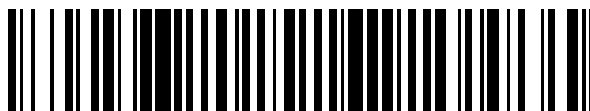


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 520 028**

51 Int. Cl.:

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 9/72 (2006.01)

A61K 31/47 (2006.01)

A61K 31/495 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.10.2007 E 07867260 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.08.2014 EP 2079443**

54 Título: **Formulaciones inhaladas de doble acción, que proporcionan un perfil de liberación tanto inmediata como sostenida**

30 Prioridad:

24.10.2006 US 862753 P

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

11.11.2014

73 Titular/es:

**ARADIGM CORPORATION (100.0%)
3929 POINT EDEN WAY
HAYWARD, CALIFORNIA 94545, US**

72 Inventor/es:

**CIPOLLA, DAVID C. y
BLANCHARD, JAMES**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 520 028 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

Formulaciones inhaladas de doble acción, que proporcionan un perfil de liberación tanto inmediata como sostenida

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas para inhalación, tales como para el tratamiento de infecciones del tracto respiratorio causadas por una variedad de microorganismos. En particular, la presente invención se refiere a una formulación de liberación bifásica que proporciona liberación inmediata y liberación sostenida de un fármaco tal como los fármacos antiinfecciosos administrados por inhalación para el tratamiento de la fibrosis quística.

Antecedentes de la invención

10 Las infecciones del tracto respiratorio son causadas por una variedad de microorganismos. Las infecciones que son persistentes tienen miríadas de consecuencias para los servicios de salud, incluyendo el aumento de la carga y coste del tratamiento, y para el paciente en términos de modelos de tratamiento más invasivos y posibilidades de una enfermedad grave o incluso la muerte. Sería beneficioso si estuviera disponible un modelo de tratamiento mejorado que proporcione un tratamiento profiláctico para evitar que los pacientes sensibles adquieran infecciones del tracto respiratorio, así como para aumentar la tasa o eficacia de erradicación de las infecciones en pacientes ya infectados con los microorganismos.

15 En particular, la fibrosis quística (CF) es un ejemplo de una enfermedad en la que los pacientes adquieren a menudo infecciones del tracto respiratorio persistentes o tenaces. La fibrosis quística es una enfermedad genética potencialmente mortal que afecta aproximadamente a 30.000 personas en los Estados Unidos con una frecuencia de aproximadamente uno de cada 2.500 nacidos vivos (Fitzsimmons SC, 1993). El nombre de fibrosis quística se refiere a la cicatrización característica (fibrosis) y a la formación de quistes dentro del páncreas, reconocidos por primera vez en la década de 1930. Cada año se diagnostican aproximadamente 1000 nuevos casos de fibrosis quística. Más del 80 por ciento de los pacientes son diagnosticados a la edad de tres años; sin embargo, casi el 10 por ciento de los nuevos casos diagnosticados tienen 18 años o más.

25 El defecto primario de la fibrosis quística se expresa como una alteración del transporte de iones a través del regulador de conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), que es la proteína que regula la conductancia de cloruro mediada por AMP cíclico en las membranas apicales de los epitelios secretores (Schroeder SA *et al.*, 1995). Específicamente, la liberación normal de cloruro intracelular en los fluidos extracelulares no responde a la elevación normal de cAMP. Esta alteración de la liberación de cloruro produce la deshidratación de los revestimientos mucosales respiratorios e intestinales circundantes y la alteración de la reabsorción de sodio de las glándulas sudoríparas. Esta deshidratación mucosal, asociada con subproductos inflamatorios e infecciosos, crea una mucosidad espesa y tenaz que obstruye y daña las vías respiratorias. El tratamiento intensivo y rápido de los síntomas de la fibrosis quística puede extender la vida de las personas con esta enfermedad.

35 Aunque la mayoría de las personas sin fibrosis quística tienen dos copias de trabajo del gen CFTR, sólo es necesaria una para prevenir la fibrosis quística. La fibrosis quística se desarrolla cuando ninguno de los genes funciona normalmente. Por lo tanto, la fibrosis quística se considera una enfermedad autosómica recesiva. Hay más de 1500 mutaciones genéticas diferentes asociadas con la enfermedad (base de datos de mutaciones de CFTR, 2006), lo que hace difíciles los procedimientos de cribado de homocigotos y heterocigotos (Zielenski J *et al.*, 1995). Sin embargo, se ha encontrado que aproximadamente dos tercios de las mutaciones son F508 delta, haciendo que ésta sea la mutación de CF más común (CF Genetic Analysis Consortium, 1994).

45 El tratamiento actual de la CF depende de la etapa de la enfermedad y de los órganos implicados. La eliminación de la mucosidad de los pulmones es una parte importante del régimen de tratamiento diario de la fibrosis quística. La fisioterapia torácica es una forma de depuración de las vías respiratorias, y requiere una percusión vigorosa (utilizando las manos ahuecadas) sobre la espalda y el pecho para sacar la mucosidad espesa de los pulmones. Otras formas de depuración de las vías respiratorias se pueden hacer con ayuda de dispositivos mecánicos utilizados para estimular la eliminación de la mucosidad. Otros tipos de tratamiento incluyen: Pulmozyme®, un agente mucolítico inhalado del que se ha demostrado que reduce el número de infecciones pulmonares y mejora la función pulmonar (Hodson M, 1995); TOBI® (solución de tobramicina para inhalación), un antibiótico aminoglucósido en aerosol utilizado para tratar infecciones pulmonares y del que se ha demostrado también que mejora la función pulmonar (Weber A *et al.*, 1994); y azitromicina oral, un antibiótico macrólido del que se ha demostrado que reduce el número de exacerbaciones respiratorias y la tasa de deterioro de la función pulmonar (Wolter J *et al.*, 2002).

50 Como se ha expuesto anteriormente, las altas tasas de colonización y el reto de controlar las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* en pacientes con fibrosis quística (CF) han hecho necesaria la búsqueda de antibióticos seguros y eficaces. Actualmente, la terapia con un aminoglucósido en combinación con un antibiótico beta-lactámico o un antibiótico de quinolonas es la terapia estándar. Una serie de estudios clínicos de 96 semanas, incluyendo 520 pacientes con fibrosis quística de moderada a severa demostró que los pacientes tratados con tobramicina inhalada pasaron de 25 a 33 % menos días en el hospital y experimentaron incrementos significativos en la función pulmonar (Moss RB, 2001). Estos resultados demuestran la eficacia de los antibióticos inhalados para tratar la fibrosis quística.

Sin embargo, el desarrollo de cepas resistentes a los fármacos, especialmente de *P. aeruginosa*, es una preocupación importante con la administración a largo plazo de antibióticos en aerosol por inhalación (LiPuma JJ, 2001).

5 Aunque la azitromicina tiene actividad frente a *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, y *Streptococcus pneumoniae*, no tiene ninguna actividad directa contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, u otros microorganismos gram-negativos no fermentadores (Lode H *et al.*, 1996). La tobramicina tiene actividad frente a *P. aeruginosa*; sin embargo, el aumento del número de pacientes con aislados resistentes durante el tratamiento continuo, de ~ 10 % a 80 % después de 3 meses (Smith AL *et al.*, 1989) ha llevado al régimen de dosificación intermitente de 28 días de tratamiento seguidos por 28 días sin tratamiento. Incluso en la terapia intermitente con tobramicina inhalada, el porcentaje de pacientes con *P. aeruginosa* multiresistente aumentó del 14 % en la línea base al 23 % después de 18 meses de tratamiento (LiPuma JJ, 2001). El desarrollo de un régimen terapéutico que administre la terapia anti-infecciosa de una manera continua, a la vez que siga inhibiendo la aparición de cepas resistentes, puede proporcionar un modelo mejor de tratamiento. Es de notar que las infecciones crónicas de las vías respiratorias por *P. aeruginosa* siguen siendo la causa principal de morbilidad y mortalidad en los pacientes con fibrosis quística. Cuando los pacientes experimentan agravamientos pulmonares, el uso de la terapia antipseudomónica, que con frecuencia consiste en un β -lactámico y un aminoglucósido, puede producir una mejoría clínica y una disminución de la carga bacteriana. Sin embargo, la erradicación de la infección es bastante excepcional.

20 En las vías respiratorias con fibrosis quística, la *P. aeruginosa* tiene inicialmente un fenotipo no mucoide, pero a la larga produce exopolisacáridos mucoides y se organiza en un biofilm, lo que indica que la infección de las vías respiratorias ha progresado de aguda a crónica. Las bacterias en biofilms son de crecimiento muy lento debido a un ambiente anaeróbico y son inherentemente resistentes a los agentes antimicrobianos, ya que las células sésiles son mucho menos sensibles que las células que crecen planctónicamente. Existen informes de que las células en biofilms son al menos 500 veces más resistentes a los agentes antibacterianos (Costerton JW *et al.*, 1995). Por lo tanto, la transición al fenotipo mucoide y la producción de un biofilm contribuyen a la persistencia de la *P. aeruginosa* en los pacientes de fibrosis quística con infección crónica porque protegen a las bacterias de las defensas del hospedante y porque interfieren con la administración de los antibióticos a la célula bacteriana.

