

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 688 397**

51 Int. Cl.:

A21D 2/00 (2006.01) **A61K 31/7036** (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) **A61K 31/12** (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01)
A61K 47/24 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 9/19 (2006.01)
A61K 31/122 (2006.01)
A61K 31/685 (2006.01)
A61K 31/7048 (2006.01)
A61K 33/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.07.2013** **PCT/US2013/052756**
87 Fecha y número de publicación internacional: **06.02.2014** **WO14022414**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2013** **E 13826076 (5)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2018** **EP 2879502**

54 Título: **Cocleatos hechos con fosfatidilserina de soja**

30 Prioridad:

30.07.2012 US 201261677414 P
17.06.2013 US 201361835825 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.11.2018

73 Titular/es:

MATINAS BIOPHARMA NANOTECHNOLOGIES, INC. (50.0%)
1545 Route 206 South, Suite 302
Bedminster NJ 07921, US y
RUTGERS, THE STATE UNIVERSITY OF NEW JERSEY (50.0%)

72 Inventor/es:

MANNINO, RAPHAEL y
LU, RUYING

74 Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

ES 2 688 397 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

Cocleatos hechos con fosfatidilserina de soja

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la capacidad de la fosfatidilserina (PS) basada en soja sin purificar o de baja pureza (40-74 % en peso) para preparar cocleatos, a métodos de preparación de fármaco-cocleatos a partir de PS basada en soja y al uso de este cocleato cargado con fármaco como tratamiento farmacéutico.

10

Antecedentes de la invención

15

Los vehículos de suministro de cocleatos son una tecnología de base amplia para el suministro de una amplia diversidad de productos terapéuticos bioactivos. Los vehículos de suministro de cocleatos son precipitados de cationes de fosfolípido estables compuestos por materiales sencillos de origen natural, por ejemplo, fosfatidilserina y calcio.

20

La estructura de bicapa de los cocleatos proporciona protección frente a la degradación para las moléculas asociadas, o "encocleadas". Dado que la estructura completa del cocleato es una serie de capas sólidas, los componentes en el interior de la estructura de cocleato permanecen básicamente intactos, incluso aunque las capas exteriores del cocleato se puedan exponer a condiciones ambientales rigurosas o enzimas. Esto incluye la protección frente a la digestión en el estómago.

25

Aprovechando estas propiedades únicas, se han usado cocleatos para mediar y mejorar la biodisponibilidad oral de compuestos biofarmacéuticos de amplio espectro de importancia pero difíciles de formular, incluyendo compuestos con escasa solubilidad en agua, fármacos proteicos y peptídicos, y moléculas hidrófilas de gran tamaño. Por ejemplo, se ha conseguido el suministro oral mediado por cocleato de anfotericina B, construcciones/plásmidos de ADN para vacunas de ADN y terapia génica, formulaciones de péptidos, y antibióticos tales como clofazimina.

30

Los cocleatos se pueden almacenar en un tampón que contiene catión, o se pueden liofilizar en un polvo, almacenar a temperatura ambiente, y reconstituir con líquido antes de la administración. La liofilización no tiene ningún efecto adverso en la morfología o las funciones del cocleato. Se ha mostrado que las preparaciones de cocleato son estables durante más de dos años a 4 °C en un tampón que contiene catión, y al menos un año en forma de un polvo liofilizado a temperatura ambiente.

35

Los cocleatos se pueden preparar mediante varios métodos, tales como métodos de atrapamiento o de hidrogel (documento de Publicación de Solicitud Internacional n.º WO 03/082209).

40

El PS de soja se comercializa en almacenes de comida saludable como suplemento nutricional. El PS no purificado (40 %) se ha usado y estudiado como suplemento nutricional y como componente que tiene un efecto beneficioso en la mejora de las funciones cerebrales en las personas de edad avanzada (Villardita C *et al.*, Clin. Trials J. 24, 1987, 84-93).

45

Aunque el PS de soja no purificado (NSPS) se ha comercializado y estudiado en pacientes, nunca se ha usado NSPS (o PS de baja pureza) para preparar cocleatos y para suministrar un fármaco usando estos cocleatos. Como se ha descrito anteriormente en el documento de Patente WO 03/082209, NSPS no forma cocleatos y es necesario un proceso de purificación para mejorar el NSPS en el contenido de PS, hasta que se alcance al menos aproximadamente un 75 % en peso de PS, permitiendo tal porcentaje la formación de cocleatos.

50

Sumario de la invención

Se ha descubierto inesperadamente que la NSPS o la PS basada en soja de baja pureza (40-74 % en peso) aún puede formar cocleatos.

55

En resumen, de acuerdo con la presente invención, se preparan cocleatos basados en lípidos mejorados mediante el uso de fosfatidilserina de soja no purificada o de baja pureza como fuente de lípidos. Los cocleatos mejorados contienen fosfatidilserina de soja en una cantidad de un 45-55 % en peso del componente lipídico del cocleato. Los cocleatos mejorados pueden ser cocleatos vacíos o cargados. Los cocleatos cargados pueden contener cualquier principio activo biológico o combinación de principios activos biológicos tales como, por ejemplo, una proteína, un péptido pequeño, un polinucleótido, un aminoglucósido, un agente antiviral, un anestésico, un antibiótico, un antifúngico, un anticancerígeno, un inmunosupresor, un antiinflamatorio esteroideo, un antiinflamatorio no esteroideo, un tranquilizante, un suplemento nutricional, un producto de hierbas, una vitamina o un agente vasodilatador. De interés particular en la práctica de la presente invención, se cargan agentes antifúngicos o agentes antibióticos en los presentes cocleatos de fosfatidilserina basada en soja para proporcionar un fármaco antifúngico/fármaco antibiótico rentable y mejorado con una toxicidad reducida. Los agentes antifúngicos preferentes incluyen anfotericina B y nistatina. Los agentes antibióticos preferentes incluyen un aminoglucósido y amikacina. Un

65

cocleato de acuerdo con las reivindicaciones comprende un fosfolípido basado en soja que comprende fosfatidilserina de soja en una cantidad de un 45 % a un 55 % en peso del componente lipídico del cocleato, un catión multivalente, y un principio activo biológico. Los cocleatos basados en lípidos mejorados de la presente invención se pueden preparar mediante un método que comprende las etapas de: (a) preparar liposomas en un medio acuoso en el que los liposomas tienen (i) una bicapa lipídica que comprende fosfatidilserina basada en soja en una cantidad de un 45-55 % en peso de la bicapa lipídica y (ii) una carga de un principio activo biológico; (b) añadir un catión multivalente a la suspensión de liposomas de (a) para formar los cocleatos de fosfatidilserina de soja/principio activo biológico; y (c) recoger los cocleatos de fosfatidilserina basada en soja/compuesto biológico activo.

La presente divulgación también enseña que los cocleatos de fosfatidilserina de soja/principio activo biológico se pueden administrar a pacientes con infecciones fúngicas o con infecciones bacterianas. Los presentes cocleatos de fosfatidilserina de soja/principio activo biológico se administran convenientemente por vía oral incluso en el tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas de pacientes inmunológicamente comprometidos. Los presentes cocleatos de fosfatidilserina/principio activo biológico también se administran por vía parenteral, o mediante otros medios de administración. El principio activo biológico preferente es anfotericina B, curcumina, y amikacina.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra un estudio *in vitro* de cocleato de amikacina frente a MAC 101 y MAC 109 en macrófago peritoneal de ratón.

La Figura 2 muestra la eficacia *in vivo* de cocleato de amikacina en un modelo de ratón de suministro IP de infección MAC 101.

La Figura 3 muestra la eficacia *in vivo* de cocleato de amikacina en un modelo de ratón de suministro oral de infección MAC 101.

La Figura 4 muestra la encocleación de gentamicina con respecto a las propiedades de PS.

La Figura 5 muestra la eficacia de encocleación de sales biliares de amikacina con respecto a las propiedades de PS.

La Figura 6 muestra la eficacia de encocleación de sales biliares de amikacina con respecto a las propiedades de PS.

La Figura 7 muestra la eficacia de encocleación de sales biliares de gentamicina con respecto a las propiedades de PS.

La Figura 8 muestra la eficacia de encocleación de sales biliares de gentamicina con respecto a las propiedades de PS.

La Figura 9 muestra la eficacia de encocleación de sales biliares de paromomicina con respecto a las propiedades de PS.

La Figura 10 muestra la eficacia de encocleación de sales biliares de paromomicina con respecto a las propiedades de PS.

La Figura 11 muestra la eficacia de encocleación de sales biliares de paromomicina con respecto a las propiedades de PS.

Descripción detallada de la invención

Cuando se usan los siguientes términos en el presente documento, tendrán las definiciones que se dan a continuación.

Un "cocleato" es un precipitado estable de fosfolípido-catión que puede estar vacío o cargado.

Un "cocleato vacío" es un cocleato que está comprendido solo por fosfolípido y cationes.

Un "cocleato cargado" es un cocleato que tiene uno o más principios activos biológicos en la estructura de fosfolípido-catión.

"Fosfatidilserina de soja" o "fosfatidilserina basada en soja" es una fosfatidilserina que se ha obtenido a partir de una composición basada en soja.

En general, los cocleatos mejorados basados en fosfolípidos se preparan mediante el uso de fosfatidilserina de soja en una cantidad de un 40-74 % en peso del componente lipídico de los cocleatos. Alternativamente, la fosfatidilserina de soja puede ser aproximadamente un 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, o un 70 %, o cualquier valor incremental de los mismos, en peso del componente lipídico de los cocleatos. Se ha de entender que se pretende que estén incluidos todos los valores, y los intervalos entre estos valores e intervalos. De acuerdo con la invención, el fosfolípido comprende fosfatidilserina de soja en una cantidad de un 45-55 % en peso del componente lipídico del cocleato.

El ácido fosfatídico es un fosfolípido preferente cuando existe un fosfolípido adicional además de la fosfatidilserina en los presentes cocleatos mejorados. Otros fosfolípidos además del ácido fosfatídico que se pueden usar en los

presentes cocleatos mejorados incluyen fosfatidilcolina, fosfatidilinositol y fosfatidilglicerol. También se pueden usar mezclas de los fosfolípidos adicionales en combinación con la fosfatidilserina de soja.

El material de partida de fosfatidilserina de soja está disponible en el mercado, o se puede purificar a partir de una composición de fosfolípidos de soja, que son mezclas de varios fosfolípidos de soja, de acuerdo con técnicas de purificación bien conocidas y convencionales.

Se puede usar cualquier compuesto multivalente para precipitar los cocleatos de los materiales de partida de liposomas. Preferentemente, los compuestos multivalentes son cationes divalentes tales como Ca^{++} , Zn^{++} , Ba^{++} , y Mg^{++} . Las fuentes preferentes de estos cationes incluyen las sales de cloruro de calcio, cinc, bario, y magnesio. CaCl_2 es una fuente particularmente preferente de cationes divalentes.

En una realización, los presentes cocleatos de fosfatidilserina de soja pueden comprender además sales biliares. La proporción en peso de fosfatidilserina basada en soja con respecto a las sales biliares está entre 20:1 y 0,5:1, preferentemente entre 10:1 y 3:1.

Las sales biliares son ácidos biliares compuestos con un catión, habitualmente sodio. Los ácidos biliares son ácidos esteroides que se encuentran principalmente en la bilis de los mamíferos. Las sales biliares se encuentran disponibles en el mercado (por ejemplo, Sigma-Aldrich n.º de catálogo 48305 Fluka sal de sodio de ácido cólico, ~50 %, sal de sodio de ácido desoxicólico, ~50 %).

Se ha descubierto inesperadamente que la adición de sales biliares aumenta la eficacia de encocleación de los cocleatos de fosfatidilserina de soja. Por ejemplo, con la inclusión de sales biliares, los cocleatos de fosfatidilserina de soja de la presente invención (por ejemplo, con el uso de un 50 % de PS de soja) son más eficaces en la encocleación que los cocleatos que contienen al menos aproximadamente un 75 % de fosfatidilserina de soja.

En una realización, los presentes cocleatos de fosfatidilserina de soja se preparan mediante un proceso que comprende las etapas de:

- a. preparar liposomas en un medio acuoso en el que los liposomas tienen (i) una bicapa lipídica que comprende fosfatidilserina basada en soja en una cantidad de un 45-55 % en peso de la bicapa lipídica y (ii) una carga de un principio activo biológico;
- b. añadir un catión multivalente a la suspensión de liposomas de (a) para formar los cocleatos de fosfatidilserina de soja/principio activo biológico; y
- c. recoger los cocleatos de fosfatidilserina basada en soja/principio activo biológico.

En una realización, el medio acuoso que contiene la suspensión de liposomas es un entorno tamponado que tiene un pH de 6,5-7,5, y la carga del principio activo biológico es a pH 10 o mayor antes de la adición de los liposomas. En una realización preferente, la suspensión de liposomas está tamponada con fosfato.

