



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 343 767**

51 Int. Cl.:
A61K 9/127 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **98948352 .4**

96 Fecha de presentación : **18.09.1998**

97 Número de publicación de la solicitud: **1014946**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.07.2000**

54 Título: **Composiciones anestésicas liposómicas de liberación sostenida.**

30 Prioridad: **18.09.1997 US 59233**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.08.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.08.2010

73 Titular/es: **Pacira Pharmaceuticals, Inc.**
10450 Science Center Drive
San Diego, California 92121, US

72 Inventor/es: **Kim, Sinil;**
Kim, Taehee y
Murdandi, Sharad

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

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 liposómicas de liberación sostenida.

5 Antecedentes de la invención

La presente invención se refiere a formulaciones liposómicas de compuestos tales como fármacos. Más particularmente, la presente invención se refiere a procedimientos de encapsular anestésicos en liposomas multivesiculares con una eficiencia elevada y tasas de liberación sostenidas *in vivo*.

10 Normalmente, la duración de la acción de un anestésico local tras su administración es suficientemente larga como para cubrir el dolor infligido durante la mayoría de los procedimientos quirúrgicos. No obstante, la duración de la acción no es lo bastante larga como para cubrir la mayoría del dolor posquirúrgico o el dolor producido por muchos procedimientos diagnósticos invasivos o por lesiones. La infusión continua o la infiltración repetida de un anestésico local en una herida quirúrgica, “puerto” diagnóstico o punto de lesión no es práctica. Por tanto, una formulación de liberación sostenida de un anestésico local sería útil para el tratamiento del dolor, especialmente a la luz de las tendencias actuales de cirugías ambulatorias y centros de atención de emergencia. Deseablemente, dichas formulaciones también son útiles en el dolor traumático y diagnóstico.

20 En la literatura se han descrito varios enfoques para desarrollar formulaciones de liberación sostenida de anestésicos locales. Por ejemplo, microesferas de polímero de ácido poliláctico-co-glicólico que contienen bupivacaína y dexametasona han producido una duración prolongada de la anestesia local. También se ha demostrado que formas cristalinas de anestésicos locales tienen una duración prolongada de la acción. Se ha demostrado que bupivacaína lipófila sin base incorporada en las membranas de liposomas multilaminares y liposomas unilaminares grandes cargados con un gradiente de protones tienen una eficacia que dura de 6 a 11 horas.

Se están desarrollando liposomas multivesiculares (LMV) como sistema de liberación de fármacos de liberación sostenida basado en lípidos para la liberación local, regional o sistémica del fármaco. Se ha demostrado la liberación sostenida de muchos fármacos estables en agua encapsulados en LMV en modelos con animales por las vías de administración intratecal, subcutánea, intraperitoneal y epidural, así como en pacientes humanos mediante las vías intracerebroventricular, intratecal, subcutánea y epidural. En un ensayo clínico de fase III, multicéntrico y aleatorizado de una formulación de LMV del agente citotóxico citarabina se ha demostrado que esta formulación es más eficaz que la citarabina libre en el tratamiento del carcinoma leptomeningial.

35 Los LMV se definen como liposomas que contienen múltiples cámaras no concéntricas dentro de cada partícula de liposoma, que se asemejan a una matriz “de tipo espuma”. Dichas partículas se deben distinguir de las vesículas multilaminares (VML), también conocidas como liposoma multilaminar, que contienen múltiples cámaras concéntricas dentro de cada partícula de liposoma. Otra partícula distinta es la vesícula unilaminar (VUL), también conocida como liposoma unilaminar, que incluye un único compartimento acuoso interno. La presente invención se refiere a LMV. La técnica anterior describe la preparación de LMV (Kim y col., Biochim. Biophys. Acta 728, 339-348, 1983).

Muchas de las sustancias catiónicas biológicamente activas usadas en las técnicas de encapsulación en LMV se usan como sales de ácidos minerales monopróticos (por ejemplo, como sales de clorhidrato). La técnica anterior (documento WO 9 703 652) ha usado dichas sales de ácidos minerales monopróticos disponibles habitualmente de sustancias catiónicas biológicamente activas para su encapsulación en liposomas sin realizar ninguna modificación en una sal de ácido mineral diprótico o triprótico. La técnica anterior también ha usado ácidos orgánicos, tales como ácidos cítrico o glutámico, para efectuar la encapsulación.