30 Aunque se han hecho muchos esfuerzos para mejorar la atención y el tratamiento de las personas con fibrosis quística, y la media de vida ha aumentado, la edad media de supervivencia de las personas con fibrosis quística es solamente hasta el final de la treintena (CF Foundation web site, 2006). Por lo tanto, existe la necesidad continuada de mejores formulaciones de compuestos anti-infecciosos, especialmente para administración por inhalación. La presente invención aborda esta necesidad.

35 El ciprofloxacino es un antibiótico de fluoroquinolona que está indicado para el tratamiento de las infecciones del tracto respiratorio inferior debidas a *P. aeruginosa*, que son comunes en los pacientes con fibrosis quística. El ciprofloxacino es de amplio espectro y, además de ser activo frente a *P. aeruginosa*, es activo frente a otros diversos tipos de bacterias gram-negativas y gram-positivas. Actúa por inhibición de la topoisomerasa II (ADN girasa) y de la topoisomerasa IV, que son enzimas necesarias para la replicación, transcripción, reparación y recombinación bacterianas. Este mecanismo de acción es diferente del de las penicilinas, cefalosporinas, aminoglucósidos, macrólidos y tetraciclinas, y por lo tanto, las bacterias resistentes a estas clases de fármacos pueden ser sensibles al ciprofloxacino. Por lo tanto, los pacientes con fibrosis quística que han desarrollado resistencia al aminoglucósido tobramicina (TOBI), probablemente todavía pueden ser tratados con ciprofloxacino. No se conoce ninguna resistencia cruzada entre ciprofloxacino y otras clases de antimicrobianos.

45 A pesar de sus interesantes propiedades antimicrobianas, el ciprofloxacino produce algunos efectos secundarios molestos, tales como intolerancia gastrointestinal (vómitos, diarrea, molestias abdominales), así como mareos, insomnio, irritabilidad y aumento de los niveles de ansiedad. Existe una clara necesidad de mejores regímenes de tratamiento que se puedan utilizar crónicamente, sin que se produzcan estos efectos secundarios debilitantes.

La administración de ciprofloxacino como un aerosol inhalado tiene la posibilidad de hacer frente a estas preocupaciones mediante la compartimentación de la administración y la acción del fármaco en el tracto respiratorio, que es el sitio primario de infección.

50 Actualmente no hay ninguna forma de ciprofloxacino en aerosol con aprobación de las autoridades sanitarias para uso humano, capaz de dirigir la administración del antibiótico directamente a la zona de infección primaria. En parte, esto es debido a que la escasa solubilidad y el amargor del fármaco han inhibido el desarrollo de una formulación adecuada para inhalación. Además, la distribución tisular de ciprofloxacino es tan rápida que el tiempo de residencia del fármaco en el pulmón es demasiado corto para proporcionar un beneficio terapéutico adicional sobre el fármaco administrado por las vías oral o IV.

55 Los vehículos de fosfolípidos como sistemas de administración de fármacos fueron redescubiertos como "liposomas" en 1965 (Bangham *et al.*, 1965). Las propiedades terapéuticas de muchos ingredientes farmacéuticos activos (los API) se pueden mejorar mediante la incorporación a sistemas liposomales de administración de fármacos. El término general de liposoma abarca una amplia variedad de estructuras, pero en general todas están compuestas de una o

más bicapas lipídicas que encierran un espacio acuoso en el que se pueden encapsular los fármacos. Los liposomas aplicados en este programa se conocen en el campo de la administración de fármacos como vesículas unilamelares grandes (LUV), que son las estructuras liposomales preferidas para la administración IV de fármacos.

5 La encapsulación en liposomas mejora las características biofarmacéuticas a través de una serie de mecanismos, incluyendo la alteración de la farmacocinética y biodistribución del fármaco, la liberación sostenida del fármaco desde el vehículo, una mejor administración a los sitios de la enfermedad y la protección de la especie de fármaco activo frente a la degradación. Las formulaciones en liposomas de los agentes anticancerosos doxorubicina (Myocet®/Evacet®, Doxyl®/Caelyx®), daunorubicina (DaunoXome®), el agente antifúngico anfotericina B (Abelcet®, AmBisome®, Amphotec®) y una benzoporfirina (Visudyne®) son ejemplos de productos de éxito introducidos en los
10 mercados de Estados Unidos, Europa y Japón durante la última década. Además, una serie de productos de segunda generación han estado en la última fase de ensayos clínicos, incluyendo los liposomas de sulfato de vincristina inyectables (VSLI) de Inex. La seguridad y la eficacia probada de los vehículos con base lipídica les hacen candidatos interesantes para la formulación de productos farmacéuticos.

15 Por lo tanto, en comparación con las formulaciones actuales de ciprofloxacino, una formulación en aerosol de ciprofloxacino liposomal ofrecería varios beneficios: 1) concentraciones de fármaco más altas, 2) aumento del tiempo de residencia del fármaco por medio de la liberación sostenida en el sitio de la infección, 3) disminución de efectos secundarios, 4) sabor más agradable, 5) mejor penetración en las bacterias, y 6) mejor penetración en las células infectadas por las bacterias. Se ha demostrado previamente que la inhalación de antibióticos de fluoroquinolonas encapsulados en liposomas puede ser eficaz en el tratamiento de infecciones pulmonares. En un modelo de ratón de
20 *F. tularensis* se demostró que los antibióticos de fluoroquinolonas encapsulados en liposomas eran superiores a la fluoroquinolona libre o no encapsulada en cuanto al aumento de la supervivencia (CA2.215.716, CA2.174.803 y CA2.101.241).

Otra solicitud, documento EP1083881B1, describe liposomas que contienen un conjugado de fármaco que comprende un compuesto de quinolona unido covalentemente a un aminoácido. Todavía otra solicitud, publicación
25 N° 20004142026, describe también el uso de antibióticos encapsulados en liposomas y la posibilidad de administración de una dosis de un producto anti-infeccioso encapsulado en liposomas, más baja en un factor de 10 o 100 que la de un producto anti-infeccioso libre no encapsulado.

Se ha publicado también que la presencia de concentraciones sub-inhedoras de agentes antibióticos dentro de las profundidades del biofilm proporcionará presiones selectivas para el desarrollo de fenotipos más resistentes (Gilbert P *et al.*, 1997). Esto puede ser parcialmente debido al fracaso de los antibióticos para penetrar adecuadamente el
30 glucocálix.

La solicitud WO2004/110493 describe una formulación de ciprofloxacino liposomal compuesta de 55 % de HSPC y 45 % de colesterol.

Sumario de la invención

35 Un aspecto de la invención es una composición de partículas bi-fásica, en aerosol. Las partículas comprenden un fármaco libre, cuyo fármaco no está encapsulado y que es ciprofloxacino. Las partículas incluyen además un liposoma que encapsula un fármaco que también es ciprofloxacino. El fármaco libre y el encapsulado en liposoma están incluidos dentro de un excipiente farmacéuticamente aceptable que se formula para administración en aerosol.

40 Un aspecto de la invención es una formulación que comprende liposomas que se administran por medio de un aerosol a los pulmones de un paciente humano, comprendiendo los liposomas ciprofloxacino libre y encapsulado.

Un aspecto adicional de la invención es un método para el tratamiento de la fibrosis quística en un paciente, comprendiendo el método administrar al paciente una formulación que comprende el ciprofloxacino anti-infeccioso, encapsulado en liposomas. La formulación se administra al paciente preferiblemente por inhalación.

45 Según otro aspecto de la presente invención, una formulación que comprende un agente anti-infeccioso tanto libre como encapsulado proporciona un nivel terapéutico inicialmente alto del agente anti-infeccioso en los pulmones para superar la barrera de erradicar la dificultad de tratar las bacterias en biofilm, a la vez que se mantiene una liberación sostenida del agente anti-infeccioso a lo largo del tiempo. Aunque no se comprenden bien algunos aspectos de la resistencia del biofilm, se cree que los mecanismos dominantes están relacionados con: (i) modificación de los entornos de nutrientes y supresión de la tasa de crecimiento dentro del biofilm; (ii) interacciones directas entre las
50 matrices de exopolímeros, y sus constituyentes, y los agentes antimicrobianos, que afectan a la difusión y disponibilidad; y (iii) el desarrollo de fenotipos específicos de unión al biofilm (Gilbert P *et al.*, 1997). El fin del agente antiinfeccioso de liberación inmediata; por ejemplo, ciprofloxacino, es por lo tanto aumentar rápidamente la concentración de antibiótico en el pulmón hasta niveles terapéuticos bordeando la dificultad de erradicar las bacterias del biofilm para abordar los retos de la baja velocidad de difusión del antibiótico hacia el biofilm y dentro del
55 mismo. El agente antiinfeccioso de liberación sostenida; por ejemplo, ciprofloxacino, sirve para mantener un nivel terapéutico de antibiótico en el pulmón con lo que se proporciona una terapia continuada a lo largo de un periodo de tiempo más prolongado, se aumenta la eficacia, se reduce la frecuencia de administración, y se reduce la posibilidad de que se formen colonias resistentes.

