animales (preferiblemente al menos 5 animales por grupo), o en pruebas con seres humanos si fuera apropiado. Se puede evaluar la eficacia de cualquier composición y método de tratamiento o prevención objetivos administrando la composición y valorando el efecto de la administración midiendo uno o más índices aplicables, y comparando los valores de estos índices después del tratamiento con los valores de los mismos índices antes del tratamiento.

El momento exacto de administración y la cantidad de cualquier composición objetivo particular que produzcan el tratamiento más eficaz en un paciente dado dependerán de la actividad, la farmacocinética y la biodisponibilidad de una composición objetivo, el estado fisiológico del paciente (incluyendo la edad, el sexo, el tipo y la fase de la enfermedad, el estado físico general, la sensibilidad a una dosificación dada, y el tipo de medicación), la vía de administración y similares. Se pueden utilizar las directrices presentadas en esta memoria para optimizar el tratamiento, por ejemplo, determinando el tiempo y/o la cantidad de administración óptimos, lo que no requerirá más que una experimentación rutinaria consistente en controlar al sujeto y ajustar la dosificación y/o la regulación temporal.

Mientras el sujeto está siendo tratado, se puede controlar la salud del paciente midiendo uno o más de los índices pertinentes en momentos predeterminados durante el periodo de tratamiento. El tratamiento, incluyendo la composición, las cantidades, los momentos de administración y la formulación, puede ser optimizado de acuerdo con los resultados de dicho control. El paciente puede ser periódicamente reevaluado para determinar el grado de mejora midiendo los mismos parámetros. Basándose en estas reevaluaciones, se pueden hacer ajustes en la(s) cantidad(es) de la composición objetivo administrada y, posiblemente, en el momento de la administración.

El tratamiento se puede iniciar con dosis más pequeñas que sean menores que la dosis óptima del compuesto. Más adelante se puede aumentar la dosis mediante pequeños incrementos hasta que se alcance el efecto terapéutico óptimo.

El uso de las composiciones objetivo puede reducir la dosificación requerida para cualquier agente individual contenido en las composiciones (por ejemplo, el agente antiinfectivo) porque el inicio y la duración del efecto de los diferentes agentes pueden ser complementarios.

Se pueden determinar la toxicidad y la eficacia terapéutica de las composiciones objetivo mediante procedimientos

farmacéuticos estándares en cultivos celulares o en animales experimentales, por ejemplo, para determinar la LD₅₀ y la ED₅₀.

- 5 Los datos obtenidos de los ensayos en cultivo celular y de los estudios con animales pueden ser utilizados en la formulación de un intervalo de dosificación para uso en seres humanos. La dosificación de cualquier composición objetivo se basa preferiblemente en un intervalo de concentraciones en circulación que incluyen la ED₅₀ con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Para composiciones de la presente invención, la dosis terapéuticamente eficaz puede ser inicialmente estimada a partir de ensayos en cultivo celular.

10. Formulación

- 10 Las formulaciones lipídicas antiinfectivas de la presente invención pueden comprender una dispersión acuosa de liposomas. La formulación puede contener excipientes lipídicos para formar los liposomas, y sales/tampones para proporcionar la osmolaridad y el pH apropiados. La formulación puede comprender un excipiente farmacéutico. El excipiente farmacéutico puede ser un líquido, un diluyente, un disolvente o un material encapsulante, implicado en llevar o transportar cualquier composición objetivo o componente de la misma de un órgano o una porción del organismo, a otro órgano u otra porción del organismo. Cada excipiente debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con la composición objetivo y sus componentes y no ser perjudicial para el paciente. Los excipientes adecuados incluyen trehalosa, rafinosa, manitol, sacarosa, leucina, trileucina y cloruro cálcico. Los ejemplos de otros excipientes adecuados incluyen (1) azúcares, tales como lactosa y glucosa; (2) almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; (3) celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; (4) goma tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes, tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; (9) aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles, tal como propilenglicol; (11) polioles, tales como glicerol, sorbitol y polietilenglicol; (12) ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes de tamponamiento, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido alginico; (16) agua exenta de pirógenos; (17) disolución salina isotónica; (18) disolución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) disoluciones tampón de fosfato; y (21) otras sustancias atóxicas y compatibles empleadas en formulaciones farmacéuticas.

Ejemplificación

Ejemplo 1

- 30 Lo siguiente es una descripción detallada de la fabricación de 150 ml de amikacina liposómica/complejada.

Volumen inicial total = 1,5 l.

Contenido de etanol = 23,5% (volumen/volumen).

Composición del lípido: DPPC/colesterol (relación molar 1:1).

[Lípido] inicial = 7,6 mg/ml.

- 35 [Sulfato de amikacina] inicial = 57,3 mg/ml.

Volumen final de producto = 150 ml.

I) Composición e infusión

- 40 Se disolvieron directamente 7,47 g de DPPC y 3,93 g de colesterol en 352,5 ml de etanol en un baño de agua a 50 °C. Se disolvieron directamente 85,95 g de sulfato de amikacina en 1147,5 ml de tampón PBS. Luego se titula la disolución con NaOH o KOH ION para llevar el pH a un valor de aproximadamente 6,8.

Se añadieron o infundieron 352,5 ml de etanol/lípido a los 1147,5 ml de amikacina/tampón para obtener un volumen inicial total de 1,5 l. El etanol/lípido fue bombeado a 30 ml/min (también llamado velocidad de infusión) con una bomba peristáltica en la disolución de amikacina/tampón que estaba siendo rápidamente agitada a 150 rpm en un recipiente de reacción sobre una placa agitadora a temperatura ambiental.

- 45 El producto fue agitado a temperatura ambiental durante 20-30 minutos.

II) Operación de diafiltración o "lavado"

El recipiente de mezclamiento fue conectado a una bomba peristáltica y un cartucho de diafiltración. El cartucho de diafiltración es una membrana de fibra hueca con un corte de pesos moleculares de 500 kilodáltones. El producto

fue bombeado desde el recipiente de reacción a través del cartucho de diafiltración y luego de vuelta al recipiente de mezclado a temperatura ambiental. Se crea una contrapresión de aproximadamente 48,26 kPa a través del cartucho. La amikacina libre y el etanol fueron forzados a través de la membrana de fibra hueca por la contrapresión, quedando atrás la amikacina liposómica (el producto). El producto fue lavado 8 veces a temperatura ambiental. Se

5 añadió tampón PBS fresco (por medio de otra bomba peristáltica) al recipiente de reacción para compensar la separación del producto de permeación y mantener un volumen de producto constante.