Resumen de la invención

50 La invención proporciona anestésicos locales encapsulados en liposomas multivesiculares (LMV), es decir vesículas lipídicas que tienen múltiples cámaras acuosas internas no concéntricas que tienen membranas internas distribuidas en forma de red a lo largo del LMV. Las cámaras contienen ácidos que son eficaces para permitir la encapsulación de ciertos anestésicos y para modular la velocidad de liberación de los anestésicos encapsulados. La invención también proporciona procedimientos para fabricar dichas composiciones y para proporcionar anestesia local a los sujetos mediante la administración de las composiciones.

La técnica anterior ha usado sales monopróticas disponibles habitualmente (por ejemplo clorhidrato o glutámico) de compuestos biológicamente activos. Esto ha tenido como resultado formulaciones inaceptables para encapsular las sustancias biológicamente activas en LMV o una eficiencia de encapsulación muy baja. La invención es el resultado del sorprendente hallazgo de que la inclusión de la forma de base libre de los compuestos anestésicos solubilizados con ácido fosfórico, o la conversión de las sales clorhidrato disponibles habitualmente de los compuestos anestésicos en sales fosfato (sal de ácido mineral triprótico) o sulfato (sal de ácido mineral diprótico) para su inclusión en LMV tiene como resultado una considerablemente mejora en la eficiencia de la encapsulación así como una liberación sostenida en medio biológicamente relevante. También se incluyen los ácidos orgánicos polialcohólicos, tales como ácido glucurónico o glucónico, en los que dicho ácido está co-encapsulado con anestésicos para ayudar en la encapsulación y efectuar la liberación sostenida del anestésico. Sorprendentemente, los ácidos orgánicos polialcohólicos son superiores a los ácidos orgánicos no polialcohólicos, y dan composiciones con una elevada eficiencia de encapsulación y

liberación sostenida del anestésico. Los ácidos orgánicos polialcohólicos mejoran considerablemente la encapsulación del anestésico y la aceptabilidad de la formulación. Las sales sulfato y una serie de otras sales requieren la inclusión de dichos ácidos para formar formulaciones aceptables.

5 Cuando el anestésico encapsulado se administra en forma de una única dosis intracutánea o subcutánea, la duración o la anestesia y la semivida del fármaco en el punto de inyección local aumentan en comparación con la inyección del anestésico sin encapsular. La dosis máxima tolerada del anestésico encapsulado también está considerablemente aumentada en la formulación liposómica con respecto a la inyección del anestésico sin encapsular.

10 El principal uso para la invención es para fabricar formulaciones de liberación sostenida de sustancias biológicamente activas que tienen elevadas velocidades de difusión a través de las membranas de bicapa lipídica. El uso de sales de ácidos minerales tanto dipróticos como tripróticos de sustancias biológicamente activas y la co-encapsulación de ácidos orgánicos polialcohólicos permite que estos fármacos difíciles de encapsular se encapsulen con facilidad y se liberen lentamente.

15 Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y a partir de las reivindicaciones.

Breve descripción de las figuras

20 La figura 1A es un gráfico que muestra el efecto anestésico (número de falta de respuesta a seis punciones en función del tiempo tras una única dosis intracutánea de fosfato de bupivacaína encapsulada en LMV que contiene diferentes concentraciones de bupivacaína.

25 La figura 1B es un gráfico que muestra el efecto anestésico (número de faltas de respuesta a seis punciones en función del tiempo tras una única dosis intracutánea de clorhidrato de bupivacaína no encapsulado a diferentes concentraciones.

30 La figura 2 es un gráfico que muestra una comparación de la duración de la anestesia para las formulaciones de las figuras 1A (fosfato de bupivacaína encapsulada en LMV, círculos rellenos) y 1B (clorhidrato de bupivacaína no encapsulado, círculos vacíos) cuantificada mediante el “tiempo hasta la mitad de la respuesta máxima (R_3)” (eje de ordenadas) frente a la concentración de la dosis administrada (eje de abscisas).

35 La figura 3A es un gráfico que muestra la cantidad total de bupivacaína (mg) que queda en un punto de inyección hasta 72 horas después de una única dosis intracutánea de fosfato de bupivacaína encapsulada en LMV (círculos rellenos) o clorhidrato de bupivacaína no encapsulada (círculos vacíos).

40 La figura 3B es un gráfico que muestra las concentraciones de bupivacaína en suero ($\mu\text{g/ml}$) hasta 72 horas después de una única dosis intracutánea de fosfato de bupivacaína encapsulado en LMV a una concentración de 1,0 por ciento (p/v) de bupivacaína (círculos rellenos) de 0,5 por ciento (p/v) de clorhidrato de bupivacaína no encapsulado (círculos vacíos).