Según otro aspecto de la presente invención, la liberación inmediata de niveles altos de un anti-infeccioso puede permitir una mayor penetración del glucocálix. La liberación sostenida del agente anti-infeccioso puede asegurar que el agente anti-infeccioso nunca caiga por debajo de la concentración sub-inhibitoria y por lo tanto reduce la probabilidad de formación de resistencias frente al agente anti-infeccioso.

- 5 Estos y otros objetos, ventajas y características de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica después de leer los detalles de las formulaciones y la metodología que se describen más completamente a continuación.

Breve descripción de los dibujos

- 10 Los aspectos y realizaciones de la invención se entenderán mejor a partir de la siguiente descripción detallada cuando se lea conjuntamente con los dibujos adjuntos. Se destaca que, según la práctica común, las diversas características de los dibujos no están a escala. Por el contrario, las dimensiones de las diversas características están ampliadas o reducidas arbitrariamente para mayor claridad. En los dibujos se incluyen las siguientes figuras:

FIG. 1 es un diagrama de flujo de la fabricación de ciprofloxacino liposomal para inhalación (HSPC /colesterol - lote de 10 L).

- 15 FIG. 2 es un gráfico que muestra la tasa de supervivencia acumulativa de los ratones después de infección con perlas de agarosa cargadas con *P. aeruginosa*, el día 0. Los ratones fueron tratados intranasalmente una vez al día empezando el día 2 y terminando el día 9 con la formulación liposomal de ciprofloxacino (fármaco) en una de tres concentraciones diferentes (100 %, diamantes abiertos; 33 %, cuadrados cerrados, o 10 %, triángulos abiertos). Se utilizó el diluyente como control (círculos cerrados). Los ratones supervivientes se sacrificaron el día 10.

20 Descripción detallada de la invención

- Antes de que se describan el presente método de formulación de ciprofloxacino encapsulado en liposomas y la administración de los mismos para la prevención y/o tratamiento de la fibrosis quística y otras afecciones médicas, y los dispositivos y formulaciones usados en conexión con los mismos, se debe entender que esta invención no se limita a la metodología, dispositivos y formulaciones particulares descritos, ya que dichos métodos, dispositivos y formulaciones pueden, por supuesto, variar. Se debe entender también que con la terminología usada en este documento se tiene el propósito de describir realizaciones particulares solamente, y no se pretende limitar el alcance de la presente invención que sólo será limitado por las reivindicaciones adjuntas.

- 30 Cuando se indica un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta la décima de la unidad del límite inferior a menos que el contexto dicte claramente otra cosa, entre los límites superior e inferior de dicho intervalo, está también específicamente descrito. Cada intervalo más pequeño entre cualquier valor establecido o valor intermedio en un intervalo establecido y cualquier otro valor establecido o intermedio en dicho intervalo establecido está incluido dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden ser independientemente incluidos o excluidos del intervalo, y cada intervalo en el que cualquiera, ninguno o ambos límites están incluidos en los intervalos más pequeños está también incluido dentro de la invención, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo establecido. Cuando el intervalo establecido incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen cualquiera o ambos de dichos límites incluidos, están también incluidos en la invención.

- 40 A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto ordinario en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque en la práctica o ensayo de la presente invención se pueden utilizar cualquier método y materiales similares o equivalentes a los descritos aquí, se describen a continuación los métodos y materiales preferidos. Todas las publicaciones mencionadas en el presente documento detallan y describen los métodos y/o materiales en relación con los cuales se citan las publicaciones.

- 45 Se debe observar que, como se usa aquí y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno", "una" y "el", "la" incluyen los plurales referentes a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. Así, por ejemplo, la referencia a "una formulación" incluye una pluralidad de dichas formulaciones y la referencia a "el método" incluye la referencia a uno o más métodos y equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la técnica, y así sucesivamente.

- 50 Las publicaciones descritas en el presente documento se proporcionan únicamente para su descripción antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en este documento se debe interpretar como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a anteceder a dicha publicación en virtud de una invención anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales que puede ser necesario que sean confirmadas de forma independiente.

- 55 Como se usa aquí, agente anti-infeccioso se refiere a los agentes que actúan contra infecciones, tales como infecciones bacterianas, víricas, fúngicas, micobacterianas, o por protozoos.

Como se usa aquí, "formulación" se refiere al agente anti-infeccioso encapsulado en liposomas, con algunos excipientes o ingredientes activos adicionales, ya sea como un polvo seco o suspendido o disuelto en un líquido.

5 Los términos "sujeto", "individuo", "paciente" y "hospedante" se utilizan de manera intercambiable en este documento y se refieren a algún vertebrado, particularmente algún mamífero y más particularmente incluyendo sujetos humanos, animales de granja, y animales de compañía mamíferos. El sujeto puede estar, pero no está necesariamente bajo el cuidado de un profesional de la salud, tal como un médico.

10 Una formulación "estable" es una en la que la proteína o enzima de la misma retiene esencialmente su estabilidad e integridad física y química durante el almacenaje y exposición a temperaturas relativamente altas. Diversos métodos analíticos para medir la estabilidad de los péptidos están disponibles en la técnica y se revisan en Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991), y Jones, A. (1993) *Adv. Drug Delivery Rev.* 10: 29-90. Se puede medir la estabilidad a una temperatura seleccionada durante un período de tiempo seleccionado.

15 "Mamífero" para los fines de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo los seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, deportivos o animales de compañía, tales como perros, caballos, gatos, vacas, etc. Preferiblemente, el mamífero es un ser humano.

Un "trastorno" es cualquier condición que se pueda beneficiar del tratamiento con los métodos y las composiciones reivindicadas.

I. Generación de liposomas que contienen ciprofloxacino

20 Según aspectos de la presente invención, se proporciona un método para la formulación de ciprofloxacino y otros agentes anti-infecciosos mediante la encapsulación de estos fármacos en liposomas. Compuestos de materiales de origen natural que son biocompatibles y biodegradables, los liposomas se utilizan para encapsular materiales biológicamente activos para múltiples propósitos. Al tener una variedad de capas, tamaños, cargas superficiales y composiciones, se han desarrollado numerosos procedimientos para la preparación de liposomas y para la encapsulación de fármacos dentro de ellos, algunos de los cuales han pasado a ser aplicados a escala hasta niveles industriales. Los liposomas se pueden diseñar para actuar como depósitos de fármaco de liberación sostenida y, en ciertas aplicaciones, para ayudar al acceso del fármaco a través de las membranas celulares.

30 La propiedad de liberación sostenida de los liposomas puede ser regulada por la naturaleza de la membrana lipídica y por la inclusión de otros excipientes en la composición de los liposomas. Una amplia investigación en tecnología de liposomas a lo largo de muchos años ha dado una predicción razonable de la velocidad de liberación del fármaco en base a la composición de la formulación de liposomas. La velocidad de liberación del fármaco depende principalmente de la naturaleza de los fosfolípidos, p.ej. hidrogenados (--H) o no hidrogenados (--G), o de la relación de fosfolípidos/colesterol (cuanto mayor sea esta relación, más rápida será la velocidad de liberación), de las propiedades hidrófilas/lipófilas de los ingredientes activos y del método de fabricación de los liposomas.

35 Los métodos para preparar liposomas bioadhesivos se pueden encontrar, por ejemplo, en el documento U.S. 5.401.511, junto con las patentes y publicaciones citadas en el mismo, que describen liposomas y métodos de preparación de liposomas. En los últimos años, se han hecho intentos exitosos para unir diferentes sustancias a los liposomas. Por ejemplo, se ha estudiado la unión de quimotripsina a liposomas como un modelo para la unión de sustancias a superficies liposomales. Sustancias de reconocimiento, incluyendo anticuerpos, glucoproteínas y lectinas, se han unido a superficies liposomales en un intento de conferir a los liposomas la especificidad buscada.

40 El número y la densidad superficial de los sitios discretos sobre las superficies liposomales para la unión covalente dependen de la formulación de los liposomas y del tipo de liposomas. Las superficies liposomales también tienen sitios para la asociación no covalente. Se prefiere la unión covalente ya que la unión no covalente podría dar como resultado la disociación de las sustancias de reconocimiento de los liposomas en el sitio de administración puesto que los liposomas y los complementos bioadhesivos del sitio de destino (es decir, la materia bioadhesiva) compiten por las sustancias de reconocimiento. Dicha disociación cambiaría los liposomas modificados administrados en liposomas regulares, no modificados, haciendo fracasar así el objetivo de la administración de los liposomas modificados.

