

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 946 919**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 9/107 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 31/167 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.08.2018** **PCT/US2018/048329**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.03.2019** **WO19046293**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.08.2018** **E 18773692 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.05.2023** **EP 3675816**

54 Título: **Composiciones anestésicas de liberación sostenida y métodos de preparación de las mismas**

30 Prioridad:

28.08.2017 US 201762550983 P

25.01.2018 US 201862621730 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.07.2023

73 Titular/es:

TLC BIOPHARMACEUTICALS, INC. (50.0%)

611 Gateway Blvd., Suite 830

South San Francisco CA 94080, US y

TAIWAN LIPOSOME COMPANY, LTD. (50.0%)

72 Inventor/es:

HONG, KEELUNG;

KAO, HAO-WEN;

LIN, YI-YU y

GUO, LUKE, S.S.

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 946 919 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

Composiciones anestésicas de liberación sostenida y métodos de preparación de las mismas

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad para la Solicitud Provisional de EE.UU. nº 62/550.983, presentada el 28 de agosto de 2017, y la Solicitud Provisional de EE.UU. nº 62/621.730, presentada el 25 de enero de 2018.

5 **Antecedentes****Campo técnico**

La presente invención se refiere a un sistema de aporte de fármacos para el aporte de una composición anestésica de liberación sostenida. La presente invención se refiere a un método para preparar el sistema de aporte de fármacos. La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica de liberación sostenida adaptada a un sistema de aporte de fármacos, que tiene una duración prolongada de la eficacia.

Descripción de la técnica relacionada

Se han presentado varios enfoques para desarrollar anestésicos locales de liberación sostenida, que incluyen 1) preparar anestésicos locales liposómicos multilaminares utilizando un método de deshidratación-rehidratación (Patente de EE.UU. nº 6.926.905), 2) preparación de anestésicos locales liposómicos multivesiculares gigantes (GMV) utilizando un procedimiento de carga en gradiente de sulfato de amonio (Patente de EE.UU. nº 7.357.944), y 3) preparación de anestésicos locales liposómicos multivesiculares (MVL) utilizando un procedimiento de agua en aceite (Patente de EE.UU. nº 8.182.835).

Para preparar anestésicos locales liposómicos multilaminares por el método de deshidratación-rehidratación, fosfolípidos y colesterol disueltos en *tert*-butanol se liofilizan y a continuación se hidratan para formar vesículas multilaminares (MLV) y las MLV se homogeneizan para obtener pequeñas vesículas unilaminares (SUV). Un anestésico local, para la composición del fármaco, particularmente bupivacaína 1, hidratar la película delgada con una solución tamponadora de pH 8,1 para formar bupivacaína encapsulada en liposomas, criosecar la bupivacaína encapsulada en liposomas junto con sorbitol como estabilizador de membrana, por ejemplo, bupivacaína, a continuación se disuelve en la solución de SUV, seguido de liofilización, hidratación y lavado con solución salina hiperosmótica para retirar bupivacaína libre.

Para preparar anestésicos locales liposómicos GMV, se obtiene una película lipídica delgada disolviendo el lípido en un disolvente, retirando el disolvente e hidratando con una solución de sulfato de amonio para formar las MLV. A continuación, las MLV se homogeneizan para obtener SUV, que se congelan y descongelan para producir GMV. El medio liposómico externo se reemplaza para crear un gradiente, un anestésico, por ejemplo, bupivacaína, se carga activamente en las GMV y se retira la bupivacaína no encapsulada.

Para preparar anestésicos locales de MVL, la bupivacaína, por ejemplo, se convierte en una forma de sal adecuada para que pueda disolverse fácilmente en una solución acuosa, y a continuación la solución acuosa de bupivacaína se mezcla con un componente lipídico en un disolvente orgánico con turbulencia mecánica para formar una emulsión de agua en aceite. A continuación, la emulsión de agua en aceite se dispersa en una segunda fase acuosa para formar esférulas de disolvente. Finalmente, se obtiene un anestésico local de MVL después de retirar el disolvente orgánico.

En 1991, Legros et al. (Patente de EE.UU. nº 5.244.678) divulgaron la preparación de bupivacaína liposómica MLV que comprende L- α -fosfatidilcolina (EPC) y colesterol en una relación molar de 4:3. Posteriormente, este grupo divulgó la preparación de anestésicos liposómicos formando una película lipídica comprendida por EPC y un anestésico apolar, seguido de la hidratación de la película lipídica con un tampón de pH controlado en el que el anestésico apolar permanece en forma descargada (Patente de EE.UU. nº 6.149.937). Por ejemplo, en la preparación de bupivacaína liposómica, la película lipídica se hidrata preferentemente con un tampón de pH 8,1 (el *pKa* de la bupivacaína es 8,1), que mantiene el 50% de la bupivacaína en forma descargada. Legros et al. también divulgaron un procedimiento para preparar composiciones criosecadas de fármacos anfífilos encapsulados en liposomas (WO1997042936), que se obtienen produciendo una película delgada que comprende componentes lipídicos y un anfílico y a continuación se rehidratan antes de su uso para obtener bupivacaína liposómica MLV.

El documento US 2015/250724 A1 se refiere a una preparación liposómica anestésica local de liberación controlada y de larga duración. El documento WO 2008/040556 A1 se refiere a composiciones vesiculares reconstituidas secas (DRV) y formulaciones acuosas de las mismas, que contienen uno o más agentes terapéuticos (por ejemplo, proteína hidrófila). El documento US 2017/035777 A1 se refiere a composiciones comprendidas por un vehículo o sistema de aporte y un agente activo dispersado dentro del vehículo o sistema de aporte, donde el vehículo o sistema de aporte contiene un polímero de poliortoéster y un disolvente aprótico polar.

Algunos de los ejemplos de la técnica anterior mencionados previamente no logran lograr un alto atrapamiento de un fármaco, es decir, una relación alta de fármaco a lípido. Aunque algunos de los ejemplos de la técnica anterior ilustran una formulación con una supuesta alta relación de fármaco a lípido, la fabricación de estas formulaciones implica procedimientos tediosos y altos costes de producción. Por lo tanto, existe una necesidad insatisfecha de

procedimientos de fabricación mejorados y simplificados para fabricar anestésicos locales liposómicos de liberación sostenida.

Compendio

La presente invención proporciona un método para preparar una composición anestésica de liberación sostenida usando liofilización en un solo paso para obtener una estructura lipídica altamente atrapada (HELS) que comprende un anestésico local y una mezcla de lípidos que incluye uno o más fosfolípidos y/o colesterol, y a continuación hidratando la HELS con una solución tamponadora de pH controlado para formar las vesículas multilaminares (MLV) con anestésico local atrapado y, opcionalmente, anestésico local no atrapado. Esta composición anestésica de liberación sostenida proporciona un inicio rápido de la anestesia y una duración prolongada de la anestesia local con una toxicidad mínima. En algunas realizaciones, el anestésico local es un anestésico de tipo amida.