Descripción detallada

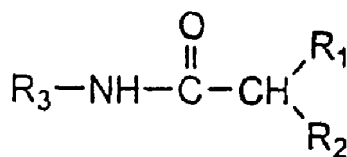
45 Se piensa que el dolor posquirúrgico o postraumático es el más intenso en el periodo de 24 horas inmediatamente posterior a la operación o a la lesión. Es posible que un mejor control del dolor posquirúrgico pueda disminuir las complicaciones pulmonares y gastrointestinales y, quizás, acortar la estancia en el hospital. Los opiáceos sistémicos de uso habitual para controlar el dolor durante este periodo posquirúrgico pueden deprimir la función pulmonar y ralentizar la recuperación gastrointestinal. Otros agentes antinociceptivos, tales como el agente antiinflamatorio no esteroide ketorolaco trometamina, pueden incrementar las hemorragias y la irritación gastrointestinal en estos momentos de estrés. Dado que los estímulos nociceptivos que surgen por intervenciones quirúrgicas o lesiones traumáticas normalmente tienen un origen local o regional, la prolongación del bloqueo sensorial local o regional para controlar el dolor es un concepto interesante. Por tanto, se cree que la mejora del tratamiento con anestésicos locales implica el mantenimiento del nivel de anestesia durante un periodo prolongado. Por desgracia, la semivida de muchos anestésicos es muy corta después de una dosis intraperitoneal (IP), intravenosa (IV), intratecal (IT), intraarticular (IA), intramuscular (IM) o subcutánea (SC). Por tanto, se necesita una preparación de liberación lenta que proporcione una exposición prolongada y sostenida a una concentración terapéutica de un anestésico local. La presente invención está dirigida a la producción, composición y uso de dicha preparación.

60 A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria descriptiva tienen el mismo significado que un experto en la técnica a la que esta invención pertenece entiende habitualmente. Aunque en la práctica o análisis de la presente invención se pueden usar procedimientos y materiales similares a los descritos en la presente memoria descriptiva, a continuación se describen procedimientos y materiales adecuados. Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes y otras referencias mencionadas en la presente memoria descriptiva se incorporan por referencia en su totalidad. Además, los materiales, procedimientos y ejemplos son únicamente ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.

Anestésicos

La presente invención proporciona una liberación prolongada de anestésicos locales, particularmente de los anestésicos de "tipo amida", desde LMV tras la administración de composiciones que contienen los LMV. La invención utiliza un anestésico local encapsulado en LMV. Generalmente, el anestésico local pertenece a la clase conocida como anestésicos de tipo amida. El nombre procede de la presencia del enlace amida (-NHCO-) en la porción central de la molécula. El grupo unido al extremo de nitrógeno de la amida es un anillo fenilsustituido, especialmente un anillo de fenilo que contiene al menos un grupo alquilo de cadena corta, tal como metilo, etilo, propilo o butilo. Ejemplos de dichos grupos incluyen 2-metilfenilo, 2,6-dimetilfenilo, 2-etilfenilo, 2,6-dietilfenilo y 2-etil-6-metilfenilo. Si el grupo sustituyente es 2,6-dimetilfenilo, los anestésicos locales también se denominan anestésicos de 2,6-xilidida.

El grupo unido al extremo CO del enlace amida se denomina CHR_1R_2 . En la anterior designación, R_1 es una alquilamina secundaria o terciaria, tal como N-alquilamina o N,N-dialquilamina. Se prefieren los grupos alquilo de cadena corta (de uno a cuatro átomos de carbono). Ejemplos incluyen N-metilamina, N-etilamina, N-propilamina, N-butilamina, N,N-dimetilamina, N,N-dietilamina, N-etil-N-metilamina y sustituyentes construidos de forma similar. Las cadenas de alquilo de tres y cuatro miembros pueden tener cualquier configuración, es decir cadena lineal (n-alquilo) o ramificada (iso-, sec- o terc-alquilo). Como alternativa, R_1 puede ser un grupo alquilenamino secundario o terciario, que además se une a R_2 . Por ejemplo, R_1 y R_2 pueden estar unidos por una cadena de alquilo que contiene nitrógeno secundaria o terciaria para formar un anillo de pirrolidina o piperidina N-alquilsustituida. En dichos ejemplos, el grupo N-alquilo es, preferentemente, una cadena corta (de uno a cuatro átomos de carbono), tal como N-metilo, N-etilo, N-propilo o N-butilo, en la que la cadena puede ser lineal o ramificada. El sustituyente de unión $\text{R}_1\text{-R}_2$ puede ser 2-piperidilo, 2-pirrolidilo, 3-piperidilo, 3-pirrolidilo, 4-piperidilo o 4-pirrolidilo. Preferentemente, el sustituyente formado cuando R_1 y R_2 están unidos mediante una cadena de alquilenamino que contiene nitrógeno secundaria o terciaria es 2-piperidilo o 2-pirrolidilo. La estereoquímica de los compuestos puede ser R o S, en función de la actividad anestésica más eficiente. Por ejemplo, la ropivacaína comercialmente disponible se encuentra en la configuración (S)(-). La bupivacaína también se encuentra en la forma conocida como levo-bupivacaína. En la designación anterior, R_2 es hidrógeno, alquilo de cadena corta (de uno a cuatro átomos de carbono) o una cadena de alquilenamino secundario o terciario que se une a R_1 , tal como se ha descrito en lo que antecede. Los anestésicos de tipo amida que son útiles en la presente invención se describen mediante la estructura siguiente:



