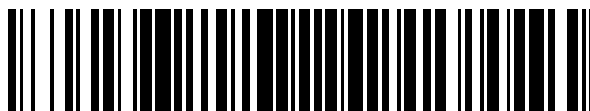


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 477 233**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.02.2011 E 11709472 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.04.2014 EP 2531222**

54 Título: **Liposomas que contienen prostaglandina E1 (PGE1), formulaciones que los contienen y su uso**

30 Prioridad:

03.02.2010 IT FI20100013

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

16.07.2014

73 Titular/es:

**BIORICERCA DI GIOVANNI BROTZU & C. SNC
(50.0%)**

**Via Carlo Cattaneo 2
09127 Cagliari, IT y
FASE 1 S.R.L. (50.0%)**

72 Inventor/es:

BROTZU, GIOVANNI

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 477 233 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

Liposomas que contienen prostaglandina E1 (PGE1), formulaciones que los contienen y su uso

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de las formulaciones farmacéuticas, y en particular a las que comprenden liposomas.

Estado de la técnica

El propósito de la presente invención es proporcionar liposomas eficaces y seguros que encapsulan prostaglandina E1 (PGE1) para el tratamiento (tras la administración sistémica) de trastornos vasculares en pacientes diabéticos, y para el tratamiento local (tras la administración tópica) de úlceras cutáneas y retinopatías diabéticas.

10 Cuando se administra de manera sistémica, se sabe que la prostaglandina E1 (PGE1) se metaboliza rápidamente en el pulmón, de forma que obviamente se pierde la mayoría de su eficacia. Para superar el problema anteriormente mencionado, se han estudiado los liposomas de fosfatidilcolina u otros fosfolípidos para determinar la viabilidad de obtener la liberación del complejo PGE1- α -ciclodextrina para el tratamiento de afecciones patológicas asociadas a la diabetes (véase, por ejemplo, Toyota T. et al.: Lipo-PGE1. A new lipid-encapsulation of prostaglandin E1: placebo and prostaglandin E1 controlled trails in patients with diabetic neuropathy and leg ulcers. Prostaglandins 1993, 46, 453-468.

En la investigación previa (véase Golub M. et al.: Metabolism of prostaglandins A1 and E1. J. Clin. Invest. 1975; 56, 1404-1410), se usaron liposomas de fosfatidilcolina como vehículo del fármaco para permitir que PGE1 pasase más allá del filtro pulmonar y evitar que fuera metabolizada por la 15-hidroxi deshidrogenasa.

20 Dada la importancia del uso de PGE1- α -ciclodextrina en el tratamiento de las enfermedades vasculares de los diabéticos, y para el tratamiento local de úlceras cutáneas y retinopatías diabéticas, existe la necesidad evidente de desarrollar formulaciones nuevas capaces de superar los problemas anteriormente mencionados, asegurando una prolongación eficaz de la semivida de la PGE1 administrada y facilitando la liberación del fármaco en el sitio necesario.

25 Sumario de la invención

Se describen liposomas unilamelares que encapsulan PGE1 y/o PGE1- α -ciclodextrina, en combinación con L-propionil carnitina, cuya superficie externa está revestida con polímeros hidrófilos.

Descripción detallada de la invención

30 La presente invención permite superar los problemas anteriormente descritos gracias a la combinación de liposomas unilamelares que comprenden prostaglandina E1 con L-propionil-carnitina, en cuya superficie externa hay presentes polímeros hidrófilos.

35 De hecho, se ha descubierto sorprendentemente que dicho revestimiento de polímeros no solamente permite una mejor adhesión a las células del tejido endotelial, sino que también mejora la estabilidad del liposoma en el plasma y por lo tanto prolonga su tiempo de circulación, con un incremento consiguiente en la semivida del fármaco y una capacidad mejorada del sistema de administración para unirse a un sitio específico.

Los liposomas unilamelares según la invención consisten en una vesícula fosfolipídica que contiene un núcleo de disolución acuosa.

Los fosfolípidos que constituyen la pared de la vesícula son fosfolípidos naturales o sintéticos, dada su elevada biocompatibilidad y atoxicidad.

40 Los fosfolípidos adecuados para el uso según la invención incluyen, por ejemplo: fosfatidilcolina (lecitina), fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, dimiristoilfosfatidilcolina (DPMC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), palmitoil-estearoilfosfatidilcolina, esfingomiolina.

Los liposomas pueden incluir también aditivos que sirven como estabilizantes o modificadores de la carga superficial, tales como colesterol, sulfato de colesterol.

45 La disolución acuosa contenida en la vesícula consiste en tampón fosfato o solución fisiológica.

Los liposomas descritos anteriormente encapsulan el ingrediente activo (ya sea en forma libre [PGE1] o en forma de un compuesto de inclusión [PGE1- α -ciclodextrina]) y L-propionil-carnitina, cuyo propósito es facilitar la beta-oxidación de las cadenas de lípidos, incrementando el metabolismo de las células endoteliales.