En otra realización, el método comprende además una etapa de añadir sales biliares a la suspensión de liposomas de (a) antes de la etapa (b) o añadir sales biliares a los cocleatos de fosfatidilserina basada en soja/principio activo biológico después de la etapa (b), en la que la proporción en peso de la bicapa lipídica con respecto a las sales biliares está entre 20:1 y 0,5:1, preferentemente entre 10:1 y 3:1.

También se desvela en el presente documento una composición de geodato que contiene (1) una monocapa lipídica que incluye un fosfolípido basado en soja que comprende aproximadamente un 40 %-74 % (preferentemente un 45-70 %, más preferentemente un 45-55 % en peso de fosfatidilserina de soja), dispuesta alrededor de un dominio hidrófobo; y (2) un estrato lipídico dispuesto alrededor de la monocapa lipídica, en el que el estrato lipídico comprende una estructura de capas catiónicas alternantes que comprenden un catión divalente y capas de tipo lámina de lípidos cargadas negativamente; y un resto de carga asociado al dominio hidrófobo.

El documento de Publicación de Solicitud de Patente Internacional n.º WO 2004/041247 ha desvelado un proceso para preparar una composición de geodato.

El principio activo bioactivo/fármaco (denominado "carga" o fármaco) puede ser hidrófobo en medio acuoso, hidrófilo o anfifílico. El fármaco puede ser una proteína, un péptido pequeño, un polinucleótido bioactivo, un agente antifúngico, un agente antiviral, un anestésico, un agente antiinfeccioso, un agente antifúngico, un agente anticancerígeno, un inmunosupresor, un antiinflamatorio esteroideo, un suplemento nutricional, un producto de hierbas, una vitamina, un antiinflamatorio no esteroideo, un tranquilizante o un agente vasodilatador. Algunos ejemplos incluyen anfotericina B, aciclovir, adriamicina, vitamina A, cabamazepina, melfalán, nifedipina, indometacina, naproxeno, estrógenos, testosteronas, esteroides, fenitoína, ergotaminas, cannabinoides rapamicina, propanidid, propofol, alfadiona, equinomicina, nitrato de miconazol, tenipósido, taxanos, paclitaxel, y taxotere.

El fármaco puede ser un polipéptido tal como ciclosporina, angiotensina I, II y III, encefalinas y sus análogos, ACTH, péptidos antiinflamatorios I, II, III, bradiquinina, calcitonina, b-endorfina, dinorfina, leucoquinina, hormona liberadora

de la hormona luteinizante (LHRH), insulina, neuroquininas, somatostatina, sustancia P, hormona liberadora de tiroides (TRH) y vasopresina.

El fármaco puede ser un antígeno. El antígeno también puede ser un carbohidrato o ADN. Algunos ejemplos de proteínas antigénicas incluyen glucoproteínas de envoltura de virus de la gripe o Sendai, proteínas de membrana celular de animales, proteínas de membrana celular de plantas, proteínas de membrana bacteriana y proteínas de membrana parasitaria.

El antígeno se extrae de la partícula, célula, tejido, u organismo fuente mediante métodos conocidos. La actividad biológica del antígeno no necesita mantenerse. Sin embargo, en algunos casos (por ejemplo, cuando una proteína tiene actividad de fusión de membrana o de unión a ligando o una conformación compleja que es reconocida por el sistema inmune), es deseable mantener la actividad biológica. En estos casos, se usa un tampón de extracción que contiene un detergente que no destruye la actividad biológica de la proteína de membrana. Algunos detergentes adecuados incluyen detergentes iónicos tales como sales de colato, sales de desoxicolato o detergentes de polioxietileno heterogéneos tales como Tween, BRIG o Triton.

La utilización de este método permite la reconstitución de antígenos, más específicamente proteínas, en los liposomas con retención de actividades biológicas, y finalmente asociación eficaz con los cocleatos. Esto evita disolventes orgánicos, tratamiento de ultrasonidos, o pH, temperatura o presión extremos, todos los cuales tienen un efecto adverso en la reconstitución eficaz del antígeno en una forma biológicamente activa.

Los presentes cocleatos mejorados pueden incluir cargas con múltiples moléculas antigénicas, moléculas biológicamente pertinentes o formulaciones farmacológicas, según sea apropiado.

Para aislar las estructuras de cocleato y para retirar la solución de polímero, los precipitados de cocleato se lavan repetidamente con un tampón que contiene una molécula cargada positivamente y, más preferentemente, un catión divalente. La adición de una molécula cargada positivamente al tampón de lavado asegura que las estructuras de cocleato se mantengan en toda la etapa de lavado, y que puedan permanecer en forma de precipitados.

En medio en el que se suspenden los cocleatos puede contener una sal tal como cloruro de sodio, sulfato de sodio, sulfato de potasio, sulfato de amonio, sulfato de magnesio, carbonato de sodio. El medio puede contener polímeros tales como Tween 80 o BRIG o Triton. El fármaco-cocleato se prepara por dilución en un vehículo farmacéuticamente aceptable apropiado (por ejemplo, un tampón que contiene catión divalente).

Las partículas de cocleato pueden ser entéricas. Las partículas de cocleato se pueden situar en cápsulas de gelatina y se puede aplicar a la cápsula un revestimiento entérico.

El experto en la materia puede determinar los medios más eficaces y terapéuticos para efectuar el tratamiento poniendo en práctica la presente invención. También se puede hacer referencia a cualquiera de numerosas autoridades y referencias que incluyen, por ejemplo, "Goodman & Gillman's, The Pharmaceutical Basis for Therapeutics", (6ª Ed., Goodman *et al.*, eds., MacMillan Publ. Co., Nueva York, 1980).

Los cocleatos mejorados de fosfatidilserina de soja de la presente invención que contienen un principio activo biológico se administran de forma conveniente a los pacientes por vía oral mediante lo cual los cocleatos se absorben en el torrente sanguíneo y las cargas bioactivas se suministran de forma sistémica. Esta es una ventaja particular para los fármacos insolubles en agua tales como anfotericina B y paclitaxel. Además, la toxicidad de numerosos fármacos hidrófobos se reduce considerablemente como se observa con los cocleatos de fosfatidilserina de soja que contienen anfotericina B como carga.

Los siguientes ejemplos ilustran la práctica de la presente invención pero no se deberían interpretar como limitantes de su alcance.

EJEMPLO 1 Formulación de cocleato cristalino de anfotericina B

Procedimientos de formulación cristalina de anfotericina B a escala de pruebas:

N.º 1.1 Formulación del experimento:

Se mezclaron 43 mg (en realidad 40 mg de anfotericina B basados en el ensayo de potencia con la concentración de 0,932 mg/mg) de anfotericina B en 1,33 ml de NaOH 0,1 N con 200 mg de fosfatidilserina de dioleilo (DOPS, de Avanti o NOF Corporation) en 6,6 ml de tampón fosfato 50 mM a pH 7,4 (los liposomas se filtraron a través de un filtro de 5 µm) para formar liposomas que contenían la anfotericina B. A continuación se añadieron 29,3 mg de cloruro de calcio a la mezcla resultante para formar cocleatos cristalinos. Para preparar cocleatos cristalinos buenos, la proporción en peso de lípido:anfotericina B se ajustó a aproximadamente 5:1.

N.º 1.2 Formulación del experimento:

A continuación se mezclaron 18 mg de anfotericina B en 0,6 ml de NaOH 0,1 N con 90 mg de DOPS (de Avanti o NOF Corporation) en 3,0 ml de tampón fosfato 50 mM a pH 7,4 (los liposomas se filtraron a través de un filtro de 5 µm, 8 µm, y 4,5 µm) para formar liposomas que contenían la anfotericina B. A continuación se añadieron 0,33 ml de solución de cloruro de calcio 0,5 M a la mezcla resultante para formar cocleatos cristalinos de anfotericina B. Para preparar cocleatos cristalinos buenos, la proporción en peso de lípido:anfotericina B se ajustó a aproximadamente 5:1.

10 Procedimientos de cocleatos cristalinos de anfotericina B (anfotericina B) a pequeña escala:

N.º 1.3 Formulación del experimento:

15 Se combinaron 399 mg (en realidad 372 mg basados en el ensayo de potencia con la concentración de 0,932 mg/mg) de anfotericina B en 12,4 ml de solución de NaOH 0,1 N con 1,86 g de PS de soja al 50 % (American Lecithin Company o Lipoid LLC) en 62 ml de tampón fosfato 50 mM a pH 7,4 (los liposomas se filtraron a través de un filtro de 5 µm) para formar liposomas que contenían la anfotericina B. Con el fin de añadir un antioxidante a la suspensión, se añadieron a continuación 372 mg de vitamina E en 37,2 ml de alcohol etílico a la mezcla de los liposomas. A continuación se añadieron 520 mg de cloruro de calcio en polvo a la mezcla resultante para formar cocleatos cristalinos de anfotericina B. Para preparar cocleatos cristalinos buenos, la proporción en peso de lípido:anfotericina B se ajustó a aproximadamente 5:1.

Procedimientos de formulación cristalina de anfotericina B a escala de hasta 4,5 l:

25 N.º 1.4 Formulación del experimento:

A continuación se mezclaron 22,75 g de anfotericina B (en realidad 21,2 g de anfotericina B basados en el ensayo de potencia con la concentración de 0,932 mg/mg) en 707 ml de solución de NaOH 0,1 N con 106 g de PS de soja al 50 % en 3,533 l de tampón fosfato 50 mM a pH 7,4 (los liposomas se filtraron a través de un filtro de 10 µm) para formar liposomas que contenían la anfotericina B. Para preparar una suspensión estable de cocleatos, se añadieron a continuación 372 mg de vitamina E en 3,72 ml de alcohol etílico. A continuación se añadieron 194,8 ml de cloruro de calcio 1 M a la mezcla resultante para formar cocleatos cristalinos. El producto final de cocleatos se liofilizó con un liofilizador durante unos días. Para preparar cocleatos cristalinos buenos, la proporción en peso de lípido:anfotericina B se ajustó a aproximadamente 5:1.

EJEMPLO 2 Formulación de cocleatos de geoda de curcumina (granular)

Procedimientos de cocleatos de geoda de curcumina (granular) a pequeña escala:

40 N.º 2.1 Formulación del experimento:

Se disolvieron en primer lugar 50 mg de curcumina en 1 g de aceite de ricino y 4,0 ml de alcohol etílico y a continuación se combinaron con 19 de PS de soja al 75 % (American Lecithin Company o Lipoid LLC) en 100 ml de agua estéril (los liposomas se filtraron a través de un filtro de 5 µm) para formar liposomas que contenían la curcumina. Con el fin de aumentar la adherencia de la suspensión y la difusión de pasta, se añadieron a continuación 500 mg de albúmina de suero bovino ("BSA", o caseína) a la mezcla de los liposomas. A continuación se añadieron 16,9 ml de cloruro de calcio 0,1 M a la mezcla resultante para formar cocleatos de geoda de curcumina. El producto final de cocleatos de geoda se liofilizó con un liofilizador durante unos días. Para preparar cocleatos de geoda de curcumina buenos, la proporción en peso de lípido:fármaco se ajustó a aproximadamente 20:1.

N.º 2.2 Formulación del experimento:

55 Se mezclaron 100 mg de PS de soja al 75 % en 100 mg de agua estéril (los liposomas se filtraron a través de un filtro de 5 µm) con 500 mg de caseína (o BSA) y a continuación se mezclaron con 50 mg de curcumina en 2,0 g de aceite de ricino y 4,0 ml de alcohol etílico para formar liposomas que contenían la curcumina. A continuación se añadieron 16,9 ml de cloruro de calcio 0,1 M a la mezcla resultante para formar cocleatos de geoda. El producto final de los cocleatos de geoda se liofilizó con un liofilizador durante unos días. Para preparar cocleatos de geoda de curcumina buenos, la proporción en peso de lípido:fármaco se ajustó a aproximadamente 20:1.