El producto fue concentrado.

Ejemplo 2

Elevado encerramiento liposómico de amikacina

10 Se prepararon cuatro muestras de formulaciones lipídicas antiinfectivas con diferentes concentraciones de lípido y de agente antiinfectivo de acuerdo con los procedimientos siguientes.

Muestra nº 1. Se disolvieron 1,72 kg de sulfato de amikacina en 23 litros de disolución salina (NaCl al 0,9%) y se ajustó el pH a 6,5 añadiendo la cantidad necesaria de NaOH. Se disolvieron los lípidos, 98,2 g de DPPC y 51,8 g de colesterol, en 7 litros de etanol. Se formaron liposomas por infusión de la disolución lipídica en la disolución de

15 amikacina a un caudal de ~600 ml/min y bajo agitación constante. La suspensión resultante fue luego lavada para separar el etanol y la amikacina no encerrada, mediante diafiltración usando un cartucho de fibra hueca de Amersham con un tamaño de poro de 500 kDa. La suspensión fue concentrada hasta un volumen final de ~3,5 l.

Muestra nº 2. El procedimiento fue similar al de la muestra nº 1, con todas las cantidades de material proporcionalmente reducidas 100 veces. Se disolvieron 17,2 g de sulfato de amikacina en 230 ml de disolución salina (NaCl al 0,9%) y se ajustó el pH a 6,6 añadiendo la cantidad necesaria de NaOH. Se disolvieron los lípidos, 0,982 g de DPPC y 0,518 g de colesterol, en 70 ml de etanol. Se formaron liposomas por infusión de la disolución lipídica en la disolución de amikacina a un caudal de ~300 ml/min y bajo agitación constante. La suspensión resultante fue luego lavada para separar el etanol y la amikacina no encerrada, mediante diafiltración usando un cartucho de fibra hueca de Amersham. La suspensión fue concentrada hasta un volumen final de ~35 ml.

20

Muestra nº 3. Se prepararon liposomas mediante un procedimiento conocido como SPLV. Se disolvieron 1,4 g de sulfato de amikacina en 20 ml de disolución salina (NaCl al 0,9%) obteniéndose un pH de 3,3. Se disolvieron los lípidos, 0,666 g de DPPC y 0,333 g de colesterol, en 40 ml de diclorometano. Se mezclaron entre sí las disoluciones de amikacina y de lípido en un matraz redondo de 500 ml de capacidad y se sometió la mezcla a una breve sonicación para formar una emulsión. Luego se conectó el matraz a un sistema rotavapor BUCHI para eliminar el diclorometano a bajo vacío (-16,93 kPa), a una temperatura de 50 °C y bajo rotación constante, hasta que la mezcla de amikacina-lípido formó un gel. Cuando se colapsó finalmente el gel, se aumentó gradualmente el vacío hasta -67,73 kPa y se continuó el secado durante 30 minutos más. El volumen final de la suspensión liposómica formada fue 22 ml.

25

Muestra nº 4. El procedimiento fue similar al de la muestra nº 3. Se disolvieron 1,3 g de sulfato de amikacina en 20 ml de disolución salina y se ajustó el pH a 6,5 mediante la adición de NaOH. Se disolvieron los lípidos, 0,583 g de DPPC y 0,291 g de colesterol, en 35 ml de diclorometano. Se omitió la operación de sonicación. La operación de eliminación del disolvente en el sistema rotavapor se llevó a cabo a 40 °C durante 2 horas. El volumen final fue 20 ml.

30

Ejemplo 3

40 Elevado encerramiento liposómico de gentamicina

Muestra nº 5. Se disolvieron 20,0 g de sulfato de gentamicina en 230 ml de disolución salina (NaCl al 0,9%) y se ajustó el pH a 6,5 añadiendo la cantidad necesaria de ácido sulfúrico. Se disolvieron los lípidos, 0,982 g de DPPC y 0,518 g de colesterol, en 70 ml de etanol. Se formaron liposomas por infusión de la disolución lipídica en la disolución de gentamicina a un caudal de ~500 ml/min y bajo agitación constante. Se separaron la gentamicina no encerrada y el etanol mediante diafiltración usando un cartucho de fibra hueca de Amersham. La suspensión fue concentrada hasta un volumen final de ~35 ml.

45

Muestra nº 6. El procedimiento fue similar al de la muestra nº 5 salvo por lo siguiente: Se disolvieron 17,0 g de sulfato de gentamicina en 230 ml de una disolución 100 mM de Na₂SO₄ y se ajustó el pH a 6,5 añadiendo la cantidad necesaria de H₂SO₄. Se disolvieron los lípidos, 0,982 g de DPPC y 0,518 g de colesterol, en 75 ml de etanol.

50

Ejemplo 4

Encerramiento de otras formas salinas de amikacina

Muestra nº 7. El procedimiento fue similar al de la muestra nº 2 del Ejemplo 2. Se disolvieron 10,7 g de amikacina base y 4,2 g de ácido cítrico en 230 ml de disolución salina (NaCl al 0,9%). El pH de la disolución resultante de amikacina-citrato era 6,2. Se disolvieron los lípidos, 0,982 g de DPPC y 0,518 g de colesterol, en 70 ml de etanol. Se formaron liposomas por infusión de la disolución lipídica en la disolución de amikacina a un caudal de ~500 ml/min y bajo agitación constante. Se separaron la amikacina no encerrada y el etanol mediante diafiltración usando un cartucho de fibra hueca de Amersham. La suspensión fue concentrada hasta un volumen final de ~35 ml.

La relación real de lípido/fármaco fue similar a la de la muestra nº 2 y de nuevo menor que la esperada (encerramiento de fármaco mayor que el esperado). Considerando el hecho de que el volumen encerrado en la muestra nº 7 fue sólo 1,5 (en comparación con 2,5 en la muestra nº 2), la relación L/D esperada/real fue tan elevada como 5,2. Por lo tanto, también se puede formular citrato de amikacina liposómico, como el sulfato de amikacina, con elevado encerramiento.

