(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 676 213**

(51) Int. CI.:

A61K 9/127 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 31/5575 (2006.01)
A61P 27/06 (2006.01)
A61K 31/216 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2014 E 14155291 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018 EP 2891484**

(54) Título: **Formulaciones liposomales estables para suministro ocular de fármacos**

(30) Prioridad:

07.01.2014 US 201414149159

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.07.2018

(73) Titular/es:

NANYANG TECHNOLOGICAL UNIVERSITY (50.0%)
50 Nanyang Avenue
Singapore 639798, SG y
SINGAPORE HEALTH SERVICES PTE LTD (50.0%)

(72) Inventor/es:

VENKATRAMAN, SUBRAMANIAN;
NATARAJAN, JAYAGANESH V.;
HOWDEN, TINA y
BOEY, FREDDY

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

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 liposomales estables para suministro ocular de fármacos

Antecedentes

La presión intraocular (PIO) en el ojo se mantiene por un flujo continuo de humor acuoso producido por el cuerpo ciliar. El exceso de fluido fluye fuera del ojo a través de la malla trabecular. Si el drenaje de flujo se bloquea, el humor acuoso se acumula dentro del ojo conduciendo a una mayor PIO e hipertensión ocular. La hipertensión ocular puede dañar el nervio óptico, dando como resultado una neuropatía óptica y visión irreversiblemente deteriorada. Esta afección, conocida como glaucoma, afecta a más de 60 millones de personas en el mundo y es la segunda causa principal de ceguera. La mayor PIO es el factor de riesgo clave modificable para el glaucoma.

Los tratamientos convencionales para los pacientes con hipertensión ocular y glaucoma incluyen la cirugía ocular y la instilación de colirios tópicos. Estas modalidades de tratamiento tienen inconvenientes. Por ejemplo, no todos los pacientes son candidatos para la cirugía ocular. Además, aunque los colirios tópicos en general se considera que son eficaces, la observancia a largo plazo de los pacientes con los esquemas de instilaciones es un problema importante. La hipertensión ocular y el glaucoma no se pueden controlar si los pacientes no siguen el esquema de instilaciones de colirio tópico adecuado.

Los colirios tópicos contienen fármacos para controlar la PIO que típicamente actúan reduciendo la producción de fluido por el ojo, aumentando el drenaje de fluido, o mediante ambos mecanismos. Los análogos de prostaglandinas, p. ej., latanoprost, son fármacos potentes que pueden reducir la PIO aumentando el drenaje acuoso a través de la vía uveoescleral.

Típicamente, solo 5% del fármaco libre aplicado al epitelio corneal mediante colirios penetra con éxito a través de la córnea. Como resultado, la cantidad de fármaco que llega al humor acuoso con frecuencia disminuye por debajo de la concentración terapéuticamente eficaz. Esto necesita la administración repetida. Además, una parte sustancial del fármaco puede entrar en la circulación a través del saco conjuntival, causando efectos secundarios sistémicos indeseables.

Como una alternativa a los colirios tópicos, se puede usar la inyección subconjuntival de un fármaco reductor de la PIO de liberación sostenida para suministrar fármacos directamente al sitio de acción. Dicha modalidad de suministro resuelve los problemas de la no observancia de los pacientes con esquemas de instilaciones y del transporte ineficiente del fármaco a través de la córnea.

La solicitud de patente de EE.UU. 2013/216606 describe liposomas que comprenden latanoprost para usar en el tratamiento de enfermedades oculares por inyección subconjuntival.

La solicitud de patente internacional WO2011/098578 describe liposomas que comprenden latanoprost y POPC.

Existe la necesidad de una formulación de fármaco estable para inyección subconjuntival que requiera una frecuencia de administración mínima para el control estable de la PIO a largo plazo.