50 Para formar conjugados covalentes de sustancias de reconocimiento y liposomas, se han estudiado reactivos de reticulación para determinar su eficacia y biocompatibilidad. Uno de dichos reactivos es el glutaraldehído (GAD). A través de la química compleja de reticulación mediante el GAD, se establece la unión de los residuos amínicos de las sustancias de reconocimiento y los liposomas.

55 Los reactivos de reticulación pueden incluir glutaraldehído (GAD) y una carbodiimida soluble en agua, preferiblemente, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC). Las sustancias de reconocimiento incluyen gelatina, colágeno y ácido hialurónico (HA). Siguiendo estas metodologías, se pueden utilizar las sustancias de reconocimiento como un adhesivo o pegamento para unir los liposomas a una zona objetivo, tal como el pulmón.

Por lo tanto, aunque no es esencial para la presente invención, el uso de dichos liposomas bioadhesivos, particularmente los que tienen ácido hialurónico como el ligando bioadhesivo, aumentarán potencialmente el tiempo de residencia en los sitios pulmonares y reducirán la depuración mucociliar y la captación de macrófagos.

5 En general, se utiliza preferiblemente el ciprofloxacino en las formulaciones de la presente invención, aunque se pueden usar otros antibióticos o antiinfecciosos conocidos por los expertos en la técnica.

10 Se preparan vesículas multilamelares (MLV) según métodos bien conocidos en la técnica. En resumen, en una realización, se pesan los lípidos y se disuelven en un disolvente orgánico adecuado (tal como cloroformo o mezclas de cloroformo-metanol). Se evapora el disolvente orgánico hasta sequedad completa en un evaporador rotatorio, a baja presión, y en un intervalo de temperatura de aproximadamente 37-40 °C. Después de la evaporación, se añade la solución de ciprofloxacino a la película lipídica seca. Se mezcla el sistema vigorosamente, después se incuba durante aproximadamente dos horas, por ejemplo, en un baño con agitación a un intervalo de temperatura apropiado para la composición de lípidos. Después, preferiblemente se tampona la preparación, por ejemplo, mediante la adición de aproximadamente una décima del volumen de solución salina tamponada con fosfato concentrada diez veces (PBS), de pH 7,4.

15 En una realización, las vesículas multilamelares (MLV) generadas como se ha descrito antes sirven como material de partida para vesículas unilamelares ácidas (ULV). Por ejemplo, las vesículas multilamelares se preparan como se ha descrito antes y se someten a extrusión en un dispositivo tal como, por ejemplo, el fabricado por Lipex Biomembranes, Inc. (Vancouver, British Columbia). La extrusión se realiza a través de una serie de membranas con tamaños de poro progresivamente más pequeños, tales como, por ejemplo, empezando con tamaños de poro en el intervalo de 0,8 a 1,0 μm (uno a dos ciclos de extrusión por tamaño de poro) y terminando en el intervalo de tamaño de poro seleccionado según el tamaño de liposoma deseado (por ejemplo, aproximadamente siete ciclos de extrusión en el tamaño final de poro).

20 Ejemplos de composiciones de liposomas y métodos para prepararlas se describen en las patentes de Estados Unidos 6.890.555; 6.855.296; 6.770.291; 6.759.057; 6.623.671; 6.534.018; 6.355.267; 6.316.024; 6.221.385 y 6.197.333. Los liposomas de la invención pueden ser multilamelares, unilamelares, o de cualquier configuración conocida, tal como las descritas en las patentes anteriores. Los liposomas de la presente invención se fabrican preferiblemente a partir de lípidos biocompatibles. En general, el tamaño de los liposomas generados está dentro de un amplio intervalo dependiendo del modo de administración, por ejemplo, 1 nm a 10 μm o 20 nm a 1 μm o aproximadamente 100 nm de diámetro $\pm 20\%$ para la administración pulmonar.

30 II. Formulación farmacéutica de liposomas que contienen ciprofloxacino

En una realización preferida, el ciprofloxacino encapsulado en liposomas se administra a un paciente en un dispositivo de inhalación de aerosol, pero se podría administrar por vía IV. En algunas realizaciones, los liposomas se administran en combinación con ciprofloxacino que no está encapsulado.

35 Independientemente de la forma de la formulación del fármaco, es preferible crear gotitas o partículas para inhalación en el intervalo de aproximadamente 0,5 μm a 12 μm , preferentemente de 1 μm a 6 μm , y más preferiblemente aproximadamente 2-4 μm . Mediante la creación de partículas inhaladas que tienen un intervalo de tamaño relativamente estrecho, es posible aumentar adicionalmente la eficiencia del sistema de administración de fármacos y mejorar la repetibilidad de la dosificación. Por lo tanto, es preferible que las partículas no solamente tengan un tamaño en el intervalo de 0,5 μm a 12 μm o de 2 μm a 6 μm o aproximadamente 3-4 μm sino que el tamaño medio de partícula esté dentro de un intervalo estrecho de modo que el 80 % o más de las partículas que se administran a un paciente tengan un diámetro de partícula que esté dentro de $\pm 20\%$ del tamaño medio de partícula, preferiblemente $\pm 10\%$ y más preferiblemente $\pm 5\%$ del tamaño medio de partícula.

45 Las formulaciones de la invención se pueden administrar a un paciente utilizando un envase desechable y un dispositivo a pilas, manual, portátil, tal como el dispositivo AERx (patente de Estados Unidos N° 5.823.178, Aradigm, Hayward, CA). Alternativamente, las formulaciones de la presente invención se pueden llevar a cabo utilizando un dispositivo mecánico (no electrónico). Se pueden usar otros dispositivos de inhalación para administrar las formulaciones incluyendo nebulizadores de chorro convencionales, nebulizadores ultrasónicos, inhaladores de niebla suave, inhaladores de polvo seco (DPI), inhaladores de dosis medidas (MDI), generadores de aerosol de condensación, y otros sistemas.

50 Se puede crear un aerosol forzando el fármaco a través de los poros de una membrana cuyos poros tienen un tamaño en el intervalo de aproximadamente 0,25 a 6 micras (patente de Estados Unidos N° 5.823.178). Cuando los poros tienen este tamaño, las partículas que escapan a través de los poros para crear el aerosol tendrán un diámetro en el intervalo de 0,5 a 12 micras. Se pueden liberar partículas de fármaco con un flujo de aire destinado a mantener las partículas dentro de este intervalo de tamaño. La creación de partículas pequeñas se puede facilitar mediante el uso del dispositivo de vibración que proporciona una frecuencia de vibración en el intervalo de aproximadamente 800 a aproximadamente 4.000 kilohertzios. Los expertos en la técnica reconocerán que se pueden hacer algunos ajustes en los parámetros tales como el tamaño de los poros desde los que se libera el fármaco, la frecuencia de vibración, la presión y otros parámetros basados en la densidad y en la viscosidad de la

formulación teniendo en cuenta que un objeto de algunas realizaciones es proporcionar partículas en aerosol que tengan un diámetro en el intervalo de aproximadamente 0,5 a 12 micras.

La formulación en liposomas puede ser una formulación líquida de baja viscosidad. La viscosidad del fármaco por sí mismo o en combinación con un vehículo debe ser suficientemente baja para que la formulación pueda ser forzada fuera de las aberturas para formar un aerosol, por ejemplo, utilizando de 137,9 a 1379 KPa para formar un aerosol que tenga preferiblemente un tamaño de partícula en el intervalo de aproximadamente 0,5 a 12 micras.

En una realización, se combina un propelente altamente volátil de bajo punto de ebullición, con los liposomas de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Los liposomas se pueden proporcionar como una suspensión o polvo seco en el propelente, o, en otra realización, los liposomas se disuelven en solución dentro del propelente. Estas dos formulaciones se pueden incluir fácilmente dentro de un recipiente que tiene una válvula como su única abertura. Puesto que el propelente es altamente volátil, es decir, tiene un punto de ebullición bajo, el contenido del recipiente estará bajo presión.