60 Procedimientos de formulación cristalina de curcumina (granular) a pequeña escala:

N.º 2.3 Formulación del experimento:

65 Se combinaron 1000 mg de PS de soja al 75 % en 100 ml de agua estéril (los liposomas se filtraron a través de un filtro de 5 µm) con 20 mg de curcumina en 4,0 ml de alcohol etílico para formar liposomas que contenían la

curcumina. Con el fin de ayudar a la estabilidad del fármaco en la bicapa lipídica, se añadieron a continuación 500 mg de caseína (o BSA) a la suspensión de los liposomas. A continuación se añadieron 16,9 ml de cloruro de calcio 0,1 M a la mezcla resultante para formar cocleatos cristalinos. El producto final de cocleatos cristalinos se liofilizó con un liofilizador durante unos días. Para preparar cocleatos cristalinos buenos, la proporción en peso de

N.º 2.4 Formulación del experimento:

Se combinaron 1000 mg de PS de soja al 75 % en 100 ml de agua estéril (los liposomas se filtraron a través de un filtro de 5 µm) con 20 mg de curcumina en 4,0 ml de alcohol etílico para formar liposomas que contenían la curcumina. A continuación se añadieron 16,9 ml de cloruro de calcio 0,1 M a la mezcla resultante para formar cocleatos cristalinos. Con el fin de ayudar a la estabilidad del fármaco en la bicapa lipídica, se añadieron a continuación 500 mg de caseína (o BSA) a la suspensión de los cocleatos. El producto final de cocleatos cristalinos se liofilizó con un liofilizador durante unos días. Para preparar cocleatos cristalinos buenos, la proporción en peso de

EJEMPLO 3 Formulación de geoda de anfotericina B (anfotericina B)

Procedimientos de formulación de geoda de anfotericina B (anfotericina B) a escala de pruebas:

N.º 3.1 Formulación del experimento:

Se mezclaron 7,5 mg de anfotericina B (en realidad 7 mg basados en el ensayo de potencia con la concentración de 0,932 mg/mg) en 0,2 ml de solución de NaOH 0,1 N con 50 mg de aceite de ricino y a continuación se combinaron con 35 mg de PS de soja al 50 % en 1,75 ml de agua estéril (los liposomas se filtraron a través de un filtro de 5 µm) para formar liposomas de geoda que contenían la anfotericina B. Para prevenir la adherencia de la formulación de geoda de anfotericina B, se añadieron a continuación 21 mg de BSA a la mezcla de los liposomas de geoda de anfotericina B. Para aumentar la estabilidad de la formulación de geoda de anfotericina B, se añadieron a continuación 7 mg de vitamina E en 70 µl de alcohol etílico a la mezcla de los liposomas de geoda. A la mezcla resultante, se añadieron a continuación 127 µl de cloruro de calcio 0,5 M para formar cocleatos de geoda de anfotericina B. Para preparar cocleatos de geoda de anfotericina B buenos, la proporción en peso de

Procedimientos de formulación de geoda de anfotericina B a escala de hasta 150 ml:

N.º 3.2 Formulación del experimento:

A continuación se mezclaron 536 mg de anfotericina B (en realidad 500 mg basados en el ensayo de potencia con la concentración de 0,932 mg/mg) en 14,3 ml de solución de NaOH 0,1 N con 3,57 g de aceite de ricino y a continuación se combinaron con 2,5 g de PS de soja al 50 % en 125 ml de agua estéril (los liposomas se filtraron a través de un filtro de 5 µm) para formar liposomas de geoda que contenían la anfotericina B. Para prevenir la adherencia de la formulación de geoda, se añadieron a continuación 1,5 g de BSA o caseína a la mezcla de los liposomas de geoda. Para aumentar la estabilidad de la formulación de geoda de anfotericina B, se añadieron a continuación 250 mg de vitamina E en 2,5 ml de alcohol etílico a la mezcla de los liposomas de geoda. A la mezcla resultante se añadieron a continuación 8,88 ml de cloruro de calcio 0,5 M para formar cocleatos de geoda. El pH de la mezcla final se ajustó a neutro con 0,3 ml de HCl 1 N. Para preparar cocleatos de geoda de anfotericina B buenos, la proporción en peso de

N.º 3.3 Formulación del experimento:

Se mezclaron 2,5 g de PS de soja al 50 % en 125 ml de agua estéril (los liposomas se filtraron a través de un filtro de 5 µm) con 1,5 g de BSA o caseína y a continuación se combinaron con 536 mg de anfotericina B (en realidad 500 mg basados en el ensayo de potencia con la concentración de 0,932 mg/mg) en 14,3 ml de solución de NaOH 0,1 N con 3,57 g de aceite de ricino para formar liposomas que contenían la anfotericina B. Para preparar una formulación de geoda estable, se añadieron a continuación 250 mg de vitamina E en 2,5 ml de alcohol etílico a la mezcla de los liposomas de geoda. El pH de la mezcla final se ajustó a neutro con 0,3 ml de HCl 1 N. A continuación se añadieron 8,88 ml de cloruro de calcio 0,5 M a la mezcla resultante para formar cocleatos de geoda. Los cocleatos de geoda se concentraron a continuación usando liofilización para proporcionar cocleatos de geoda con agua estéril en cualquier concentración (basada en los requisitos del experimento) con una proporción en peso de

EJEMPLO 4 Formulación de cocleato cristalino de amikacina para estudio *in vitro*

Procedimiento de formulación de amikacina para estudio *in vitro*:

N.º 4.1 Formulación del experimento:

Se filtraron 2 mg de amikacina en 1,0 ml de agua desionizada destilada (D.D) a través de un filtro de 0,22 µm y se combinaron con 20 mg de PS de soja al 50 % en 2,0 ml de agua estéril (los liposomas se filtraron a través de un filtro de 5, 0,8 y 0,45 µm) para formar liposomas que contenían la amikacina. A la mezcla resultante se añadieron a continuación 0,206 ml de cloruro de calcio 0,1 M para formar cocleatos. La mezcla se ajustó a continuación a la concentración de fármaco de la amikacina a 0,5 mg/ml con agua estéril. Para preparar cocleatos cristalinos de amikacina buenos se usó una proporción de lípido: fármaco de aproximadamente 10:1.

N.º 4.2 Formulación del experimento:

Se filtraron 2 mg de amikacina en 1,0 ml de agua D.D a través de un filtro de 0,22 µm y se combinaron con 20 mg de PS de soja al 50 % en 2,0 ml de agua estéril (los liposomas se filtraron a través de un filtro de 5, 0,8 y 0,45 µm) para formar liposomas que contenían la amikacina. A la mezcla resultante se añadieron a continuación 0,206 ml de cloruro de calcio 0,1 M para formar cocleatos. Para reducir el tamaño de agregación de los cocleatos cristalinos, se añadieron a continuación 15 mg de cloruro de sodio en 52 µl de agua estéril a la mezcla de los cocleatos. La mezcla se ajustó a continuación a la concentración de fármaco de la amikacina a 0,5 mg/ml con agua estéril. Además, el producto final contenía cloruro de sodio 0,066 M. Para preparar cocleatos cristalinos de amikacina buenos se usó una proporción de lípido: fármaco de aproximadamente 10:1.

N.º 4.3 Formulación del experimento:

Se filtraron 2 mg de amikacina en 1,0 ml de agua D.D a través de un filtro de 0,22 µm y se combinaron con 20 mg de PS de soja al 50 % en 2,0 ml de agua estéril (los liposomas se filtraron a través de un filtro de 5, 0,8 y 0,45 µm) para formar liposomas que contenían la amikacina. A la mezcla resultante se añadieron a continuación 0,206 ml de cloruro de calcio 0,1 M para formar cocleatos. Para reducir el tamaño de agregación de los cocleatos cristalinos, se añadieron a continuación 76 mg de cloruro de sodio en 264 µl de agua estéril a la mezcla de los cocleatos. La mezcla se ajustó a continuación a la concentración de fármaco de la amikacina a 0,5 mg/ml con agua estéril. Además, el producto final contenía cloruro de sodio 0,33 M. Para preparar cocleatos cristalinos de amikacina buenos se usó una proporción de lípido: fármaco de aproximadamente 10:1.

N.º 4.4 Formulación del experimento:

Se filtraron 2 mg de amikacina en 1,0 ml de agua D.D a través de un filtro de 0,22 µm y se combinaron con 20 mg de PS de soja al 50 % en 2,0 ml de agua estéril (los liposomas se filtraron a través de un filtro de 5, 0,8 y 0,45 µm) para formar liposomas que contenían la amikacina. A la mezcla resultante se añadieron a continuación 0,206 ml de cloruro de calcio 0,1 M para formar cocleatos. Para reducir el tamaño de agregación de los cocleatos cristalinos, se añadieron a continuación 152 mg de cloruro de sodio en 524 µl de agua estéril a la mezcla de los cocleatos. La mezcla se ajustó a continuación a la concentración de fármaco de la amikacina a 0,5 mg/ml con agua estéril. Además, el producto final contenía cloruro de sodio 0,66 M. Para preparar cocleatos cristalinos de amikacina buenos se usó una proporción de lípido: fármaco de aproximadamente 10:1.

EJEMPLO 5 Formulación de cocleato cristalino de amikacina para estudio *in vivo*Procedimiento de formulación de amikacina para estudio *in vivo*:

N.º 5.1 Formulación del experimento:

Se filtraron 200 mg de amikacina en 20 ml de agua D.D a través de un filtro de 0,22 µm y se combinaron con 2000 mg de PS de soja al 50 % en 200 ml de agua estéril (los liposomas se filtraron a través de un filtro de 5, 0,8 y 0,45 µm) para formar liposomas que contenían la amikacina. A la mezcla resultante se añadieron a continuación 17 ml de cloruro de calcio 0,1 M para formar cocleatos. Los cocleatos se concentraron a continuación mediante liofilización para proporcionar cocleatos cristalinos (aproximadamente 6,7 mg/ml) con una proporción de lípido: amikacina de aproximadamente 10:1.

N.º 5.2 Formulación del experimento:

Se filtraron 200 mg de amikacina en 20 ml de agua D.D a través de un filtro de 0,22 µm y se combinaron con 2000 mg de PS de soja al 50 % en 200 ml de agua estéril (los liposomas se filtraron a través de un filtro de 5, 0,8 y 0,45 µm) para formar liposomas que contenían la amikacina. A la mezcla resultante se añadieron a continuación 17 ml de cloruro de calcio 0,1 M para formar cocleatos. Para reducir el tamaño de agregación de los cocleatos cristalinos, se añadieron a continuación 1125,2 mg de cloruro de sodio en 3,88 ml de agua estéril a la mezcla de los cocleatos. Los cocleatos se concentraron a continuación mediante liofilización para proporcionar cocleatos cristalinos (aproximadamente 6,7 mg/ml y cloruro de sodio 0,66 M) con una proporción de lípido: amikacina de aproximadamente 10:1.

EJEMPLO 6 Estudio *in vitro* de formulación de cocleato cristalino de aminoglucósidos

Macrófagos e infección

- 5 Líneas celulares: línea celular de macrófago peritoneal de ratón (Raw 246.7), y/o THP-1, una línea celular de macrófagos humana. Las células se cultivaron en DMEM y RPMI-1640, respectivamente, complementadas con un 5 % de suero bovino fetal inactivado térmicamente. Se establecieron monocapas de macrófagos por adición de 10^5 macrófagos a una placa de cultivo tisular de 24 pocillos. Después de 24 horas, las monocapas se infectaron y se dejó que la infección transcurriera durante 1 hora, y a continuación las bacterias extracelulares se retiraron mediante lavado. Algunos de los contenidos de los pocillos se lisaron y se sembraron en placa en una placa de agar Middlebrook 7H10, para determinar el inóculo intracelular de la bacteria. Los pocillos remanentes se trataron diariamente con diferentes cocleatos de aminoglucósidos (es decir, amikacina, gentamicina, y paromomicina) preparados de acuerdo con el método reivindicado. Después del tratamiento, las monocapas celulares se lisaron y el lisado se sembró en placa en agar 7H10 para cuantificar la carga intracelular.

Tabla 1 Comparación de eficacia entre formulación de aminoglucósidos encocleados y aminoglucósidos libres

Resultados	Eficacia mejorada frente a fármaco libre
Amikacina	• <i>Mycobacterium avium</i> (10x - 20x) • <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (7x) • <i>Francisella tularensis</i> LVS (3x)
Gentamicina	• <i>Mycobacterium avium</i> (10x) • <i>Mycobacterium smegmatis</i> (50x) • <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (2x) • <i>Francisella tularensis</i> LVS (2x) • <i>Francisella tularensis</i> tipo A (4x)
Paromomicina	• <i>Francisella tularensis</i> tipo A (4x) • <i>Cutaneous Leishmaniasis</i> (3x)

Como se indica en la Tabla 1, los cocleatos de aminoglucósidos tuvieron una eficacia mejorada frente a diferentes bacterias en comparación con los correspondientes fármacos libres no encocleados.

EJEMPLO 7 Estudio *in vitro* de formulación de cocleato cristalino de amikacina

- Métodos: como se muestra en el Ejemplo 4, las formulaciones de cocleato de amikacina (Amkcch) se optimizaron para la eficacia de encocleación de amikacina y el tamaño de partícula variando el tipo de PS usada, la proporción de PS: principio activo biológico, la proporción de PS:Ca⁺⁺, y la concentración de NaCl. La eficacia de Amkcch frente a infecciones de Ma intracelulares se evaluó *in vitro* usando macrófagos peritoneales de ratón infectados con las cepas MAC 101 o MAC 109 de *M. avium*. Se sembraron células Raw 264.7 de macrófagos peritoneales de ratón (Mo) a 105 células/pocillo. Las monocapas de Mo se infectaron en una proporción de 1:10 durante 1 h y se retiraron las bacterias extracelulares. Las monocapas se trataron con preparaciones de amikacina libre y/o cocleato de amikacina durante 4 días y se determinó el número de bacterias intracelulares. Los ensayos se repitieron tres veces.

- Resultados: las cepas de Ma de control sin tratar crecieron en Mo de 3,8' 105 a 4,9' 106. Ma en Mo tratados con amikacina libre (10 y 20 mg/ml) se eliminaron a 6,1 y 3,4 ' 104 bacterias, respectivamente. Amkcch optimizado (10 y 20 mg/ ml) demostró una mejora de eficacia de más de 10 veces, reduciendo el recuento bacteriano a 3,9 y 1,7 ' 103 bacterias en Mo (p < 0,05 en comparación con la amikacina libre).