Resumen

Para abordar la necesidad de un tratamiento mejorado de la presión intraocular (PIO), se proporciona una formulación liposomal estable para el suministro ocular. La formulación incluye un liposoma que contiene al menos una bicapa lipídica que incluye una fosfatidilcolina. La formulación también contiene latanoprost (que es una prostaglandina $F_{2\alpha}$) encapsulada en el liposoma. Además, el liposoma tiene un diámetro menor de 2 µm.

La formulación es para usar en el tratamiento de un trastorno ocular y se administra por inyección subconjuntival.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en los siguientes dibujos y descripción.

Breve descripción de los dibujos

La siguiente descripción se refiere a los dibujos que acompañan, en los que:

La figura 1 es una gráfica de la liberación acumulada de latanoprost de un liposoma de palmitoil-oleil-fosfatidilcolina (POPC) frente al tiempo;

La figura 2a es una gráfica del porcentaje de la cantidad de partida de latanoprost que queda en los liposomas frente al tiempo para liposomas que contienen fosfatidilcolina (PC) de huevo y liposomas que contienen POPC;

La figura 2b es una gráfica del tamaño del liposoma frente al tiempo de almacenamiento a 4ºC; y

La figura 3 es una gráfica de la presión intraocular frente a los días después de una sola inyección subconjuntival de latanoprost encapsulado en un liposoma que contiene POPC.

Descripción detallada

Como se ha mencionado antes, se proporciona una formulación liposomal estable para el suministro ocular por inyección subconjuntival. La formulación incluye un liposoma que contiene al menos una bicapa lipídica que incluye una fosfatidilcolina. En una realización, el liposoma es una vesícula unilaminar. La fosfatidilcolina es la palmitoil-oleil-fosfatidilcolina (POPC).

La formulación también contiene una prostaglandina $F_{2\alpha}$ encapsulada en el liposoma. La prostaglandina $F_{2\alpha}$ es el latanoprost.

La relación molar de la prostaglandina $F_{2\alpha}$ a la POPC puede ser de 0,01:1 a 0,5:1. En una realización, la relación molar es de 0,01:1 a 0,35:1. En una realización preferida, la formulación liposomal estable incluye latanoprost y POPC en una relación molar de 0,01:1 a 0,175:1. Además, el liposoma se puede formular para incluir entre 2 y 25% en peso de la prostaglandina $F_{2\alpha}$.

El liposoma puede tener un diámetro menor de 2 µm. En una realización, el diámetro del liposoma es de 100 nm a 300 nm, p. ej., 100 nm, 150 nm, 200 nm, 250 nm y 300 nm. En una realización preferida, el diámetro es 100 nm. Estos liposomas cargados con fármacos de tamaño nanométrico, pueden liberar la prostaglandina $F_{2\alpha}$ lentamente a lo largo del tiempo.

En una realización, la formulación liposomal descrita antes puede ser una formulación acuosa previamente constituida, lista para inyectar para la inyección subconjuntival.

La formulación es para usar en el tratamiento de un trastorno ocular, que se basa en administrar la formulación liposomal descrita antes. La enfermedad ocular puede ser la hipertensión ocular o el glaucoma. Preferiblemente, el trastorno es el glaucoma. Según la invención, la formulación liposomal se administra por inyección subconjuntival.

La administración de la formulación liposomal descrita antes puede reducir significativamente la PIO en una hora después de la inyección. Más específicamente, la administración de la formulación liposomal da como resultado una reducción de la PIO de al menos 30% (p. ej., 30%, 40% y 50%) comparado con la PIO previa al tratamiento. Ventajosamente, la PIO permanece reducida durante tanto tiempo como 4-6 meses después de una sola inyección.