De acuerdo con otra formulación, los liposomas que contienen ciprofloxacino se proporcionan como un polvo seco por sí mismo, y de acuerdo con otra formulación más, los liposomas que contienen ciprofloxacino se proporcionan en una formulación en solución. El polvo seco se puede inhalar directamente permitiendo la inhalación solamente a la misma velocidad de flujo inspiratorio y al mismo volumen inspiratorio medidos para cada administración. El polvo se puede disolver en un disolvente acuoso para crear una solución que se mueva a través de una membrana porosa para crear un aerosol para inhalación. Cualquier formulación que hace posible la producción de formas en aerosol de liposomas que contienen ciprofloxacino que pueden ser inhaladas y administradas a un paciente a través de la vía intrapulmonar se pueden utilizar en conexión con la presente invención. Información específica con respecto a las formulaciones que pueden ser utilizadas en conexión con dispositivos de administración de aerosol está descrita en Remington's Pharmaceutical Sciences, A.R. Gennaro editor (latest edition) Mack Publishing Company. En cuanto a las formulaciones de insulina, también es útil tener en cuenta los resultados de Sciarra *et al.*, (1976). Cuando se utilizan propelentes de bajo punto de ebullición, se manejan los propelentes dentro de un recipiente presurizado del dispositivo y se mantienen en estado líquido. Cuando se acciona la válvula, se libera el propelente y fuerza al ingrediente activo desde el recipiente junto con el propelente. El propelente "desaparecerá" con la exposición a la atmósfera circundante, es decir, el propelente se evapora inmediatamente. La desaparición se produce tan rápidamente que es esencialmente el ingrediente activo puro el que se administra realmente a los pulmones del paciente.

III. Regímenes de dosificación

Basándose en lo anterior, los expertos en la técnica entenderán que se puede utilizar una pluralidad de diferentes tratamientos y medios de administración para tratar a un único paciente. Por lo tanto, los pacientes que ya reciben medicaciones tales como, por ejemplo, ciprofloxacino o antibióticos etc. por vía intravenosa, se pueden beneficiar de la inhalación de las formulaciones de la presente invención. Algunos pacientes pueden recibir sólo formulaciones de liposomas que contienen ciprofloxacino, por inhalación. Estos pacientes pueden tener síntomas de fibrosis quística, estar diagnosticados de infecciones pulmonares, o tener síntomas de una afección médica, cuyos síntomas se pueden beneficiar de la administración al paciente de un antibiótico tal como ciprofloxacino. Las formulaciones de la invención se pueden utilizar también para diagnóstico. En una realización, por ejemplo, un paciente puede recibir una dosis de una formulación de la invención como parte de un procedimiento para diagnosticar infecciones pulmonares, en donde uno o más de los síntomas del paciente mejora en respuesta a la formulación.

Un paciente recibirá típicamente una dosis de aproximadamente 0,01 a 10 mg/kg/día de ciprofloxacino \pm 20 % o \pm 10 %. Esta dosis se administrará típicamente mediante al menos una, preferiblemente varias "ráfagas" desde el dispositivo de aerosol. La dosis total al día se administra preferiblemente al menos una vez al día, pero se puede dividir en dos o más dosis al día. Algunos pacientes se pueden beneficiar de un período de "carga" del paciente con ciprofloxacino con una dosis más alta o una administración más frecuente durante un período de días o semanas, seguido por una dosis reducida o de mantenimiento. Como la fibrosis quística es típicamente una enfermedad crónica, se espera que los pacientes reciban dicha terapia durante un período de tiempo prolongado.

Se ha demostrado previamente que la inhalación de antibióticos de fluoroquinolonas encapsulados en liposomas puede ser eficaz en el tratamiento de infecciones pulmonares y se ha demostrado que son superiores a la fluoroquinolona libre o no encapsulada en un modelo de ratón de *F. tularensis* (documentos CA 2.215.716, CA 2.174803 y CA 2.101.241). Sin embargo, no se anticipó el posible beneficio de combinar los antibióticos de fluoroquinolonas libres y encapsulados para tratar esas infecciones pulmonares. Según un aspecto de la presente invención, se administran inmediatamente concentraciones altas de un antibiótico a la vez que se proporciona también una liberación sostenida del agente terapéutico durante horas o durante un día.

Otra solicitud, documento EP1083881B1, describe liposomas que contienen un conjugado de fármacos que comprende un compuesto de quinolona unido covalentemente a un aminoácido. Esta solicitud no prevé la necesidad de tener ambos, un componente de liberación inmediata y un componente de liberación sostenida, para tratar esas infecciones pulmonares.

Otra solicitud, documento US 2000142026, describe también el uso de antibióticos encapsulados en liposomas. Esta solicitud expone la posibilidad de administración de una dosis de un antibiótico encapsulado en liposomas, más baja en un factor de 10 o 100, que la del antibiótico libre no encapsulado. Sin embargo, no anticipó el beneficio de la combinación de ambos, el antibiótico libre y el encapsulado, para proporcionar un nivel terapéutico inicialmente alto del antibiótico en los pulmones para superar la barrera para erradicar la dificultad de tratar las bacterias del biofilm.

Por lo tanto, como se ha expuesto antes, las formulaciones según algunos aspectos de la invención incluyen ciprofloxacino libre o no encapsulado en combinación con el ciprofloxacino encapsulado en liposomas. Dichas formulaciones pueden proporcionar un beneficio inmediato con el ciprofloxacino libre dando como resultado un rápido aumento en la concentración de antibiótico en el fluido pulmonar que rodea las colonias bacterianas o el biofilm y reduciendo su viabilidad, seguido por un beneficio sostenido debido al ciprofloxacino encapsulado que continúa destruyendo las bacterias o disminuyendo su capacidad de reproducirse, o reduciendo la posibilidad de que surjan colonias resistentes al antibiótico. Los expertos en la materia entenderán las ventajas relativas de las formulaciones de la invención para tratar afecciones médicas en una base de paciente a paciente.

IV. Método de tratamiento

Hasta ahora se ha expuesto principalmente la solicitud de esta invención para tratar infecciones en pacientes con fibrosis quística. Sin embargo, será obvio para un experto en la técnica que esta invención tendrá utilidad y ventajas más allá de la fibrosis quística. Este método de tratamiento se aplica a otros estados patológicos que implican infecciones de las vías nasales, de las vías respiratorias, del oído interno o de los pulmones; incluyendo pero sin limitarse a: bronquiectasias, tuberculosis, neumonía, incluyendo pero sin limitarse a neumonía asociada a ventilación, neumonía adquirida en la comunidad, neumonía bronquial, neumonía lobar; infecciones por *Streptococcus pneumoniae*, *Chlamydia*, *Mycoplasma pneumoniae*, estafilococos, tratamiento profiláctico o prevención para condiciones en las que podría surgir una infección, por ejemplo, pacientes intubados o con ventilación, infecciones en pacientes con trasplante de pulmón, bronquitis, tosferina (tos ferina), infecciones del oído interno, infecciones estreptocócicas de garganta, ántrax por inhalación, tularemia, o sinusitis.

Parte experimental

Los siguientes ejemplos se exponen a fin de proporcionar a los expertos ordinarios en la técnica una exposición y descripción completas de cómo preparar y utilizar la presente invención, y no se pretende que limiten el alcance de lo que se considera como la invención ni se pretende que representen que el experimento que sigue es el único experimento realizado. Se han hecho esfuerzos para asegurar la exactitud con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero se debe contar con algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique otra cosa, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio, la temperatura se indica en grados centígrados, y la presión es presión atmosférica o casi atmosférica.

Ejemplo 1

Fabricación de ciprofloxacino encapsulado:

Se encapsula el ciprofloxacino (50 mg/mL) en liposomas que consisten en fosfatidil-colina de soja hidrogenada (HSPC) (70,6 mg/mL), un derivado semi-sintético totalmente hidrogenado de lecitina natural de soja (SPC), y colesterol (29,4 mg/mL). El lípido se organiza en una bicapa, con un tamaño medio de partícula de 75 a 120 nm. La suspensión estéril se suspende en un tampón isotónico (histidina 25 mM, NaCl 145 mM a pH 6,0, 300 mOsm/kg) y se administra por inhalación. Estas preparaciones liposomales de ciprofloxacino contienen aproximadamente 1 % de ciprofloxacino no encapsulado.

El procedimiento de fabricación incluye las siguientes etapas.

1. Preparación de tampones.
2. Pesada de los componentes lipídicos.
3. Disolución de lípidos en un disolvente (tBuOH:EtOH:H₂O destilada / 49:49:2).
4. Mezcla de la solución de lípidos en el disolvente con tampón de sulfato de metilamina (10 % v/v en disolvente) para formar vesículas multilamelares (MLV) con tampón de sulfato de metilamina encapsulado a 30 mg/mL de lípidos.
5. Extrusión a través de cuatro filtros apilados de policarbonato de 80 nm de tamaño de poro para generar vesículas unilamelares grandes (LUV). Se realizó un segundo paso de extrusión para generar liposomas con un diámetro medio de ~100 nm.
6. Ultrafiltración para concentrar los liposomas hasta ~ 55 mg/mL de lípidos totales.