Un ejemplo de anestésico local según la presente invención es un anestésico de tipo amida, como la ropivacaína. Otros anestésicos locales que pueden usarse incluyen lidocaína, bupivacaína y levobupivacaína. En algunas realizaciones, la HELS según la presente invención se prepara disolviendo ropivacaína apolar, fosfolípido y colesterol en un sistema disolvente, por ejemplo, *tert*-butanol solo o un codisolvente de *tert*-butanol/agua, seguido de la retirada del sistema disolvente utilizando una técnica de liofilización. En algunas realizaciones, se forma una composición de ropivacaína hidratando la HELS con una solución tamponadora farmacéuticamente aceptable a un pH superior a 5,5. La ropivacaína teóricamente descargada es el 0,8% de la ropivacaína disponible a pH 6,0 según el cálculo del *pKa* (el *pKa* de la ropivacaína es 8,1). Sin embargo, cuando se selecciona un tampón de pH 6,0 como solución de hidratación, la eficacia de asociación (EA) de la composición anestésica resultante es superior al 64%, lo que demuestra que el porcentaje de anestésico de tipo amida descargado no contribuye de manera crítica a la EA.

No obstante, el valor de pH de una solución tamponadora farmacéuticamente aceptable puede seleccionarse para ajustar la relación de anestésico atrapado a anestésico no atrapado en las MLV de una composición anestésica. En ciertas realizaciones, la relación molar de anestésico de tipo amida a fosfolípido ($\text{moles}_{\text{fármaco}}:\text{moles}_{\text{fosfolípido}}$) en la MLV con anestésico de tipo amida atrapado de la composición anestésica es de al menos 0,5:1, y puede proporcionar una cantidad suficiente de anestésico de tipo amida a un sujeto que lo necesita para prolongar la duración de la anestesia después de la administración local *in vivo*. Además, limitar la cantidad de anestésico de tipo amida no atrapado puede lograr una anestesia de inicio rápido con una exposición minimizada a la concentración plasmática máxima ($C_{\text{máxima}}$).

Otros objetivos, ventajas y características novedosas de la invención se harán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada cuando se toma junto con los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un gráfico que muestra la concentración plasmática de ropivacaína en ratas después de la inyección subcutánea (SC) de una composición de ropivacaína (hidratada con una solución de histidina de pH 5,5, cuadrado cerrado; hidratada con una solución de histidina de pH 6,0, triángulo cerrado; e hidratada con una solución de histidina de pH 6,5, círculo cerrado) o después de una inyección SC de ropivacaína no formulada (rombo abierto) (todos los datos se muestran como media $\pm$ desviación estándar (DE));

las figuras 2A y 2B son una serie de gráficos que representan el efecto después de la administración SC de una composición de ropivacaína (círculo), ropivacaína (cuadrado) y vehículo (triángulo) sobre los umbrales de retirada de la pata del ratón ante estímulos mecánicos (todos los datos se muestran como media $\pm$ error estándar de la media (SEM)); la figura 2A es una representación gráfica de tiempo frente al umbral de retirada (g); la figura 2B es una representación gráfica de tiempo frente al cambio en el umbral mecánico (%); y

las figuras 3A y 3B son una serie de gráficos que representan el efecto anestésico a lo largo del tiempo después de una única inyección intracutánea (IC) de una composición de ropivacaína en comparación con la misma dosis de ropivacaína (todos los datos se muestran como media $\pm$ SEM); la figura 3A ilustra el efecto anestésico sobre la cohorte de cobayas dosificadas a 3,0 mg por roncha IC de la composición de ropivacaína (cuadrado cerrado) o ropivacaína (cuadrado abierto); la figura 3B ilustra el efecto anestésico sobre la cohorte de cobayas dosificadas a 1,5 mg por roncha IC de la composición de ropivacaína (triángulo cerrado) o ropivacaína (triángulo abierto).

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Según se emplean anteriormente y a lo largo de la divulgación, se entenderá que los siguientes términos, a menos que se indique lo contrario, tienen los siguientes significados.

Según se usa en este documento, las formas singulares "un", "uno(a)" y "el/la" incluyen la referencia en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Todos los números en este documento pueden entenderse modificados por "aproximadamente", que, cuando se refiere a un valor medible como una cantidad, una duración temporal y similares, significa que abarca variaciones de $\pm 10\%$, preferiblemente $\pm 5\%$, más preferiblemente $\pm 1\%$, e incluso más preferiblemente $\pm 0,1\%$ del valor especificado,

ya que tales variaciones son apropiadas para obtener una cantidad deseada de fármaco, a menos que se especifique lo contrario.

La "eficacia de asociación" (AE) representa la cantidad de sustancia farmacológica atrapada por las vesículas multilaminares (MLV) en una composición anestésica y se calcula mediante la relación de la cantidad de sustancia farmacológica atrapada en las MLV a la cantidad de sustancia farmacológica en la composición anestésica original. La MLV con fármaco atrapado se puede obtener mediante métodos conocidos en la técnica según las propiedades físicas de la MLV y el conocimiento general en el campo de la técnica. Preferiblemente, la MLV con la sustancia farmacológica atrapada puede obtenerse separando el fármaco no atrapado de una composición anestésica utilizando métodos de centrifugación, por ejemplo, centrifugación tradicional, centrifugación en gradiente de densidad, centrifugación diferencial, o mediante métodos de filtración, por ejemplo, diafiltración, filtración en gel, filtración por membrana.

Vesícula multilaminar

El término "vesícula multilaminar (MLV)" o "vesículas multilaminares (MLV)", según se usa en el presente documento, se refiere a una partícula caracterizada por tener un espacio interior acuoso secuestrado de un medio externo por una membrana de una o más bicapas que forman una vesícula. Las membranas de bicapa de las vesículas multilaminares están típicamente formadas por lípidos, es decir, moléculas anfifílicas de origen sintético o natural que comprenden dominios hidrófobos e hidrófilos espacialmente separados. En ciertas realizaciones de la presente invención, una vesícula multilaminar está formada por más de una capa de membrana de bicapa lipídica.

En general, las membranas de bicapa de MLV comprenden una mezcla de lípidos que típicamente incluye lípidos de cadena dialifática, como fosfolípidos, diglicéridos, glucolípidos dialifáticos, lípidos individuales como esfingomielina y glucoesfingolípido, esteroides como colesterol y derivados del mismo, y combinaciones de los mismos. Ejemplos de fosfolípidos según la presente invención incluyen, pero no se limitan a, 1,2-dilauroil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DLPC), 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DMPC), 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DPPC), 1-palmitoil-2-estearoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (PSPC), 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (POPC), 1,2-diestearoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DSPC), 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DOPC), fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC), 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) (sal de sodio) (DMPG), 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) (sal de sodio) (DPPG), 1-palmitoil-2-estearoil-*sn*-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) (sal de sodio) (PSPG), 1,2-diestearoil-*sn*-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) (sal de sodio) (DSPG), 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) (DOPG), 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfo-L-serina (sal de sodio) (DMPS), 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfo-L-serina (sal de sodio) (DPPS), 1,2-diestearoil-*sn*-glicero-3-fosfo-L-serina (sal de sodio) (DSPS), 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfo-L-serina (DOPS), 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfato (sal de sodio) (DMPA), 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfato (sal de sodio) (DPPA), 1,2-diestearoil-*sn*-glicero-3-fosfato (sal de sodio) (DSPA), 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfato (sal de sodio) (DOPA), 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (DPPE), 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (POPE), 1,2-diestearoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE), 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfo-(1'-mio-inositol) (sal de amonio) (DPPI), 1,2-diestearoil-*sn*-glicero-3-fosfoinositol (sal de amonio) (DSPI), 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfo-(1'-mio-inositol) (sal de amonio) (DOPI), cardiolipina, L- α -fosfatidilcolina (EPC) y L- α -fosfatidiletanolamina (EPE).