Como se ha mencionado antes, la formulación liposomal inyectada puede liberar lentamente la prostaglandina $F_{2\alpha}$, es decir, latanoprost, a lo largo de varios meses. Por ejemplo, se puede liberar 50% de la cantidad inicial del fármaco en los liposomas en el espacio de 10 días después de la inyección de la formulación en el ojo. Preferiblemente, se libera 65% del fármaco en el espacio de 28 días de la inyección. La aplicación tópica crónica de fármacos antiglaucoma a menudo induce enfermedad de la superficie ocular. La característica de liberación lenta de la formulación liposomal obvia la necesidad de aplicaciones diarias de estos fármacos, reduciendo o eliminando así los efectos secundarios simultáneos.

Típicamente, los fármacos que no son estables se liofilizan o congelan a una temperatura de -20ºC o inferior para prevenir la pérdida de actividad a lo largo del tiempo. Es de destacar que la liofilización o congelación de las formulaciones de liberación sostenida de los liposomas cargados con fármacos puede afectar de forma adversa al perfil de liberación del fármaco, dando como resultado una variabilidad impredecible en la eficacia del fármaco.

Ventajosamente, la formulación liposomal es estable durante periodos de tiempo prolongados. Por ejemplo, la formulación se puede almacenar a 4ºC durante hasta 6 meses (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5 y 6 meses) sin agregación de los liposomas o pérdida de fármaco de los mismos. Por lo tanto, la formulación liposomal se puede almacenar en un vial a 4ºC durante periodos prolongados y después se puede inyectar directamente desde el vial.

Ejemplo 1: Preparación de vesículas unilaminares grandes (VUG) para estudios de liberación de fármaco

Se usó una técnica de hidratación de película fina para formular liposomas de POPC cargados con latanoprost, para estudios de liberación del fármaco. Brevemente, se pesó la POPC y se disolvió en una mezcla de disolventes de cloroformo:metanol (2:1 v/v). Se añadió latanoprost (solución madre en acetonitrilo 2 mg/ml) a la mezcla de disolventes lipídica con una relación molar de fármaco:lípido de 0,175:1 y se mantuvo a 40ºC. La mezcla de disolventes se añadió a un matraz de fondo redondo en un rotavapor conectado a un baño de agua mantenido a 40ºC. El matraz de rotó a 100 rpm con baja presión durante 1 h para separar el disolvente, formando así una película fina de lípido cargado con fármaco. Se añadió solución salina tamponada con fosfato isotónica (PBS; 150 mM, pH 5,5) a esta película para formar vesículas multilaminares (VML). Las VML se extruyeron diez veces a través de un filtro de policarbonato (0,2 µm - 0,08 µm). La extrusión dio como resultado la formación de VUG que tenían una distribución de tamaños de 0,09-0,12 µm de diámetro.

Ejemplo 2: Preparación de VUG para estudios de estabilidad de fármaco

También se prepararon VUG cargadas con fármaco para estudios de estabilidad. Se disolvió la POPC en PBS a pH 6,7 con agitación constante a temperatura ambiente durante 2 horas, para formar VML. Las VML se extruyeron 3-5 veces usando tres membranas de policarbonato de 80 nm de tamaño apiladas entre sí en una extrusora de

sobremesa para formar VUG de POPC. Se disolvió el latanoprost en etanol y la solución resultante, mantenida en un matraz de fondo redondo a 50ºC en un baño de agua, se secó bajo una corriente de nitrógeno gaseoso para formar una película fina de fármaco. La película de fármaco se hidrató con las VUG de POPC a temperatura ambiente durante 2-3 h hasta que no se observaron gotitas de aceite en las paredes del matraz. Se usó una relación molar de latanoprost:POPC de 0,175:1 para preparar las VUG cargadas con fármaco. Las VUG de POPC cargadas con latanoprost se esterilizaron por filtración a temperatura ambiente usando un filtro de jeringa de 0,2 µm y se almacenaron a 4ºC hasta su análisis. Se usó un método similar para preparar una formulación comparativa de liposomas de PC de huevo cargados con latanoprost.