- Conclusiones: como se indica en la Figura 1, las formulaciones de cocleato de amikacina fueron 10 - 50 veces más activas que la amikacina libre frente a infección por *M. avium* en macrófagos. Las preparaciones de cocleato de amikacina mostraron una actividad significativa y mejorada frente a cepas de Ma en macrófagos, lo que sugiere que los cocleatos consiguieron una mayor concentración intracelular durante un periodo de tiempo más prolongado que la amikacina libre.

EJEMPLO 8 Estudio *in vivo* de formulación de cocleato cristalino de amikacina

- Se ha desarrollado una formación de cocleatos de amikacina. Se evaluó la eficacia *in vivo* de los cocleatos de amikacina frente a *Mycobacterium avium complex* (MAC) usando ratones negros C57BL/6.

- Se infectaron ratones, 12/grupo, con *M. avium* 101 (8,1 x 10⁷ bacterias/ratón) mediante inyección en la vena de la cola.
- Después de 7 días, se recogieron 6 ratones y se cuantificó el número de MAC en el bazo para establecer la

carga bacteriana de línea base (Tiempo 0).

- Los ratones se trataron con diversos cocleatos de amikacina como se indican las Figuras 2 y 3
- a 1,0 mg de amikacina/día durante 2 semanas.
- Se recogieron ratones en la semana 3 y 2 días después (después de 2 semanas de tratamiento), y los bazos se
- Se contaron las colonias de las placas y se analizaron los datos.

Como se demuestra en las Figuras 2 y 3, los cocleatos de amikacina, administrados I.P. o por vía oral, fueron activos, reduciendo el número de carga bacteriana en el bazo. La preparación de cocleato de amikacina con alta concentración de sal fue por vía oral.

Conclusión: el suministro oral de formulaciones de cocleato de amikacina demuestra una eficacia *in vivo* similar a la amikacina libre IP.

EJEMPLO 9 Procedimiento de alta concentración de sal para formulaciones de aminoglucósidos para estudio *in vitro*

N.º 9.1 Formulación del experimento:

Se filtraron 2 mg de aminoglucósido en 1,0 ml de agua D.D a través de un filtro de 0,22 µm y se combinaron con 20 mg de PS de soja al 50 % en 2,0 ml de agua estéril (los liposomas se filtraron a través de un filtro de 5, 0,8 y 0,45 µm) para formar liposomas que contenían el aminoglucósido. A la mezcla resultante se añadieron a continuación 0,206 ml de cloruro de calcio 0,1 M para formar cocleatos. La mezcla se ajustó a continuación a la concentración de fármaco del aminoglucósido a 0,5 mg/ml con agua estéril. Para preparar cocleatos cristalinos de aminoglucósido buenos se usó una proporción de lípido: fármaco de aproximadamente 10:1.

N.º 9.2 Formulación del experimento:

Se filtraron 2 mg de aminoglucósido en 1,0 ml de agua D.D a través de un filtro de 0,22 µm y se combinaron con 20 mg de PS de soja al 50 % en 2,0 ml de agua estéril (los liposomas se filtraron a través de un filtro de 5, 0,8 y 0,45 µm) para formar liposomas que contenían el aminoglucósido. A la mezcla resultante se añadieron a continuación 0,206 ml de cloruro de calcio 0,1 M para formar cocleatos. Para reducir el tamaño de agregación de los cocleatos cristalinos, se añadieron a continuación 15 mg de cloruro de sodio en 52 µl de agua estéril a la mezcla de los cocleatos. La mezcla se ajustó a continuación a la concentración de fármaco del aminoglucósido a 0,5 mg/ml con agua estéril. Además, el producto final contenía cloruro de sodio 0,066 M. Para preparar cocleatos cristalinos de aminoglucósido buenos se usó una proporción de lípido: fármaco de aproximadamente 10:1.

N.º 9.3 Formulación del experimento:

Se filtraron 2 mg de aminoglucósido en 1,0 ml de agua D.D a través de un filtro de 0,22 µm y se combinaron con 20 mg de PS de soja al 50 % en 2,0 ml de agua estéril (los liposomas se filtraron a través de un filtro de 5, 0,8 y 0,45 µm) para formar liposomas que contenían el aminoglucósido. A la mezcla resultante se añadieron a continuación 0,206 ml de cloruro de calcio 0,1 M para formar cocleatos. Para reducir el tamaño de agregación de los cocleatos cristalinos, se añadieron a continuación 76 mg de cloruro de sodio en 264 µl de agua estéril a la mezcla de los cocleatos. La mezcla se ajustó a continuación a la concentración de fármaco del aminoglucósido a 0,5 mg/ml con agua estéril. Además, el producto final contenía cloruro de sodio 0,33 M. Para preparar cocleatos cristalinos de aminoglucósido buenos se usó una proporción de lípido: fármaco de aproximadamente 10:1.

N.º 9.4 Formulación del experimento:

Se filtraron 2 mg de aminoglucósido en 1,0 ml de agua D.D a través de un filtro de 0,22 µm y se combinaron con 20 mg de PS de soja al 50 % en 2,0 ml de agua estéril (los liposomas se filtraron a través de un filtro de 5, 0,8 y 0,45 µm) para formar liposomas que contenían el aminoglucósido. A la mezcla resultante se añadieron a continuación 0,206 ml de cloruro de calcio 0,1 M para formar cocleatos. Para reducir el tamaño de agregación de los cocleatos cristalinos, se añadieron a continuación 152 mg de cloruro de sodio en 524 µl de agua estéril a la mezcla de los cocleatos. La mezcla se ajustó a continuación a la concentración de fármaco del aminoglucósido a 0,5 mg/ml con agua estéril. Además, el producto final contenía cloruro de sodio 0,66 M. Para preparar cocleatos cristalinos de aminoglucósido buenos se usó una proporción de lípido: fármaco de aproximadamente 10:1.

Tabla 2 Resultados de encocleación de amikacina para estudio en casa obtenido a partir de sobrenadante de encocleación de amikacina (PS de soja al 50 % de Degussa frente al 50 % de Lipoid y antes y después de liofilización)

Medido usando	Proporción de lípido: fármaco	PS de soja al 85 % de Degussa antes de liofilización	PS de soja al 85 % de Degussa después de liofilización	PS de soja al 50 % de Lipoid antes de liofilización	PS de soja al 50 % de Lipoid después de liofilización
Tampón	20:1	34 % en sob.	39,5 % en sob.	34,5 % en sob.	33,8 % en sob.
Tampón	10:1	69,1 % en sob.	72,6 % en sob.	50 % en sob.	48,3 % en sob.
Tampón	5:1	74,7 % en sob.	83,5 % en sob.	61,3 % en sob.	58,1 % en sob.
Sob. plano de PS de soja al 85 % de Degussa	20:1	25,3 % en sob.	30,2 % en sob.	25,7 % en sob.	25 % en sob.
Sob. plano de PS de soja al 85 % de Degussa	10:1	55,4 % en sob.	58,4 % en sob.	38,4 % en sob.	36,8 % en sob.
Sob. plano de PS de soja al 85 % de Degussa	5:1	61,6 % en sob.	69,5 % en sob.	49,5 % en sob.	47 % en sob.
Sob. plano de PS de soja al 50 % de Lipoid	20:1	29,6 % en sob.	34,3 % en sob.	30 % en sob.	29,5 % en sob.
Sob. plano de PS de soja al 50 % de Lipoid	10:1	59,8 % en sob.	62,9 % en sob.	43,6 % en sob.	42,4 % en sob.
Sob. plano de PS de soja al 50 % de Lipoid	5:1	64,3 % en sob.	72,2 % en sob.	52,8 % en sob.	50,8 % en sob.

- 5 El porcentaje de encocleación se determina por medición de la cantidad de amikacina en el sobrenadante (ensayo de ninhidrina) después de la formación de los cocleatos y a continuación centrifugación. La cantidad en el sobrenadante se resta a continuación de la cantidad total durante el proceso de encocleación. Esto se informa como porcentaje en sobrenadante. Cuanto menor es el porcentaje en sobrenadante, mayor es la eficacia de encocleación. Los resultados que se enumeran en la Tabla 2 demuestran claramente que PS de soja al 50 % es más eficaz en la encocleación que PS al 85 %.
- 10

Tabla 3 Resultados de formulación de amikacina obtenidos a partir de absorbancia a 400 nm

Medido usando	Proporción de PS de soja al 50 % con respecto a fármaco	Proporción de PS de soja al 85 % con respecto a fármaco	Proporción de PS de soja al 50 % con respecto a fármaco	Proporción de PS de soja al 85 % con respecto a fármaco	Proporción de PS de soja al 50 % con respecto a fármaco (5:1)	Proporción de PS de soja al 85 % con respecto a fármaco (5:1)
Tampón fosfato 50 mM + amikacina	50,6 % en sob.	94,4 % en sob.	34,8 % en sob.	54,9 % en sob.	53,5 % en sob.	76,4 % en sob.
Sob. plano de PS de soja al 50 % + amikacina	41 % en sob.	79 % en sob.	27,9 % en sob.	45,2 % en sob.	44,3 % en sob.	63,8 % en sob.
Sob. plano de PS de soja al 85 % + amikacina	44 % en sob.	82,8 % en sob.	30 % en sob.	47,8 % en sob.	46,8 % en sob.	66,9 % en sob.

El porcentaje de encocleación se determina por medición de la cantidad de amikacina en el sobrenadante (ensayo de ninhidrina) después de la formación de los cocleatos y a continuación centrifugación. La cantidad en el sobrenadante se resta a continuación de la cantidad total durante el proceso de encocleación. Esto se informa como porcentaje en sobrenadante. Cuanto menor es el porcentaje en sobrenadante, mayor es la eficacia de encocleación.

- 5 Los resultados que se enumeran en la Tabla 3 demuestran claramente que PS de soja al 50 % es más eficaz en la encocleación que PS al 85 %.

Tabla 4 Resultados de formulación de amikacina obtenidos a partir de la absorbancia a 400 nm

Medido usando	Proporción de DOPS con respecto a amikacina	PS de soja al 50 % de Lipoid	DOPS de Avanti	PS de soja al 99 % de Avanti	DOPS NOF
Tampón fosfato 50 mM	10:1	47,3 % en sob.	87,7 % en sob.	84,3 % en sob.	86,4 % en sob.
Sob. de cocleatos planos de PS de soja al 50 % de Lipoid	10:1	37,1 % en sob.	77 % en sob.	73,5 % en sob.	64 % en sob.
Sob. plano de DOPS de Avanti	10:1	43,6 % en sob.	83 % en sob.	80 % en sob.	81,7 % en sob.
Sob. plano de PS de soja al 99 % de Avanti	10:1	41,9 % en sob.	84,6 % en sob.	81 % en sob.	83 % en sob.

- 10 El porcentaje de encocleación se determina por medición de la cantidad de amikacina en el sobrenadante (ensayo de ninhidrina) después de la formación de los cocleatos y a continuación centrifugación. La cantidad en el sobrenadante se resta a continuación de la cantidad total durante el proceso de encocleación. Esto se informa como porcentaje en sobrenadante. Cuanto menor es el porcentaje en sobrenadante, mayor es la eficacia de encocleación.
- 15 Los resultados que se enumeran en la Tabla 4 demuestran claramente que PS de soja al 50 % es más eficaz en la encocleación que PS al 99,99 %.

La Figura 4 muestra la encocleación de gentamicina con respecto a las propiedades de PS. De forma similar a las Tablas 1-3, los resultados que se enumeran en la Figura 4 demuestran claramente que PS de soja 50 % es más eficaz en la encocleación de gentamicina a menores concentraciones de sal biliar que PS al 85 % o PS al 99,99 %.

20 **EJEMPLO 10 Eficacia de encocleación de cocleatos de sales biliares de amikacina, gentamicina, y paromomicina**

25 N.º 10.1 Procedimiento para la formulación de aminoglucósidos con sales biliares (después de calcio) para estudios *in vitro*.

Cocleatos cristalinos de formulación de aminoglucósido con diferentes cantidades de sales biliares (Sigma-Aldrich n.º de catálogo 48305 Fluka sal de sodio de ácido cólico, ~50 % sal de sodio de ácido desoxicólico, ~50 %):

- 30 Se filtraron 2 mg de aminoglucósido en 0,2 ml de agua estéril a través de un filtro de 0,22 µm y se combinaron con 20 mg de liposomas de PS de soja al 50 % en 2,0 ml de agua estéril (los liposomas de PS de soja se filtraron en primer lugar a través de filtros de 5, 0,8 y 0,45 µm) para formar liposomas que contenían el aminoglucósido. A la mezcla resultante, se añadieron a continuación 0,159 ml de cloruro de calcio 0,1 M con mezcla vigorosa para formar los cocleatos de aminoglucósido. Con el fin de hacer más pequeño el tamaño de partícula de los cristales de cocleato de aminoglucósido, se añadieron a continuación 20,4 mg de sales biliares a la mezcla de los cocleatos de aminoglucósido. La mezcla se ajustó a continuación a una concentración de fármaco del aminoglucósido de 0,5 mg/ml con el tampón como la suspensión. Las formulaciones de cocleato de aminoglucósido finales contenían 11,3 mM.

