(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 539 591**

(51) Int. Cl.:

A61K 9/127 (2006.01)
A61K 31/7036 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.10.2003** **E 11159754 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.05.2015** **EP 2363114**

(54) Título: **Liberación sostenida de antiinfectantes**

(30) Prioridad:

29.10.2002 US 421923 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.07.2015

(73) Titular/es:

INSMED INCORPORATED (100.0%)
10 Finderne Ave, Building 10
Bridgewater NJ 08807-3365 , US

(72) Inventor/es:

BONI, LAWRENCE T y
MILLER, BRIAN S.

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

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).

ES 2 539 591 T3

DESCRIPCIÓN

Liberación sostenida de antiinfectantes

Cierta tecnología de liberación sostenida adecuada, por ejemplo, para administración por inhalación emplea liposomas y complejos de lípidos para proporcionar efecto terapéutico prolongado de un fármaco en el pulmón y sistémicamente por liberación sostenida, y la capacidad para direccionar y mejorar la absorción de fármaco en sitios de enfermedad. La presente invención comprende un antiinfectante liposómico para uso en el tratamiento de infecciones pulmonares en pacientes de fibrosis quística (CF) utilizando antiinfectante liposómico. Inesperadamente, los tratamientos con la nueva formulación requieren una dosis significativamente menor que la conocida para alcanzar eficacia en la técnica.

Como se informa en Goodman y Gilman's The Pharmaceutical Basis of Therapeutics, 8ª edición, "dado que la incidencia de nefrotoxicidad y ototoxicidad está relacionada con la concentración a la que se acumula un aminoglicosido, es crítico reducir la dosis de mantenimiento de estos fármacos en los pacientes con función renal deteriorada". Dado que los aminoglicosidos pueden producir disfunción vestibular o auditiva y nefrotoxicidad cualquiera que sea el grado de deterioro de un paciente, es importante por lo general reducir las dosis de mantenimiento. La presente invención proporciona reducciones espectaculares en las dosis de mantenimiento.

Los pacientes de CF sufren secreciones espesas de moco y/o esputo en los pulmones, infecciones frecuentes como consecuencia, y biofilms resultantes de colonizaciones bacterianas. Todos estos fluidos y materiales crean barreras para contra el direccionamiento eficaz de las infecciones con antiinfectantes.

La presente invención supera estas barreras, e incluso permite una dosificación reducida (en cantidad o frecuencia), reduciendo con ello la carga de fármaco en los pacientes.

Para las infecciones de pulmón en general, el protocolo de dosificación estipulado por la invención proporciona un medio de reducción de la carga de fármaco.

Sumario de la invención

La invención está de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

Breve Descripción de los Dibujos

Figura 1: Diagrama de la sección transversal del esputo/biofilm observado en pacientes con fibrosis quística.

Figura 2: Representación gráfica del efecto de direccionamiento y depósito del fármaco de la presente invención.

Figuras 3 y 4: Representaciones gráficas de la bacteriología de amikacina en diversas formas.

Figura 5: Representación gráfica de la liberación sostenida para amikacina y tobramicina liposómicas.

Figura 6: Datos acerca de ciprofloxacino libre o complejado.

Figura 7: Representación gráfica de la residencia del fármaco en el pulmón dados diversos protocolos de dosificación.

Descripción Detallada de la Invención

La presente invención da a conocer un antiinfectante liposómico para uso en el tratamiento o la mejora de infecciones pulmonares, tal como en pacientes de fibrosis quística, que comprende la administración de antiinfectante (tal como antibiótico) encapsulado en partículas basadas en lípidos.

Los antiinfectantes son agentes que actúan contra las infecciones, tales como infecciones bacterianas, micobacterianas, fúngicas, virales o causadas por protozoos.

Los antiinfectantes descritos en esta memoria incluyen, pero sin carácter limitante, aminoglicosidos (v.g., estreptomicina, gentamicina, tobramicina, amikacina, netilmicina, kanamicina, y análogos), tetraciclinas (tales como clorotetraciclina, oxitetraciclina, metaciclina, doxiciclina, minociclina y análogas), sulfonamidas, (v.g., sulfanilamida, sulfadiazina, sulfametaoxazol, sulfisoxazol, sulfacetamida, y análogas), ácido paraaminobenzoico, diaminopirimidinas (tales como trimetoprima, utilizada a menudo en conjunción con sulfametoxazol, pirazinamida, y análogos), quinolonas (tales como ácido nalidíxico, cinoxacino, ciprofloxacino y norfloxacino y análogos), penicilinas (tales como penicilina G, penicilina V, ampicilina, amoxicilina, bacampicilina, carbenicilina, carbenicilina-indanilo, ticarcilina, azlocilina, mezlocilina, piperacilina, y análogos), penicilinas resistentes a las penicilinasas (tales como meticilina, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina, nafcilina y análogos), cefalosporinas de primera generación (tales como cefadroxil, cefalexina, cefradina, cefalotín, cefapirín, cefazolín, y análogos), cefalosporinas de segunda generación (tales como cefaclor, cefamandol, cefonicid, cefoxitín, cefotetán, cefuroxima, cefuroxima-axetil, cefmetazol, cefprozil, loracarbef, ceforanida, y análogos), cefalosporinas de tercera generación (tales como

cefepima, cefoperazona, cefotaxima, ceftizoxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefixima, cefpodoxima, ceftibutén, y análogos), otras beta-lactamas (tales como imipenem, meropenem, aztreonam, ácido clavulánico, sulbactam, tazobactam, y análogos), inhibidores de beta-lactamasas (tales como ácido clavulánico), cloranfenicol, macrólidos (tales como eritromicina, azitromicina, claritromicina, y análogos), lincomicina, clindamicina, espectinomicina, polimixina B, polimixinas (tales como polimixina A, B, C, D, E1 (colistina A), o E2, colistina B o C, y análogos) colistina, vancomicina, bacitracina, isoniazida, rifampín, etambutol, etionamida, ácido aminosalicílico, cicloserina, capreomicina, sulfonas (tales como dapsona, sulfoxona sódica, y análogos), clofazimina, talidomida, o cualquier otro agente antibacteriano que pueda encapsularse en lípidos. Los antiinfectantes pueden incluir agentes antifúngicos, con inclusión de antifúngicos poliénicos (tales como anfotericin B, nistatina, natamicina, y análogos), flucitosina, imidazoles (tales como miconazol, clotrimazol, econazol, ketoconazol, y análogos), triazoles (tales como itraconazol, fluconazol, y análogos), griseofulvina, terconazol, butoconazolo-ciclopirax, ciclopiroxolamina, haloprogín, tolnaftato, naftifina, terbinafina, o cualquier otro antifúngico que pueda ser encapsulado o complejado con lípidos. La discusión y los ejemplos están dirigidos fundamentalmente hacia amikacina. Pueden utilizarse combinaciones de fármacos.

Los antiinfectantes dados a conocer en esta memoria incluyen los aminoglicosidos, las quinolonas, los antifúngicos poliénicos y las polimixinas.

Entre las infecciones pulmonares (tal como en pacientes de fibrosis quística) que pueden tratarse con el antiinfectante liposómico de la invención se encuentran infecciones de Pseudomonas (v.g., *P. aeruginosa, P. paucimobilis, P. putida, P. fluorescens, y P. acidovorans*), estafilocócicas, de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), estreptocócicas (con inclusión de *Streptococcus pneumoniae*), *Escherichia coli, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Haemophilus, Yersinia pestis, Burkholderia pseudomallei, B. cepacia, B. gladioli, B. multivorans, B. vietnamiensis, Mycobacterium tuberculosis, complejo M. avium* (MAC) (M. *avium y M. intracellulare*), *M. kansasii, M. xenopi, M. marinum, M. ulcerans, o complejo M. fortuitum (M. fortuitum y M. chelonae)*.

La presente invención comprende un anti-infectante liposómico para uso en el tratamiento o la mejora de una infección pulmonar en un paciente, en donde el antiinfectante es amikacina.

El antiinfectante "liposómico" o "Lip-An" expuesto en esta memoria es cualquier forma de composición antiinfectante en la cual al menos aproximadamente 1% en peso del antiinfectante está asociado con el lípido o como un liposoma en el que el antibiótico puede estar en la fase acuosa o la fase de bicapa hidrófoba o en la región del grupo de cabeza interfacial de la bicapa liposómica. Con preferencia, al menos aproximadamente 5%, o al menos aproximadamente 10%, o al menos aproximadamente 20%, o al menos aproximadamente 25%, está asociado de este modo. La asociación se mide por separación a través de un filtro en el cual el lípido y el fármaco asociado con el lípido quedan retenidos y el fármaco libre se encuentra en el filtrado.