Tabla 13. Sumario de los parámetros de las muestras 5-7 (ejemplos comparativos)

Parámetro medido	Nº de muestra		
	5	6	7
Concentración de lípidos (mg/ml)	44,8	41,8	41,7
Concentración de fármaco (mg/ml)	14,2	14,9	17,8
Relación real de lípido/fármaco (peso/peso)	3,2	2,8	2,3
Volumen encerrado (µl/micromol)	2,3	2,7	1,5
Relación esperada de lípido/fármaco (peso/peso)	5,7	5,4	12,2
Relación L/D esperada/real	1,82	1,92	5,20
Tamaño de los liposomas (µm)	0,226	0,236	0,234

Ejemplo 5

15 Biodisponibilidad de amikacina de formulaciones liposómicas de amikacina inhaladas en la rata

Se midió la velocidad de liberación de amikacina de los liposomas después de la inhalación por ratas y se comparó con la amikacina soluble inhalada.

Se generaron aerosoles de los productos de ensayo por medio de un nebulizador PARI LC Star fijado a una cámara de inhalación sólo para nariz. Las ratas CD[®]IGS recibieron una dosis estimada depositada en el pulmón de 6 mg/kg de amikacina en forma de una formulación liposómica o 5 mg/kg de amikacina soluble como una sola dosis o como una dosis diaria durante 14 días consecutivos. Se homogeneizó el pulmón u otro tejido con un aparato Polytron. Se examinó la cinética de supresión de amikacina del pulmón mediante el análisis de productos de homogeneización pulmonares en diferentes puntos temporales después del tratamiento con una sola dosis o 1 día y 28 días después de la administración de las múltiples dosis. Los niveles de amikacina se midieron por inmunofluorescencia polarizada en un analizador Abbott TDx[®] en ausencia o presencia de Triton X-100 al 1%, que libera la amikacina de los liposomas. Se añadieron liposomas a muestras de pulmón completo antes de la homogeneización para examinar la liberación de amikacina bajo estas condiciones. Se midieron las amikacinas libre y total con y sin Triton X-100 al 1% para evaluar las fugas de fármaco.

La amikacina liposómica, añadida a las muestras de pulmón completo, no mostró liberación significativa alguna de amikacina como resultado de la homogeneización tisular con el homogeneizador Polytron en ausencia de este detergente. Sin embargo, la adición de Triton X-100 al 1% condujo a la recuperación de todo el fármaco esperado. Por lo tanto, se pudo hacer una comparación directa entre el nivel total de amikacina (con detergente) y los niveles libremente disponibles en tejido pulmonar.

Se observó una elevada concentración total de amikacina (aproximadamente 500-600 µg/g de tejido pulmonar) inmediatamente después de la dosis única de 6 mg/kg de la amikacina liposómica, que disminuyó lentamente en aproximadamente un 50% a lo largo de un periodo de 7 días. El perfil temporal de la liberación de amikacina libre desde estos liposomas mostró una elevada concentración inicial de fármaco libre, que resultaba probablemente de amikacina liberada como resultado de la nebulización. Esta fase fue seguida de un nadir a aproximadamente las 24 horas y un aumento posterior, alcanzando un máximo de 279 µg/g a las 96 horas después de la administración. Al final del experimento de 7 días, una porción sustancial del fármaco que quedaba en el pulmón estaba en forma libre (aproximadamente 50-70%). Parecía que una pequeña porción del fármaco soluble administrado por inhalación también permanecía en el pulmón durante un largo periodo de tiempo. Sin embargo, la mayoría de la amikacina administrada en forma soluble era suprimida en varias horas, y la aparente AUC de amikacina libre a lo largo de 7 días era al menos 2 veces mayor en los animales que recibieron amikacina liposómica que en aquellos que

recibieron amikacina soluble. Algunos aspectos de este comportamiento pueden ser cualitativamente modelados con apropiadas constantes de velocidad para la supresión y la liberación lenta de fármaco desde los liposomas.

5 Después de 14 días consecutivos de administración (24 horas después de la última dosis), más del 20% de la amikacina total en los pulmones de las ratas que habían recibido amikacina liposómica estaba presente como fármaco libre (aproximadamente 650 µg/g). El nivel total de fármaco libre era incluso mayor que la cantidad en las ratas que habían inhalado amikacina soluble (aproximadamente 500 µg/g).

10 Se libera lentamente amikacina libre de los liposomas de las formulaciones liposómicas de amikacina en los pulmones de animales sanos a lo largo de una escala temporal de días. El fármaco libre que se libera tiene un tiempo de permanencia relativamente largo en el pulmón, como se ve por un depósito sustancial de fármaco libre en los pulmones.

Ejemplo 6

Proceso de infusión en línea

15 La esencia del proceso de infusión en línea es que una corriente de disolución de lípido es mezclada con una corriente de disolución de agente antiinfectivo "en línea" por medio de, por ejemplo, un conector en Y que está conectado a un trozo de tubo, denominado tubo de mezclamiento, donde puede tener lugar un mezclamiento adicional. A este respecto, este nuevo proceso difiere del proceso "convencional" de infusión en etanol, donde la disolución de lípido se infunde como una corriente en un volumen de disolución de amikacina.

Preparación de disoluciones de amikacina y de lípido

20 Se disolvieron 12,0 g de sulfato de amikacina en 200 ml de agua y se ajustó el pH a 6,5 añadiendo la cantidad necesaria de una disolución de NaOH al 25%. Se disolvieron los lípidos, 1,480 g de DPPC y 0,520 g de colesterol, en una mezcla de 60 ml de etanol y 10 ml de agua. Estas cantidades dan lugar a una tanda de 300 ml después de la infusión a unos caudales de lípido/amikacina de 300/500 ml/min, respectivamente. Los volúmenes pueden ser proporcionalmente ajustados para una escala mayor o si se desean caudales diferentes.