en la que R_1 y R_2 son como se ha descrito en lo que antecede, y R_3 es un anillo fenilo alquilsustituido, como se ha descrito en lo que antecede.

Ilustrativos de la descripción anterior de los anestésicos de tipo amida útiles en la presente invención son, por ejemplo, bupivacaína, levo-bupivacaína, mepivacaína, lidocaína, pirrocaína, prilocaína y ropivacaína.

Los anestésicos deberían estar presentes en las composiciones de la invención en concentraciones de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 5,0% p/v o, preferentemente, de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 2,0% p/v. Los porcentajes en peso se definen como el peso del anestésico por volumen de LMV.

Las formas de base libre de los anestésicos locales de la invención se pueden solubilizar. Deseablemente se forma la forma en sal hidrosoluble para su almacenamiento y liberación a partir de LMV. La forma en sal se puede introducir en la primera fase acuosa del LMV como tal o puede formarse mediante la adición de la forma en base libre y suficiente ácido para solubilizar los anestésicos en la medida deseada. La sal puede ser cualquier sal mineral di o triprótica farmacéuticamente aceptable, tal como la sal fosfato o la sal sulfato. También son útiles las sales de ácido polihidroxicarboxílico del anestésico, tal como las sales de tartarato, gluconato o gluconurato. Las combinaciones de dichas sales son preferibles como componentes de la primera fase acuosa de las composiciones de la invención. Por tanto, los anestésicos de tipo amida están presentes en las composiciones farmacéuticas de la invención en forma de sales de polihidroxicarboxilato y sales minerales di y tripróticas. Formas de realización preferidas de la invención son aquéllas con una mezcla binaria de sales anestésicas de tipo amida, una derivada de un ácido polihidroxicarboxílico y la otra derivada de un ácido mineral di o triprótico.

Liposomas multivesiculares

Las composiciones anestésicas de la invención también incluyen liposomas multivesiculares (LMV) que encapsulan y proporcionan una liberación modulada y sostenida de los anestésicos descritos en lo que antecede. Los LMV se preparan mediante el procedimiento siguiente. Una emulsión de tipo "agua en aceite" que contiene una sal de ácido no hidrohálico de cualquiera de los anestésicos descritos en lo que antecede está formada por dos fases inmiscibles, una fase lipídica y una primera fase acuosa.

La fase lipídica está formada por al menos un lípido anfipático y al menos un lípido neutro en un disolvente orgánico volátil. El término “lípido anfipático” se refiere a moléculas que tienen un grupo “de cabeza” hidrófilo y un grupo “de cola” hidrófobo y pueden tener capacidad de formación de membranas. Como se usa en la presente memoria descriptiva, lípidos anfipáticos incluyen los que tienen una carga negativa neta, una carga positiva neta y

5 lípidos zwitteriónicos (que no tienen carga neta en su punto isoeléctrico). El término “lípido neutro” se refiere a aceites o grasas que no tienen capacidad de formación de vesículas por sí mismos y que carecen de un grupo “de cabeza” cargado o hidrófilo. Ejemplos de lípidos neutros incluyen, entre otros, ésteres de glicerol, ésteres de glicol, ésteres de tocoferol, ésteres de esteroles, que carecen de un grupo “de cabeza” cargado o hidrófilo, y alcanos y escualenos.

10 El lípido anfipático se escoge de una amplia gama de lípidos que tienen una región hidrófoba y una región hidrófila en la misma molécula. Lípidos anfipáticos adecuados son fosfolípidos zwitteriónicos, incluidos fosfatidilcolina, fosfatidiletanolaminas, esfingomielinas, lisofosfatidilcolinas y lisofosfatidiletanolaminas. También son adecuados los fosfolípidos anfipáticos aniónicos, tales como fosfatidilglicerol, fosfatidilserinas, fosfatidilinositoles, ácidos fosfatídicos y cardiolipinas. También son adecuados los lípidos anfipáticos catiónicos tales como aciltrimetilamoniopropa-

15 nos, diacildimetilamoniopropanos y estearilamina.