50 La superficie externa de los liposomas se reviste después con polímeros hidrófilos, tales como poli-L-lisina (PLL), poliornitina y fibronectina, o mezclas de las mismas.

Se prefiere poli-L-lisina para asegurar la adhesión a las células en las placas de cultivo, ya que se ha demostrado que la poli-L-lisina hace que el liposoma se adhiera a las células endoteliales.

5 Las vesículas unilamelares pequeñas (SUV) según la invención se pueden preparar mediante el uso de técnicas conocidas, partiendo de vesículas liposómicas multilamelares (MLV) mediante extrusión de estas últimas a través de filtros de policarbonato, mediante el uso de un extrusor adecuado, o mediante homogeneización.

Las SUV así obtenidas se revisten después con los polímeros hidrófilos "haciendo gotear" los liposomas gota a gota en la disolución de polímeros bajo una agitación constante.

10 Las vesículas liposómicas multilamelares (MLV) se pueden preparar también, según métodos conocidos, mediante la dispersión de todos los componentes (fosfolípidos, cualquier estabilizante, PEG1 y/o PGE1- α -ciclodextrina, carnitina) en tampón fosfato (pH 7,4) con agitación mecánica a una temperatura mayor que la temperatura de transición (T_c) del fosfolípido que se está usando. Las MLV resultantes se usan para obtener SUV mediante extrusión a través de una membrana de policarbonato o mediante homogeneización. Las SUV así obtenidas se purifican después mediante la eliminación del ingrediente activo sin encapsular mediante diálisis.

15 Las formulaciones para el uso sistémico, por lo tanto, consisten en los liposomas así obtenidos diluidos de manera adecuada - con solución salina, por ejemplo - para obtener una formulación adecuada, por ejemplo, para la administración sistémica mediante inyección venosa en una infusión lenta a lo largo de 24 horas.

Si se necesitan formulaciones para uso tópico (p.ej. para el tratamiento de úlceras o retinopatías, como se mencionó previamente), los liposomas se dispersan en películas de polímeros adecuados.

20 Dichas películas se conocen y se preparan mediante el uso de polímeros orgánicos, tales como hialuronato sódico, hidroxipropilcelulosa (HPMC), polietileno glicol 400 (PEG 400) y agua, en proporciones adecuadas, y se caracterizan por sus propiedades viscoelásticas, su grosor y bio-adhesión in vitro, mediante el uso de un reómetro, un micrómetro y un tensiómetro, respectivamente.

25 Las películas se usan después para preparar la medicación para la aplicación in situ que consiste, por ejemplo, en tiras de diversos tamaños a aplicar sobre lesiones o sobre la superficie a tratar. También pueden estar en forma de lentes de contacto para aplicarlas directamente en el ojo para el tratamiento de retinopatías.

Si es necesario, las formulaciones también se pueden liofilizar y posteriormente reconstituir en el momento de su uso.

30 La eficacia (E%) de la encapsulación del ingrediente activo y la carnitina en los liposomas se determinó mediante HPLC (obviamente después de haber descompuesto los liposomas con un agente de lisis de membranas adecuado, tal como Triton X-100).

Los liposomas se caracterizaron basándose en sus dimensiones, índice de polidispersión (PI) y potencial z, aunque sus características morfológicas y estructurales se estudiaron en un microscopio electrónico de transmisión (TEM) y en un microscopio óptico de luz polarizada.

Los estudios de liberación in vitro se llevaron a cabo mediante el uso de celdas de difusión de Franz.

35 Los liposomas revestidos y sin revestir se ensayaron después in vitro, mediante el uso de células endoteliales para determinar el efecto de los polímeros usados sobre la adhesión de las vesículas a dichas células.

También se determinó la distribución de PGE1 dentro de las células.

40 Las células se trataron con los liposomas revestidos con polímeros hidrófilos y que contenían PGE1 (en forma libre y de complejo). Los liposomas se "marcaron" con colorantes hidrófilos y lipófilos para permitir que se pudieran localizar dentro de la célula. Al final del experimento, las células se fijaron y se estudiaron al microscopio para determinar la interiorización de los liposomas y su localización.

La invención se ilustra ahora adicionalmente en vista de los ejemplos proporcionados a continuación.

Ejemplo 1

45 Los liposomas se prepararon en condiciones asépticas mediante el uso de materias primas estériles. Se usó una disolución de fosfatidilcolina (50 mg/ml), PGE1 (libre o compuesto) (60 μ g/ml) y L-propionil-carnitina (10 mg/ml). Los componentes se colocaron en un recipiente estéril adecuado con medio acuoso estéril (tampón, pH 7,4).