El tratamiento con antiinfectante liposómico requiere una dosis notablemente menor que los tratamientos conocidos anteriormente. En una realización preferida, se administra a humanos menos de 100 mg por día de un aminoglicosido. En otra realización preferida se administran aproximadamente 30 a 50 mg en días alternos o cada 3 días. Es de esperar que las dosis puedan reducirse correspondientemente para otras especies en comparación con la dosis recomendada para un antiinfectante que no está liposómico complejado o lípidos. Esta es una dosis inesperadamente baja.

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

Las realizaciones de la invención que no tratan CF, se pueden usar para cualquier animal, aunque preferiblemente se usan con seres humanos. Las cantidades relativas para un animal dado se miden con respecto a dicho animal.

El protocolo de dosificación es preferiblemente una vez al día o menos. En realizaciones preferidas, el protocolo de dosificación es una sola vez cada dos días, una vez cada tres días, una vez a la semana o menos. Por ejemplo, el protocolo de dosificación puede ser cada dos días o menos, utilizando 50% o menos de la cantidad de fármaco libre comparativa. O bien, por ejemplo, la dosificación puede ser diaria utilizando 35% o menos de la cantidad de fármaco libre comparativa.

Para tratar las infeccionas de la invención, una cantidad eficaz de un compuesto farmacéutico será reconocida por los médicos pero incluye una cantidad eficaz para tratar, reducir, mejorar, eliminar o prevenir uno o más síntomas de la enfermedad que se desea tratar, o la afección que se pretende evitar o tratar, o para producir de algún otro modo un cambio clínicamente reconocible en la patología de la enfermedad o afección. La mejora incluye reducir la incidencia o la gravedad de las infeccionas en los animales tratados profilácticamente. En ciertas realizaciones, la cantidad eficaz es una eficaz para tratar o mejorar después que se han presentado síntomas de infección pulmonar.

En ciertas otras realizaciones, la cantidad eficaz es una eficaz para tratar o mejorar la incidencia o gravedad media de las infeccionas en animales tratados profilácticamente (como se mide por estudios estadísticos).

El liposoma u otros sistemas de suministro basados en lípidos puede administrarse por inhalación sea como un spray, polvo, o aerosol nebulizado, o por administración intratecal. Se prefieren las administraciones por inhalación. El resultado global es una administración menos frecuente y un índice terapéutico mejorado comparado con el fármaco libre o la forma parenteral del fármaco. Los liposomas son particularmente ventajosos debido a su capacidad para proteger el fármaco siendo al mismo tiempo compatibles con el revestimiento pulmonar o el agente tensioactivo del pulmón.

La presente invención incluye un antiinfectante liposómico para uso en el tratamiento de infeccionas pulmonares Gram-negativas. Una infección tratada útilmente es la infección crónica de pseudomonas en pacientes de CF. Los tratamientos conocidos de infeccionas pulmonares (por ejemplo en los pacientes de CF) con amikacina comprenden por regla general la administración de aproximadamente 200-600 mg de amikacina o tobramicina al día por inhalación. La presente invención permite el tratamiento por administración, en una realización preferida, de 100 mg o menos de amikacina al día (o normalizado a 100 mg al día o menos en el caso de dosificación menos frecuente). En otra realización, se efectúa la administración de 60 mg o menos de amikacina al día. Y en otra realización adicional se efectúa la administración de aproximadamente 30 a 50 mg no más que una vez cada dos días. La realización más preferida comprende administrar aproximadamente 30 a 50 mg cada dos días o cada tres días.

Los tratamientos conocidos de infeccionas pulmonares con tobramicina comprenden por regla general administrar 300 mg, dos veces al día, en adultos y niños de 6 años de edad o mayores.

Los lípidos utilizados para formar los liposomas de la invención consisten en DPPC y colesterol.

Los lípidos dados a conocer en esta memoria pueden ser lípidos sintéticos, semi-sintéticos o existentes naturalmente, con inclusión de fosfolípidos, tocoferoles, esteroides, ácidos grasos, glicoproteínas tales como albúmina, lípidos cargados negativamente y lípidos catiónicos. Los fosfolípidos incluyen fosfatidilcolina de huevo (EPC), fosfatidilglicerol de huevo (EPG), fosfatidilinositol de huevo (EPI), fosfatidilserina de huevo (EPS), fosfatidiletanolamina (EPE) y ácido fosfatídico de huevo (EPA); los equivalentes de soja, fosfatidilcolina de soja (SPC); SPG, SPS, SPI, SPE, y SPA; los equivalentes de huevo y soja hidrogenados (v.g., HEPC, HSPC), otros fosfolípidos constituidos por eslabonas éster de ácidos grasos en las posicionas 2 y 3 del glicerol que contienen cadenas de 12 a 26 átomos de carbono y grupos de cabeza diferentes en la posición 1 del glicerol que incluyen colina, glicerol, inositol, serina, etanolamina, así como los ácidos fosfatídicos correspondientes. Las cadenas de estos ácidos grasos pueden ser saturadas o insaturadas, y el fosfolípido puede estar constituido por ácidos grasos de longitudes de cadena diferentes y grados diferentes de insaturación. En particular, las composiciones de las formulaciones pueden incluir dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), un constituyente principal del agente tensioactivo pulmonar existente naturalmente así como dioleoilfosfatidilcolina (DOPC). Otros ejemplos incluyen dimiristoil fosfatidilcolina (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, seranida, esfingosina, esfingomielina y fosfolípidos acilados simples como mono-oleoil-fosfatidiletanolamina (MOPE).

Los lípidos dados a conocer en esta memoria pueden incluir sales de amonio de ácidos grasos, fosfolípidos y glicéridos, esteroides, fosfatidilgliceroles (PGs), ácidos fosfatídicos (PAs), fosfatidilcolinas (PCs), fosfatidilinositoles (PIs) y las fosfatidilserinas (PSs). Los ácidos grasos incluyen ácidos grasos de longitudes de cadena de carbonos de 12 a 26 átomos de carbono que son saturadas o insaturadas. Algunos ejemplos específicos incluyen: miristilamina, palmitilamina, laurilamina y estearilamina, dilauroil-etilfosfocolina (DLEP), dimiristoil-etilfosfocolina (DMEP), dipalmitoil-etilfosfocolina (DPEP) y diestearoiletilfosfocolina (DSEP), cloruro de N-(2,3-di-(9(Z)-octadeceniloxi)-prop-1-il-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA) y 1,2-bis(oleoiloxi)-3-(trimetilammonio)propano (DOTAP). Ejemplos de esteroides incluyen colesterol y ergosterol. Ejemplos de PGs, PAs, PIs, PCs y PSs incluyen DMPG, DPPG, DSPG, DMPA, DPPA, DSPA, DMPI, DPPI, DSPI, DMPS, DPPS y DSPS, DSPC, DPPC, DMPC, DOPC, y PC de huevo.

Los liposomas o complejos lipídicos compuestos de fosfatidilcolinas, tales como DPPC, favorecen la absorción por las células en el pulmón tales como macrófagos alveolares y ayudan a sostener la liberación del agente antiinfectante en el pulmón (Gonzales-Rothi et al. 1991)). Los lípidos con carga negativa tales como los PGs, PAs, PSs y PIs, además de reducir la agregación de las partículas, pueden jugar un papel en las características de liberación sostenida de la formulación de inhalación así como en el transporte de la formulación a través del pulmón (transcitosis) para absorción sistémica. Se cree que los compuestos de esterol afectan a las características de liberación e infiltración de la formulación.

Los liposomas son membranas de bicapa lipídica completamente cerradas que contienen un volumen acuoso atrapado. Los liposomas pueden ser vesículas unilaminares (que poseen una sola membrana lipídica) o vesículas multilaminares (estructuras de tipo cebolla caracterizadas por bicapas de membrana múltiples, separadas cada una de la siguiente por una capa acuosa). La bicapa está compuesta de dos monocapas de lípido que tienen una región hidrófoba de "cola" y una región hidrófila "de cabeza". La estructura de la bicapa de la membrana es tal que las

"colas" hidrófobas (no polares) de las monocapas lipídicas se orientan hacia el centro de la bicapa, mientras que las "cabezas" hidrófilas se orientan hacia la fase acuosa.

Un clatrato lipídico es una estructura tridimensional de tipo jaula que emplea uno o más lípidos en donde la estructura atrapa un agente bioactivo.