Anestésicos locales

El término "anestésicos locales" se refiere a uno o más grupos de sustancias que provocan pérdida de sensibilidad en una zona circunscrita de un sujeto provocada por la depresión de la excitación en las terminaciones nerviosas o la inhibición del proceso de conducción en los nervios periféricos. En algunas realizaciones, los anestésicos locales son anestésicos de tipo amida. La estructura típica de los anestésicos de tipo amida contiene una parte lipófila y una parte hidrófila que se conectan mediante un enlace -NHCO- cerca del centro de la molécula. Anestésicos de tipo amida adecuados incluyen, entre otros, lidocaína, bupivacaína, levobupivacaína, ropivacaína, mepivacaína, prilocaina, articaína y prilocaína. En determinadas realizaciones, el anestésico de tipo amida es la base de ropivacaína.

Estructura lipídica altamente atrapada

El término "estructura lipídica altamente atrapada" (HELS) se refiere a una torta liofilizada en fase sólida o un polvo seco que contiene una mezcla de lípidos y uno o más anestésicos de tipo amida, que se puede fabricar, almacenar a largo plazo para prolongar la vida útil de la composición, e hidratar inmediatamente antes del uso clínico. La mezcla de lípidos descrita anteriormente puede comprender uno o más fosfolípidos sin colesterol o puede comprender uno o más fosfolípidos con un porcentaje molar de colesterol no superior al 50% con respecto a la cantidad de la mezcla de lípidos total. Alternativamente, el porcentaje molar de colesterol sobre la base de la mezcla de lípidos es de aproximadamente 0% a aproximadamente 50% y, opcionalmente, de aproximadamente 33% a aproximadamente 40%. En algunas realizaciones de la presente invención, el fosfolípido o los fosfolípidos y el colesterol están en una relación molar de 1:1 a 3:1.

La HELS se puede preparar 1) disolviendo una mezcla de lípidos y uno o más anestésicos de tipo amida en un sistema disolvente para formar una estructura líquida que comprende uno o más disolventes para formar una solución homogénea, y 2) retirando el disolvente o los disolventes para solidificar la formulación de la mezcla de lípidos y el anestésico o los anestésicos de tipo amida. La retirada del disolvente se puede realizar utilizando técnicas conocidas

tales como criosecado (lío-filización) o secado por aspersión. Ejemplos de sistemas disolventes adecuados para el criosecado incluyen, entre otros, *terc*-butanol y sistemas de codisolventes de *terc*-butanol/agua con o sin otros disolventes no acuosos tales como acetona, acetonitrilo, etanol, *n*-propanol, isopropanol, *n*-butanol, metanol, diclorometano, dimetilsulfóxido y tetracloruro de carbono. Ejemplos de sistemas disolventes adecuados para el secado por aspersión incluyen, entre otros, agua, etanol, metanol, cloroformo, diclorometano, éter dietílico, tetracloruro de carbono, acetato de etilo y dioxano.

Composición anestésica

El término "composición anestésica" se refiere a un producto vesicular multilaminar (MLV) adecuado para la administración local. En ciertas realizaciones, una composición anestésica comprende un anestésico de tipo amida atrapado por MLV así como un anestésico de tipo amida no atrapado. El término "atrapar" o "atrapamiento" se refiere a la membrana de bicapa de MLV que encapsulan, embeben o se asocian con una sustancia farmacológica elegida. Las MLV con anestésico de tipo amida atrapado se pueden obtener mediante métodos conocidos en la técnica, preferiblemente separando el anestésico de tipo amida no atrapado de la composición anestésica usando métodos de centrifugación, por ejemplo, centrifugación tradicional, centrifugación en gradiente de densidad, centrifugación diferencial, o mediante métodos de filtración, por ejemplo, diafiltración, filtración en gel, filtración por membrana. La distribución de tamaños de las MLV con anestésico de tipo amida atrapado según la presente invención puede determinarse mediante diversos métodos conocidos en la técnica. Un tamaño de partícula ejemplar de MLV con anestésico de tipo amida atrapado no es inferior a 1 µm; y opcionalmente, es mayor de 5 µm, tal como en un intervalo de 5 µm a 50 µm, o de 10 µm a 25 µm. Alternativamente, el diámetro mediano (D50) de las MLV con anestésico de tipo amida atrapado de la composición anestésica no es inferior a 1 µm; y, opcionalmente, es mayor de 5 µm, tal como en un intervalo de 5 µm a 50 µm, o de 10 µm a 25 µm.

Para preparar la composición anestésica para su uso, la HELS se hidrata con una solución tamponadora acuosa a un valor de pH superior a 5,5. En algunas realizaciones, la solución tamponadora acuosa tiene un intervalo de pH de 5,5 a 8,0 y opcionalmente de 6,0 a 7,5.

Soluciones tamponadoras acuosas adecuadas según la presente invención incluyen, entre otras, citrato, acetato, malato, piperazina, succinato, ácido 2-(*N*-morfolino)etanosulfónico (MFS), histidina, bis-tris, fosfato, etanolamina, ácido *N*-(2-acetamido)iminodiacético (ADA), carbonato, ácido *N*-(2-acetamido)-2-aminoetanosulfónico (ACES), ácido 1,4-piperazindietanosulfónico (PIPES), ácido 3-morfolino-2-hidroxipropanosulfónico (MOPSO), imidazol, ácido *N,N*-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico (BES), ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-etanosulfónico (HEPES), trietanolamina, lisina, tris y glicilglicina. La cantidad de anestésico de tipo amida no atrapado en la composición se puede ajustar en función del coeficiente de distribución del anestésico seleccionando un valor de pH apropiado para la solución tamponadora acuosa en función de la indicación clínica y la dosis de inyección total.

En algunas realizaciones, la solución tamponadora acuosa comprende histidina en una concentración que varía de 1 mM a 200 mM, de 10 mM a 150 mM o de 40 mM a 120 mM.

La cantidad de anestésico de tipo amida no atrapado es una función de la eficacia de asociación (AE) de la composición anestésica, que se determina mediante un método de centrifugación. Matemáticamente, la cantidad de anestésico de tipo amida no atrapado se expresa de la siguiente manera:

$$A_{no\ atrapado} = A_{total} \times (1 - AE)$$

donde $A_{no\ atrapado}$ es la cantidad de anestésico de tipo amida no atrapado; A_{total} es la cantidad total de anestésico de tipo amida en la composición anestésica; y AE se obtiene dividiendo la cantidad de anestésico de tipo amida atrapado en las MLV por la cantidad total de anestésico de tipo amida en la composición anestésica. AE según la presente invención es al menos 60% y, opcionalmente, de 70% a 95%.