Lípidos neutros adecuados son triglicéridos, ésteres de propilenglicol, ésteres de etilenglicol y escualeno. Ejemplos de triglicéridos útiles en la presente invención son trioleína, tripalmitoleína, trimiristoleína, trilinoleína, tributirina, tricaproína, tricaprilina y tricaprina. Las cadenas grasas en los triglicéridos útiles en la presente invención pueden

20 ser todas iguales o no todas iguales (triglicéridos de cadena mixta), incluyendo todas diferentes. Las cadenas grasas tanto saturadas como insaturadas son útiles en la presente invención. Los ésteres de propilenglicol pueden ser diésteres mixtos de ácidos caprílico y capríco.

En la presente invención se pueden usar muchos tipos de disolventes orgánicos volátiles, incluidos éteres, ésteres, éteres halogenados, hidrocarburos, halohidrocarburos o freones. Por ejemplo, éter dietílico, cloroformo, tetrahidrofurano, acetato de etilo. Forano, y cualquier combinación del mismo, son adecuados para usar en la elaboración de las composiciones anestésicas de la presente invención.

25

Opcionalmente, pero altamente deseable, en la fase lipídica están incluidos otros componentes. Entre éstos están

30 colesterol o esteroides vegetales.

La primera fase acuosa incluye un anestésico, al menos un ácido polihidroxicarboxílico, y al menos un ácido mineral di o triprótico. En algunas formas de realización de la invención también se incluye ácido clorhídrico. El ácido clorhídrico no es un constituyente esencial, sino que es opcional y deseable en algunas formas de realización. Los ácidos minerales di o tripróticos incluyen ácido sulfúrico y ácido fosfórico. También incluidos en la primera fase acuosa

35 están ácidos polihidroxicarboxílicos tales como ácido glucurónico, ácido glucónico y ácido tartárico. Los ácidos minerales di y tripróticos y los ácidos polihidroxiorgánicos están presentes en la primera fase acuosa en concentraciones de 0,01 mM a aproximadamente 0,5M o, preferentemente, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 300 mM. Cuando se usa ácido clorhídrico, está presente en cantidades menores, de aproximadamente 0,1 mM a aproximada-

40 mente 50 mM, o, preferentemente, de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 25 mM.

La fase lipídica y la primera fase acuosa se mezclan mediante turbulencia mecánica, tal como mediante el uso de palas rotatorias o vibratorias, agitación, extrusión a través de estructuras deflectoras o tubos porosos, mediante ultrasonidos o mediante atomización con boquilla, para producir una emulsión de agua en aceite. Por tanto, los anestésicos

45 de la invención se encapsulan directamente en la primera etapa de la fabricación de los LMV.

Después, toda la emulsión de agua en aceite se dispersa en una segunda fase acuosa por los medios descritos en lo que antecede para formar esférulas de disolvente suspendidas en la segunda fase acuosa. El término “esférulas de disolvente” se refiere a una gota esferoide microscópica de disolvente orgánico dentro de la cual están suspendidas

50 múltiples gotas más pequeñas de solución acuosa. Por tanto, las esférulas de disolvente resultantes contienen múltiples gotas acuosas con el anestésico disuelto en su interior. La segunda fase acuosa puede contener componentes adicionales, tales como glucosa y/o lisina.

El disolvente orgánico volátil se retira después de las esférulas mediante, por ejemplo, evaporación de superficie de la suspensión. Cuando el disolvente se ha evaporado sustancial o completamente, se forman las LMV. Los gases que se pueden usar para la evaporación incluyen nitrógeno, argón, helio, oxígeno, hidrógeno y dióxido de carbono. Como alternativa, el disolvente volátil se puede retirar mediante burbujeo, evaporación rotatoria, o con el uso de membranas selectivas de disolvente.

55

60 *Procedimiento para proporcionar anestesia*

La invención también proporciona un procedimiento de proporcionar anestesia regional a un sujeto mediante la administración de las composiciones anestésicas reivindicadas bien por vía intracutánea, subcutánea o a través de un

65 bloqueo nervioso local o regional. Las dosis se pueden administrar bien como un bloqueo nervioso (incluido hasta el límite de actuar como bloqueo motor) o como un bloqueo sensorial.

El término “terapéuticamente efectivo” en lo que atañe a las composiciones de la presente invención significa que un anestésico presente en la primera fase acuosa dentro del LMV se libera de un modo suficiente para alcanzar un nivel concreto de anestesia. Las dosis exactas variará en función de factores tales como el anestésico concreto, así como de factores del paciente tales como edad, sexo, estado general y similares. Los expertos en la técnica pueden tener en cuenta fácilmente estos factores y usarlos para establecer concentraciones terapéuticas efectivas sin recurrir a experimentación indebida.