Los proliposomas son formulaciones que pueden convertirse en liposomas o complejos lipídicos después de entrar en contacto con un lípido acuoso. Puede ser necesaria agitación u otro tipo de mezcladura.

Los liposomas pueden producirse por una diversidad de métodos (por ejemplo, véase, Bally, Cullis et al., Biotechnol Adv. 5(1): 194, 1987). El procedimiento de Bangham (J. Mol. Biol., J Mol Biol. 13(1): 238-52, 1965) produce vesículas multilaminares ordinarias (MLVs). Lenk et al. (U.S. Pat. Nos. 4.522.803, 5.030.453 y 5.169. 637), Fountain et al. (U.S. Pat. No. 4.588.578) y Cullis et al. (U.S. Pat. No. 4.975.282) dan a conocer métodos para producir liposomas multilaminares que tienen una distribución de soluto interlaminar sustancialmente igual en cada uno de sus compartimientos acuosos. Papahadjopoulos et al., Patente U.S. No. 4.235.871, da a conocer la preparación de liposomas oligolaminares por evaporación en fase inversa.

Pueden producirse vesículas unilaminares a partir de MLVs por diversas técnicas, por ejemplo, la extrusión de Cullis et al. (U.S. Pat. No. 5.008.050) y Loughrey et al. (U.S. Pat. No. 5.059.421). Pueden utilizarse sonicación y homogeneización para producir liposomas unilaminares más pequeños a partir de liposomas mayores (véase, por ejemplo, Papahadjopoulos et al., Biochim. Biophys. Acta., 135: 624-638, 1967; Deamer, Patente U.S. No. 4.515.736; y Chapman et al., Liposome Technol., 1984, pp. 1-18).

La preparación de liposomas original de Bangham et al., J. Mol. Biol., 1965, 13: 238-252) implica suspender fosfolípidos en un disolvente orgánico que se evapora luego a sequedad dejando un film de fosfolípido en la vasija de reacción. A continuación, se añade una cantidad apropiada de fase acuosa, se deja "hinchar" la mixtura, y los liposomas resultantes que están constituidos por vesículas multilaminares (MLVs) se dispersan por medios mecánicos. Esta preparación proporciona la base para el desarrollo de las pequeñas vesículas unilaminares tratadas por ultrasonidos descritas por Papahadjopoulos et al. (Biochem. Biophys, Acta., 1967, 135: 624-638), y vesículas unilaminares grandes.

Técnicas para producir vesículas unilaminares grandes (LUVs), tales como evaporación en fase inversa, procedimientos de infusión, y dilución en detergente, pueden utilizarse para producir liposomas. Una revisión de estos y otros métodos para producción de liposomas puede encontrarse en el texto Liposomes, Marc Ostro, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1983, capítulo 1. Véase también Szoka, Jr. et al., (1980, Ann. Rev. Biophys, Bioeng., 9: 467.

Otras técnicas que se utilizan para preparar vesículas incluyen las que forman vesículas de evaporación en fase inversa (REV), Papahadjopoulos et al., Patente U.S. No. 4.235.871. Otra clase de liposomas que pueden utilizarse son los caracterizados por tener distribución de soluto laminar sustancialmente igual. Esta clase de liposomas se conoce como vesículas plurilaminares estables (SPLV) como se definen en la Patente U.S. No. 4.522.803 concedida a Lenk, et al. e incluye vesículas monofásicas como las descritas en la Patente U.S. No. 4.588.578 concedida a Fountaín, et al. y vesículas multilaminares congeladas y descongeladas (FATMLV) como se ha descrito arriba.

Una diversidad de esteroles y sus derivados solubles en agua tales como hemisuccinato de colesterol han sido utilizados para formar liposomas; véase específicamente Janoff et al., Patente U.S. No. 4.721.612, expedida en fecha 26 de enero de 1988, titulada "Steroidal Liposomes". Mayhew et al., describieron un método para reducir la toxicidad de agentes antibacterianos y agentes antivirales por encapsulación de los mismos en liposomas que comprendían alfa-tocoferol y ciertos derivados del mismo. Asimismo, se han utilizado para formar liposomas una diversidad de tocoferoles y sus derivados solubles en agua, véase Janoff et al., Patente U.S. No. 5.041.278.

Un proceso para formación de liposomas implica un proceso de "infusión en disolvente". Este 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 solución de lípido (preferiblemente una solución) e inyectar luego la solución en un medio acuoso que contiene agentes bioactivos. Típicamente, un disolvente compatible con el proceso es uno que puede eliminarse por lavado en un proceso acuoso tal como diálisis. La composición que se somete a ciclos frío-caliente se forma preferiblemente por infusión en disolvente, prefiriéndose infusión en etanol. Los alcoholes son preferidos como disolventes. 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 solución de lípido e inyectar luego la solución en un medio acuoso que contiene agentes bioactivos. Una cantidad "pequeña" de disolvente es una cantidad compatible con la formación de liposomas en el proceso de infusión. Tales procesos se describen en Lee et al., Solicitud de Patente U.S. 10/634.144, presentada el 4 de agosto de 2003, Pilkiewicz et al, Solicitud de Patente U.S. 10/383,173, presentada el 5 de marzo de 2003, y Boni et al., Solicitud de Patente U.S. 10/383.004, presentada el 5 de marzo de 2003.

La clasificación por tamaños de los liposomas puede realizarse por varios métodos, tales como técnicas de extrusión, sonicación y homogeneización que son bien conocidas, y practicadas fácilmente, por los especialistas con

experiencia ordinaria. La extrusión implica hacer pasar liposomas, a presión, una o más veces a través de filtros que tienen tamaños de poro definidos. Los filtros están hechos generalmente de policarbonato, pero los filtros pueden ser de cualquier material duradero que no interaccione con los liposomas y que sea suficientemente resistente para permitir la extrusión a una presión suficiente. Los filtros preferidos incluyen filtros "rectos" dado que los mismos pueden soportar generalmente la mayor presión de los procesos de extrusión preferidos de la presente invención. También pueden utilizarse filtros de "paso tortuoso". La extrusión puede utilizar también filtros asimétricos, tales como filtros AnotecO™, lo que implica la extrusión de los liposomas a través de un filtro poroso de óxido de aluminio del tipo de poros ramificados.

El tamaño de los liposomas puede reducirse también por sonicación, que emplea energía sónica para romper o cizallar los liposomas, que se convertirán espontáneamente en liposomas más pequeños. La sonicación de conduce por inmersión de un tubo de vidrio que contiene la suspensión de liposomas en el epicentro sónico producido en un sonicador de tipo baño. Alternativamente, puede utilizarse un sonicador de tipo sonda con el cual la energía sónica se genera por vibración de una sonda de titanio en contacto directo con la suspensión de liposomas. Pueden utilizarse también aparatos de homogeneización y molienda, tales como el homogeneizador Gifford Wood, Polytron™ o Microfluidizer™ para romper liposomas de mayor tamaño en liposomas más pequeños.

Los liposomas resultantes pueden separarse en poblaciones homogéneas utilizando métodos bien conocidos en la técnica, tales como filtración de flujo tangencial. En este procedimiento, una población de liposomas de tamaños heterogéneos se hacen pasar a través de filtros de flujo tangencial, dando así como resultado una población de liposomas con un límite de tamaños 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 pasan a través del filtro. Este filtrado puede ser sometido luego a filtración de flujo tangencial a través de un segundo filtro, que tiene un tamaño de poro más pequeño que el primer filtro. El material retenido por este filtro es una población de liposomas que tiene límites de tamaño superior e inferior definidos por los tamaños de poro de los filtros primero y segundo, respectivamente.

Mayer et al. encontraron que los problemas asociados con la retención eficiente de agentes bioactivos lipófilos ionizables tales como agentes antineoplásticos, por ejemplo, antraciclinas o alcaloides de la vinca, pueden aliviarse por empleo de gradientes iónicos transmembranales. Además de inducir una mayor absorción, tales gradientes transmembranales pueden actuar también para aumentar la retención de antiinfectante en los liposomas.

El antiinfectante liposómico tiene un efecto antiinfectante sostenido y menor toxicidad, haciendo posible una administración menos frecuente y un índice terapéutico mejorado. En estudios preclínicos con animales y en comparación con tobramicina inhalada (no liposómica o lipídica) al nivel de dosis equivalente, se demostró que, durante el periodo de tiempo que sigue poco después de la administración hasta más de 24 horas después, la amikacina liposómica/complejada exhibía niveles de fármaco en el pulmón que oscilaban desde dos veces a varios centenares de veces mayores que el de tobramicina. Adicionalmente, la amikacina liposómica mantenía estos niveles durante mucho más de 24 horas. En un modelo animal diseñado para mimetizar la infección de pseudomonas observada en los pacientes de CF, se demostró que la amikacina liposómica eliminaba significativamente la infección en los pulmones de los animales cuando se comparaba con los aminoglicosidos libres.