La relación molar de anestésico de tipo amida a fosfolípido ($\text{moles}_{\text{fármaco}}:\text{moles}_{\text{fosfolípido}}$, D:PL) de las MLV con anestésico de tipo amida atrapado es preferentemente de al menos 0,5:1, incluidos, entre otros, 0,7:1, 0,9:1, 1,2:1 o 1,4:1, y el diámetro mediano (D50) de las MLV con anestésico de tipo amida atrapado es preferentemente no inferior a 1 µm, por ejemplo, no inferior a 5 µm; y, opcionalmente, dentro de un intervalo de 5 µm a 20 µm, o de 5 µm a 15 µm.

La concentración de anestésico de tipo amida de la composición anestésica debe ser superior a 2 mg/ml para lograr un beneficio terapéutico clínico. Concentraciones adecuadas de anestésico de tipo amida incluyen, entre otras, de 2 mg/ml a 30 mg/ml y de 10 mg/ml a 20 mg/ml. La cantidad restringida de anestésico no atrapado en las composiciones anestésicas de la invención puede proporcionar el beneficio de lograr una dosis de tolerancia máxima más alta (dependiendo de la concentración plasmática de anestésico que provoque toxicidad en el sistema nervioso central y el sistema cardiovascular) y puede usarse para proporcionar una eficacia de inicio rápido. En algunas realizaciones, la $C_{\text{máxima}}$ después de la administración de una composición de ropivacaína es el 16,7% de la que se obtiene después de la administración de ropivacaína sin formular, lo que indica que se puede usar una dosis clínica aprobada 6 veces más alta dentro del margen de seguridad de este anestésico.

Para uso clínico, la AE en ciertas realizaciones de la invención varía de 70% a 95%. Las MLV restantes con anestésico de tipo amida atrapado actúan como depósito para liberar gradualmente el anestésico de tipo amida en el entorno

local de una manera que mantiene la dosis terapéuticamente eficaz en el la zona local. En algunas realizaciones, la semivida de la ropivacaína derivada de una única administración SC de una composición de ropivacaína según la invención se prolonga al menos 10 veces en comparación con la de ropivacaína no formulada. La duración del efecto anestésico después de la administración de la composición de ropivacaína de la invención se extiende significativamente más allá de la de la ropivacaína sin formular.

La divulgación se describirá adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos específicos no limitativos.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran la preparación y las propiedades de ciertas realizaciones de la presente invención.

Ejemplo 1

10 Preparación de composiciones de ropivacaína

La HSPC y la DMPC se adquirieron de NOF Corporation. El colesterol se adquirió de Sigma-Aldrich y la ropivacaína se adquirió de Apollo Scientific o Dishman. Todos los demás productos químicos se adquirieron de Sigma-Aldrich.

15 Para preparar varias HELS, se usaron diferentes mezclas de lípidos con ropivacaína en las siguientes relaciones molares: HSPC:colesterol:ropivacaína = 1,5:1:2,2, HSPC:colesterol:ropivacaína = 2:1:2,9, DMPC:colesterol:ropivacaína = 2:1: 2,9 y DMPC:DPPG:colesterol:ropivacaína = 1,85:0,15:1:2,9. Los lípidos y la ropivacaína se mezclaron y a continuación se disolvieron en *tert*-butanol o en un sistema de codisolventes de *tert*-butanol/agua (1/1, vol/vol) para formar las estructuras líquidas. Cada muestra de estructura líquida se congeló durante de 30 a 60 minutos y a continuación se liofilizó durante la noche para obtener HELS en forma de torta liofilizada.

20 Para preparar las estructuras lipídicas para el control del vehículo, se pesó una mezcla de lípidos con una relación molar de DMPC:colesterol = 2:1 y a continuación se disolvió en *tert*-butanol. La muestra resultante se congeló durante 60 minutos y a continuación se liofilizó durante la noche para obtener una torta liofilizada de vehículo.

Las tortas liofilizadas se hidrataron con diferentes tampones a diferentes valores de pH a temperaturas adecuadas (por ejemplo, superiores a 25°C/temperatura ambiente (TA) para DMPC y superior a 60°C para HSPC) durante de 2 a 10 minutos para formar composiciones de ropivacaína y composiciones de vehículo, respectivamente.

25 Ejemplo 2

Caracterización de las composiciones de ropivacaína

La eficacia de asociación (AE) de cada preparación descrita anteriormente se determinó como sigue. Doscientos microlitros de cada composición de ropivacaína se transfirieron a una centrífuga y se centrifugaron durante 5 min a 3000 × g a 4°C. Después de decantar el sobrenadante, se obtuvieron MLV con ropivacaína atrapada y se resuspendieron hasta un volumen final de 200 µl. Se estableció un estándar de absorbancia de referencia para cada sustancia farmacológica (p. ej., ropivacaína) basándose en soluciones de la sustancia farmacológica de prueba de concentración conocida. Las cantidades de fármaco tanto de la composición original de ropivacaína como de las MLV con ropivacaína atrapada se midieron utilizando un espectrofotómetro ultravioleta/visible (UV/Vis). La AE representa la relación de la cantidad de fármaco en las MLV con ropivacaína atrapada a la cantidad de fármaco en la composición de ropivacaína. La D:PL de MLV con ropivacaína atrapada se calculó multiplicando la D:PL de HELS por AE. Un resumen de los resultados se muestra en la Tabla 1.

El tamaño de partícula de cada composición de ropivacaína se midió utilizando un analizador de difracción láser (LA-950V2, Horiba). El diámetro mediano (D50) de las MLV con ropivacaína atrapada formadas al hidratar la HELS (DMPC:colesterol = 2:1) con tampón de histidina 50 mM (pH 6,5) era 11,1 ± 0,3 µm (n = 3).