7. Diafiltración frente a 10 volúmenes de tampón (NaCl 145 mM, histidina 5 mM, pH 6,0) para eliminar el etanol y generar un gradiente de pH transmembrana.
8. Determinación de la concentración de lípidos por HPLC.
- 5 9. Calentamiento de la suspensión de liposomas a 50 °C y adición lenta de ciprofloxacino pulverizado (60 % de la masa total de lípidos) con agitación. El ciprofloxacino se añade por incrementos (10 % de la masa cada 4 minutos durante un período de 40 minutos) y el producto se incuba a 50 °C durante 20 minutos después de la adición de la última alícuota para completar el proceso de carga del fármaco.
- 10 10. Diafiltración de los liposomas cargados de ciprofloxacino frente a 3 volúmenes de NaCl 145 mM, acetato 5 mM, pH 4,0 para separar el ciprofloxacino no encapsulado en condiciones en las que el ciprofloxacino libre es soluble.
11. Diafiltración de los liposomas cargados de ciprofloxacino frente a 5 volúmenes de NaCl 145 mM, histidina 25 mM, pH 6,0 para separar cualquier resto de ciprofloxacino no encapsulado, reduciendo adicionalmente los niveles de disolvente residual e intercambiando el tampón externo por el tampón del producto final deseado.
- 15 12. Ultrafiltración de la formulación a una concentración de ciprofloxacino de 50 mg/mL (se requieren análisis en proceso).
13. Pre-filtración de los liposomas a través de láminas filtrantes de 0,45/0,2 µm para separar las partículas que pueden obstruir los filtros de grado esterilizante. Los filtros empleados son de hecho, filtros de grado de esterilizante; sin embargo, se emplean a presiones elevadas que no son compatibles con su uso para filtración estéril.
- 20 14. Filtración redundante a través de filtros de grado esterilizante de 0,2 µm.
15. Llenado en viales y empaquetado de la muestra.

El esquema general de fabricación se muestra en la Figura 1.

Descripción del modelo de infección:

- 25 Se evaluaron los liposomas con ciprofloxacino encapsulado en un modelo de ratón de infección pulmonar de *P. aeruginosa*. Se ha demostrado que los ratones con Cfr inactivado, con intestino corregido, tienen un fenotipo pulmonar de fibrosis quística después de la infección con perlas de agarosa cargadas con *P. aeruginosa* (van Heeckeren et al, 2004), y tienen una respuesta inflamatoria similar a la de los ratones UNC con Cfr inactivado (van Heeckeren et al, 2004). Todas estas características hacen que esta sea la cepa de elección para investigar si el fármaco tiene eficacia en un modelo de ratón de infección pulmonar con fibrosis quística, y no si hay una respuesta diferencial entre los ratones de tipo natural y los ratones con fibrosis quística. Se utilizaron ratones de un sexo, machos, para eliminar el sexo como un posible factor de confusión. Todos los ratones eran de entre 6-8 semanas de edad y pesaron > 16 g.

- 35 Se prepararon perlas de agarosa (PA) cargadas con *P. aeruginosa* y se utilizaron como se ha descrito antes (van Heeckeren, *et al.*, 1997, van Heeckeren *et al.*, 2000, van Heeckeren and Schluchter, 2002) con pequeñas diferencias. Los ratones fueron inoculados con una dilución 1:35 de las perlas, y se administraron las perlas a ratones anestesiados con isoflurano. Se estableció que esto era una dosis LD50, aunque las pequeñas diferencias de experimento a experimento pueden llevar a respuestas diferenciales, lo que no es predecible. Es decir, en un experimento, la dosis es una LD50, pero puede ser una LD90 en otro. Puesto que en esta invención interesa investigar si estos fármacos tienen eficacia clínica, se intentó establecer la dosis en el intervalo entre la LD50 y la LD90 en los ratones control de CF infectados. Se realizó la eutanasia intervencional si los ratones estaban moribundos (retraso severo en el reflejo de enderezarse y palpablemente fríos), y se realizó una necropsia para determinar si había o no infección pulmonar abierta. Los ratones que fueron sacrificados se incluyeron como si se hubiera producido la muerte espontánea.

- 45 Tratamientos con ciprofloxacino liposomal:

Se administraron formulaciones de ciprofloxacino liposomal o formulaciones simuladas (diluyente) (≤0,05 mL) por vía intranasal.

Diseño del estudio de intervalo de dosis:

- 50 Se ensayaron tres dosis: 10 %, 33 % y 100 % de la concentración máxima (50 mg/mL) de ciprofloxacino compuestas de 99 % de ciprofloxacino encapsulado y 1 % de ciprofloxacino libre, más el diluyente liposomal como un control negativo. Se prepararon los dosis inferior y media por dilución. El Día 0, se inocularon los ratones transtraquealmente con perlas de agarosa cargadas de *P. aeruginosa* diluidas 1:35 en PBS estéril, pH 7,4. Los días 2 a 9, se trataron los ratones con el fármaco o con el simulado de diluyente una vez al día. El Día 10, los ratones

fueron sacrificados. Las medidas de los resultados incluyeron los signos clínicos (incluyendo calidad del pelaje, postura, capacidad de enderezarse después de ser puestos en decúbito lateral, deambulación), cambios con respecto al peso corporal inicial, y supervivencia. En el momento del sacrificio, se observó la patología pulmonar macroscópica, se realizó el lavado broncoalveolar (BAL) utilizando 1 mL de PBS estéril, pH 7,4, se analizaron la sangre entera, el fluido BAL sin procesar y homogenatos de bazo para determinar la presencia o ausencia de *P. aeruginosa*, y se contaron las células BAL utilizando un hemocitómetro.

Resultados de supervivencia:

La Figura 2 muestra la tasa de supervivencia acumulativa para cada grupo a los 10 días indicada como un porcentaje del número de ratones que sobreviven. El día 10, los tres grupos tratados con ciprofloxacino liposomal tuvieron mayores tasas de supervivencia que el grupo control con diluyente. Sólo hubo 2 muertes en cada uno de los grupos de tratamiento liposomal, mientras que hubo 6 muertes en el grupo del diluyente. El grupo de la dosis del 100 % tuvo la supervivencia más larga de todos los grupos, con todos los ratones supervivientes hasta el día 5, mientras que los otros grupos todos tuvieron 2 muertes en este tiempo.

La administración intranasal (para alcanzar el pulmón) de ciprofloxacino encapsulado en liposomas que contiene aproximadamente 1 % de ciprofloxacino libre aumentó la tasa de supervivencia de los ratones con infecciones pulmonares de *P. aeruginosa*. Por consiguiente, el ciprofloxacino liposomal inhalado es eficaz en pacientes con fibrosis quística u otras enfermedades con infecciones pulmonares.

La Figura 2 muestra la tasa de supervivencia acumulativa después de la infección. Se infectaron los ratones con perlas de agarosa cargadas de *P. aeruginosa* el día 0. Se trataron los ratones por vía intranasal una vez al día empezando el día 2 y terminando el día 9 con la formulación liposomal de ciprofloxacino (fármaco) en una de tres concentraciones diferentes (100 %, diamantes abiertos; 33 %, cuadrados cerrados, o 10 %, triángulos abiertos). Se utilizó el diluyente como control (círculos cerrados). Los ratones supervivientes fueron sacrificados el día 10.

Ejemplo 2

Preparación de ciprofloxacino no encapsulado: Se preparó una solución de ciprofloxacino no encapsulado, o "libre" a una concentración de 30 mg/mL en acetato de sodio 10 mM, pH 3,2.

Fabricación de ciprofloxacino encapsulado: Se encapsuló ciprofloxacino (50 mg/mL) en liposomas que consisten en fosfatidil-colina de soja hidrogenada (HSPC) (70,6 mg/mL), un derivado de lecitina de soja natural (SPC) semi-sintético totalmente hidrogenado, y colesterol (29,4 mg/mL), como se describe en el Ejemplo 1. La caracterización de esta formulación liposomal indicó que aproximadamente el 1 % del ciprofloxacino estaba libre; esto es, no estaba encapsulado dentro del liposoma.

Descripción del modelo de infección: Se evaluaron formulaciones que contenían ciprofloxacino libre y ciprofloxacino encapsulado en liposomas, en dos experimentos adicionales en un modelo de ratón de infección pulmonar de *P. aeruginosa* como se describe en el Ejemplo 1.

Diseño del estudio de intervalo de dosis: Se evaluaron en dos experimentos separados, una dosis de la combinación de ciprofloxacino libre y liposomal (0,36 mg/kg de ciprofloxacino libre y 0,6 mg/kg de ciprofloxacino liposomal), dos dosis de ciprofloxacino liposomal (0,6 mg/kg y 1,2 mg/kg) y el diluyente liposomal como control negativo. El Día 0, se inocularon los ratones transtraquealmente con perlas de agarosa cargadas de *P. aeruginosa* diluidas 1:35 en PBS estéril, pH 7,4. Los días 2 a 9, se trataron los ratones con el fármaco o con el simulado de diluyente una vez al día. El Día 10, se sacrificaron los ratones. Las medidas de los resultados incluyeron signos clínicos (incluyendo calidad del pelaje, postura, capacidad de enderezarse después de ser puesto en decúbito lateral, deambulación), cambios con respecto al peso corporal inicial, y supervivencia. En el momento del sacrificio, se observó la patología pulmonar macroscópica, se realizó el lavado broncoalveolar (BAL) utilizando 1 mL de PBS estéril, pH 7,4, se analizaron la sangre entera, el fluido BAL sin procesar y homogenatos de bazo para determinar la presencia o ausencia de *P. aeruginosa*, y se contaron las células BAL utilizando un hemocitómetro.