No obstante, generalmente, el intervalo de dosis adecuado para uso humano incluye el intervalo de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 300 mg de anestésico total. El límite superior está limitado por la toxicidad del anestésico concreto y el límite inferior es de aproximadamente el 10% del límite superior.

La invención se describirá adicionalmente en los ejemplos siguientes.

Ejemplos

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

Ejemplo 1

Fabricación de LMV que contienen fosfato de bupivacaína

El clorhidrato de bupivacaína (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) se convirtió en fosfato de bupivacaína mediante preparación inicial de clorhidrato de bupivacaína acuoso con hidróxido sódico IN para preparar la base libre. El precipitado se lavó exhaustivamente con agua y después se convirtió en la sal fosfato con una cantidad equimolar de ácido fosfórico.

Para cada lote de la formulación se añadieron 5 ml de un primer componente acuoso discontinuo que contenía 60 mg/l de fosfato de bupivacaína, ácido glucurónico 150 mM, ácido clorhídrico 15 mN y ácido fosfórico 20 mM a un vaso mezclador que contenía un componente lipídico que contenía 5 ml de cloroformo USP (Spectrum Chemical Co., Gardena, CA) como disolvente y 1,2-dierucoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DEPC) 18,6 Mm, dipalmitoil fosfatidilglicerol 4,2 mM (Avanti Polar-Lipids, Inc., Alabaster, AL) (un lípido anfipático aniónico), colesterol 30 mM (Avanti Lipids) y tricaprilina 10,8 mM.. El primer componente acuoso inmiscible y el componente lipídico se mezclaron a 16.000 rpm en un mezclador Omni (OMNI International, Gainesville, VA) durante 9 minutos. La emulsión de agua en aceite resultante se transfirió a un vaso de mezclado de 50 ml que contenía 25 ml de un segundo componente acuoso continuo que contenía 32 mg/ml de glucosa y lisina sin base 10 mM (Sigma Chemical Co., MO). Después, la mezcla se mezcló durante 20 segundos a 4.000 rpm en un mezclador Omni.

La emulsión doble resultante de agua en aceite se transfirió a un matraz de tipo Erlenmeyer de 1 l que contenía 275 ml de la segunda fase acuosa continua (glucosa, 32 mg/ml; lisina sin base 40 mM). El cloroformo se evaporó durante 15 minutos a un flujo constante (90 l/min) de gas nitrógeno a 37°C para formar partículas de LMV en suspensión. Las partículas de LMV se aislaron mediante centrifugación a 200 x g durante 10 minutos, después se lavaron tres veces con una solución al 0,9 por ciento (p/v) de NaCl. Cada lote se almacenó a 2-8°C y se usó para estudios posteriores en un plazo de 48 horas.

Ejemplo 2

Recuperación de bupivacaína de diferentes formulaciones de LMV

Las muestras de bupivacaína se solubilizaron mediante la adición de un volumen equimolar de una solución 1M del ácido indicado y después mediante la adición lentamente, con agitación, de agua adicional hasta alcanzar 60 mg/ml o una solución transparente. Después, el pH se ajustó hasta aproximadamente 5. La concentración final de bupivacaína se determinó mediante HPLC frente a un patrón interno.

Para cada intento de formulación, la primera solución de fase acuosa contenía el contraion de bupivacaína a 60 mg de bupivacaína por ml, o el límite de solubilidad del contraion de bupivacaína, a un pH de 5. Otros parámetros para la fabricación de LMV son como se ha descrito en lo que antecede. Recuperación se refiere al porcentaje de bupivacaína en la solución del contraion encapsulada y recuperada en el producto LMV final. Para el estudio 2, la primera fase acuosa también contenía ácido glucurónico 150 mM. Los resultados se muestran en la tabla 1.