25 La disolución de amikacina preparada de acuerdo con lo anterior da lugar a una disolución de aproximadamente 40 mg/ml de amikacina (por base). La disolución de lípidos que se presenta era DPPC/colesterol (relación molar de 60/40), con un lípido total correspondiente a una disolución de aproximadamente 20 mg/ml (etanol al 90%). Los lípidos se calentaron a ~40 °C para acelerar la disolución.

30 Las cantidades exactas necesarias para una tanda de 300 ml son: 150 ml de amikacina, 90 ml de lípido y 60 ml de disolución salina (o agua) adicional que se añade después o durante la infusión para ajustar la concentración final de etanol.

Procedimiento de fabricación

En la Figura 8 se muestra una realización del sistema de infusión.

35 Se mezclan en línea las disoluciones de lípido y de amikacina usando un conector en Y [diámetro interno (DI) de 3,2 mm, diámetro externo (DE) de 6,4 mm] a caudales de ~300/500 ml/min (es decir, una relación de volúmenes de ~1/1,67 en lugar de ~1/3,35 en el proceso convencional). Se empleó un tubo MasterFlex L/S 25 (DI de 4,8 mm) para suministrar la disolución de lípido y se empleó un tubo L/S 17 (DI de 6,4 mm) para suministrar la disolución de amikacina. Para obtener caudales sincrónicos, se utilizaron dos cabezales de bomba con un sistema impulsor MasterFlex. De acuerdo con las áreas transversales de los tubos, la relación teórica de caudales debería ser $4,8^2/6,4^2 = 0,562 = 1/1,78$. Cuando se ajustó el sistema de impulsión de la bomba a 500 ml/min para el tubo L/S 17 de amikacina, los caudales medidos fueron ~300/500 = 1/1,67.

Puesto que la disolución de lípido contiene 90% de etanol, la mezcla en línea tenía ~34% de etanol. Para evitar la precipitación de la amikacina, se puede añadir una disolución de NaCl antes o durante la infusión a un caudal de 100-200 ml/min (se supone que ya se han formado los liposomas en este momento). De esta manera, la mezcla final tendría ~27% de etanol, en el cual se espera que toda la amikacina libre sea soluble.

45 El caudal total de infusión de líquido, 800-1000 ml/min, es comparable al caudal de permeación cuando se utilizan dos cartuchos grandes para diafiltración. Esto hace posible realizar infusión y concentración simultáneas por diafiltración.

50 La suspensión de liposomas resultante fue lavada para separar la amikacina libre por diafiltración usando un cartucho de fibra hueca UFP-500-C-3MA de Amersham (área de membrana de 140 cm²; fibra con DI de 0,5 mm). En la primera operación, se concentró la suspensión hasta casi la mitad del volumen original (150 ml). A continuación, durante la diafiltración para lavar, se hizo recircular la suspensión y se alimentó disolución salina fresca a la mezcla

a un caudal de ~6 ml/min con objeto de equiparar la velocidad de permeación y mantener así un volumen constante. Se continuó la diafiltración hasta que se proporcionó un volumen de disolución salina de alimentación igual a 4 veces el volumen de la suspensión (es decir, 4 x 150 ml = 600 ml). A este procedimiento de diafiltración/lavado se hará referencia como 4 "lavados". Finalmente, se concentró la suspensión (diafiltración sin entrada de disolución salina) para obtener el Producto Final con unas deseadas concentraciones de amikacina y de lípido. El caudal de recirculación durante la operación de diafiltración fue ~350 ml/min y, durante la operación de concentración final, se redujo gradualmente hasta ~150 ml/min con objeto de mantener la presión de entrada por debajo de 68,95 kPa.

Referencias

1. Veldhuizen, R., Nag, K., Orgeig, S. y Possmayer, F., The Role of Lipids in Pulmonary Surfactant, *Biochim. Biophys. Acta* 1408: 90-108 (1998).
2. Hagwood, S., Derrick, M. y Poulain, F., Structure and Properties of Surfactant Protein B, *Biochim. Biophys. Acta* 1408: 150-160 (1998).
3. Johansson, J., Structure and Properties of Surfactant Protein C, *Biochim. Biophys. Acta* 1408: 161-172 (1998).
4. Ikegami, M. y Jobe, A. H., Surfactant Protein Metabolism in vivo, *Biochim. Biophys. Acta* 1408: 218-225 (1998).
5. Couveur, P., Fattel, E. y Andremont A., Liposomes and Nanoparticles in the Treatment of Intracellular Bacterial Infections, *Pharm. Res.* 8: 1079-1085 (1991).
6. Gonzales-Rothi, R. J., Casace, J., Straub, L., y Schreier, H., Liposomes and Pulmonary Alveolar Macrophages: Functional and Morphologic Interactions, *Exp. Lung Res.* 17: 685-705 (1991).
7. Swenson, C. E., Pilkiewicz, F. G., y Cynamon, M. H., Liposomal Aminoglycosides and TLC G-65, *Aids Patient Care* 290-296 (diciembre de 1991).
8. Costerton, J. W., Stewart, P. S., y Greenberg, E. P., Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections, *Science* 284: 1318-1322 (1999).
9. Cash, H. A., Woods, D. E., McCullough, W. G., Johanson, J. R., y Bass, J. A., A Rat Model of Chronic Respiratory Infection with *Pseudomonas aeruginosa*, *American Review of Respiratory Disease* 119: 453-459 (1979).
10. Cantin, A. M. y Woods, D. E., Aerosolized Prolastin Suppresses Bacterial Proliferation in a Model of Chronic *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infection, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 160: 1130-1135 (1999).
11. Ramsey, B. W., Dorkin, H. L., Eisenberg, J. D., Gibson, R. L., Harwood, I. R., Kravitz, R. M., Efficacy of Aerosolized Tobramycin in Patients with Cystic Fibrosis, *New England J. of Med.* 328: 1740-1746 (1993).
12. Mendelman, P. M., Smith, A. L., Levy, J., Weber, A., Ramsey, B., Davis, R. L., Aminoglycoside Penetration, Inactivation, and Efficacy in Cystic Fibrosis Sputum, *American Review of Respiratory Disease* 132: 761-765 (1985).
13. Price, K. E., DeFuria, M. D., Pursiano, T. A., Amikacin, an aminoglycoside with marked activity against antibiotic-resistant clinical isolates, *J. Infect. Dis.* 134: S249-261 (1976).
14. Dámaso, D., Moreno-López, M., Martínez-Beltrán, J., García-Iglesias, M. C., Susceptibility of current clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and enteric gram-negative bacilli to Amikacin and other aminoglycoside antibiotics, *J. Infect. Dis.* 134: S394-90 (1976).
15. Pile, J. C., Malone, J. D., Eitzen, E. M., Friedlander, A. M., Anthrax as a potential biological warfare agent, *Arch. Intern. Med.* 158: 429-434 (1998).
16. Gleiser, C. A., Berdjis, C. C., Hartman, H. A., y Glouchenour, W. S., Pathology of experimental respiratory anthrax in *Macaca mulatta*, *Brit. J. Exp. Pathol.*, 44: 416-426 (1968).