Tabla 1. La AE y la relación molar calculada de anestésico de tipo amida a fosfolípido (D:PL) de diversas formulaciones

Composición lipídica	Estado de hidratación		Concentración de ropivacaina (mg/ml) de la composición de ropivacaina	EA (%)	Relación D:PL calculada de MLV con ropivacaina atrapada
	Tampones	pH			
HSPC:colesterol = 3:2	Tampón de citrato 100 mM en solución de NaCl al 0,9%	5,0	60	22	0,32
HSPC:colesterol = 3:2	Tampón de histidina 100 mM en solución de NaCl al 0,9%	6,0	60	64	0,93
HSPC:colesterol = 3:2	Tampón de fosfato 50 mM	6,5	60	89	1,30
HSPC:colesterol = 3:2	Tampón de histidina 50 mM	6,5	60	93	1,36
HSPC:colesterol = 3:2	Tampón de histidina 100 mM en solución de NaCl al 0,9%	7,0	60	86	1,25
HSPC:colesterol = 3:2	Tampón de tris 100 mM en solución de NaCl al 0,9%	8,0	60	100	1,46
HSPC:colesterol = 2:1	Tampón de histidina 50 mM	6,0	60	94	1,37
DMPC:colesterol = 2:1	Tampón de histidina 50 mM	5,5	TA	71	1,03
DMPC:colesterol = 2:1	Tampón de histidina 50 mM	6,0	TA	84	1,22
DMPC:colesterol = 2:1 (codisolvente)	Tampón de histidina 50 mM	6,0	TA	82	1,20
DMPC:colesterol = 2:1	Tampón de histidina 50 mM	6,5	TA	90	1,31

Ejemplo 3

Estudio farmacocinético de composiciones de ropivacaína

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley hembra canuladas en la vena yugular (JVC) para un estudio farmacocinético (PK). Las ratas se alojaron en una sala de mantenimiento que funciona con un ciclo circadiano de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad y que proporciona acceso libre a agua y alimentos. Las composiciones de ropivacaína se prepararon según el Ejemplo 1, en el que las HELS de DMPC:colesterol:ropivacaína = 2:1:2,9 se hidrataron con tampones de histidina 50 mM a pH 5,5, 6,0 y 6,5, respectivamente. La ropivacaína sin formular se preparó disolviendo monohidrato de hidrocloreto de ropivacaína en NaCl al 0,9% hasta 24,0 mg/ml. Los perfiles PK *in vivo* de las respectivas composiciones de ropivacaína liposómicas y de ropivacaína no formulada administrada a grupos de ratas ($n = 3$ o 4 por grupo) se compararon después de la inyección subcutánea (SC) a una dosis de 20,0 mg/kg de ropivacaína. Se recogieron muestras de sangre a los 15 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 8 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas después de la inyección. Se obtuvieron muestras de plasma por centrifugación y se mantuvieron congeladas a -80°C hasta su análisis. Los datos PK obtenidos de las muestras se analizaron utilizando un modelo no compartimental (programa WinNonlin®). Los parámetros PK derivados de este modelo se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Parámetros PK derivados de ratas después de una sola administración SC de composiciones de ropivacaína o ropivacaína no formulada

Parámetro	Ropivacaína	Composición de ropivacaína		
		Hidratada con solución de histidina a pH 5,5	Hidratada con solución de histidina a pH 6,0	Hidratada con solución de histidina a pH 6,5
n	4	3	4	4
$T_{1/2}$ (h)	$3,1 \pm 1,4$	$33,9 \pm 24,3$	$31,8 \pm 16,9$	$34,9 \pm 16,0$
$C_{m\acute{a}xima}$ (ng/ml)	$801,8 \pm 208,0$	$444,7 \pm 74,0$	$284,5 \pm 61,3$	$133,5 \pm 34,8$
$T_{m\acute{a}ximo}$ (h)	$1,8 \pm 0,5$	$1,7 \pm 0,6$	$1,5 \pm 0,6$	$1,5 \pm 0,6$
AUC_{0-1} (h×ng/ml)	4035 ± 632	3415 ± 142	3511 ± 462	3665 ± 930

La $C_{m\acute{a}xima}$ de la composición de ropivacaína era menor cuando el valor de pH de la solución de hidratación era más alcalino. En comparación con el grupo de ropivacaína sin formular, la $C_{m\acute{a}xima}$ era del 55,5% para la composición de ropivacaína hidratada con la solución de histidina de pH 5,5, del 35,5% para la composición de ropivacaína hidratada con la solución de histidina de pH 6,0 y del 16,7% para la composición de ropivacaína hidratada con la solución de histidina de pH 6,5. La semivida ($T_{1/2}$) de las tres composiciones de ropivacaína se prolongó significativamente en comparación con la de la ropivacaína sin formular. Basado en la superficie bajo la curva (AUC_{0-1}), se liberó del 84,6% al 90,8% de la ropivacaína 72 horas después de la inyección de la composición de ropivacaína. Los resultados del estudio PK se muestran en la Figura 1. Después de la administración de la misma dosis, la ropivacaína en el plasma pudo detectarse hasta las 72 horas en todos los grupos de composición de ropivacaína, sin embargo, la ropivacaína no pudo detectarse en el plasma después de 24 horas en el grupo de la ropivacaína no formulada.

Ejemplo 4

Efecto anestésico en un modelo de ratón con incisión en la pata

Se usaron ratones C57/BL6 macho silvestres (8 semanas de edad, Envigo) para evaluar la eficacia anestésica después de una incisión en la pata como se describe en *Anesthesiology*, octubre 2003; 99(4): 1023-7 y *J Neurosci. Methods*, julio de 1994; 53(1): 55-63. La sala de mantenimiento de ratones funciona con un ciclo circadiano de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad para garantizar que no se utilizaran luces y que los investigadores y técnicos no entraran en la sala de los ratones durante el ciclo de oscuridad. La composición de ropivacaína y el vehículo se prepararon según el Ejemplo 1, en el que se hidrataron cada una de una HELS de DMPC:colesterol:ropivacaína = 2:1:2,9 y una estructura lipídica del vehículo de DMPC:colesterol = 2:1 con tampón de histidina 50 mM a pH 6,0. La ropivacaína sin formular se preparó disolviendo ropivacaína en una solución de sacarosa al 9,4% que contenía HCl 0,1 N a 18,3 mg/ml. El estudio de eficacia *in vivo* de la composición de ropivacaína, la ropivacaína sin formular y el vehículo ($n = 8$ por grupo) se compararon después de la inyección SC después de la incisión en la pata a la dosis de 0,18 mg de ropivacaína por incisión.

Se tomaron umbrales mecánicos (von Frey) de referencia ($T = -2$ horas) de 32 ratones antes de la cirugía; los umbrales de referencia se midieron en la pata trasera izquierda del ratón. Los 32 ratones recibieron una incisión plantar (5 mm de largo y 5 mm de profundidad) en la pata trasera izquierda. Dos horas después de la cirugía ($T = 0$ horas), se volvió a evaluar el umbral mecánico de cada ratón y se confirmó la presencia de alodinia mecánica en cada ratón. Treinta y dos ratones se aleatorizaron en 4 grupos (8 ratones por grupo). Mientras estaba anestesiado con anestesia de isoflurano al 2,5%, cada ratón recibía una inyección SC de vehículo (10 μ l), composición de ropivacaína (10 μ l de 18,3 mg/ml) o ropivacaína sin formular (10 μ l de 18,3 mg/ml). El umbral de retirada de la pata del 50% de cada ratón se obtuvo utilizando el método de elevación y descenso en el momento de referencia (-2) y los momentos designados (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 y 24 horas) después del tratamiento de inyección SC.