El agente tensioactivo pulmonar facilita la expansión y compresión de los pulmones durante la respiración. Esto se consigue por recubrimiento del pulmón con una combinación de lípido y proteína. El lípido está presente como una monocapa con las cadenas hidrófobas dirigidas hacia el exterior. El lípido representa 80% del agente tensioactivo pulmonar, siendo la mayor parte del lípido fosfatidilcolina, 50% de la cual es dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC) (Veldhuizen et al, 1998). Las proteínas tensioactivas (SP) que están presentes actúan para mantener la estructura y facilitar tanto la expansión como la compresión del agente tensioactivo pulmonar que ocurre durante la respiración. De éstas, SP-B y SP-C tienen específicamente comportamiento lítico y pueden lisar los liposomas (Hagwood et al., 1998; Johansson, 1998). Se cree que este comportamiento lítico facilita la rotura gradual de los liposomas seguida por su liberación de contenidos internos que permiten un efecto de depósito. Esta rotura de los liposomas ocurre naturalmente como se pone de manifiesto por el desenredado espontáneo de los cuerpos laminares eyectados por exocitosis (Ikegami & Jobe, 1998). Además de llegar a quedar asimilados dentro del agente tensioactivo pulmonar, los liposomas pueden ser ingeridos directamente por los macrófagos por fagocitosis (Couveur et al., 1991; Gonzales-Roth et al., 1991; Swenson et al., 1991). La absorción de los liposomas por los macrófagos alveolares es otro medio por el cual pueden suministrarse fármacos al sitio enfermo.

Loa lípidos utilizados para formar liposomas para uso en inhalación son comunes a los lípidos endógenos encontrados en el agente tensioactivo pulmonar. Los liposomas están compuestos de bicapas que atrapan el producto farmacéutico deseado. Éstas pueden estar configuradas como vesículas multilaminares de bicapas concéntricas con el producto farmacéutico atrapado dentro del lípido de las diferentes capas o en el espacio acuoso entre las capas. Se dan a conocer aquí procesos singulares para crear liposomas y complejos lípido/fármaco singulares. Los productos de estos procesos para uso en la presente invención forman parte de la presente invención, donde el anti-infectante liposómico está producido por infusión en disolvente.

La ratio de lípido a fármaco utilizando el proceso dado a conocer en esta memoria es preferiblemente menor que 3 a 1. Y, más preferiblemente, la ratio de lípido a fármaco es menor que 2,5 a 1. Adicionalmente, el porcentaje de antiinfectante libre presente después que el producto se dializa durante una duración particular es menor.

Todos los procesos descritos en esta memoria pueden adaptarse fácilmente para fabricación aséptica en gran escala. El tamaño final de los liposomas puede ajustarse por modificación de la composición del lípido, la concentración, los excipientes, y los parámetros de proceso.

Un obstáculo para el tratamiento de enfermedades infecciosas tales como *Pseudomonas aeruginosa*, la causa principal de la enfermedad crónica en los pacientes de fibrosis quística, es la penetración del fármaco dentro de la barrera esputo/biofilm en las células epiteliales (Figura 1). En la Figura 1, las formas de rosquilla representan antiinfectante liposómico/complejado, el símbolo "+" representa antiinfectante libre, el símbolo "-" designa mucina, alginato y DNA, y el símbolo de barra gruesa 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 envuelve y previene la penetración de fármacos con carga positiva tales como aminoglicosidos, haciéndolos biológicamente ineficaces (Mendelman et al., 1985). El atrapamiento de antiinfectantes en liposomas podría proteger o proteger parcialmente los antiinfectantes contra la fijación inespecífica al esputo/biofilm, haciendo posible la penetración de los liposomas o complejos lipídicos (con aminoglicosido atrapado) (Figura 1).

Se ha demostrado que la amikacina tiene un alto grado de resistencia a las enzimas bacterianas, proporcionando así un mayor porcentaje de aislados clínicos susceptibles que el encontrado para otros aminoglicosidos con inclusión de tobramicina y gentamicina (Price et al., 1976). En particular, los aislados de *P. aeruginosa* son mucho más sensibles a la amikacina que a otros aminoglicosidos, al tiempo que no exhiben resistencia cruzada alguna (Damaso et al., 1976).

El efecto sostenido de liberación y depósito de la amikacina liposómica se aprecia claramente en la Figura 2. En este estudio, se administró tobramicina a ratas por administración intratraqueal e intravenosa. Las ratas recibieron también amikacina liposómica por vía intratraqueal a la misma dosis (4 mg/rata). Los datos demuestran que únicamente con la amikacina liposómica se consigue un efecto sostenido de liberación y depósito. De hecho, 24 horas después de la dosificación, únicamente la amikacina liposómica exhibe niveles significativos del fármaco en los pulmones del animal, mientras que ambas formulaciones de tobramicina revelaban niveles insignificantes, debido fundamentalmente, según se cree, a absorción sistémica rápida. Este aumento mayor que 100 veces de aminoglicosido en el pulmón para el antiinfectante liposómico respalda la idea de un antiinfectante liposómico de liberación sostenida que puede tomarse con una frecuencia significativamente menor que la formulación TOBI™ aprobada actualmente (Chiron Corporation, Ameryville, CA).

Además, la presencia de un esputo/biofilm impide la penetración de los aminoglicosidos libres debido a fijación de los antiinfectantes a su superficie (Figura 1). Por tanto, se precisan dosis que exceden de 1000 µg de tobramicina/gramo de tejido pulmonar para exhibir un efecto terapéutico en los pacientes de CF. Esto se resuelve con la amikacina liposómica. Así, el nivel terapéutico de fármaco se mantiene durante un periodo de tiempo más largo en las formulaciones liposómicas de amikacina comparado con la tobramicina libre. Esta facilitación de la fijación y penetración podría ser también un medio por el cual la amikacina liposómica podría reducir significativamente la resistencia bacteriana, cuyo desarrollo se observa comúnmente cuando los antibacterianos están presentes en *vivo* a niveles inferiores a la concentración inhibidora mínima.

Se determinó la farmacocinética de la amikacina en ratas después de administración intratraqueal (IT) de tobramicina libre o amikacina liposómica. Estos datos se compararon con la distribución obtenida en los pulmones después de una inyección de tobramicina libre en la vena del rabo. En todos los casos se administró una dosis de 4 mg/rata. Como puede verse en la Figura 2, puede suministrarse una deposición mucho mayor de aminoglicosido por IT comparada con la inyección. El efecto de depósito de la tecnología de antiinfectante liposómico se demuestra también en el hecho de que, comparada con la tobramicina administrativa por vía IT o IV, queda todavía en los pulmones una dosis más de 100 veces mayor de fármaco en el caso de la amikacina liposómica 24 horas después de la administración. Así pues, el nivel terapéutico de fármaco se mantiene durante un periodo de tiempo mayor en las formulaciones liposómicas de amikacina comparado con tobramicina libre.

La fijación de los aminoglicosidos al esputo de los pacientes de CF constituye un problema, particularmente si esta fijación reduce la bioactividad del antiinfectante (Hunt et al., 1995). Para determinar si la amikacina liposómica puede retener actividad biológica después de un periodo de tiempo prolongado, se administró amikacina liposómica a ratas normales por instilación intratraqueal. Esto fue seguido por su eliminación a las 2 ó 24 horas por un lavado bronquial alveolar (BAL) a fin de determinar la actividad biológica. Las muestras se concentraron por ultrafiltración seguida por filtración (0,2 micrómetros) para eliminar los microbios pulmonares contaminantes. La concentración de amikacina se determinó empleando un instrumento TDX y la actividad biológica se determinó utilizando un ensayo de dilución en caldo Mueller Hinton (*Pseudomonas aeruginosa*). Los resultados se muestran en la Tabla I siguiente:

tiempo (horas)	amikacina (microgramos/ml)	amikacina en el filtrado (microgramos/ml)	MIC (µg/ml)
2	160	119	1,9
24	73	32	4,0

Como se muestra por la tabla anterior, la amikacina liposómica recuperada por filtración era capaz de destruir *P. aeruginosa* en un ensayo de 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 para el stock de amikacina liposómica filtrado. Así pues, la amikacina liposómica era activa todavía después de 24 horas en el pulmón. A las 24 horas, la tobramicina libre a la misma dosis era indetectable en un BAL. Esto indica que la formación antiinfectante liposómica no sólo es retenida en el pulmón, sino que la misma está también disponible libremente para atravesar un esputo/biofilm a lo largo del tiempo. Estos datos, combinados con los hechos que se evidencian en la Figura 2 y la Tabla II (siguiente), de que la amikacina liposómica libera el antiinfectante libre a lo largo del tiempo en tanto que mantiene niveles elevados del antiinfectante en los pulmones, respaldan la base racional de que este sistema puede proporcionar un efecto antiinfectante sostenido a lo largo del tiempo. Este efecto podría tener importancia en la reducción tanto de la bio-carga de la *Pseudomonas* como del desarrollo de resistencia debido a niveles-valle de antiinfectante.