Ejemplo 3: Caracterización de los liposomas de POPC cargados con fármaco

Se llevaron a cabo estudios de liberación de fármacos mediante diálisis de liposomas de POPC cargados con latanoprost preparados como se ha descrito en el ejemplo 1 antes, frente a PBS a un pH de 7,4 y midiendo por HPLC la cantidad de latanoprost liberada. Los resultados se muestran en la figura 1. A lo lago de un periodo de 28 días, se liberó aproximadamente 65% del latanoprost de los liposomas de POPC cargados con latanoprost de una forma dependiente del tiempo.

Las características físicas de los liposomas de POPC cargados con latanoprost se determinaron esencialmente como se describe en Venkatraman et al., solicitud de publicación internacional Nº 2012/021107.

La estabilidad de los liposomas de POPC cargados con latanoprost preparados como se ha descrito en el ejemplo 2 anterior se midió y se comparó con los liposomas de PC de huevo cargados con latanoprost similares. La estabilidad de los liposomas almacenados a 4ºC se evaluó durante un periodo de 6-9 meses. La estabilidad se evaluó midiendo el tamaño medio de los liposomas así como midiendo la concentración de latanoprost en los liposomas por HPLC. Los resultados se representan en la figura 2A y figura 2B. Como se muestra en la figura 2A, se perdió una cantidad significativa de latanoprost de los liposomas de PC de huevo a lo largo del tiempo, demostrando una reducción de 45% de la cantidad de partida del latanoprost después de 3 meses de almacenamiento a 4ºC. De forma inesperada, no se perdió una cantidad medible de latanoprost de los liposomas de POPC incluso después de 6 meses de almacenamiento a 4ºC. Volviendo al tamaño de partículas, los resultados representados en la figura 2B ponen de manifiesto que el tamaño medio de los liposomas de PC de huevo cargados con latanoprost se hacía progresivamente menor a lo largo de un periodo de almacenamiento de 9 meses a 4ºC. De nuevo inesperadamente, los liposomas de POPC cargados con latanoprost no cambiaron sensiblemente incluso después de 6 meses a 4ºC. Es de destacar que un cambio en el tamaño de un liposoma cargado con fármaco alterará significativamente la cinética de liberación del fármaco.

Ejemplo 4: Actividad in vivo de la formulación liposomal de latanoprost

Se ensayó la eficacia de la formulación liposomal de latanoprost descrita antes en un modelo animal de glaucoma, en concreto, en macacos cangrejeros (*Macaca fascicularis*) que tenían hipertensión ocular, definida como una PIO > 18 mm de Hg. Los estudios con animales se llevaron a cabo de acuerdo con la declaración para el uso de animales en investigación oftálmica y de la visión aprobada por la Asociación de Investigación en Visión y Oftalmología. Además, también se siguieron las directrices del Comité de ética en animales de la Asociación para la Evaluación y Acreditación del Cuidado de Animales de Laboratorio de Singapur SingHealth.

Los macacos se anestesiaron por inyección intramuscular de una mezcla que contenía ketamina (5-10 mg/kg de peso corporal) y maleato de acepromazina (0,25 mg/kg de peso corporal), junto con una inyección subcutánea de sulfato de atropina (0,125 mg/kg de peso corporal). Se vigilaron sus vías respiratorias, respiración y pulso durante todos los procedimientos. Se usaron de una a dos gotas de xilocaína al 1% como anestesia tópica para reducir la posible incomodidad de los animales durante la inyección subconjuntival. Las pupilas de los animales se dilataron con colirios de hidrocloruro de fenilefrina al 2,5% y tropicamida al 1% (Alcon Laboratories, French's Forest, NSW, Australia).

Los liposomas de POPC cargados con latanoprost se prepararon por la técnica descrita en el ejemplo 2 anterior. Se introdujo una formulación liposomal de latanoprost (100 µl) que tenía una relación molar de fármaco/lípido inicial de 0,175:1 por inyección subconjuntival en ambos ojos de tres animales. Se midió la PIO antes de la inyección y en intervalos diarios y semanales después de inyección.