Resultados de supervivencia: La Tabla 1 muestra la tasa de supervivencia acumulativa para cada grupo a los 10 días indicada como porcentaje del número de ratones que sobrevivieron en ambos estudios. El día 10, todos los grupos tratados con una combinación de ciprofloxacino libre y liposomal tuvieron mayores tasas de supervivencia que el grupo de control con diluyente.

Tabla 1: Media de supervivencia por grupo de dos estudios en ratones CF con infección pulmonar de *P. aeruginosa* tratados con ARD-3100 instilado intranasalmente, o con el control

Dosis (mg/kg)	Ciprofloxacino libre %	Media del número de inicio	Media de mortalidad	Media de supervivencia
0 (control)	N/A	9	9,6	34 %
0,6	1	8,5	2,5/8,5	66 %
1.2	1	8,5	□ 3/8,5	65 %
0.96	38	10,5	2,5/10,5	76 %

5 Conclusión: La administración intranasal (para alcanzar el pulmón) de ciprofloxacino encapsulado en liposomas aumentó la tasa de supervivencia de los ratones con infecciones pulmonares de *P. aeruginosa*. El ciprofloxacino liposomal o combinaciones de ciprofloxacino libre y liposomal inhalados son eficaces en pacientes con fibrosis quística u otras enfermedades con infecciones pulmonares.

Ejemplo 3

10 Fabricación de ciprofloxacino encapsulado: Se encapsuló ciprofloxacino (50 mg/mL) en liposomas que consisten en fosfatidil-colina de soja hidrogenada (HSPC) (70,6 mg/mL), un derivado de lecitina de soja natural (SPC) semi-sintético totalmente hidrogenado, y colesterol (29,4 mg/mL), como se describe en el Ejemplo 1. La caracterización de esta formulación liposomal indicó que aproximadamente el 1 % del ciprofloxacino estaba libre; esto es, no estaba encapsulado dentro del liposoma.

15 Administración de la combinación de ciprofloxacino libre y encapsulado: En lugar de utilizar una formulación que contiene ambos, el ciprofloxacino libre y el encapsulado, un método alternativo es crear la mezcla durante el proceso de administración. Por ejemplo, la adición de cizallamiento o de calor de una manera controlada puede producir de forma reproducible en algunos de los liposomas la pérdida de su integridad y la liberación de los contenidos de fármaco que habían sido previamente encapsulados dentro de los liposomas. Los estudios que utilizan el sistema electromecánico AERx confirmaron la posibilidad de utilizar este método. Formulaciones que contenían
20 aproximadamente 99 % de ciprofloxacino encapsulado se administraron utilizando el sistema AERx y se recogieron las gotitas del aerosol. Con el controlador de temperatura fijado a temperaturas de 13, 45, 77, 108 y 140 °C, el aerosol recogido contenía 89, 84, 82, 77 y 41 por ciento de ciprofloxacino encapsulado, respectivamente.

25 La presente invención se muestra y se describe en el presente documento de una manera que se considera que incluye las realizaciones más prácticas y preferidas. Se reconoce, sin embargo, que se pueden realizar desviaciones de las mismas que están dentro del alcance de la invención y que habrá modificaciones obvias para un experto en la técnica tras la lectura de esta descripción.

30 Aunque la presente invención ha sido descrita con referencia a las realizaciones específicas de la misma, los expertos en la técnica entenderán que se pueden hacer diversos cambios y se pueden sustituir equivalentes sin apartarse del alcance de la invención. Además, se pueden hacer muchas modificaciones para adaptarse a una situación, material, composición de materia, procedimiento, etapa o etapas del procedimiento, para el objetivo y alcance de la presente invención. Todas estas modificaciones se pretende que estén dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas a este documento.

Referencias

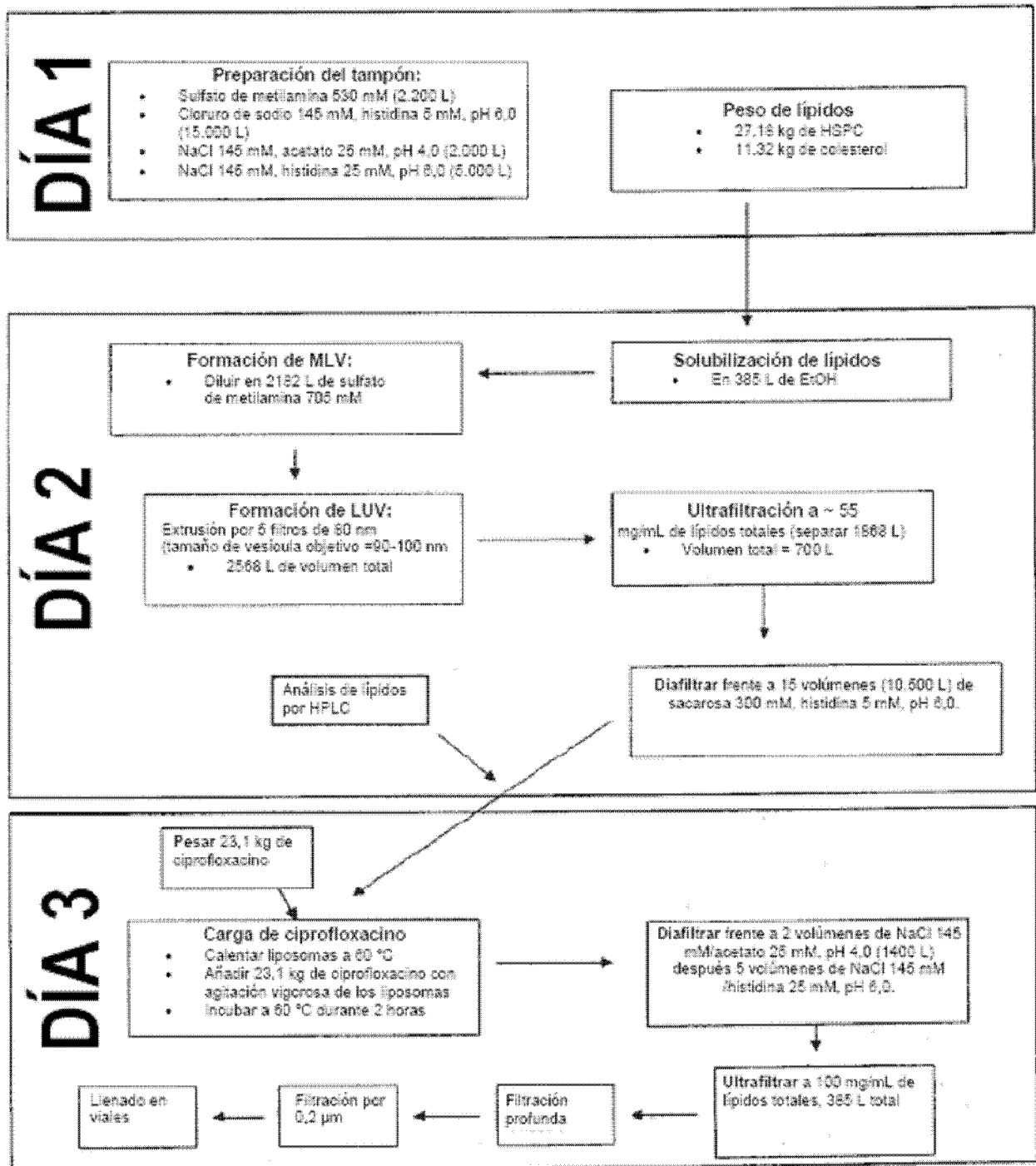
- Almeida JA, Runge S, Mülleret RH, Peptide-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): Influence of production parameters. *Int J Pharm.* 149 (2) (1997) 255-265.
- 5 Bangham AD, Standish MM, Watkins JC, Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol.* 13 (1) (1965) 238-252.
- Conforti A, Franco L, Milamino R, Velo GP, Boccu E, Largajolli E, Schiavon O, Veronese FM. PEG superoxide dismutase derivatives: anti-inflammatory activity in carrageenan pleurisy in rats. *Pharm Research Commun.* 19, pg. 287, 1987.
- 10 Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM., Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol.* 1995; 49:711-45.
- Fitzsimmons SC. The changing epidemiology of cystic fibrosis. *J Pediatr.* 1993 Jan; 122(1):1-9.
- Gilbert P, Das J, Foley I., Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv Dent Res.* 1997 Apr; 11(1):160-7.
- 15 Helle J, Barr J, Ng SY, Shen HR, Schwach-Abdellaoui K, Gurny R, Vivien-Castioni N, Loup PJ, Baehni P, Mombelli A. Development and applications of injectable poly(ortho esters) for pain control and periodontal treatment. *Biomaterials*, 23, 2002, 4397-4404.
- Hodson M, Shah PL, DNase trials in cystic fibrosis. *Respiration* 1995; 62, Suppl 1: 29-32.
- Katre NV, Knauf MJ, Laird WJ., Chemical modification of recombinant interleukin 2 by polyethylene glycol increases its potency in the murine Meth A sarcoma model. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* vol. 84, 1487-91, 1987.
- 20 LiPuma JJ., Microbiological and immunologic considerations with aerosolized drug delivery. *Chest.* 2001 Sep; 120(3 Suppl):118S-123S.
- Lode H, Borner K, Koeppe P, Schaberg T., Azithromycin—review of key chemical, pharmacokinetic and microbiological features. *J Antimicrob Chemother.* 1996; 37, Suppl C: 1-8
- Moss R B., Administration of aerosolized antibiotics in cystic fibrosis patients. *Chest.* 2001 Sep; 120(3 Suppl):107S-113S.
- 25 Passirani C, Barratt G, Devissaguet JP, Labarre D., Long-circulating nanoparticles bearing heparin or dextran covalently bound to poly(methyl methacrylate). *Pharm Res.* 1998 Jul; 15(7):1046-50.
- Peppas Bures P, Leobandung W, Ichikawa H., Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur J of Pharm and Biopharm.* 2000 Jul; 50(1):27-46. Review.
- 30 Polonio RE Mermel LA, Paquette GE, Sperry JF., Eradication of biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* (RP62A) by a combination of sodium salicylate and vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001 Nov; 45(11):3262-6.
- Schroeder SA Gaughan DM, Swift M., Protection against bronchial asthma by CFTR delta F508 mutation: a heterozygote advantage in cystic fibrosis. *Nat Med.* 1995 Jul; 1(7):703-5.
- Sciarra JJ, Patel SP., In vitro release of therapeutically active ingredients from polymer matrixes. *J of Pharm Sci.* 1976 Oct; 65(10): 1519-22.
- 35 Smith AL, Ramsey BW, Hedges DL, Hack B, Williams-Warren J, Weber A, Gore EJ, Redding GJ. Safety of aerosol tobramycin administration for 3 months to patients with cystic fibrosis. *Ped Pulmonol.* 1989; 7(4):265-271.
- Thorgeirsdottir TO, Kjoniksen AL, Knudsen KD, Kristmundsdottir T, Nystrom B. Viscoelastic and Structural Properties of Pharmaceutical Hydrogels Containing Monocaprin. *Eur. J. of Pharm. and Biopharm.* 2005 Feb; 59(2):333-42.
- 40 Van Heeckeren AM, Schluchter MD, Drumm ML, Davis PB. Role of Cfr genotype in the response to chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004 Nov; 287(5):L944-52. Epub 2004 Jul 9.
- Van Heeckeren AM, Scaria A, Schluchter MD, Ferkol TW, Wadsworth S, Davis PB. Delivery of CFTR by adenoviral vector to cystic fibrosis mouse lung in a model of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004 Apr; 286(4):L717-26. Epub 2003 Sep 26.
- 45 Van Heeckeren A, Ferkol T, Tosi M., Effects of bronchopulmonary inflammation induced by *pseudomonas aeruginosa* on adenovirus-mediated gene transfer to airway epithelial cells in mice. *Gene Ther.* 1998 Mar; 5(3):345-51.