La dispersión se mantuvo bajo agitación mecánica constante durante 2 horas. Así se obtuvo una dispersión coloidal homogénea (vesicular) de liposomas multilamelares (MLV).

50 Los MLV se extruyeron después mediante el uso de filtros de policarbonato con un diámetro de poro de 50 nm para obtener vesículas unilamelares pequeñas (SUV).

Los liposomas unilamelares se dializaron después para eliminar el fármaco sin encapsular.

- 5 Los liposomas resultantes se "vertieron gota a gota" después en una disolución de polilisina (PM 150.000-300.000) a una concentración que correspondió al 0,01-1 % y se mantuvieron con agitación constante durante 2-3 horas para garantizar la interacción electrostática del polímero hidrófilo (cargado positivamente) con la superficie liposómica (cargada negativamente). La interacción entre el liposoma y el polímero se identificó a partir de la variación de la carga superficial (el potencial z se hace positivo) y a partir de las dimensiones de las vesículas (desde 60 nm hasta 98 nm).

- 10 Los liposomas resultantes se pueden liofilizar después y conservarlos a temperatura ambiente, y se pueden usar para la preparación de formulaciones para la administración sistémica, p.ej. para la dilución en una solución salina del 0,09%.

De manera alternativa, si se necesita preparar formulaciones para la aplicación tópica, los liposomas revestidos o sin revestir se incorporan en películas de polímeros para la administración tópica del fármaco. Las películas se preparan mediante el uso de hialuronato sódico, hidroxipropilcelulosa (HPMC), polietilen glicol 400 (PEG 400) y agua, en proporciones adecuadas.

- 15 Las películas se caracterizan in vitro basándose en sus propiedades visco-elásticas, su grosor y su bio-adhesión, mediante el uso de un reómetro, un micrómetro y un tensiómetro, respectivamente. De nuevo, los estudios de liberación in vitro se llevan a cabo mediante el uso de celdas de difusión de Franz.

Caracterización de liposomas

Se descubrió que el diámetro medio de los liposomas fue de 60 nm con un índice de polidispersión de 0,2.

- 20 La cantidad de PGE 1 contenida en los liposomas tras la purificación estuvo en el intervalo de 30-50 µg/ml, mientras la cantidad de carnitina estuvo en el intervalo de 0,05 a 0,2 mg/ml.

- 25 Los liposomas se caracterizaron basándose en sus dimensiones, índice de polidispersión (PI) y potencial z, respectivamente, mediante espectroscopía de correlación de fotones (PCS) (dimensiones y PI) y M3-PALS (dispersión de luz con análisis de fase), que mide la movilidad electroforética de las partículas en una celda controlada mediante termostato (potencial z), mediante el uso del aparato Zetasizer Nano (Malvern Instruments, R.U.).

REIVINDICACIONES

1. Liposomas unilamelares que comprenden PGE1 en combinación con L-carnitina, en los que en la superficie externa de dichos liposomas hay polímeros hidrófilos.
- 5 2. Los liposomas unilamelares según la reivindicación 1, que comprenden fosfolípidos naturales o sintéticos elegidos de: lecitina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, dimiristoilfosfatidilcolina - DPMC, dipalmitoilfosfatidilcolina DPPC, diestearoilfosfatidilcolina DSPC, palmitoil-estearoilfosfatidilcolina, esfingomiélin, posiblemente en combinación con aditivos que actúan como estabilizantes o modificadores de la carga superficial.
- 10 3. Los liposomas unilamelares según la reivindicación 1, en los que dicha PGE1 es prostaglandina E1 en forma libre o como un complejo de inclusión de PGE1- α -ciclodextrina.
4. Los liposomas unilamelares según la reivindicación 1, en los que dichos polímeros hidrófilos se eligen de: Poli-L-Lisina - PLL, poliornitina y fibronectina o mezclas de las mismas.
5. Un proceso para la preparación de liposomas según las reivindicaciones 1-4, en el que dichos liposomas se obtienen mediante homogeneización o extrusión de liposomas multilamelares a través de filtros de policarbonato.
- 15 6. Las formulaciones para la administración sistémica que comprenden liposomas según las reivindicaciones 1 - 4.
7. Las formulaciones para la aplicación tópica que contienen liposomas según las reivindicaciones 1 - 4.
8. Las formulaciones según la reivindicación 7, en las que dichas formulaciones comprenden liposomas según las reivindicaciones 1 - 4 dispersos en películas de polímeros.
- 20 9. Las formulaciones según la reivindicación 8, en las que dichas películas de polímeros se preparan mediante el uso de polímeros orgánicos elegidos de: hialuronato sódico, hidroxipropilcelulosa - HPMC, polietilenglicol 400 y agua en proporciones adecuadas.
10. Las formulaciones según la reivindicación 9, que consisten en tiras para aplicación "in situ".