- 40 Se filtraron 2 mg de aminoglucósido en 0,2 ml de agua estéril a través de un filtro de 0,22 µm y se combinaron con 20 mg de liposomas de PS de soja al 50 % en 2,0 ml de agua estéril (los liposomas de PS de soja se filtraron en primer lugar a través de filtros de 5, 0,8 y 0,45 µm) para formar liposomas que contenían el aminoglucósido. A la mezcla resultante, se añadieron a continuación 0,159 ml de cloruro de calcio 0,1 M con mezcla vigorosa para formar los cocleatos de aminoglucósido. Con el fin de hacer más pequeño el tamaño de partícula de los cristales de cocleato de aminoglucósido, se añadieron a continuación 13,6 mg de sales biliares a la mezcla de los cocleatos de aminoglucósido. La mezcla se ajustó a continuación a una concentración de fármaco del aminoglucósido de 0,5 mg/ml con el tampón como la suspensión. Las formulaciones de cocleato de aminoglucósido finales contenían 7,8 mM.

- 50 Se filtraron 2 mg de aminoglucósido en 0,2 ml de agua estéril a través de un filtro de 0,22 µm y se combinaron con 20 mg de liposomas de PS de soja al 50 % en 2,0 ml de agua estéril (los liposomas de PS de soja se filtraron en

primer lugar a través de filtros de 5, 0,8 y 0,45 µm) para formar liposomas que contenían el aminoglucósido. A la mezcla resultante, se añadieron a continuación 0,159 ml de cloruro de calcio 0,1 M con mezcla vigorosa para formar los cocleatos de aminoglucósido. Con el fin de hacer más pequeño el tamaño de partícula de los cristales de cocleato de aminoglucósido, se añadieron a continuación 6,8 mg de sales biliares a la mezcla de los cocleatos de aminoglucósido. La mezcla se ajustó a continuación a una concentración de fármaco del aminoglucósido de 0,5 mg/ml con el tampón como la suspensión. Las formulaciones de cocleato de aminoglucósido finales contenían 3,9 mM.

Se filtraron 2 mg de aminoglucósido en 0,2 ml de agua estéril a través de un filtro de 0,22 µm y se combinaron con 20 mg de liposomas de PS de soja al 50 % en 2,0 ml de agua estéril (los liposomas de PS de soja se filtraron en primer lugar a través de filtros de 5, 0,8 y 0,45 µm) para formar liposomas que contenían el aminoglucósido. A la mezcla resultante, se añadieron a continuación 0,159 ml de cloruro de calcio 0,1 M con mezcla vigorosa para formar los cocleatos de aminoglucósido. Con el fin de hacer más pequeño el tamaño de partícula de los cristales de cocleato de aminoglucósido, se añadieron a continuación 3,4 mg de sales biliares a la mezcla de los cocleatos de aminoglucósido. La mezcla se ajustó a continuación a una concentración de fármaco del aminoglucósido de 0,5 mg/ml con el tampón como la suspensión. Las formulaciones de cocleato de aminoglucósido finales contenían 1,95 mM.

Se filtraron 2 mg de aminoglucósido en 0,2 ml de agua estéril a través de un filtro de 0,22 µm y se combinaron con 20 mg de liposomas de PS de soja al 50 % en 2,0 ml de agua estéril (los liposomas de PS de soja se filtraron en primer lugar a través de filtros de 5, 0,8 y 0,45 µm) para formar liposomas que contenían el aminoglucósido. A la mezcla resultante, se añadieron a continuación 0,159 ml de cloruro de calcio 0,1 M con mezcla vigorosa para formar los cocleatos de aminoglucósido. Con el fin de hacer más pequeño el tamaño de partícula de los cristales de cocleato de aminoglucósido, se añadieron a continuación 1,7 mg de sales biliares a la mezcla de los cocleatos de aminoglucósido. La mezcla se ajustó a continuación a una concentración de fármaco del aminoglucósido de 0,5 mg/ml con el tampón como la suspensión. Las formulaciones de cocleato de aminoglucósido finales contenían 0,97 mM.

N.º 10.2 Procedimiento para la formulación de aminoglucósidos con sales biliares (antes de calcio) para estudios *in vitro*.

Se filtraron 2 mg de aminoglucósido en 0,2 ml de agua estéril a través de un filtro de 0,22 µm y se combinaron con 20 mg de liposomas de PS de soja al 50 % en 2,0 ml de agua estéril (los liposomas de PS de soja se filtraron en primer lugar a través de filtros de 5, 0,8 y 0,45 µm) para formar liposomas que contenían el aminoglucósido. Con el fin de hacer más pequeño el tamaño de partícula de los cristales de cocleato de aminoglucósido, se añadieron a continuación 20,4 mg de sales biliares a la mezcla de los liposomas de aminoglucósido. A la mezcla resultante, se añadieron a continuación 0,159 ml de cloruro de calcio 0,1 M con mezcla vigorosa para formar los cocleatos de aminoglucósido. La mezcla se ajustó a continuación a una concentración de fármaco del aminoglucósido de 0,5 mg/ml con el mismo tampón como la suspensión. Las formulaciones de cocleato de aminoglucósido finales contenían 11,3 mM.

Se filtraron 2 mg de aminoglucósido en 0,2 ml de agua estéril a través de un filtro de 0,22 µm y se combinaron con 20 mg de liposomas de PS de soja al 50 % en 2,0 ml de agua estéril (los liposomas de PS de soja se filtraron en primer lugar a través de filtros de 5, 0,8 y 0,45 µm) para formar liposomas que contenían el aminoglucósido. Con el fin de hacer más pequeño el tamaño de partícula de los cristales de cocleato de aminoglucósido, se añadieron a continuación 13,6 mg de sales biliares a la mezcla de los liposomas de aminoglucósido. A la mezcla resultante, se añadieron a continuación 0,159 ml de cloruro de calcio 0,1 M con mezcla vigorosa para formar los cocleatos de aminoglucósido. La mezcla se ajustó a continuación a una concentración de fármaco del aminoglucósido de 0,5 mg/ml con el tampón como la suspensión. Las formulaciones de cocleato de aminoglucósido finales contenían 7,8 mM.

Se filtraron 2 mg de aminoglucósido en 0,2 ml de agua estéril a través de un filtro de 0,22 µm y se combinaron con 20 mg de liposomas de PS de soja al 50 % en 2,0 ml de agua estéril (los liposomas de PS de soja se filtraron en primer lugar a través de filtros de 5, 0,8 y 0,45 µm) para formar liposomas que contenían el aminoglucósido. Con el fin de hacer más pequeño el tamaño de partícula de los cristales de cocleato de aminoglucósido, se añadieron a continuación 6,8 mg de sales biliares a la mezcla de los liposomas de aminoglucósido. A la mezcla resultante, se añadieron a continuación 0,159 ml de cloruro de calcio 0,1 M con mezcla vigorosa para formar los cocleatos de aminoglucósido. La mezcla se ajustó a continuación a una concentración de fármaco del aminoglucósido de 0,5 mg/ml con el tampón como la suspensión. Las formulaciones de cocleato de aminoglucósido finales contenían 3,9 mM.

Se filtraron 2 mg de aminoglucósido en 0,2 ml de agua estéril a través de un filtro de 0,22 µm y se combinaron con 20 mg de liposomas de PS de soja al 50 % en 2,0 ml de agua estéril (los liposomas de PS de soja se filtraron en primer lugar a través de filtros de 5, 0,8 y 0,45 µm) para formar liposomas que contenían el aminoglucósido. Con el fin de hacer más pequeño el tamaño de partícula de los cristales de cocleato de aminoglucósido, se añadieron a continuación 3,4 mg de sales biliares a la mezcla de los liposomas de aminoglucósido. A la mezcla resultante, se

añadieron a continuación 0,159 ml de cloruro de calcio 0,1 M con mezcla vigorosa para formar los cocleatos de aminoglucósido. La mezcla se ajustó a continuación a una concentración de fármaco del aminoglucósido de 0,5 mg/ml con el tampón como la suspensión. Las formulaciones de cocleato de aminoglucósido finales contenían 1,95 mM.

5 Se filtraron 2 mg de aminoglucósido en 0,2 ml de agua estéril a través de un filtro de 0,22 μ m y se combinaron con 20 mg de liposomas de PS de soja al 50 % en 2,0 ml de agua estéril (los liposomas de PS de soja se filtraron en primer lugar a través de filtros de 5, 0,8 y 0,45 μ m) para formar liposomas que contenían el aminoglucósido. Con el fin de hacer más pequeño el tamaño de partícula de los cristales de cocleato de aminoglucósido, se añadieron a
10 continuación 1,7 mg de sales biliares a la mezcla de los liposomas de aminoglucósido. A la mezcla resultante, se añadieron a continuación 0,159 ml de cloruro de calcio 0,1 M con mezcla vigorosa para formar los cocleatos de aminoglucósido. La mezcla se ajustó a continuación a una concentración de fármaco del aminoglucósido de 0,5 mg/ml con el tampón como la suspensión. Las formulaciones de cocleato de aminoglucósido finales contenían 0,97 mM.

15 Las Figuras 5-11 muestran la eficacia de encocleación de sales biliares de aminoglucósido, incluyendo sales biliares de amikacina, sales biliares de gentamicina, y sales biliares de paromomicina.

20 El porcentaje de encocleación se determina por medición de la cantidad de sales biliares de aminoglucósido en el sobrenadante (ensayo de ninhidrina) después de la formación de los cocleatos y a continuación centrifugación. La cantidad en el sobrenadante se resta a continuación de la cantidad total durante el proceso de encocleación. Estos resultados demuestran claramente que PS de soja al 50 % es más eficaz en la encocleación para las concentraciones de sal biliar inferiores que PS al 75 % o PS al 99,99 %. A es sales biliares añadidas después de la encocleación. B es sales biliares añadidas antes de la encocleación.

25

REIVINDICACIONES

1. Cocleato que comprende:

- 5 un fosfolípido basado en soja que comprende fosfatidilserina de soja en una cantidad de un 45 % a un 55 % en peso del componente lipídico del cocleato,
un catión multivalente, y
un principio activo biológico.

10 2. El cocleato de la reivindicación 1 en el que el fosfolípido basado en soja es una mezcla compuesta por al menos fosfatidilserina de soja y ácido fosfatídico.

3. Método para la producción de cocleatos de fosfatidilserina basada en soja/principio activo biológico que comprende las etapas de:

- 15 a. preparar liposomas en un medio acuoso en el que los liposomas tienen (i) una bicapa lipídica que comprende fosfatidilserina basada en soja en una cantidad de un 45 a un 55 % en peso de la bicapa lipídica y (ii) una carga de un principio activo biológico;
b. añadir un catión multivalente a la suspensión de liposomas de (a) para formar los cocleatos de fosfatidilserina
20 de soja/principio activo biológico; y
c. recoger los cocleatos de fosfatidilserina basada en soja/principio activo biológico.

4. El método de la reivindicación 3, en el que en la etapa (a), el medio acuoso que contiene la suspensión de liposomas es un entorno tamponado que tiene un pH de 6,5-7,5, y la carga del principio activo biológico está a pH 10
25 o mayor antes de la adición a los liposomas, en el que la suspensión de liposomas está opcionalmente tamponada con fosfato.

5. El cocleato de las reivindicaciones 1 o 2 o el método de las reivindicaciones 3 o 4, en el que el principio activo biológico es al menos un miembro seleccionado entre el grupo que consiste en una proteína, un péptido pequeño, un polinucleótido, un aminoglucósido, un agente antiviral, un anestésico, un antibiótico, un agente antifúngico, un agente anticancerígeno, un inmunosupresor, un agente antiinflamatorio esteroideo, un agente antiinflamatorio no esteroideo, un tranquilizante, un suplemento nutricional, un producto de hierbas, una vitamina y un agente vasodilatador,
30 en el que el principio activo biológico es opcionalmente al menos un miembro seleccionado entre el grupo que consiste en un aminoglucósido, anfotericina B, aciclovir, adriamicina, carbamazepina, curcumina, melfalán, nifedipina, indometacina, naproxeno, estrógenos, testosteronas, esteroides, fenitoína, ergotaminas, cannabinoides, rapamicina, propanidid, propofol, alfadiona, equinomicina, nitrato de miconazol, tenipósido, un taxano, paclitaxel, y taxotere,
35 en el que el principio activo biológico es preferentemente anfotericina B, curcumina, amikacina, o un aminoglucósido.

6. El cocleato de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, o 5, o el método de una cualquiera de las reivindicaciones 3-5, en el que el catión multivalente es Ca^{++} , Zn^{++} , Ba^{++} , o Mg^{++} ,
40 en el que el catión multivalente es preferentemente Ca^{++} .