La eficacia anestésica de la composición de ropivacaína (círculo), ropivacaína sin formular (cuadrado) y vehículo (triángulo) después de la incisión en la pata se muestra en las Figuras 2A y 2B. Se representó gráficamente el umbral de retirada del 50% promedio para cada grupo de tratamiento; los datos presentados como un umbral de retirada (g) se representaron frente al tiempo (Figura 2A). Para tener en cuenta la variabilidad entre las sensibilidades mecánicas de referencia de los ratones individuales, los umbrales de retirada de la pata del 50% de cada ratón después de la cirugía y el tratamiento se normalizaron a su propio umbral de retirada del 50% de referencia ($T = -2$ horas). Se representó gráficamente el umbral de retirada del 50% normalizado promedio para cada grupo de tratamiento; los datos presentados como % de cambio en el umbral mecánico en relación con los umbrales de referencia se representaron frente al tiempo (Figura 2B). El tiempo de inicio de la composición de ropivacaína y la anestesia de ropivacaína sin formular después de la administración era similar, con un aumento del umbral de retirada de 0,04 g a 0,26 g y 0,22 g, respectivamente, en el primer momento ($T = 1$ hora). El grupo de la composición de ropivacaína producía la acción analgésica más grande (~88%) y más prolongada (al menos 5 horas), y el grupo de ropivacaína sin formular también producía cierto grado de analgesia en comparación con el grupo del vehículo.

Ejemplo 5

Efecto de la anestesia en cobayas utilizando un modelo modificado de pinchazo con alfiler de la roncha IC

Se emplearon cobayas macho (8 semanas de edad, alrededor de 500 g, Charles River Laboratories) para evaluar la eficacia anestésica como se describe en *J Pharmacol Exp Ther.* 1945; 85: 78-84. Todas las cobayas se alojaron en jaulas grupales con 2 animales por jaula, con alimento para cobayas (Healthy Pet®) y agua a voluntad con el fin de asegurar una nutrición y un enriquecimiento apropiados. La condición de alojamiento se controló a ~18-23°C (65-75°F) con un ciclo circadiano de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad. Después de un período inicial de aclimatación a las condiciones de laboratorio durante 12 días, las cobayas se designaron aleatoriamente como n° 1 a n° 8. La composición de ropivacaína se preparó según el Ejemplo 1, en el que una HELS de DMPC:colesterol:ropivacaína = 2:1:2,9 se hidrató con tampón de histidina 50 mM a pH 6,0. La ropivacaína sin formular se preparó disolviendo monohidrato de hidrocloreto de ropivacaína en agua ultrapura hasta 20,5 mg/ml.

Este estudio de eficacia *in vivo* de las cobayas ($n = 4$ o 6 por grupo) comparaba la composición de ropivacaína y la ropivacaína sin formular después de la inyección intracutánea (IC) a una dosis de 3,0 mg de ropivacaína por roncha IC y 1,5 mg de ropivacaína por roncha IC, respectivamente. Los lomos de las cobayas fueron rasurados un día antes del experimento. En el día experimental, se dibujaron cuatro zonas sobre el lomo antes de la administración del fármaco y se determinó la sensibilidad de estas zonas mediante un pinchazo con alfiler. Cada animal recibió cuatro formulaciones designadas en el lomo, que crearon 4 ronchas, respectivamente. La reacción a los pinchazos con alfiler en el lugar de la inyección se probó a los 0 min, 15 min, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 8 horas, 10 horas, 12 horas y 23 horas después de la inyección de la formulación. Los pinchazos con alfiler se aplicaron en primer lugar a una zona de control fuera de la roncha en cada momento. Después de observar la reacción normal del animal al pinchazo con alfiler fuera de la roncha, se aplicaron seis pinchazos dentro de la roncha y los pinchazos a los que la cobaya no reaccionaba se registraron como falta de respuesta. Los animales que mostraban una respuesta del 100% para todos los pinchazos no se controlaban en momentos adicionales.

Se determinaron los efectos anestésicos del grupo de composición de ropivacaína en comparación con el grupo de ropivacaína sin formular a la misma dosis y los resultados se representan en las Figuras 3A y 3B. El inicio de la anestesia tanto para la composición de ropivacaína como para la ropivacaína sin formular en las dosis de 3,0 mg (Figura 3A) y 1,5 mg de ropivacaína (Figura 3B) se observó en el primer momento, en menos de 15 min. El grupo de composición de ropivacaína exhibía efectos anestésicos sostenidos en comparación con lo que se observó para el grupo de ropivacaína sin formular para ambas dosis. Para una dosis de 3 mg de ropivacaína por roncha IC, se observó un efecto anestésico significativamente sostenido a las 10 horas y 12 horas después de la inyección ($p < 0,05$) para el grupo de composición de ropivacaína en comparación con el grupo de ropivacaína sin formular. Para una dosis de 1,5 mg de ropivacaína por roncha IC, el efecto anestésico también se mantuvo durante más tiempo para el grupo de composición de ropivacaína en comparación con el grupo de ropivacaína sin formular, y se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) a las 2 horas, 4 horas y 5 horas después de la inyección.

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar una composición anestésica de liberación sostenida, que comprende:
 crear una estructura lipídica altamente atrapada (HELS) que comprende:
 al menos un anestésico de tipo amida, y
 - 5 una mezcla de lípidos que incluye al menos un fosfolípido, e

hidratar la HELS con una solución tamponadora acuosa a un pH de 5,5 a 8,0; donde la hidratación de la HELS forma vesículas multilaminares (MLV) con anestésico de tipo amida atrapado; el diámetro mediano de las MLV con anestésico de tipo amida atrapado es de al menos 1 μm ; y la relación molar del anestésico de tipo amida al fosfolípido en las MLV con anestésico local atrapado es de al menos 0,5:1.
- 10 2. El método según la reivindicación 1, en el que la HELS está en forma de torta, polvo, masa sólida no pelicular o una combinación de los mismos.
3. El método según la reivindicación 1, donde el método para crear HELS comprende:
 disolver la mezcla de lípidos y el al menos un anestésico de tipo amida en un sistema disolvente para formar una estructura líquida; y
 - 15 retirar el sistema disolvente de la estructura líquida.
4. El método según la reivindicación 3, en el que el paso de retirar el sistema disolvente incluye liofilizar o secar por aspersión la estructura líquida.
5. El método según la reivindicación 3, en el que el sistema disolvente incluye *terc*-butanol o un codisolvente de *terc*-butanol/agua.
- 20 6. El método según la reivindicación 1, en el que la mezcla de lípidos comprende colesterol
7. El método según la reivindicación 6, en el que el porcentaje molar de colesterol en la mezcla de lípidos no es superior al 50%.
8. El método según la reivindicación 6, en el que el al menos un fosfolípido y el colesterol están en una relación molar de 1:0,01 a 1:1.
- 25 9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el al menos un anestésico de tipo amida es lidocaína, bupivacaína, levobupivacaína, ropivacaína, mepivacaína, pirrocaína, articaína o prilocaína.
10. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el al menos un anestésico de tipo amida es base de ropivacaína.
11. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la solución tamponadora acuosa comprende
 - 30 histidina en una concentración que varía de 1 mM a 200 mM.
12. Una composición anestésica de liberación sostenida para administrar localmente un anestésico local a un sujeto que lo necesite, donde la composición se prepara mediante el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8; el diámetro mediano de las MLV con anestésico de tipo amida atrapado en la composición anestésica es de al menos 1 μm ; y la relación molar de anestésico de tipo amida a fosfolípido en las MLV con anestésico local atrapado es de al
 - 35 menos 0,5:1.
13. La composición anestésica de liberación sostenida según la reivindicación 12, en la que el al menos un anestésico de tipo amida es base de ropivacaína.
14. La composición anestésica de liberación sostenida según la reivindicación 12, en la que la solución tamponadora acuosa comprende histidina en una concentración que varía de 1 mM a 200 mM.