ES 2 343 767 T3

TABLA 1

Recuperación de bupivacaína encapsulada en LMV a partir de formulaciones que contienen varios ácidos

Bupivacaína (mg/ml)	ácido incluido	ácido adicional	recuperación (%)
Estudio 1			
60	fosfórico		5,7
60	sulfúrico		(Agregados)
23	nítrico		No se forma LMV
40	clorhídrico		No se forma LMV
26	glucurónico		34
60	tartárico		Agregados
41	acético		No se forma LMV
2,2	perclórico		No se forma LMV
Estudio 2			
60	fosfórico	glucurónico 150 mM	35
60	sulfúrico	glucurónico 150 mM	16
23	nítrico	glucurónico 150 mM	45
40	clorhídrico	glucurónico 150 mM	16
26	glucurónico	glucurónico 150 mM	48
60	tartárico	glucurónico 150 mM	20
41	acético	glucurónico 150 mM	18
2,2	perclórico	glucurónico 150 mM	No se forma LMV
60	cítrico	glucurónico 150 mM	13
60	málico	glucurónico 150 mM	19
60	succínico	glucurónico 150 mM	20

Los resultados de la tabla demuestran claramente que la adición de un ácido polihidroxiorgánico (en este caso, ácido glucurónico) además de uno de una serie de otros ácidos, incluidos ácidos minerales tripróticos tales como ácido fosfórico, o ácidos polihidroxiorgánicos, tales como ácido glucurónico, proporciona un considerable efecto sinérgico. Este sorprendente descubrimiento conduce a una carga y recuperación de los LMV de la invención mayor que lo encontrado previamente.

Ejemplo 3

Estudios con animales in vivo usando inyecciones intracutáneas

Para los estudios de eficacia se usaron cobayas macho (Harlan Sprague-Dawley San Diego, CA) de 800-1000 gramos de peso. Para los estudios farmacocinéticos se usaron cobayas macho (Harlan Sprague-Dawley) de 400-600 gramos de peso. Los animales se introdujeron en jaulas, 1 por jaula, en un ambiente de temperatura controlada con periodos alternos de 12 horas de luz y oscuridad y se les permitió acceso libre a alimento y agua. Antes de cada estudio se acostumbró a los animales al ambiente durante al menos 7 días. Para la determinación de la dosis máxima tolerada (DMT) se usaron ratones CD1 hembra (Sprague-Dawley) de 22-28 gramos de peso. Todos los animales se mantuvieron de acuerdo con las directrices del Comité sobre los Cuidados y Uso de Animales de Laboratorio del Institute of Laboratory Animal Resources, National Research Council.

Las formulaciones de bupivacaína y clorhidrato de bupivacaína encapsulados en LMV preparadas tal como se ha descrito en lo que antecede se diluyeron en solución salina normal de modo que un volumen constante de 1 ml contenía una dosis a concentraciones de 2,1%, 1,0% o 0,5% (p/v) de bupivacaína. Las concentraciones se confirmaron solubilizando un alícuota de 50 μ l de la formulación de LMV en 1 ml de alcohol isopropílico, seguido por la dilución en agua y análisis mediante un procedimiento de HPLC publicado previamente tal como se ha descrito (P. Le Guevello y col., J. Chromatography 622:284-290, 1993). El análisis por HPLC de las formulaciones de LMV reveló que menos del 5% de bupivacaína total estaba presente en la formulación en forma de bupivacaína no encapsulada.

Se realizaron estudios de infiltración de anestesia en los cobayas de estudio usando un modelo modificado de punción de roncha intracutánea tal como se ha descrito (R. H. de Jong y col., Anesth. Analog 59:401-5, 1980). El día anterior al experimento se pinzaron pelos de los dorsos de los animales. Cada animal recibió una dosis de

bupivacaína encapsulada en LMV (concentraciones de 0,5, 1,0 o 2,1 por ciento (p/v) de bupivacaína) o bupivacaína no encapsulada (concentraciones de 0,25, 0,5, 0,75 o 1,0 (p/v) por ciento de bupivacaína), que produjo una roncha. El margen de la roncha se marcó con tinta indeleble. La reacción a las punciones en el punto de la inyección se estudió justo antes de la inyección (tiempo cero) y 15 minutos, 2, 6, 12, 18, 24, 30 y 36 horas después de la inyección de bupivacaína encapsulada en LMV y a cero, 5, 15 minutos y 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 horas después de la inyección de clorhidrato de bupivacaína. Las punciones se aplicaron primero a un área control fuera de la roncha en cada punto de tiempo. Después de observar la reacción normal del animal a la punción (respuesta de vocalización), se aplicaron seis punciones dentro de la roncha y el número de punciones a las que la cobaya no reaccionó se registró como falta de respuesta. Cada punción se aplicó a un intervalo de 3-5 segundos. Todos los animales respondieron con vocalización a las seis punciones basales.