7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3-6, en el que la proporción en peso de la bicapa lipídica con respecto al principio activo biológico está entre 3:1 y 20:1.

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3-7, en el que el método comprende además una etapa de añadir sales biliares a la suspensión de los liposomas de (a) antes de la etapa (b) o añadir sales biliares a los cocleatos de fosfatidilserina basada en soja/principio activo biológico después de la etapa (b), en el que la proporción en peso de la bicapa lipídica con respecto a las sales biliares está entre 20:1 y 0,5:1, preferentemente, entre 10:1 y 3:1.
50

9. El cocleato de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 o 6, en el que el cocleato comprende además sales biliares
55 y/o en el que la proporción en peso del fosfolípido basado en soja con respecto a las sales biliares está entre 20:1 y 0,5:1, preferentemente, entre 10:1 y 3:1.

10. Una cantidad antifúngica eficaz de un cocleato que comprende (i) un fosfolípido basado en soja que comprende fosfatidilserina de soja en una cantidad de un 45 % a un 55 % en peso del componente lipídico del cocleato, (ii) un catión multivalente y (iii) un agente antifúngico para su uso para tratar un paciente con una infección fúngica.
60

11. Una cantidad antibacteriana eficaz de un cocleato que comprende (i) un fosfolípido basado en soja que comprende fosfatidilserina de soja en una cantidad de un 45 % a un 55 % en peso del componente lipídico del cocleato, (ii) un catión multivalente y (iii) un agente antibiótico para su uso para tratar un paciente con una infección bacteriana.
65

12. La cantidad antifúngica eficaz de un cocleato para el uso de la reivindicación 10, en la que el agente antifúngico es anfotericina B.

5 13. La cantidad antibacteriana eficaz de un cocleato para el uso de la reivindicación 11, en la que el agente antibiótico es un aminoglucósido.

14. La cantidad antibacteriana eficaz de un cocleato para el uso de la reivindicación 11, en la que el agente antibiótico es amikacina.