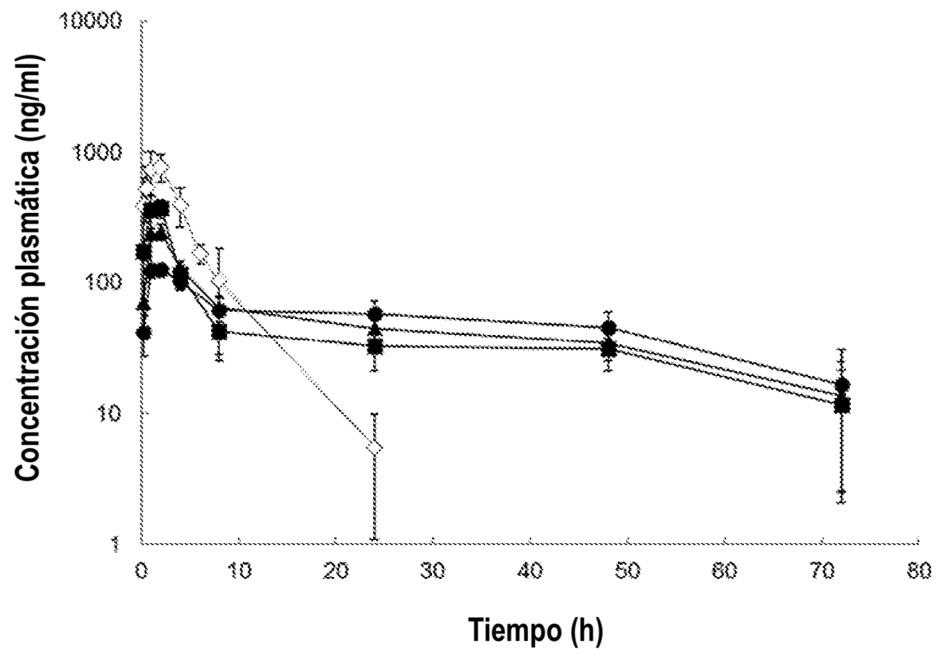


Fig. 1

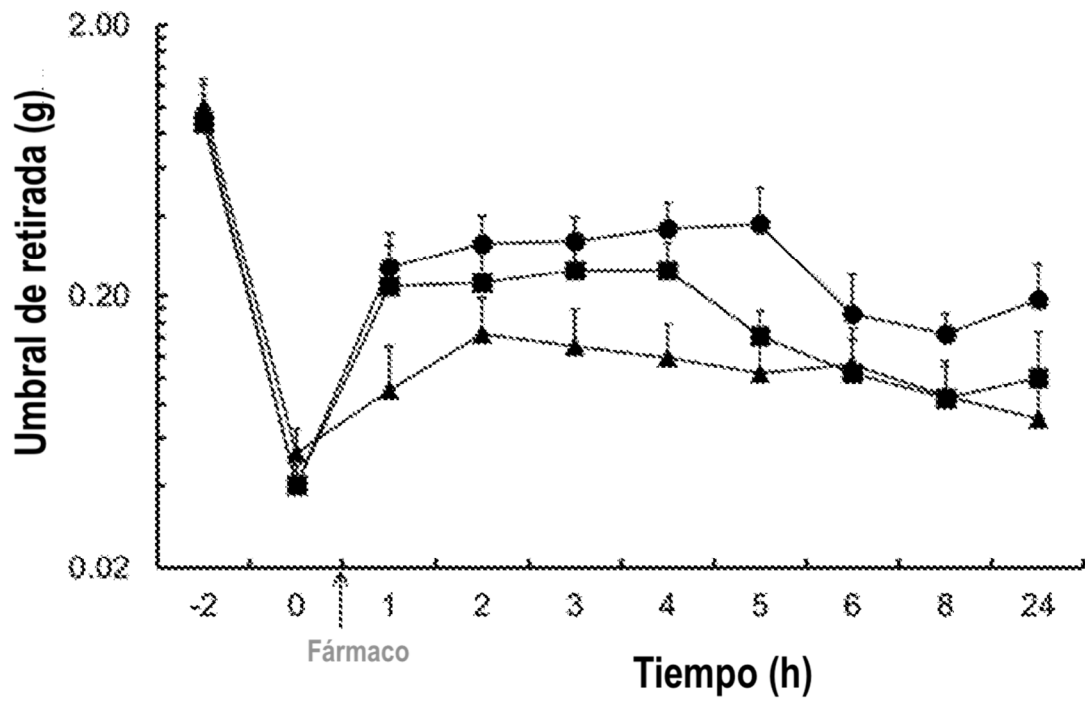


Fig. 2A

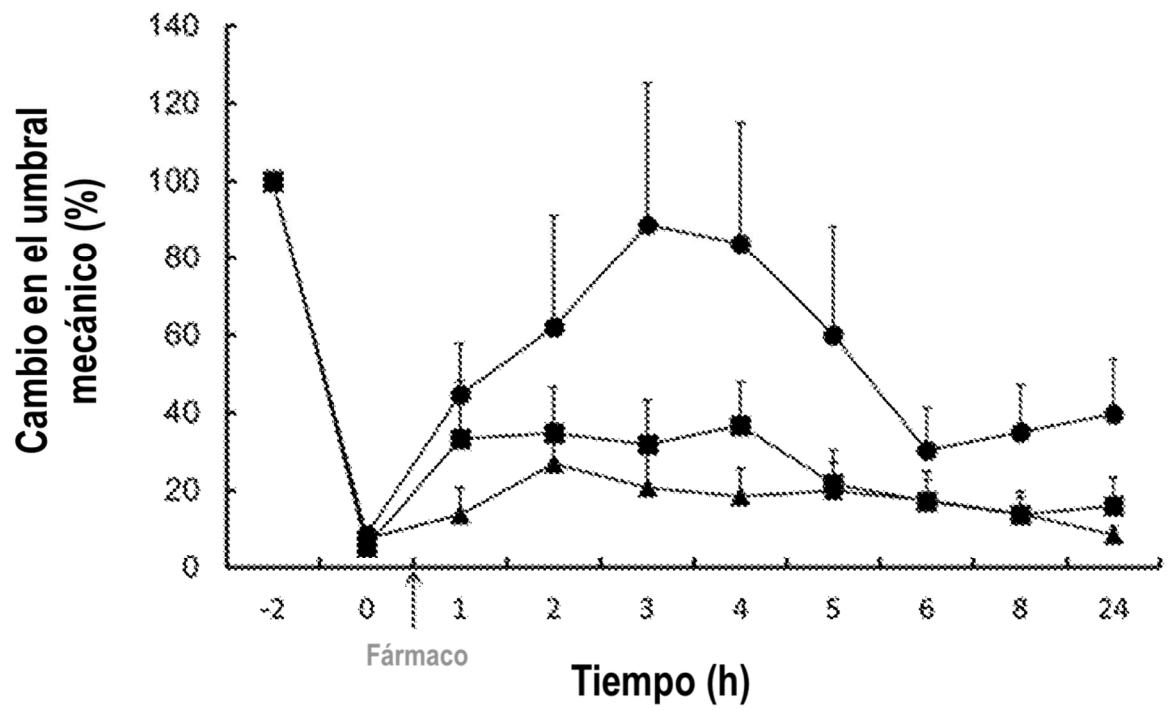