Como una demostración en *vitro* de la liberación lenta de la amikacina liposómica y su efecto antiinfectante sostenido, la formulación se incubó en esputo de pacientes con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (COPD) que contenía Pseudomonas mucoide PAO1. La amikacina liposómica se incubó también en alginato que contenía Pseudomonas mucoide PAO1. En ambos casos se observó una destrucción sostenida y mejorada de la Pseudomonas a lo largo del tiempo, como se muestra en la Tabla II:

Ensayo In Vitro Esputo/Alginato(% supervivencia de Pseudomonas Mucoide) PAO1						
		Tiempo de Incubación a 37 °C				
		1 h	3 h	6 h	24 h	Conc. de amikacina (microgramos/ml)
Lip-An-15	Esputo	81	15	22	<1	8
Lip-An-15	Alginato	100	59	1	<1	10

Las curvas de destrucción clásicas no son aplicables para la tecnología de antiinfectante liposómico debido a que las formulaciones liposómicas exhiben una liberación lenta de antiinfectante con un efecto antiinfectante mejorado. El liposoma protege la amikacina contra el esputo y/o el alginato hasta su liberación. Con el tiempo, se observa una destrucción completa, coherente con el modelo de efecto antiinfectante sostenido de la liberación lenta sin interferencia o desactivación alguna del antiinfectante.

Se estudió la eficacia de las formulaciones liposómicas de amikacina utilizando un modelo para infección pulmonar crónica (Cash et al., 1979) donde se instiló en la tráquea de ratas P. aeruginosa embebida en una matriz de cuentas de agarosa. Este modelo animal de *Pseudomonas* mucoide se desarrolló para asemejarse a las infecciones de *Pseudomonas* observadas en los pacientes de CF. Algunos de los correlatos clínicos para la CF incluyen: una patología de pulmón similar; el desarrollo de trastornos complejos inmunes; y una conversión en el fenotipo mucoide por las cepas de *P. aeruginosa* (Cantin y Woods, 1999). Se infectaron pulmones de rata con más de 10^7 CFUs de una *Pseudomonas* mucoide (cepa PAO1) obtenida de un aislado de un paciente con CF, y se trataron subsiguientemente con (a) aminoglicosido libre, (b) el vehículo lipídico solo como control sin fármaco, y (c) amikacina liposómica. Adicionalmente, las formulaciones se cribaron primeramente respecto a la capacidad para destruir en *vitro* la *P. aeruginosa* en placas Kirby-Bauer modificadas.

Se testaron diversas formulaciones de amikacina liposómica basándose, o bien en composiciones de lípidos diferentes o en parámetros de fabricación que daban como resultado zonas de destrucción diferentes en experimentos en *vitro*. Este experimento se diseñó para determinar el aumento de eficacia obtenido con el aminoglicosido liposómico sobre el aminoglicosido libre. Se compararon composiciones de lípido de control en blanco, dos formulaciones de amikacina liposómica y amikacina libre y tobramicina libre a las mismas concentraciones de aminoglicosido que las formulaciones de antiinfectante liposómico. Adicionalmente, se administró también una dosis diez veces mayor de amikacina libre y una dosis diez veces mayor de tobramicina libre. La dosificación fue IT diariamente a lo largo de siete días. Los resultados (Figura 3) indican que la amikacina liposómica en las dos formulaciones (que diferían en composición de lípido) revelaban una reducción significativa en los niveles de CFU y eran mejores en la reducción de CFUs que la amikacina libre o la tobramicina libre a dosis diez

veces mayores. En la figura, Lip-An-14 es DPPC/Col/DOPC/DOPG (42:45:4:9) y 10 mg/ml de amikacina, Lip-An-15 es DPPC/Col (1:1) también a 10 mg/ml. Todas las ratios lípido-lípido y lípido-fármaco en este contexto son peso a peso.

El experimento siguiente (Figura 4) se diseñó para demostrar la liberación lenta y las capacidades antiinfectantes sostenidas de la amikacina liposómica. La dosificación se realizó cada dos días durante 14 días, en oposición a dosificación diaria durante 7 días como en los experimentos anteriores. Los resultados indican que la amikacina liposómica en ambas formulaciones (que diferían en composición lipídica) era 10 a 100 veces más potente (mayor capacidad para reducir los niveles de CFU) que la amikacina libre o la tobramicina libre. Una dosis humana diaria de 600 mg TOBI® (o aproximadamente 375 mg/m^2) corresponde a una dosis diaria en la rata de 9,4 mg. Así pues, los datos pueden correlacionarse directamente con una mejora de 10 a 100 veces en la eficacia en humanos. Debe tenerse en cuenta que una reducción de 2-log es el valor óptimo que puede observarse en este modelo. Una reducción de 100 veces en *P. aeruginosa* en ensayos de esputo ha sido correlacionada con una función pulmonar mejorada (Ramsey et al., 1993). La liberación sostenida de las formulaciones liposómicas de amikacina indica que puede emplearse una dosis menor y/o menos frecuente para obtener una reducción mayor en el crecimiento bacteriano que la que puede obtenerse con el aminoglicosido libre.

La eficacia de la amikacina liposómica se estudió en un modelo para infección pulmonar crónica en el que *P. aeruginosa* se embebió en una matriz de cuentas de agarosa que se instiló a través de la tráquea de ratas Sprague/Dawley. Tres días después se dosificó amikacina libre o amikacina liposómica cada día (Figura 3) o cada 2 días (Figura 4) a 1 mg/rata o 10 mg/rata del aminoglicosido libre o 1 mg/rata de amikacina liposómica complejada, así como con liposomas en blanco (vehículo lipídico) como control, con 5 ratas por grupo.

Los pulmones de rata homogeneizados (congelados) después del experimento de 14 días se analizaron respecto al contenido y actividad del aminoglicosido. El ensayo químico clínico se realizó utilizando un instrumento TDX, mientras que el bioensayo se realizó midiendo zonas de inhibición en placas de agar embebidas con *Bacillus subtilis*.

Los resultados se muestran en la Tabla III

Formulación	**Bioensayo (microgramos/ml)**	**Ensayo Clínico (microgramos/ml)**
Lip-An-14 a 10 mg/ml	9,5	9,1
Lip-An-15 a 10 mg/ml	21,5	18,4
Amikacina libre a 100 mg/ml	nd	2,0
Tobramicina libre a 100 mg/ml	nd	1,4

Los resultados de la Tabla III indican que el aminoglicosido está presente y es activo para ambas formulaciones de antiinfectante liposómico, mientras que apenas puede detectarse para el aminoglicosido libre incluso a la dosis 10 veces mayor. Estos resultados demuestran además las características de liberación sostenida del antiinfectante liposómico, y confirman también que el antiinfectante que queda es todavía activo. De las formulaciones anteriores, únicamente la tobramicina libre (0,1 microgramo/ml) exhibía algún nivel detectable de aminoglicosido en los riñones.

El efecto de liberación sostenida y depósito de la amikacina liposómica se demuestra adicionalmente en la Figura 5. Se administró a ratas una infección pulmonar crónica en la que *P. aeruginosa* estaba embebida en una matriz de cuentas de agarosa que se instiló a través de la tráquea, utilizando las mismas cuentas empleadas en los estudios de eficacia. Las ratas recibieron luego tobramicina libre o amikacina liposómica (formulación Lip-An-14) por administración intratraqueal a la misma dosis (2 mg/rata). Los datos, medidos en microgramos de antiinfectante por gramo de tejido pulmonar a lo largo del tiempo, demuestran que el antiinfectante liposómico exhibe un efecto de una liberación sostenida y depósito, mientras que la tobramicina libre revelaba niveles insignificantes en los pulmones a las 24 horas, debido fundamentalmente, según se cree, a absorción sistémica rápida. Este aumento mayor que 100 veces de antiinfectante en el pulmón para la amikacina liposómica en una rata infectada respalda la idea de un antiinfectante liposómico de liberación sostenida que puede administrarse con frecuencia significativamente menor que la formulación TOBI™ aprobada actualmente.