REIVINDICACIONES

1. Una formulación lipídica antiinfectiva que comprende un agente antiinfectivo y una formulación lipídica, en donde el agente antiinfectivo es un aminoglicósido, la relación ponderal de lípido a aminoglicósido es 0,75:1 o menos, y la formulación lipídica comprende un fosfolípido y un esteroles.
- 5 2. La formulación lipídica antiinfectiva de la Reivindicación 1, en donde la formulación lipídica está sustancialmente exenta de lípidos aniónicos.
3. La formulación lipídica antiinfectiva de la Reivindicación 1, en donde la relación de lípido a aminoglicósido es 0,5:1 o menos.
- 10 4. La formulación lipídica antiinfectiva de cualquier reivindicación precedente, en donde la formulación lipídica es un liposoma.
5. La formulación lipídica antiinfectiva de la Reivindicación 4, en donde el liposoma tiene un diámetro medio de 0,1 μm a 1,0 μm , de 0,2 μm a 0,5 μm , de 0,2 μm a 0,4 μm , o de 0,2 μm a 0,3 μm .
6. La formulación lipídica antiinfectiva de cualquier reivindicación precedente, en donde el aminoglicósido es amikacina, gentamicina, tobramicina, estreptomycin, netilmicina o kanamicina.
- 15 7. La formulación lipídica antiinfectiva de la Reivindicación 6, en donde el aminoglicósido es amikacina.
8. La formulación lipídica antiinfectiva de cualquier reivindicación precedente, en donde la formulación lipídica comprende lípidos neutros.
9. La formulación lipídica antiinfectiva de la Reivindicación 8, en donde todos los lípidos que componen la formulación lipídica son lípidos neutros.
- 20 10. La formulación lipídica antiinfectiva de cualquier reivindicación precedente, exenta de lípidos aniónicos.
11. La formulación lipídica antiinfectiva de cualquier reivindicación precedente, en donde el fosfolípido es dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) y el esteroles es colesterol.
12. La formulación lipídica antiinfectiva de cualquier reivindicación precedente, para uso en medicina.
- 25 13. La formulación lipídica antiinfectiva de la Reivindicación 12, para tratar a un paciente con una infección pulmonar.
14. La formulación lipídica antiinfectiva de la Reivindicación 13, en donde la infección pulmonar es una infección por pseudomonas, *P. aeruginosa*, *P. paucimobilis*, *P. putida*, *P. fluorescens* y *P. acidovorans*, estafilococos, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), estreptococos, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Haemophilus*, *Yersinia pestis*, *Burkholderia pseudomallei*, *B. cepacia*, *B. gladioli*,
30 *B. multivorans*, *B. vietnamiensis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium complex* (MAC), *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. fortuitum complex*, *M. fortuitum* o *M. chelonae*.
15. La formulación lipídica antiinfectiva de la Reivindicación 13 o Reivindicación 14, en donde el paciente tiene fibrosis quística.
- 35 16. Un método para preparar la formulación lipídica antiinfectiva de cualquier reivindicación precedente, que comprende infundir una disolución o mezcla acuosa o alcohólica del aminoglicósido con una disolución o mezcla de lípido-alcohol a una temperatura por debajo de la transición de fase de al menos uno de los lípidos, en donde la infusión de la disolución o mezcla acuosa o alcohólica del aminoglicósido se realiza desde arriba.
17. El método de la Reivindicación 16, en donde la disolución o mezcla de lípido-alcohol tiene una concentración de 10 a 30 mg/ml.
- 40 18. El método de la Reivindicación 16 o Reivindicación 17, en donde la disolución o mezcla acuosa o alcohólica del aminoglicósido tiene una concentración de 20 a 70 mg/ml.
19. Un método para preparar una formulación lipídica antiinfectiva de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 15, que comprende: mezclar una corriente de una disolución o mezcla de lípido con una corriente de una disolución o mezcla de aminoglicósido, en donde las dos corrientes se mezclan en línea.
- 45 20. El método de la Reivindicación 19, en donde las dos corrientes entran en un conector en Y antes del mezclamiento en línea.

21. El método de la Reivindicación 19 o Reivindicación 20, en donde las disoluciones o mezclas son acuosas o alcohólicas.
22. El método de la Reivindicación 19, 20 o 21, en donde la formulación lipídica es un liposoma.
- 5 23. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 19 a 22, en donde el aminoglicósido es amikacina, gentamicina, tobramicina, estreptomycin, netilmicina o kanamicina.
24. El método de la Reivindicación 23, en donde el aminoglicósido es amikacina.
25. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 19 a 24, en donde la corriente de una disolución o mezcla de lípido y la corriente de una disolución o mezcla de aminoglicósido se mezclan a un caudal total de 700 a 900 ml/min.
26. El método de la Reivindicación 25, en donde el caudal total es 800 ml/min.
- 10 27. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 19 a 26, en donde la corriente de una disolución o mezcla de lípido se añade a un caudal de 200 a 400 ml/min.
28. El método de la Reivindicación 27, en donde la corriente de una disolución o mezcla de lípido se añade a un caudal de 300 ml/min.
- 15 29. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 19 a 28, en donde la corriente de una disolución o mezcla de aminoglicósido se añade a un caudal de 400 a 600 ml/min.
30. El método de la Reivindicación 29, en donde la corriente de una disolución o mezcla de aminoglicósido se añade a un caudal de 500 ml/min.
31. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 19 a 30, en donde la temperatura de las corrientes combinadas es 30-40 °C.
- 20 32. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 19 a 31, en donde la temperatura de la disolución o mezcla de lípido es 30 °C y la temperatura de la disolución o mezcla de aminoglicósido es 30 °C.
33. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 19 a 31, en donde la temperatura de la disolución o mezcla de lípido es 50 °C y la temperatura de la disolución o mezcla de aminoglicósido es la temperatura ambiental.
- 25 34. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 19 a 33, que comprende además la operación de diluir las corrientes combinadas con agua al menos 20 segundos después del mezclamiento.
35. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 19 a 34, en donde la concentración de la disolución o mezcla de aminoglicósido es de 30 a 50 mg/ml.
36. El método de la Reivindicación 35, en donde la concentración de la disolución o mezcla de aminoglicósido es de 40 a 50 mg/ml.
- 30 37. El método de las Reivindicaciones 19-36, en donde el fosfolípido es DPPC y el esteroles es colesterol.
38. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 19 a 37, en donde la relación de lípido a aminoglicósido es 0,5:1 o menos.