ACTIVIDAD *IN VITRO* DE COCLEATO DE AMIKACINA

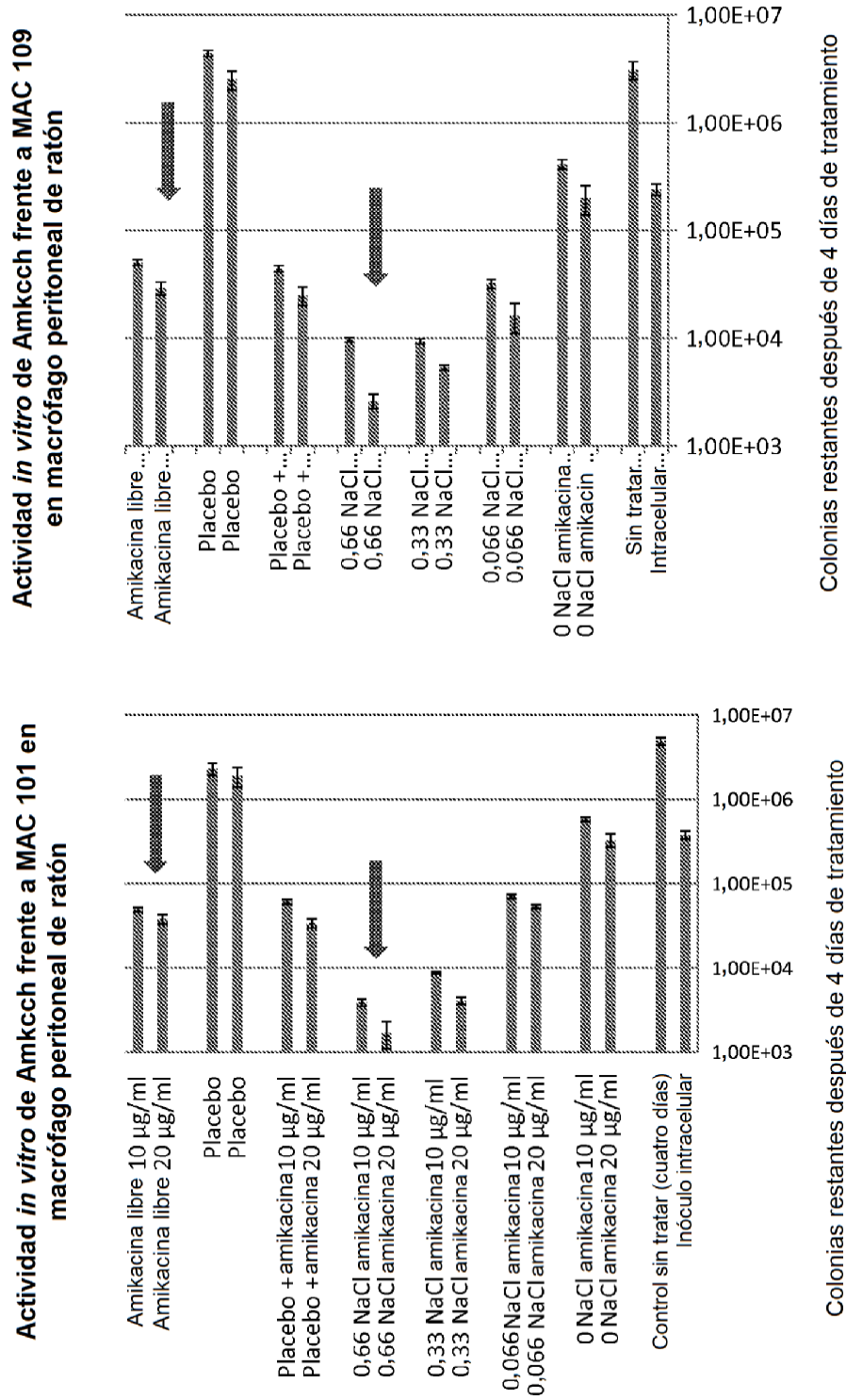


Figura 1

**EFICACIA *IN VIVO* DE AMKCCH EN UN MODELO DE RATÓN
DE INFECCIÓN CON MAC 101 - SUMINISTRO IP**

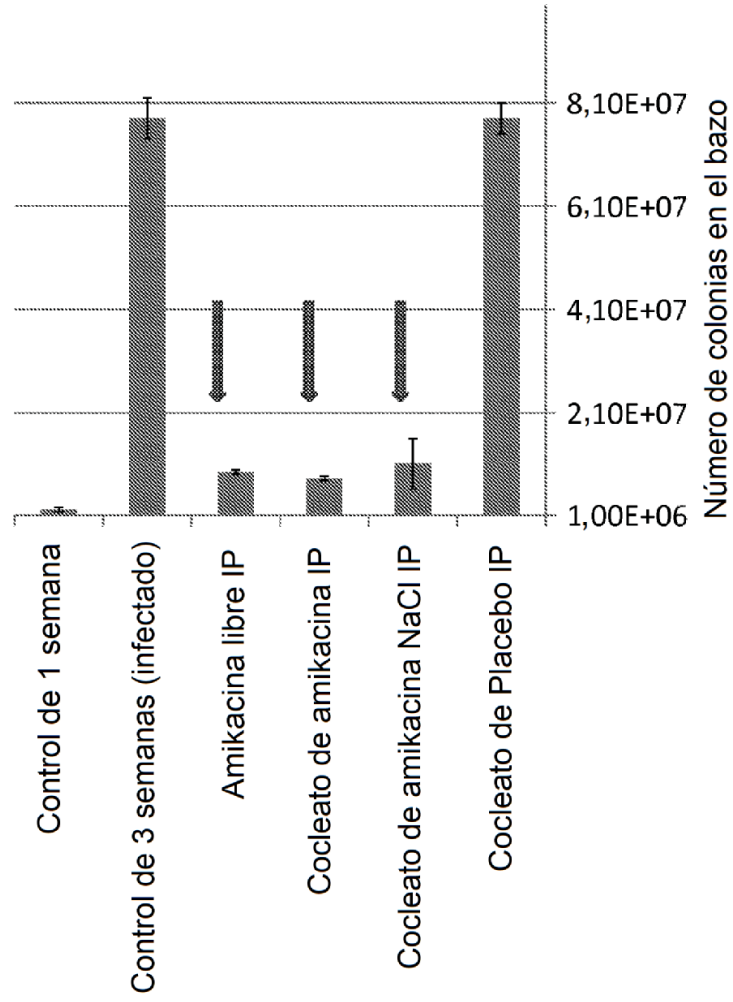


Figura 2

**EFICACIA *IN VIVO* DE AMKCCCH EN UN MODELO DE RATÓN
DE INFECCIÓN CON MAC 101 - SUMINISTRO ORAL**

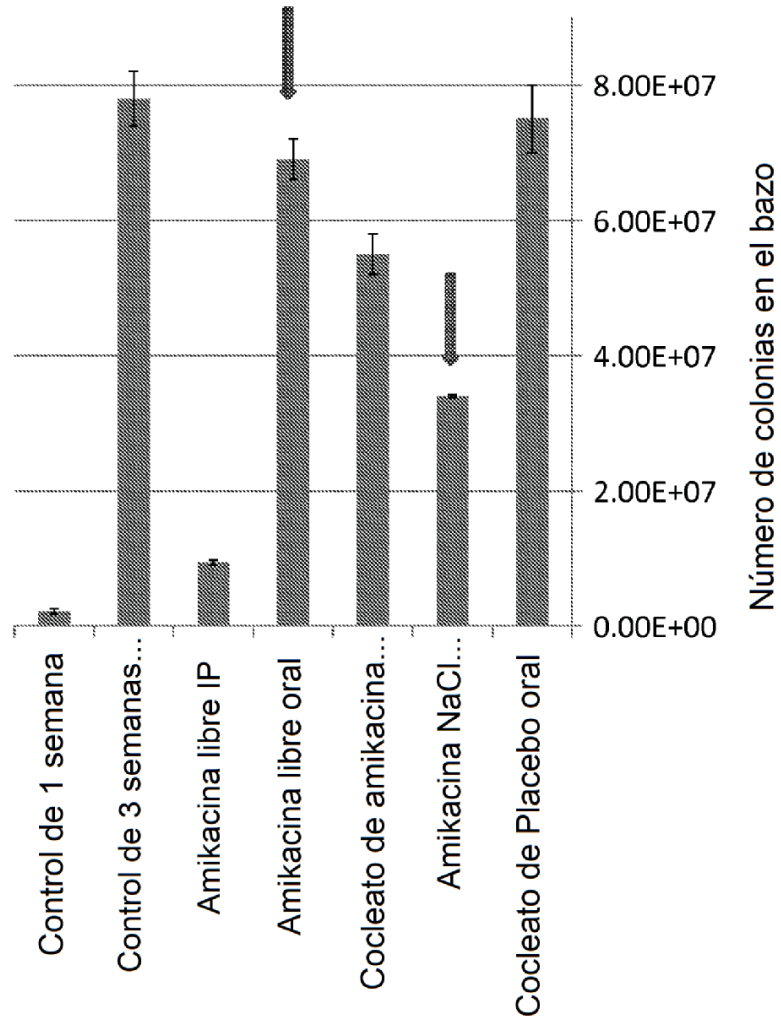
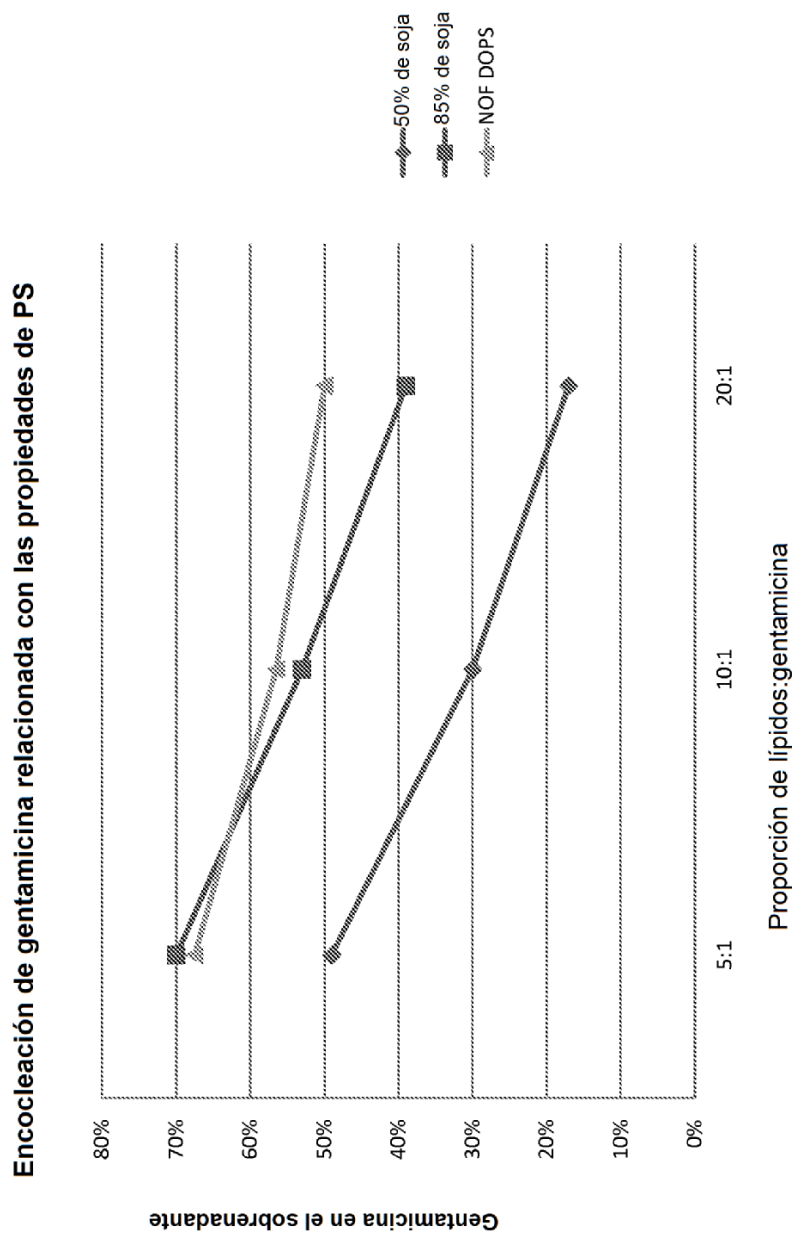
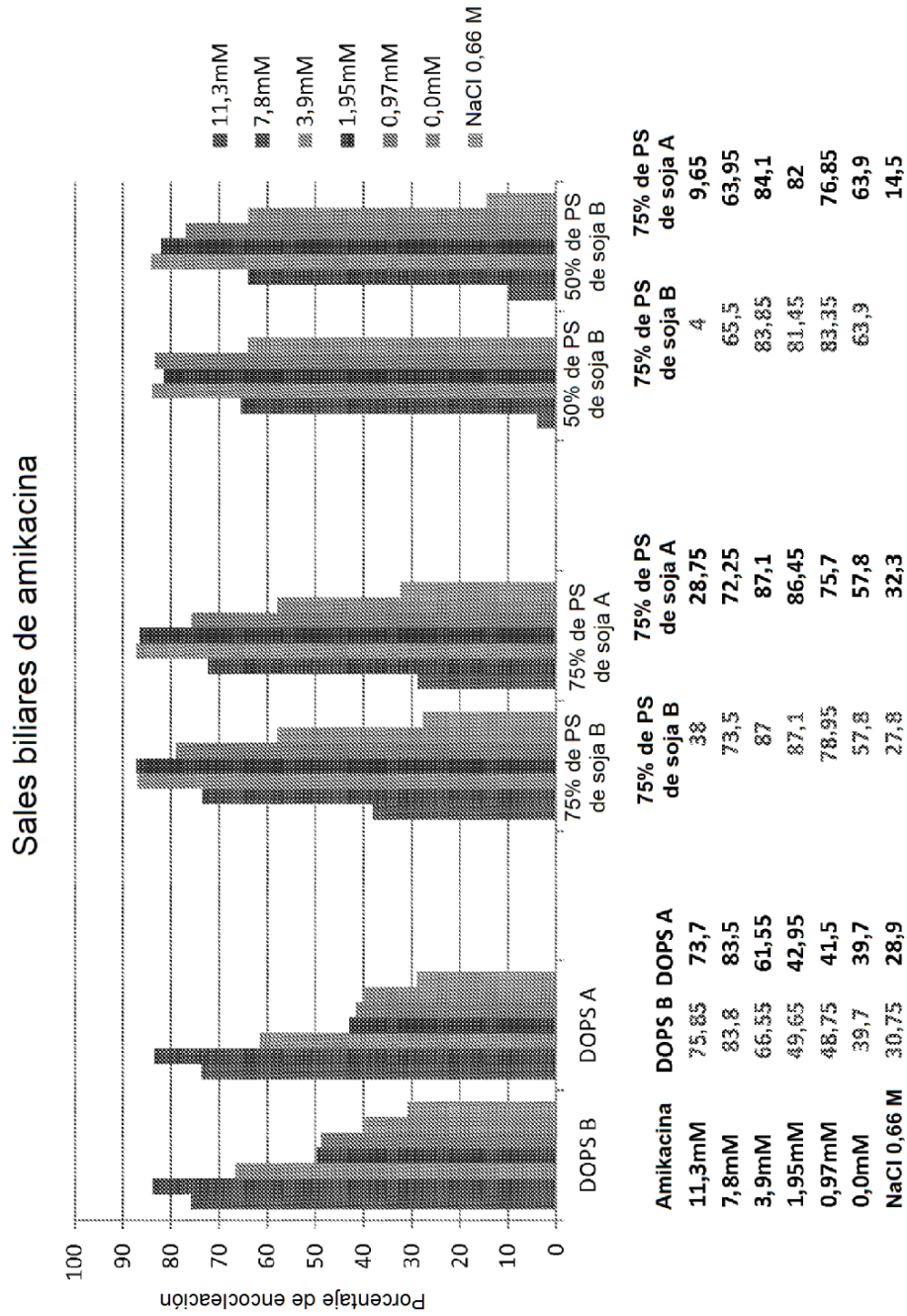


Figura 3



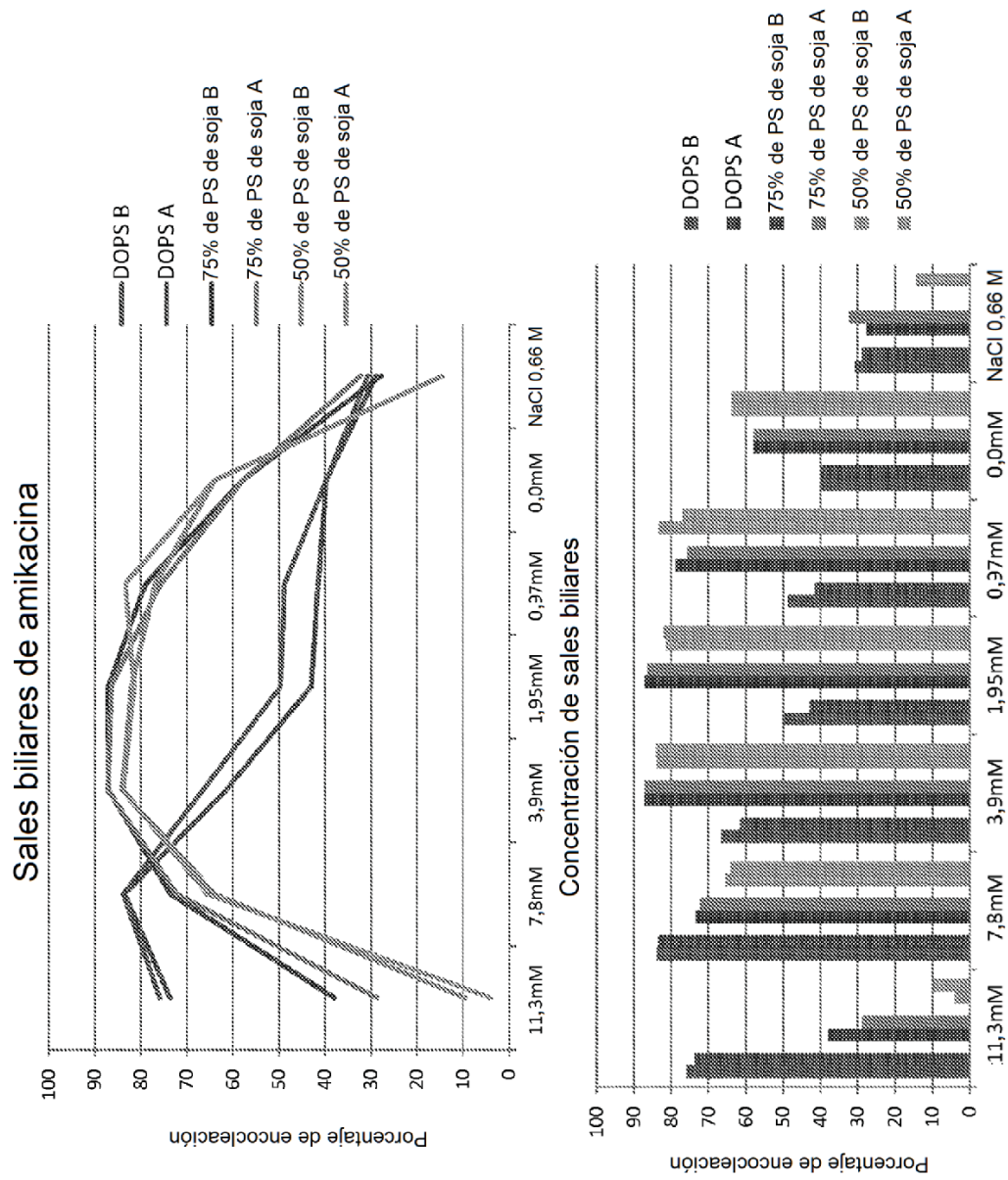
La eficacia de encocleación es el inverso del porcentaje en el sobrenadante

Figura 4



A es sales biliares añadidas después de la encocleación. B es sales biliares añadidas antes de la encocleación.

Figura 5



Concentración de sales biliares
Figura 6

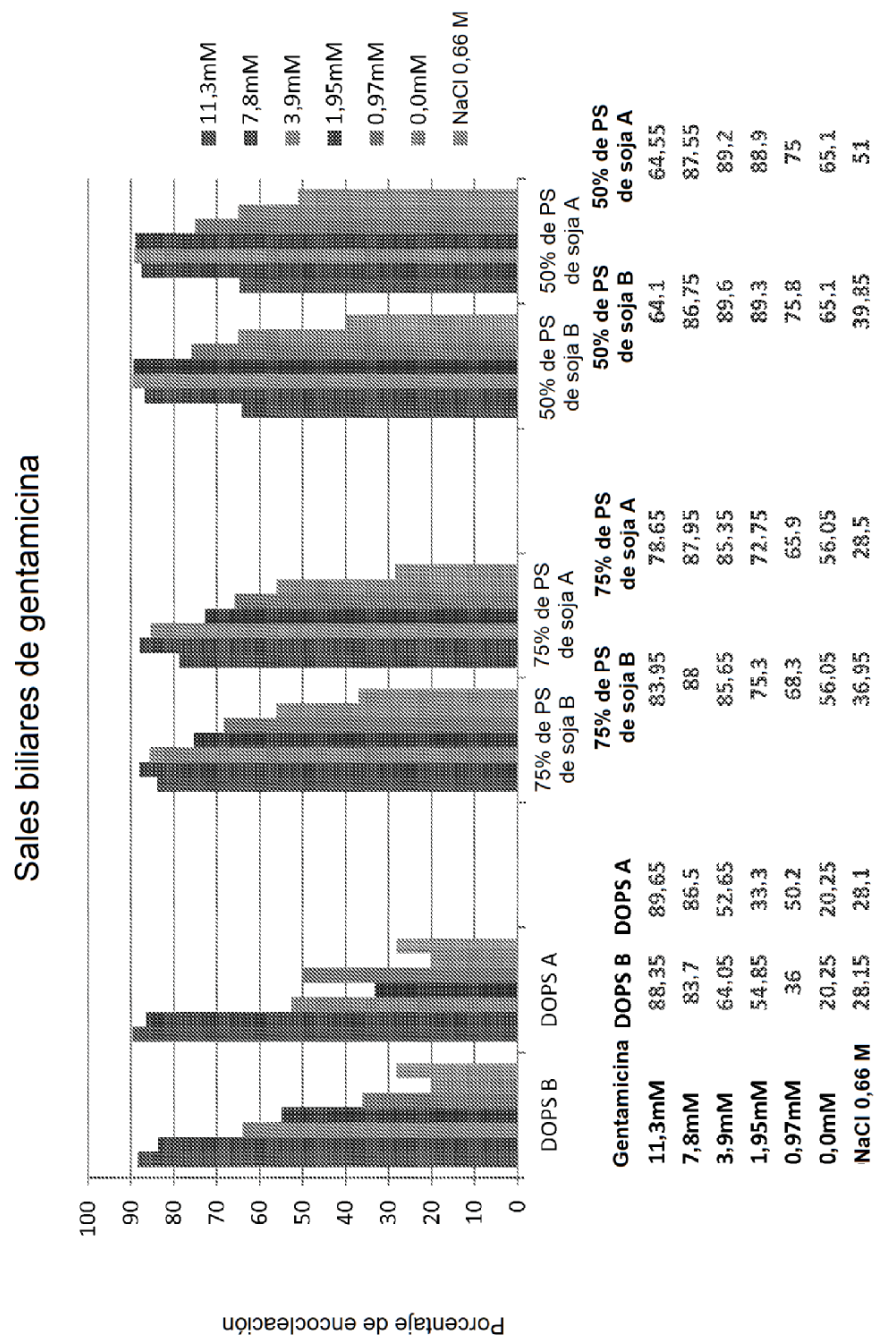
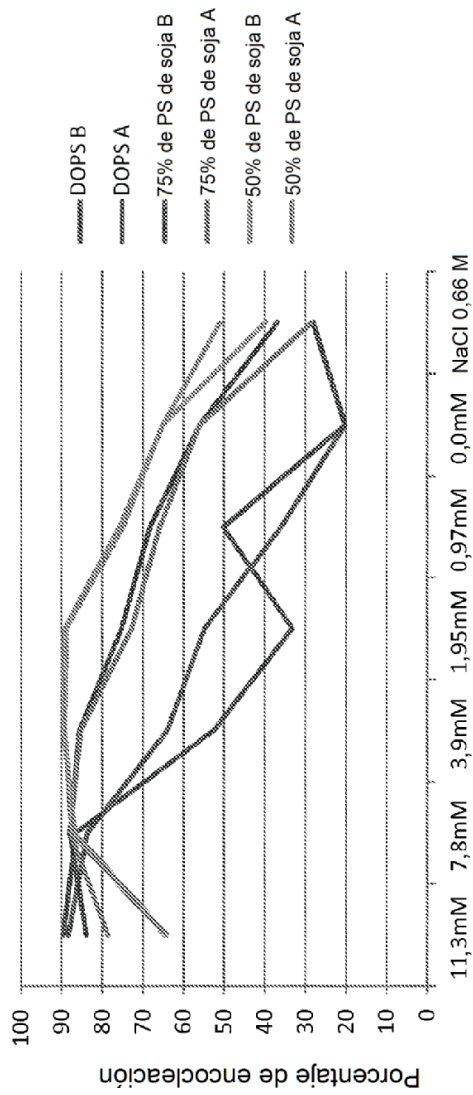
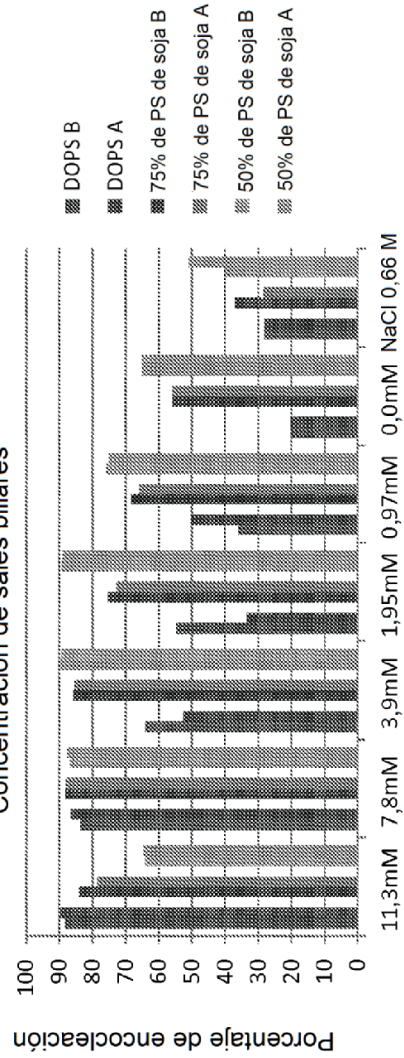