Se determinó la farmacocinética de la amikacina en ratas después de administración intratraqueal (IT) de tobramicina libre o amikacina liposómica complejada. Se administró una dosis de 2 mg/rata. El efecto de depósito de la tecnología de antiinfectante liposómico se demuestra en que, en comparación con tobramicina libre administrada por vía IT, queda todavía un aumento mayor que 100 veces en fármaco para la amikacina liposómica complejada en los pulmones infectados 24 horas después de la administración. Así pues, el nivel terapéutico de fármaco se mantiene durante un periodo de tiempo mayor en las formulaciones liposómicas comparado con la tobramicina libre.

La Figura 7 muestra el tiempo de residencia y la acumulación notables de cantidades eficaces de antiinfectante en los pulmones, un resultado que establece que pueden utilizarse dosificaciones relativamente infrecuentes. Cada dosis se administra 4 horas por inhalación (en rata, 3 ratas por grupo, como anteriormente) de amikacina liposómica nebulizada (DPPC/Col., 1:1) a 15 mg/ml de amikacina. La dosificación tenía lugar el día 1; los días 1, 3 y 5; o los días 1, 2, 3, 4, y 5. Las ratas que proporcionaban una barra de datos dada se sacrificaron después de la dosificación respectiva de la barra de datos. La formulación está preparada según el ejemplo.

En un estudio, se administró este compuesto a ratones y se comparó con ciprofloxacino libre administrado por vía intratraqueal y ciprofloxacino libre administrado por vía oral, administrándose los tres compuestos a la misma dosis (Figura 6). La dosis para cada ratón era 15 mg/kg, con 3 ratones por grupo. Se administró cipro liposómico en DPPC/colesterol (9:1), a 3 mg/ml de cipro, con la formulación producida como en el Ejemplo. La ratio de lípido a fármaco era 12,5:1 en peso. En comparación con ciprofloxacino administrado por vía oral, el ciprofloxacino liposómico estaba presente en los pulmones de los ratones en cantidades más de dos órdenes de magnitud mayores que el ciprofloxacino libre. Además, sólo el ciprofloxacino liposómico exhibía niveles de fármaco en el pulmón al cabo de 24 horas, mientras que el fármaco administrado por vía oral era indetectable en menos de 2 horas. Estos datos respaldan el uso de ciprofloxacino liposómico y otros antiinfectantes del tipo de los aminoglicosidos, tetraciclinas y macrólidos para el tratamiento y la prevención profiláctica de enfermedades intracelulares utilizadas por bioterroristas.

Un tipo de proceso de fabricación de liposomas comprende típicamente infusión en etanol a la temperatura ambiente, que es inferior a la temperatura de transición de fase para los lípidos utilizados en la formulación. Se mezclan liposomas en forma de pequeñas vesículas unilaminares (SUVs) con una solución acuosa o etanólica que contiene el agente bioactivo a atrapar. Se infunde etanol en esta mixtura. La mixtura forma inmediatamente hojas extendidas de lípido o vesículas multilaminares (MLVs). Las hojas extendidas de lípido, en caso de formarse, pueden ser MLVs de forma inducida después de eliminación del etanol por borboteo o lavado por métodos tales como centrifugación, diálisis o diafiltración. Las MLVs tendrán típicamente un diámetro comprendido entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 3,0 µm.

O bien, los lípidos a emplear se disuelven en etanol para formar una solución lípido-etanol. La solución lípido-etanol se infunde en una solución acuosa o etanólica que contiene la molécula del agente bioactivo a atrapar. Todas las manipulaciones se realizan por debajo de la transición de fases del lípido de punto de fusión más bajo. La mixtura forma inmediatamente hojas extendidas de lípido o vesículas multilaminares (MLVs) (10). Las hojas extendidas de lípido formarán MLVs después de eliminación del etanol por borboteo o lavado por métodos tales como centrifugación, diálisis o diafiltración. Las MLVs tendrán típicamente diámetros comprendidos entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 3,0 µm.

Lípidos	**Ratio molar**	**Lípido/Amikacina, p/p**
DPPC	-	1,1
DPPC/DOPG	9:1	1,0
DPPC/DOPG	7:1	3,9
DPPC/DOPG	1:1	2,8
DPPC/DOPG	1:2	2,7
DOPG	---	2,6
DPPC/Colesterol	19:1	1,0
DPPC/Colesterol	9:1	1,2
DPPC/Colesterol	4:1	1,7
DPPC/Colesterol	13:7	2,1
DPPC/Colesterol	1:1	2,7
DPPC/DOPC/Colesterol	8,55:1: 0,45	2,0
DPPC/DOPC/Colesterol	6,65:1: 0,35	3,0
DPPC/DOPC/Colesterol	19:20:1	2,5
DPPC/DOPG/Colesterol	8,55:1: 0,45	3,8
DPPC/DOPG/Colesterol	6,65:1: 0,35	4,1
DPPC/DOPG/Colesterol	19:20:1	4,2

Lípidos	Ratio molar	Lípido/Amikacina, p/p
DPPC/DOPC/DOPG/Colesterol	42:4:9:45	3,7
DPPC/DOPC/DOPG/Colesterol	59:5:6:30	3,7

Se prepararon varias formulaciones con amikacina por el método del Ejemplo, como se resume a continuación:

Información adicional acerca de la formación de antiinfectante liposómico complejado puede encontrarse en PCT/US03/06847, presentada el 5 de marzo de 2003.

EJEMPLO:

Lo siguiente es una descripción detallada de la fabricación de 150 ml de amikacina liposómica.

Volumen Inicial Total = 1,5 l

Contenido de Etanol = 23,5% (v/v)

Composición del Lípido = DPPC/Col (ratio molar 1:1)

[Lípido] inicial: 7,6 mg/ml

[Amikacina Sulfato] inicial = 57,3 mg/ml

Volumen Final del Producto = 150 ml

I) Composición e Infusión:

Se disolvieron 7,47 g de DPPC y 3,93 g de colesterol directamente en 352,5 ml de etanol en un baño de agua a 50ºC. Se disolvieron directamente 85,95 g de amikacina sulfato en 1147,5 ml de tampón PBS. La solución se tituló luego con NaOH o KOH 10 N para llevar el pH a aproximadamente 6,8.

Se añadieron o infundieron 352,5 ml etanol/lípido en los 1147,5 ml de tampón de amikacina para dar un volumen inicial total de 1,5 l. El lípido/etanol se bombeó a 30 ml/min (denominado también tasa de infusión) con una bomba peristáltica en la solución amikacina/tampón que se mantenía en agitación rápida a 150 rpm en una vasija de reacción sobre una placa de agitación a la temperatura ambiente.

El producto se agitó a la temperatura ambiente durante 20-30 minutos.

II) Paso de Diafiltración o "Lavado":

La vasija de mezcladura se acopló a una bomba peristáltica y un cartucho de diafiltración. El cartucho de diafiltración es una fibra hueca de membrana con un corte por peso molecular de 500 kilodaltons. El producto se bombeó desde la vasija de reacción a través del cartucho de diafiltración y se devolvió luego a la vasija de mezcladura a la temperatura ambiente. Se creó una contrapresión de aproximadamente 7 psi (48,3 kPa) a través del cartucho. Se forzaron la amikacina libre y el etanol a través de la membrana de fibra hueca por la contrapresión, dejando atrás la amikacina liposómica (producto). El producto se lavó 8 veces a la temperatura ambiente. Se añadió tampón PBS nuevo (mediante otra bomba peristáltica) a la vasija de reacción para compensar la eliminación de permeado y mantener un volumen constante de producto.

El producto se concentró.

Si bien esta invención se ha descrito poniendo énfasis en realizaciones preferidas, será obvio para quienes poseen una experiencia ordinaria en la técnica que pueden realizarse variaciones en los dispositivos y métodos preferidos y que se considera que la invención puede practicarse de modo diferente al descrito específicamente en esta memoria. De acuerdo con ello, esta invención incluye todas las modificaciones abarcadas dentro del alcance de la invención tal como se define por las reivindicaciones que siguen.