Figura 1

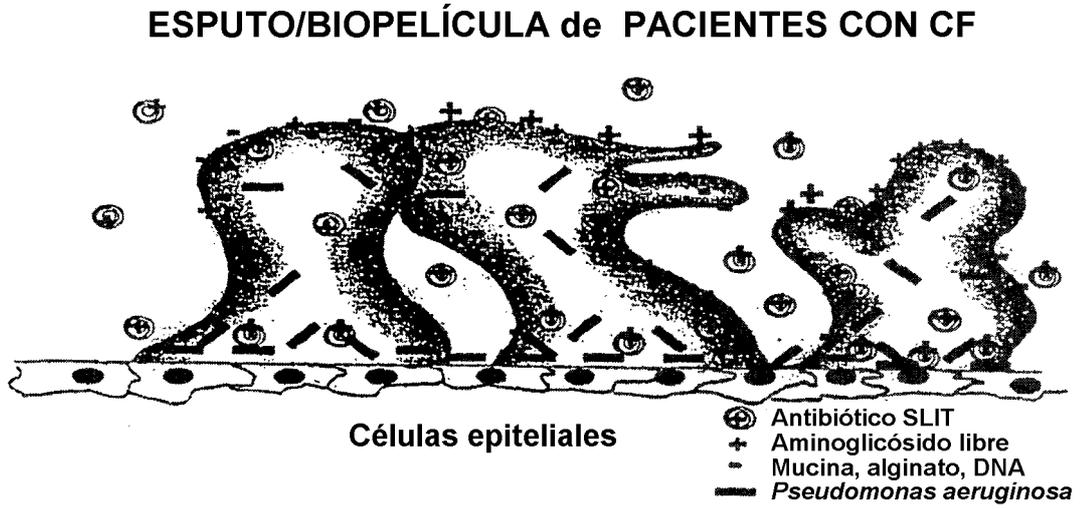


Figura 2

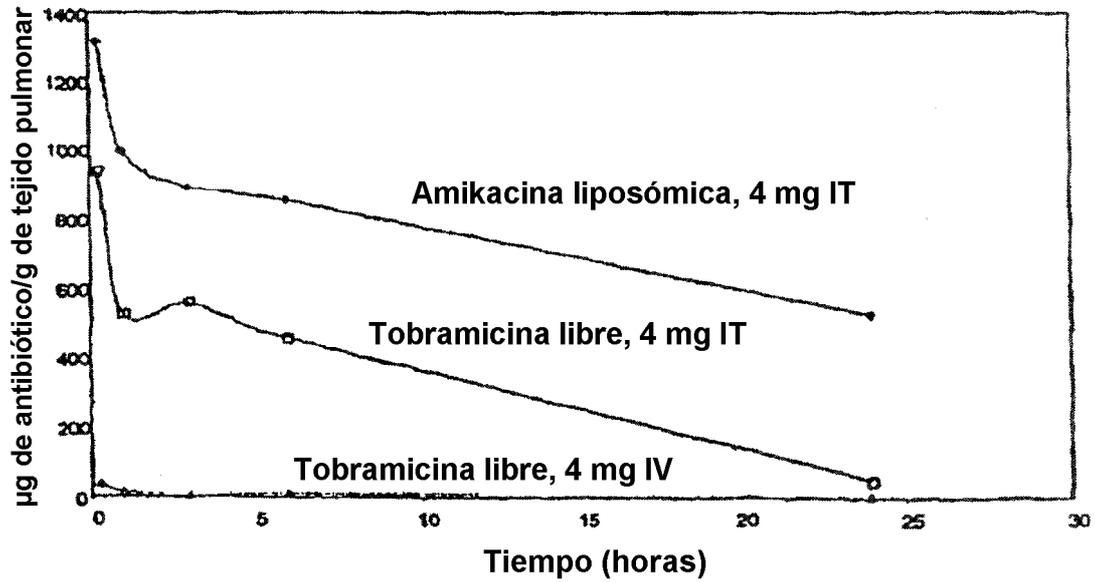


Figura 3

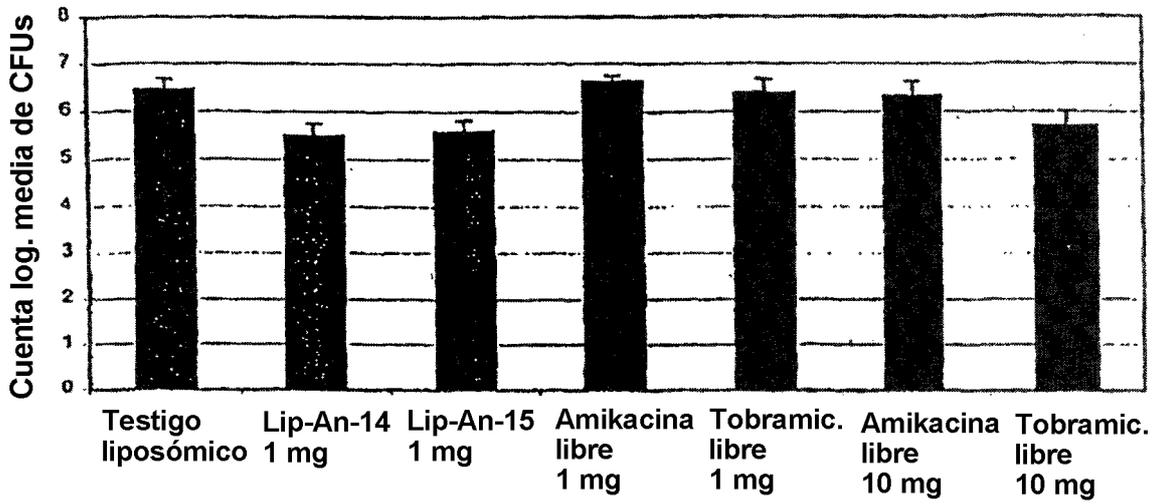