Figura 7

Sales biliares de amikacina



Concentración de sales biliares



Concentración de sales biliares

Figura 8

Sales biliares de paromomicina

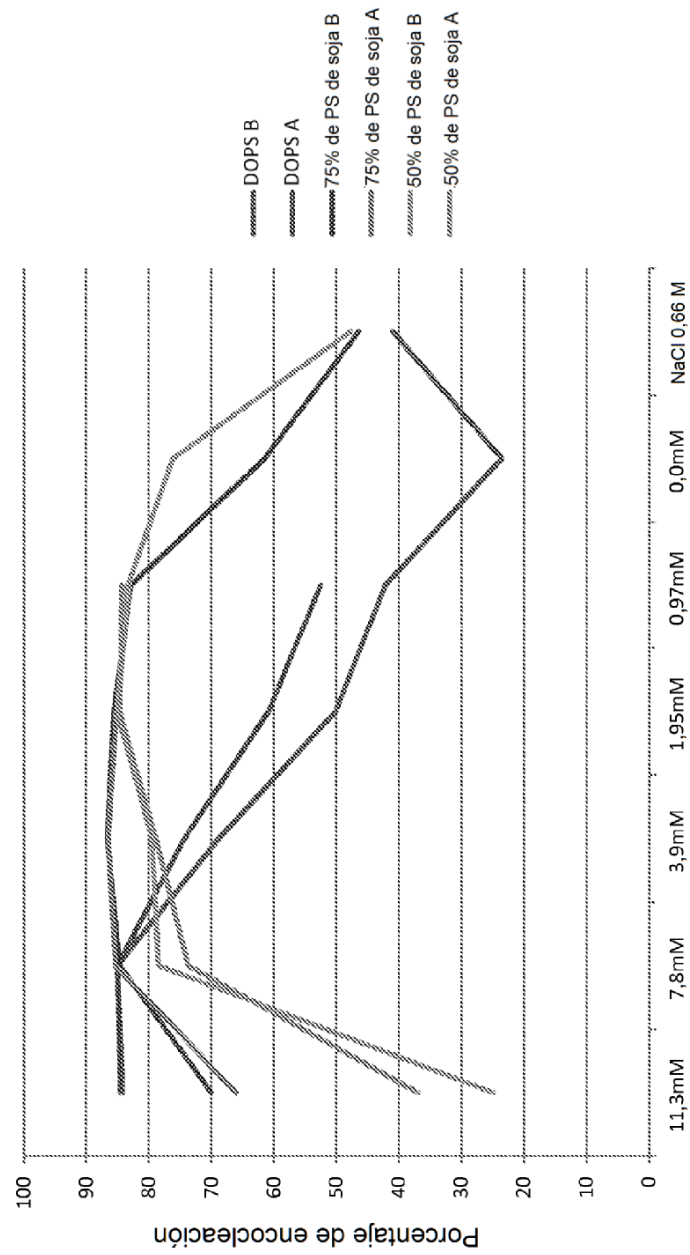


Figura 9

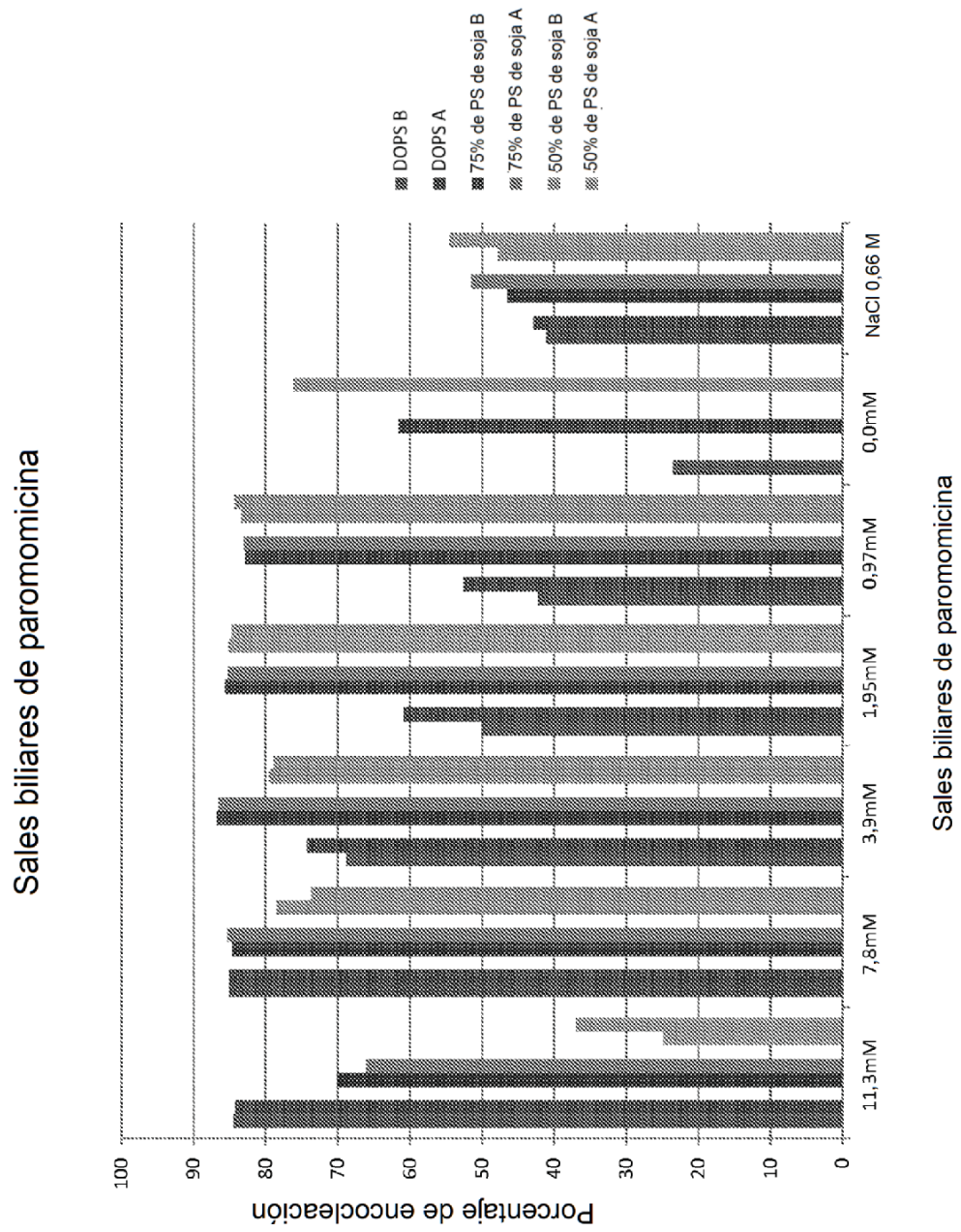


Figura 10

Sales biliares de paromomicina

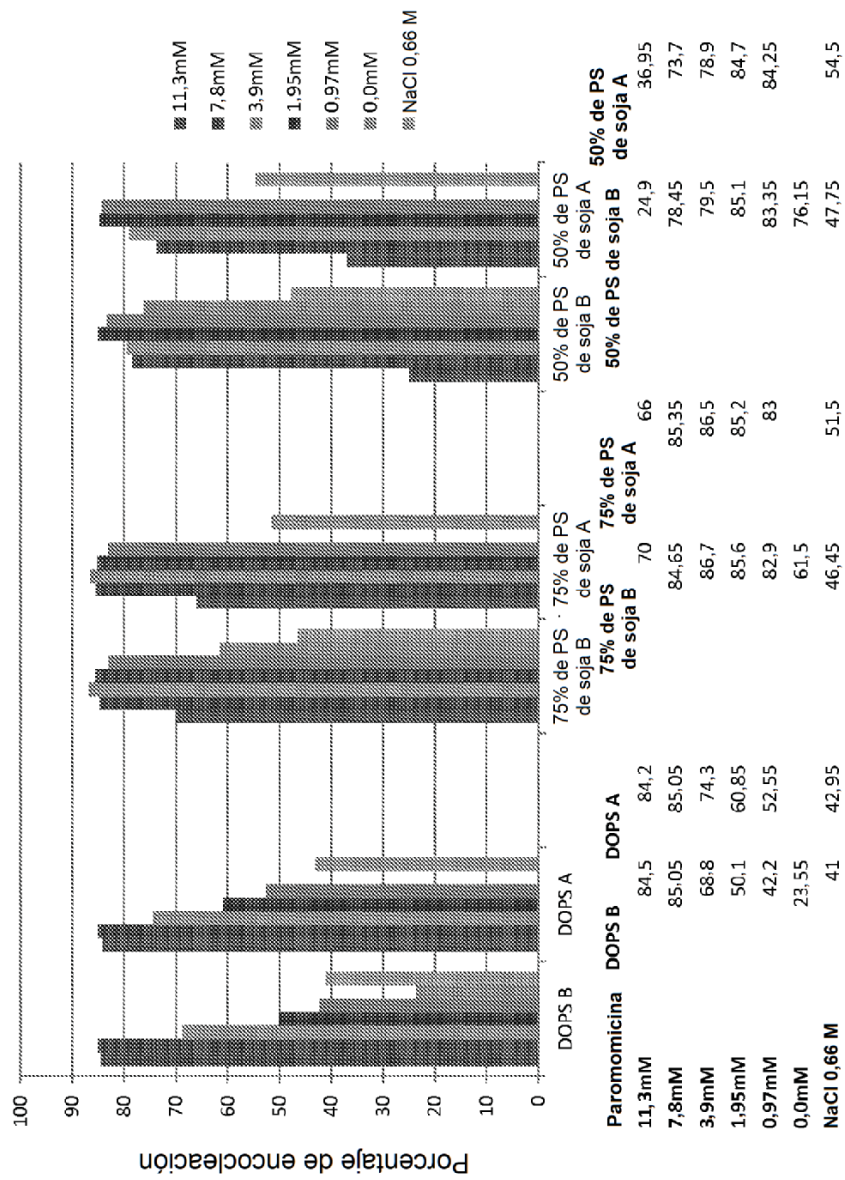


Figura 11