- Van Heeckeren AM, Schluchter MD., Murine models of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. Lab Anim. 2002 Jul; 36(3):291-312.
- 5 Van Heeckeren AM, Tscheikuna J, Walenga RW, Konstan MW, Davis PB, Erokwu B, Haxhiu MA, Ferkol TW. Effect of *Pseudomonas* infection on weight loss, lung mechanics, and cytokines in mice. Am J Respir Crit Care Med. 2000 Jan; 161(1):271-9.
- Weber A, Smith A, Williams-Warren J, Ramsey B, Covert DS., Nebulizer delivery of tobramycin to the lower respiratory tract. Pediatr Pulmonol. 1994 May; 17(5):331-9.
- Wolter J, Seeney S, Bell S, Bowler S, Masel P, McCormack J., Effect of long term treatment with azithromycin on disease parameters in cystic fibrosis: a randomised trial. Thorax 2002; 57: 212-216.
- 10 Woodle MC, Storm G, Newman MS, Jekot JJ, Collins LR, Martin FJ, Szoka FC Jr., Prolonged systemic delivery of peptide drugs by long-circulating liposomes: illustration with vasopressin in the Brattleboro rat. Pharm Res. 1992 Feb; 9(2):260-5.
- Zielenski J, Tsui LC., Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations. Annual Rev Genet. 1995; 29:777-807.
- 15 Ye, Q, Asherman J, Stevenson M, Brownson E, Katre NV., DepoFoam technology: a vehicle for controlled delivery of protein and peptide drugs. J Control Rel. Feb 14; 64(1-3):155-66.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición de ciprofloxacino encapsulado en liposomas, en la que los liposomas consisten en 50 mg/mL de ciprofloxacino, 70,6 mg/mL de fosfatidil-colina de soja hidrogenada (HSPC) y 29,4 mg/mL de colesterol, en donde los liposomas tienen un tamaño medio de partícula de 75 nm a 120 nm y en donde los liposomas se suspenden en un tampón isotónico que comprende histidina 25 mM, NaCl 145 mM a pH 6,0 y 300 mOsm/kg, y en donde la composición se formula para administración en aerosol.
- 10 2. Una composición de partículas que comprende ciprofloxacino encapsulado en liposomas según la reivindicación 1, y ciprofloxacino no encapsulado, en donde el ciprofloxacino no encapsulado se forma a partir de una solución a una concentración de 30 mg/mL en acetato de sodio 10 mM, pH 3,2, en donde la composición comprende 0,36 mg/kg de ciprofloxacino no encapsulado y 0,6 mg/kg de ciprofloxacino encapsulado, y en donde la composición se formula para administración en aerosol.

FIGURA 1



AR.3 Tasa de supervivencia acumulativa

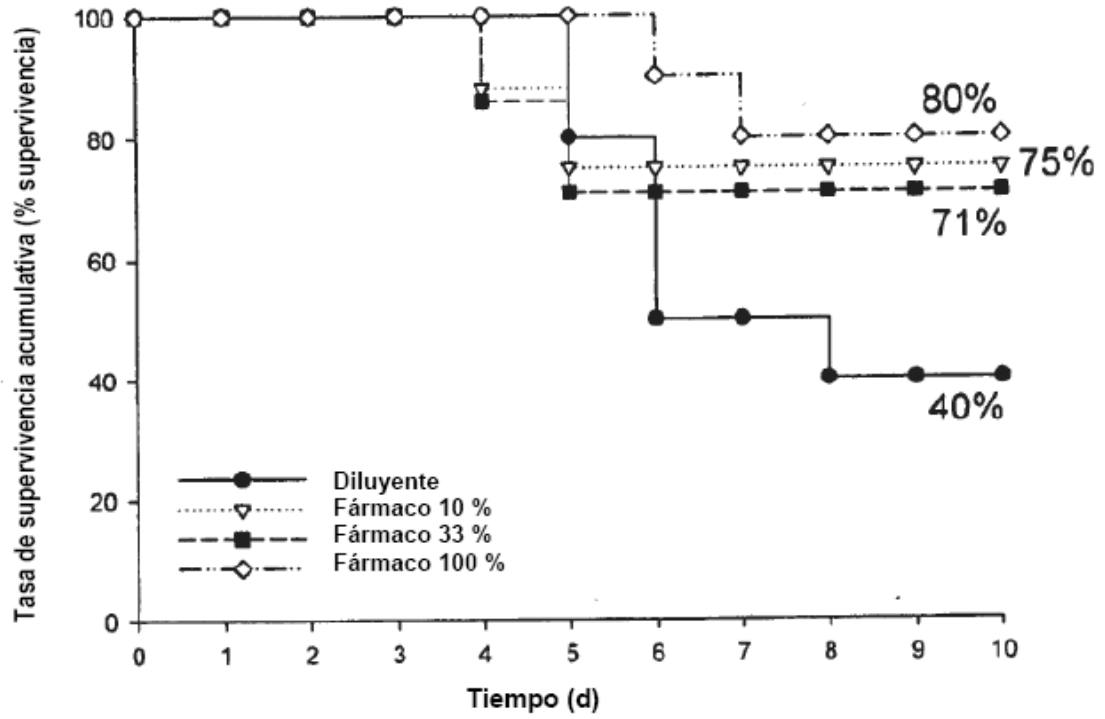


FIGURA 2