Figura 4

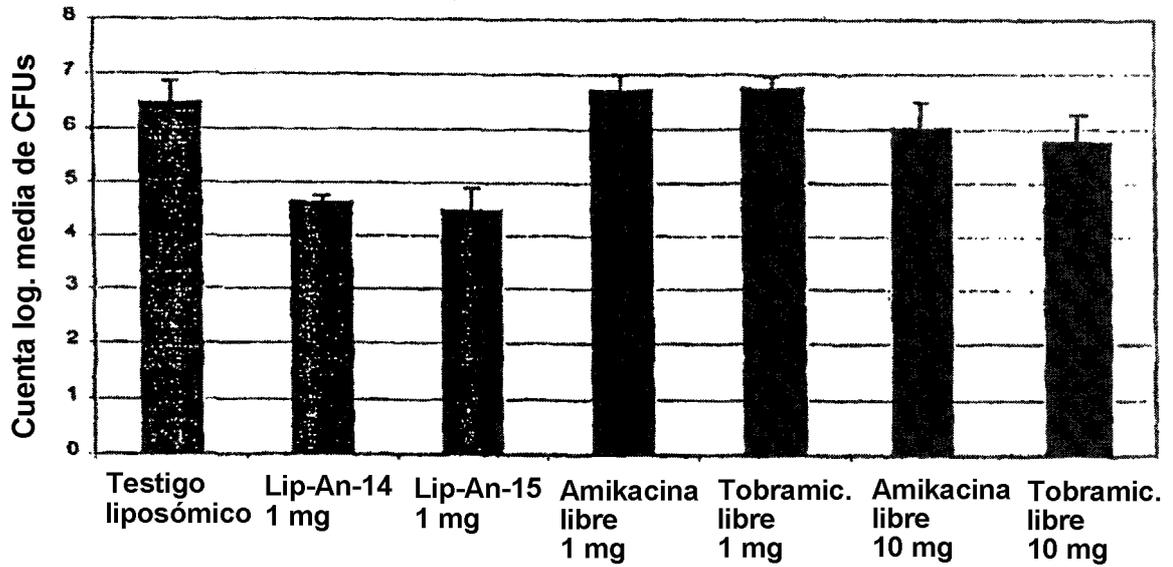


Figura 5

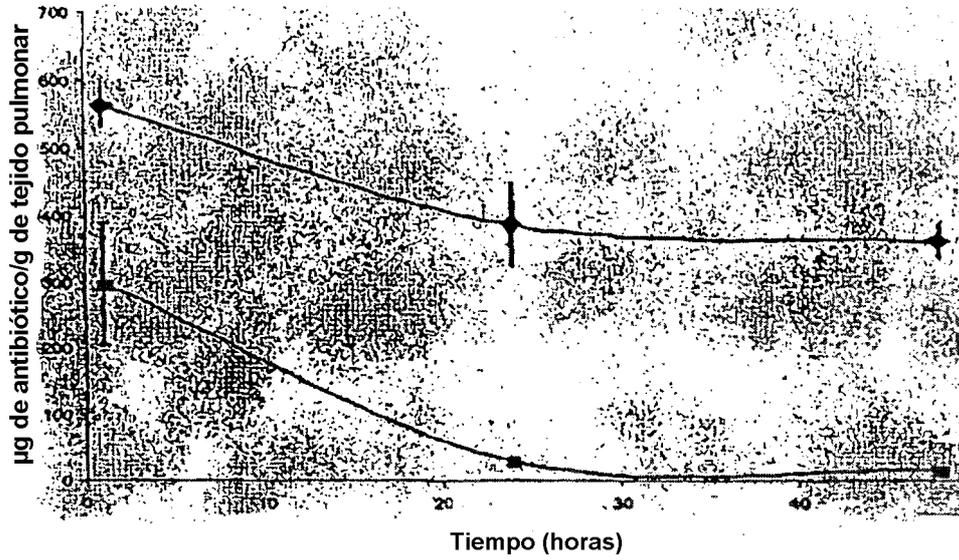


Figura 6