Los monos se anestesiaron ligeramente con ketamina (5 mg/kg de peso corporal) antes de medir la PIO. De nuevo se usaron 1-2 gotas de xilocaína al 1% como anestesia tópica para reducir la posible incomodidad a los animales implicados durante el procedimiento de medición. Se midió la PIO usando un tonómetro calibrado (Tono-Pen® XL, Reichert Technologies, Depew, NY). La PIO se vigiló durante tres días antes de la inyección y durante 120 días después de la inyección. Los resultados se muestran en la figura 3. Una sola inyección subconjuntival condujo a una rápida disminución inicial de la presión intraocular durante el primer día después de inyección. La PIO reducida se mantuvo estable durante al menos 120 días después de inyección.

REIVINDICACIONES

1. Una formulación liposomal estable para usar en el tratamiento de un trastorno ocular mediante suministro ocular por inyección subconjuntival, comprendiendo la formulación un liposoma que incluye al menos una bicapa lipídica que contiene palmitoil-oleil-fosfatidilcolina (POPC) y latanoprost encapsulado en el liposoma, en donde el liposoma tiene un diámetro menor de 2 µm.

2. La formulación liposomal estable para usar en el tratamiento de un trastorno ocular según la reivindicación 1, en donde la formulación tiene una relación molar de latanoprost a POPC de 0,01:1 a 0,5:1.

3. La formulación liposomal estable para usar en el tratamiento de un trastorno ocular según la reivindicación 2, en donde la relación molar de latanoprost a POPC es de 0,01:1 a 0,175:1.

4. La formulación liposomal estable para usar en el tratamiento de un trastorno ocular según la reivindicación 2 o 3, en donde el liposoma tiene un diámetro de 100 nm a 300 nm.

5. La formulación liposomal estable para usar en el tratamiento de un trastorno ocular según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el trastorno ocular es la hipertensión ocular o el glaucoma.

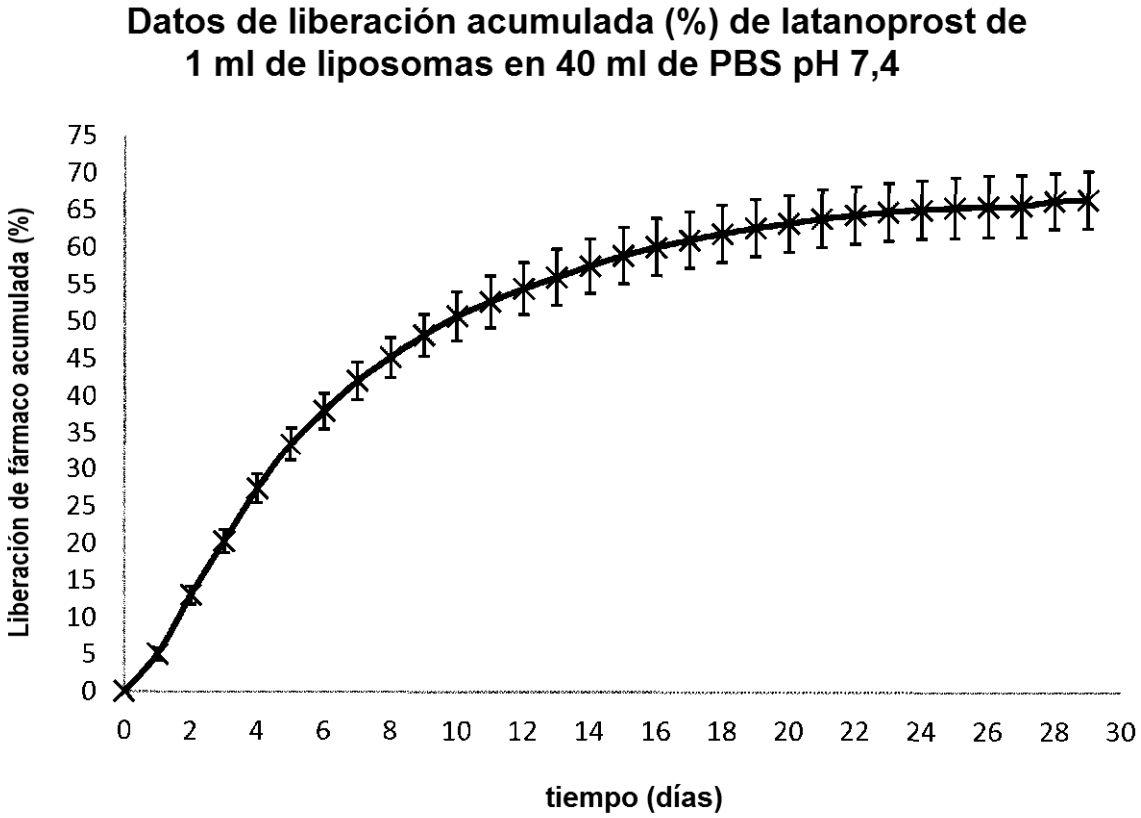
Datos de liberación acumulada (%) de latanoprost de 1 ml de liposomas en 40 ml de PBS pH 7,4
Liberación de fármaco acumulada (%)
75
70
65
60
55
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
26
28
30
tiempo (días)