Referencias

1. Veldhuizen, R., Nag, K., Orgeig, S. and Possmayer, F., The Role of Lipids en Pulmonary Surfactant, Biochim. Biophys. Acta 1408:90-108 (1998).

2. Hagwood, S., Derrick, M. and Poulain, F., Structure and Properties of Surfactant Protein B, Biochim. Biophys. Acta 1408:150-160 (1998).

3. Johansson, J., Structure and Properties of Surfactant ProteinC, Biochim. Biophys. Acta 1408:161-172 (1998).

4. Ikegami, M. and Jobe, A.H., Surfactant Protein Metabolism en vivo, Biochim. Biophys. Acta 1408:218-225 (1998).

5. Couveur, P., Fattel, E. and Andremont,A., Liposomes and Nanoparticles en the Treatment of Intracellular Bacterial Infections, Pharm. Res. 8:1079-1085 (1991).

6. Gonzales-Rothi, R.J., Casace, J., Straub, L., and 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., and Cynamon, M.H., Liposomal Aminoglycosides and TLC-65 Aids Patient Care 290-296 (Dec., 1991).

8. Costerton, J.W., Stewart, P.S., and 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., and 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. and Woods, D.E. Aerosolized Prolastin Suppresses Bacterial Proliferation en 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 en 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 en 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. Damaso, D., Moreno-Lopez, M., Martinez-Beltran, J., Garcia-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., & Glouchenour, W.S., Pathology of experimental respiratory anthrax in Macaca mulatta. Brit. J. Exp. Path., 44:416-426 (1968).

REIVINDICACIONES

1. Un anti-infectante liposómico para uso en el tratamiento o la mejora de una infección pulmonar en un paciente, en donde el anti-infectante es amikacina, para administración pulmonar a un paciente por inhalación, el anti-infectante se dosifica una vez al día o menos y los lípidos utilizados para formar los liposomas consisten en dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC) y colesterol.

2. El uso de un anti-infectante liposómico en la fabricación de un medicamento para tratamiento o mejora de una infección pulmonar en un paciente, en donde el medicamento es amikacina, para administración pulmonar al paciente por inhalación, la dosificación del medicamento es una vez al día o menos y los lípidos utilizados para formar los liposomas consisten en DPPC y colesterol.

3. El anti-infectante liposómico para uso según la reivindicación 1 o uso del anti-infectante liposómico según la reivindicación 2, en donde la infección es bacteriana.

4. El anti-infectante liposómico para uso según, o el uso de la reivindicación 3, en donde la infección es micobacteriana.

5. El anti-infectante liposómico para uso según, o el uso de cualquiera de las reivindicación anteriores, en donde la infección a tratar o mejorar es una infección de *Pseudomonas,* estafilocócica, de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), estreptocócica, *de Escherichia coli, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Haemophilus, Yersinia pestis, Burkholderia pseudomallei, B. cepacia, B. gladioli, B. multivorans, B. vietnamiensis, Mycobacterium tuberculosis,* complejo de *M. avium* (MAC) *(M. avium* y *M. intracellulare), M. kansasii, M. xenopi, M. marinum, M. ulcerans,* o complejo de *M. fortuitum (M. fortuitum* y *M. chelonae)*.

6. El anti-infectante liposómico para uso según, o el uso de la reivindicación 5, en donde la infección a tratar o mejorar es *P. aeruginosa*, *P. paucimobilis, P. putida, P. fluorescens o P. acidovorans*.

7. El anti-infectante liposómico para uso según, o el uso de la reivindicación 6, en donde la infección a tratar o mejorar es una infección de *P. aeruginosa*.

8. El anti-infectante liposómico para uso según, o el uso de la reivindicación 5, en donde la infección a tratar o mejorar es *Streptococcus pneumoniae*.

9. El anti-infectante liposómico para uso según, o el uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la cantidad eficaz es una que es eficaz para tratamiento o mejora después que se han presentado síntomas de infección pulmonar.

10. El anti-infectante liposómico para uso según, o el uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anti-infectante es amikacina como amikacina-sulfato.

11. El anti-infectante liposómico para uso según, o el uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anti-infectante liposómico se prepara por infusión en disolvente.