Fig. 2B

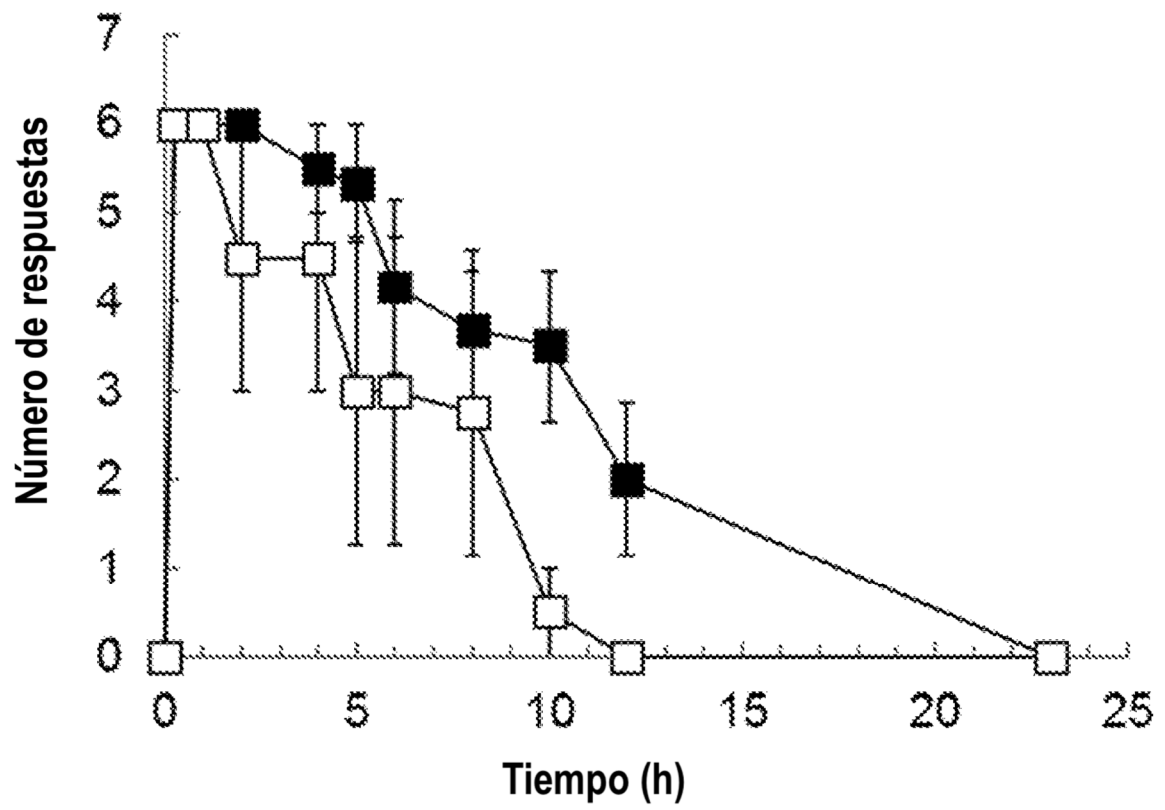


Fig. 3A

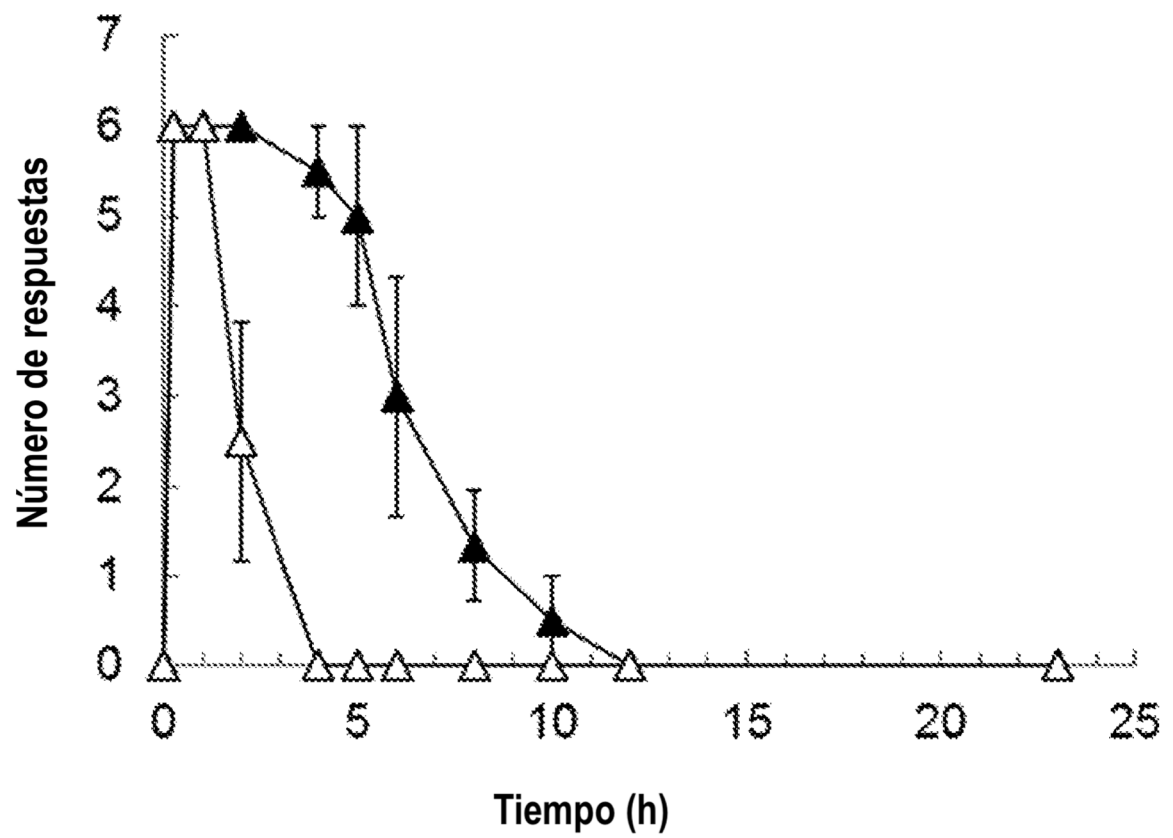


Fig. 3B