FIG. 1

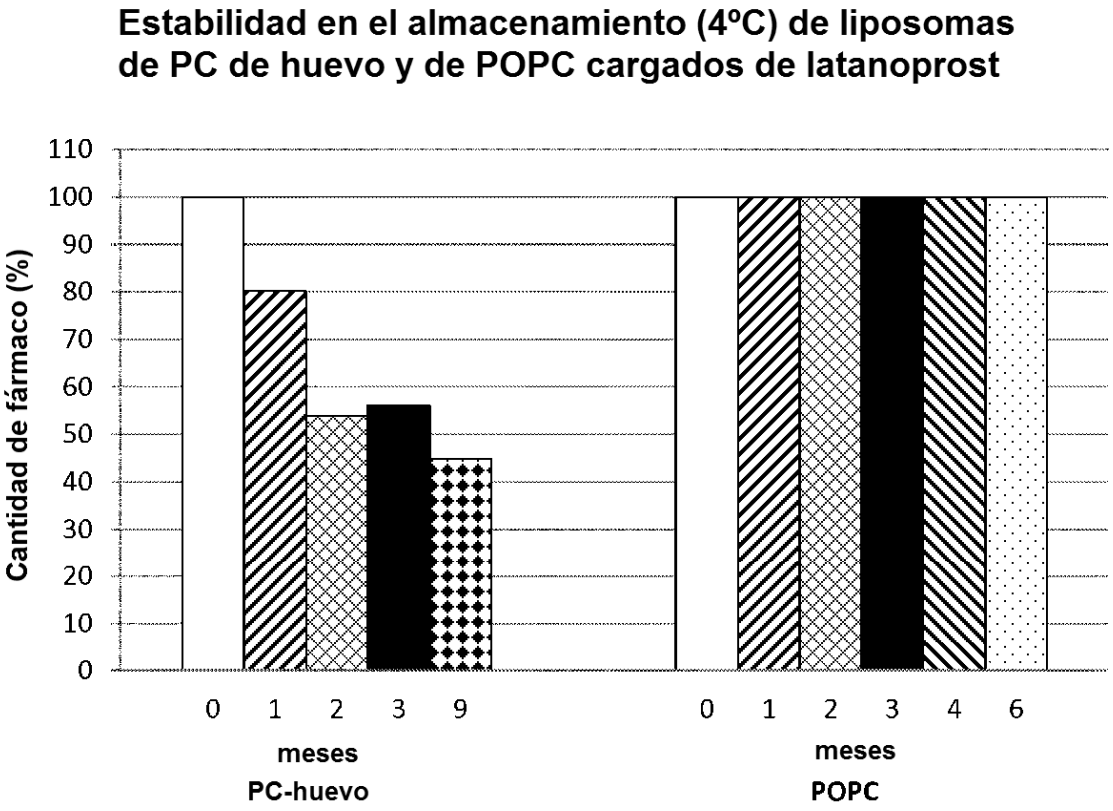
Estabilidad en el almacenamiento (4ºC) de liposomas de PC de huevo y de POPC cargados de latanoprost
Cantidad de fármaco (%)
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0 1 2 3 9
meses
PC-huevo
0 1 2 3 4 6
meses
POPC