Figura 1

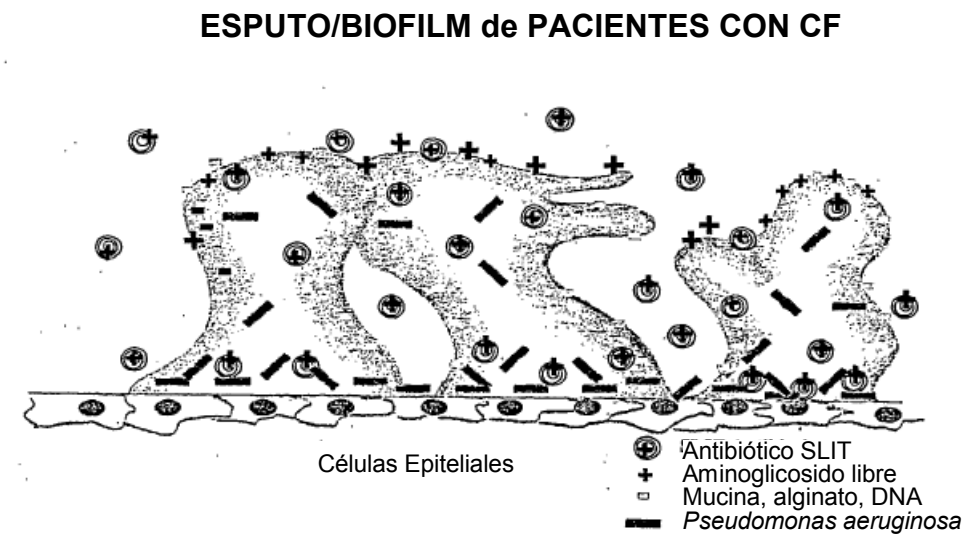


Figura 2

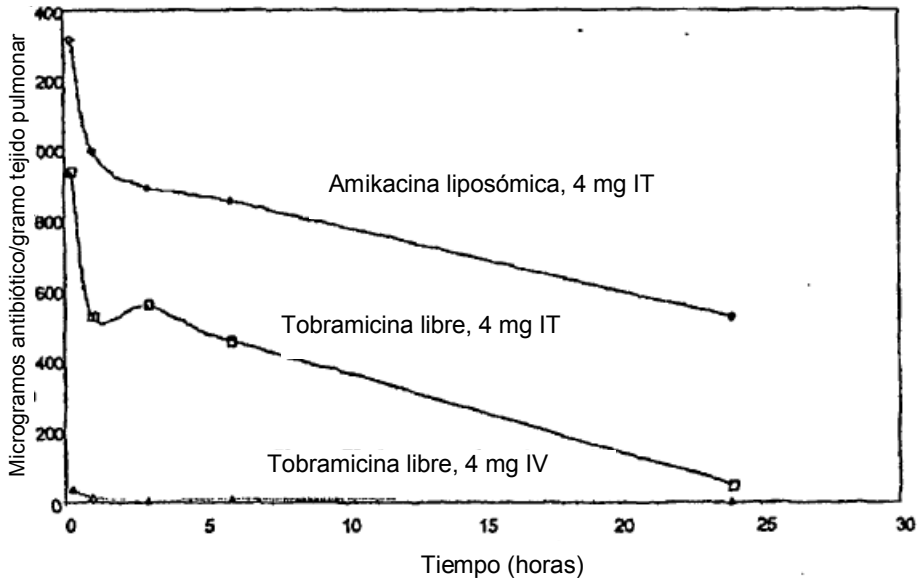


Figura 3

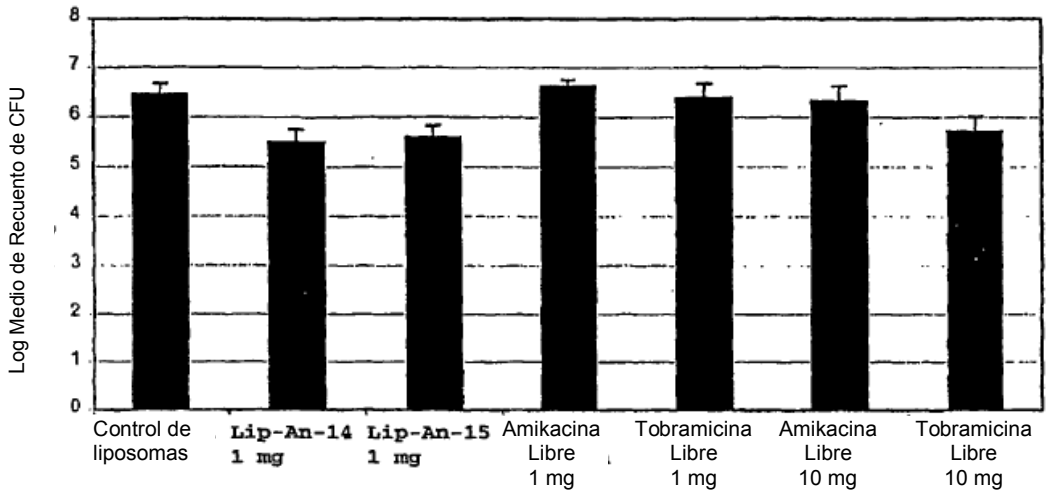


Figura 4

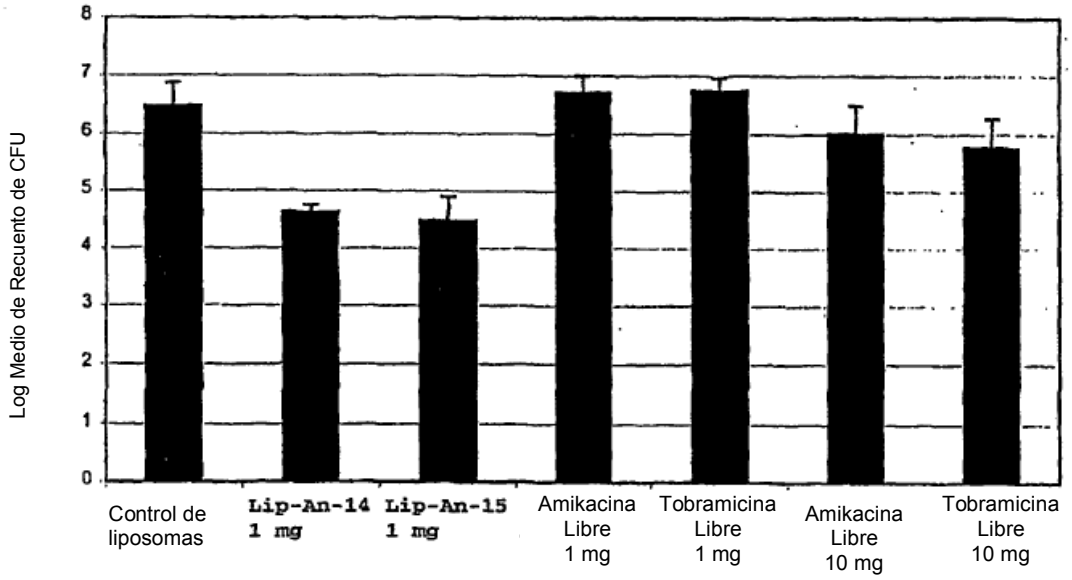


Figura 5

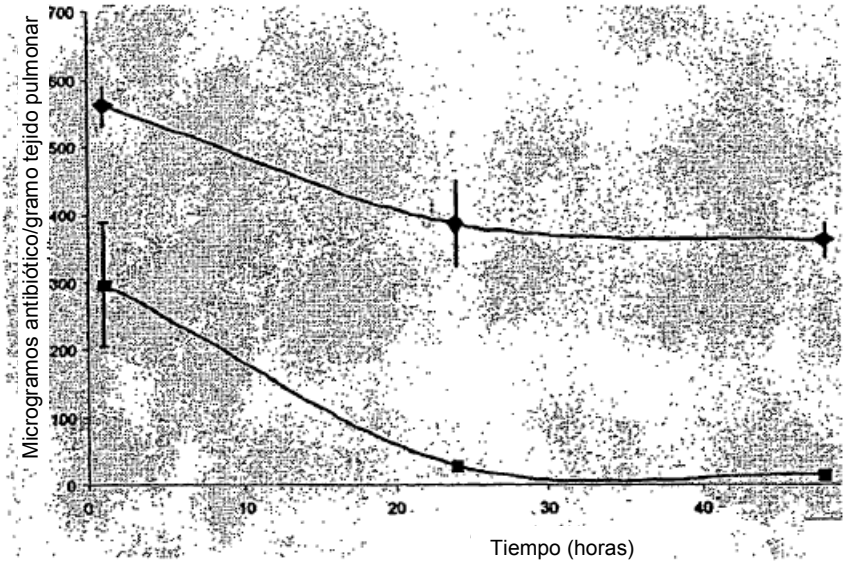


Figura 6

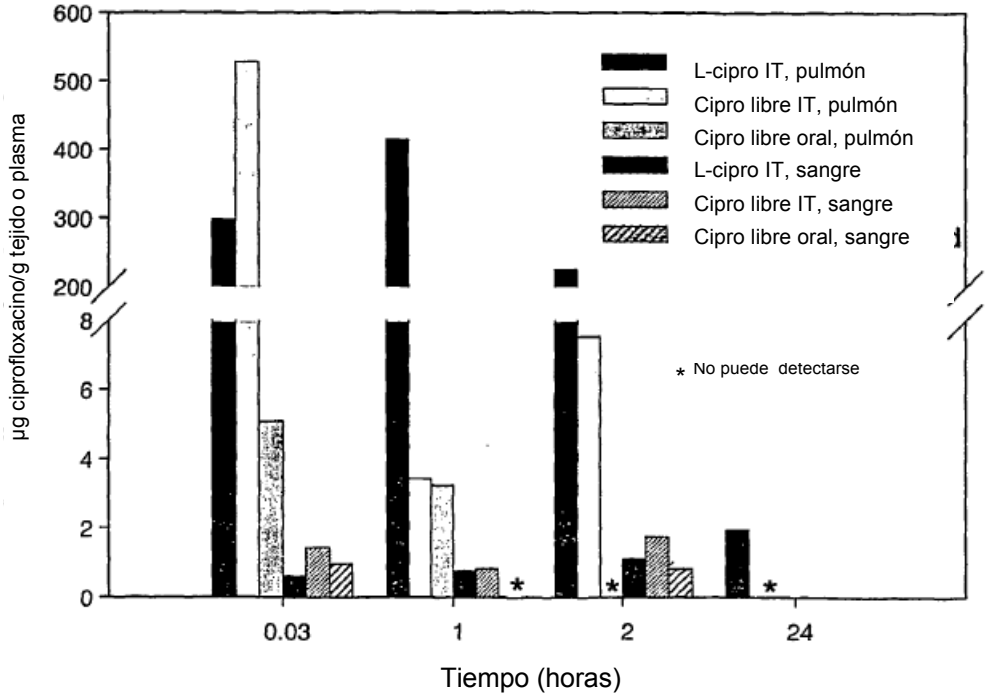
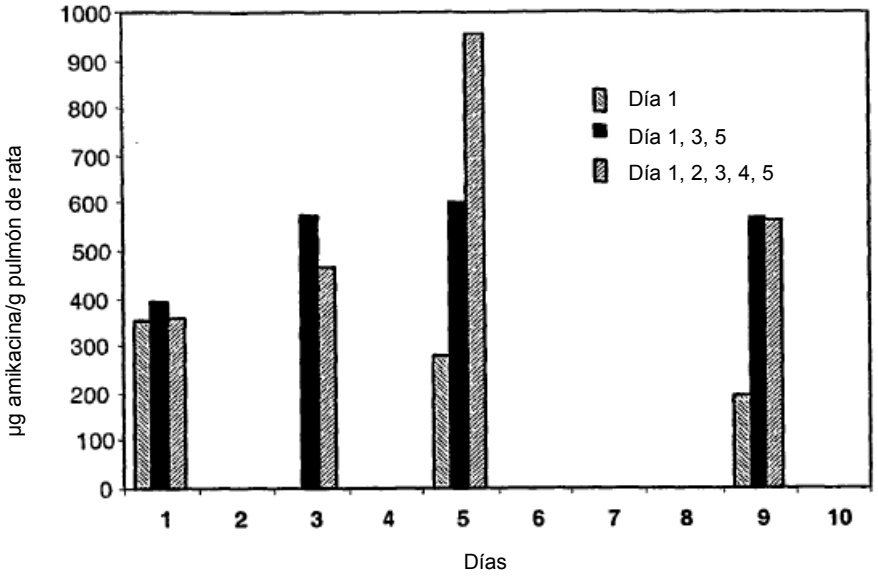


Figura 7


1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
µg amikacina/g pulmón de rata
Día 1
Día 1, 3, 5
Día 1, 2, 3, 4, 5
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
Días