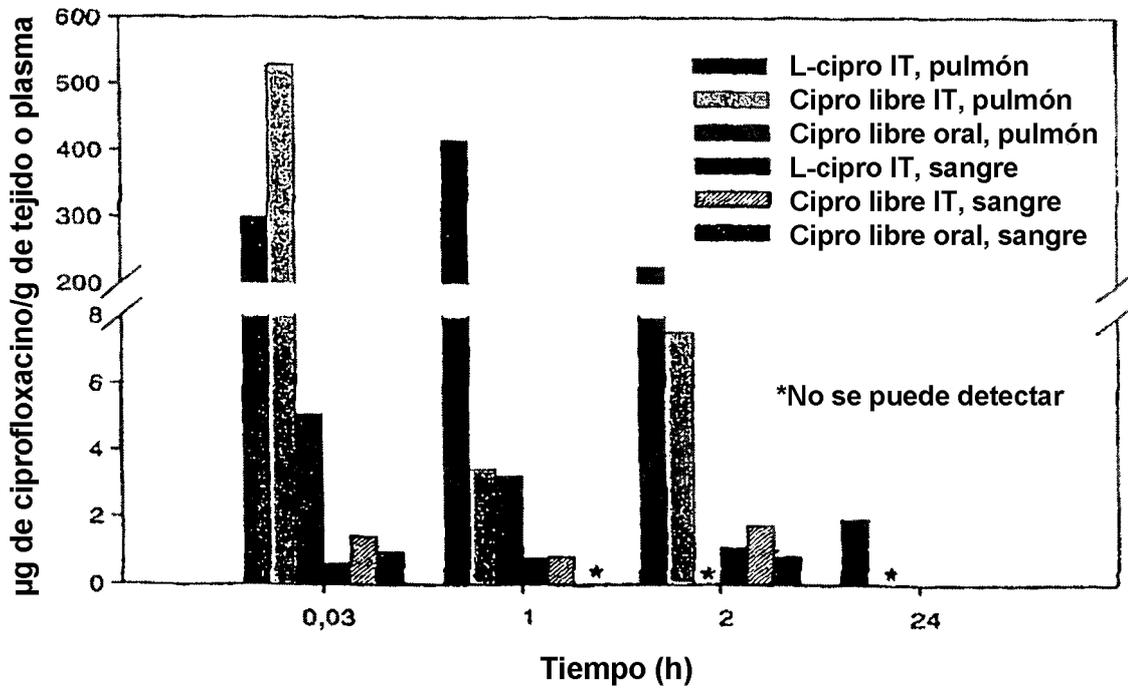


Figura 7

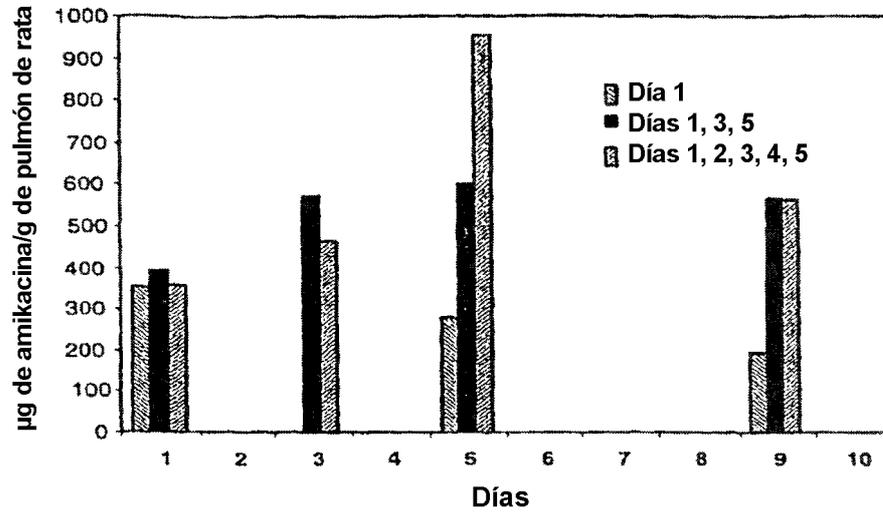


Figura 8

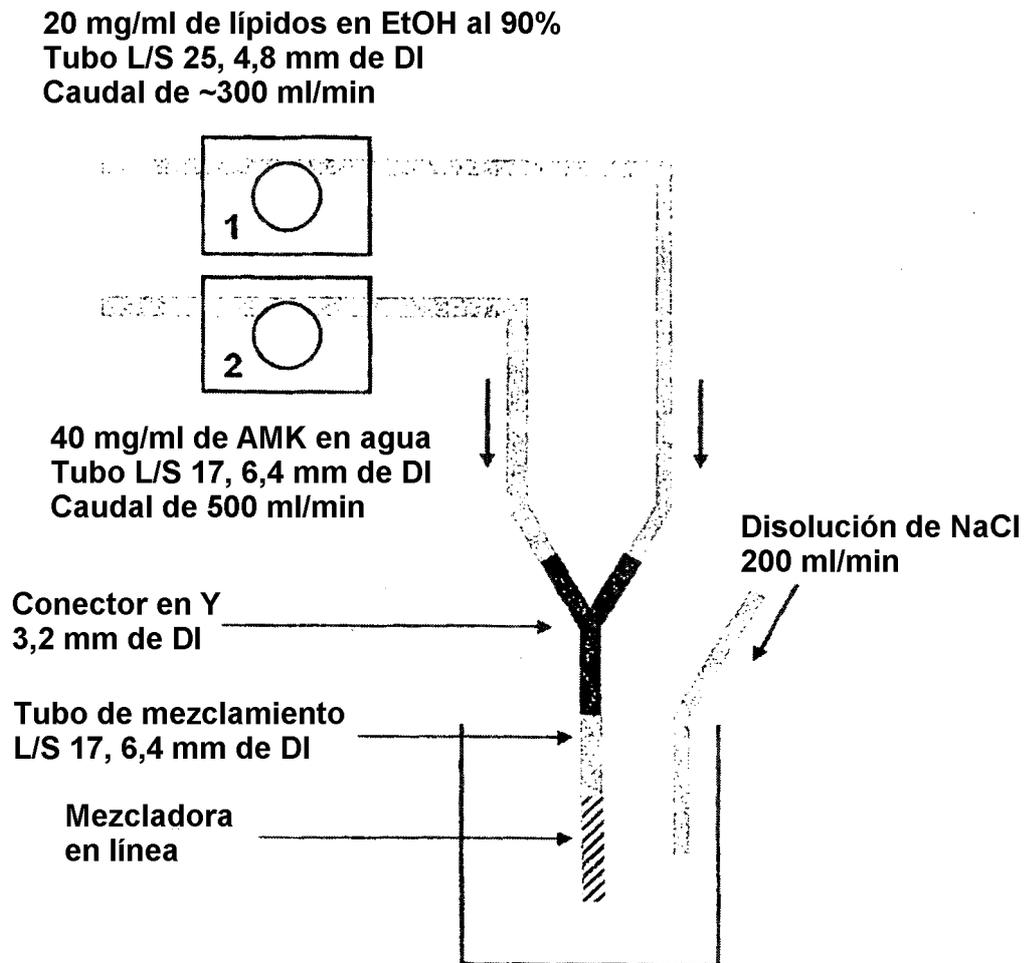


Figura 9