FIG. 2A

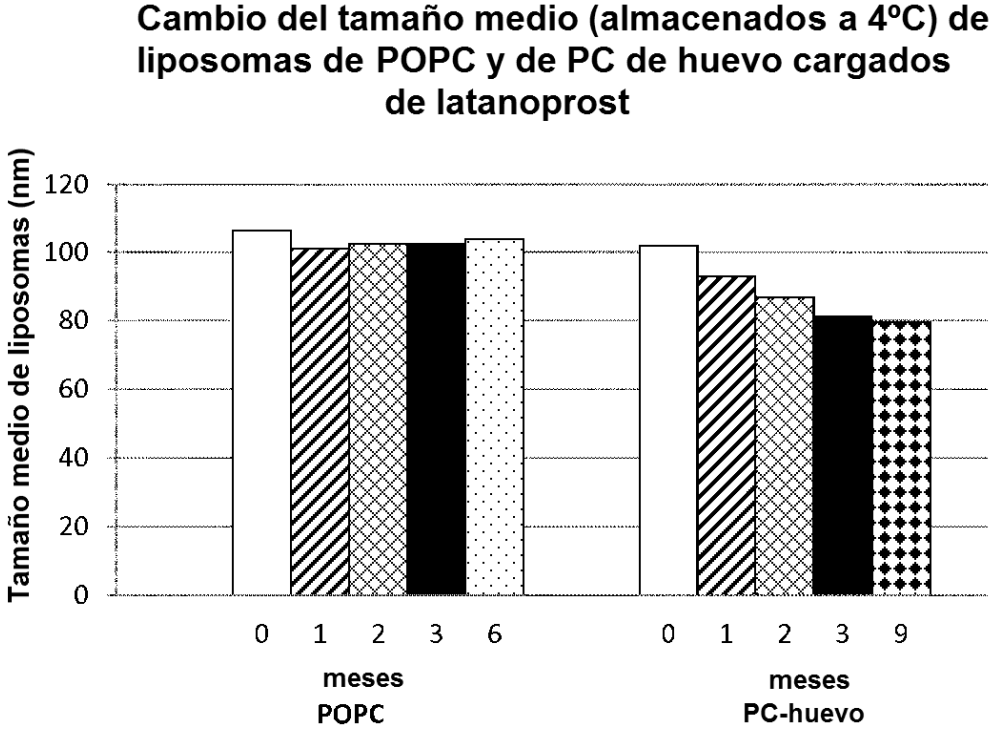
Cambio del tamaño medio (almacenados a 4ºC) de liposomas de POPC y de PC de huevo cargados de latanoprost
Tamaño medio de liposomas (nm)
120
100
80
60
40
20
0
0 1 2 3 6
meses
POPC
0 1 2 3 9
meses
PC-huevo

FIG. 2B

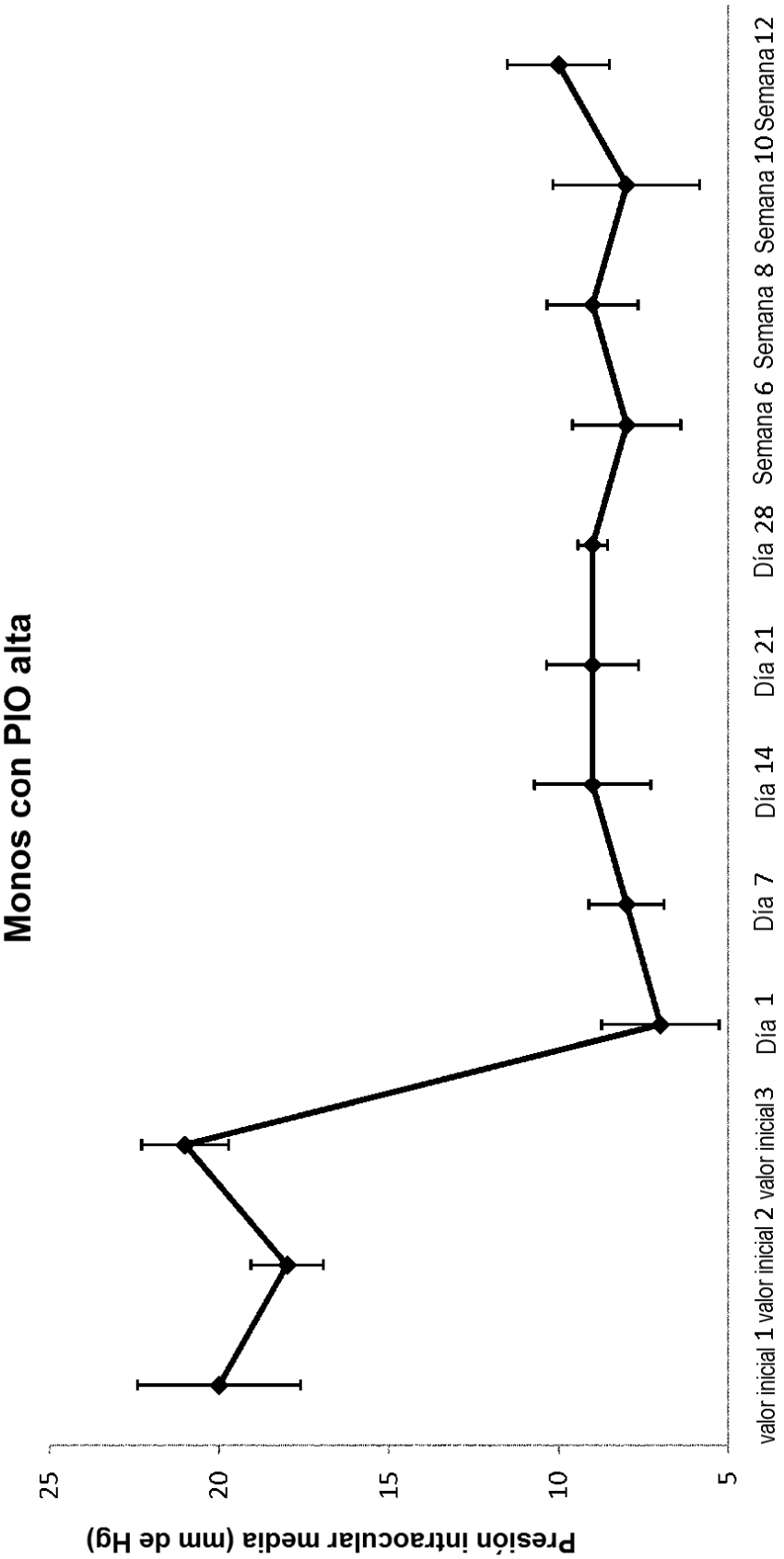
Monos con PIO alta
Presión intraocular media (mm de Hg)
25
20
15
10
5
valor inicial 1 valor inicial 2 valor inicial 3
Día 1
Día 7
Día 14
Día 21
Día 28
Semana 6
Semana 8
Semana 10
Semana 12
días o semanas

FIG. 3