Los datos obtenidos de los animales indican un rápido inicio de anestesia tras una única dosis intracutánea de bupivacaína encapsulada en LMV seguido por una duración prolongada de anestesia sensorial de una duración de hasta 28 horas, en función de la concentración de bupivacaína en el LMV administrado. El rápido inicio de la anestesia es atribuible, en parte, a una fracción baja pero significativa de bupivacaína no encapsulada (aproximadamente 5% del total) en los lotes de LMV que encapsula la bupivacaína usados en estos experimentos. La duración de la anestesia obtenida mediante el uso de estas formulaciones puede cubrir el peor periodo posquirúrgico, las primeras 24 horas. Una duración mayor de la anestesia, quizá siete días o más, sería más adecuada para el dolor crónico, tal dolor por cáncer o neuropático.

Ejemplo 4

Análisis de los datos de los estudios de eficacia

Las curvas de eficacia de la anestesia se representaron en forma del número de las faltas de respuesta como una función del tiempo. Las áreas bajo la curva (AUC) se calcularon mediante la regla del trapecio hasta el último punto de datos. Con respecto a la figura 1A, las concentraciones de bupivacaína encapsuladas en LMV en porcentaje en peso por volumen (p/v%) fueron 2,1% (●), 1,0% (■) y 0,5% (▲). Con respecto a la figura 1B, las concentraciones de bupivacaína no encapsulada en porcentaje de peso por volumen fueron 0,25% (V), 0,5% (Δ), 0,75% (O) y 1,0% (□). Cada punto de dato representa la media para 5 a 6 animales. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM).

La evaluación de la respuesta a las punciones mostró que se alcanzaba la anestesia local completa (condición de falta de respuesta) en un plazo de 15 minutos después de la administración intracutánea de cualquiera de las formulaciones de LMV de bupivacaína. (Fig. 1A) o de clorhidrato de bupivacaína no encapsulada (Fig. 1B).

La figura 2 muestra la duración del efecto anestésico medido mediante el tiempo hasta la mitad de la respuesta máxima (R_3) para las diversas dosis de la formulación de LMV (círculos rellenos) y para el fármaco no encapsulado (círculos vacíos). Cada punto de dato representa la media y el error estándar de la media (SEM) de 5 a 6 animales. Estos resultados muestran que la duración del efecto anestésico era dependiente de la concentración en ambos casos. No obstante, las formulaciones de LMV que contienen concentraciones de 0,5 y 1,0 por ciento en peso de fosfato de bupivacaína eran 3,2 y 2,9 veces más prolongadas, respectivamente, en comparación con dosis comparables de clorhidrato de bupivacaína.

Ejemplo 5

Determinación de la dosis máxima tolerada (DMT)

La determinación de la dosis máxima tolerada (DMT) se realizó en ratones usando una prueba subcutánea conocida en la técnica (R. H. de Jong y col., *Anesthesiology* 54:177-81, 1981). A grupos de tres ratones cada uno se administró inyecciones de 780 ó 980 mg por kg de peso corporal de la formulación de LMV que contiene sulfato de bupivacaína descrita en lo que antecede en forma de dos dosis divididas de 500 μ l cada una (volumen total de 1,0 ml). Las dosis se administraron en una secuencia rápida en cada flanco. Grupos control de 3 ratones cada uno recibieron una de las dosis de prueba en forma de una dosis única de 10, 20, 30 ó 50 mg/kg de peso corporal de clorhidrato de bupivacaína no encapsulada. La DMT se definió como la dosis más elevada a la cual ninguno de los animales experimento toxicidad sistémica.

Estos estudios demostraron que ninguno de los ratones que recibieron clorhidrato de bupivacaína libre por vía subcutánea mostró ningún signo de toxicidad sistémica a dosis de 10 y 20 mg/kg. No obstante, a las dosis de 30 y 50 mg/kg, dos de tres y tres de tres animales, respectivamente, desarrollaron toxicidad. Por otro lado, la formulación de LMV de sulfato de bupivacaína administrada por vía subcutánea a una dosis de 780 mg/kg no demostró ningún signo de toxicidad sistémica en ninguno de los animales; mientras que tres de tres animales presentaron toxicidad a una dosis de 980 mg/kg. Por tanto, se estimó que la DMT para bupivacaína no encapsulada era de aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal y para el sulfato de bupivacaína encapsulada en LMV se estimó a aproximadamente 780 mg/kg de peso corporal.

La toxicidad más grave surgida por el uso de anestésicos locales es convulsión o colapso cardiovascular. Consistente con el menor pico de concentración sérica que se encuentra tras la administración de las formulaciones de

LMV de bupivacaína, la dosis máxima tolerada para la bupivacaína encapsulada el LMV fue muchas veces mayor que para el clorhidrato de bupivacaína. Estos datos predecirían un incremento del perfil de seguridad sistémica para las composiciones producidas por el procedimiento de la presente invención. Los perfiles de toxicidad de los ingredientes activos e inactivos están bien definidos, lo que reduce la probabilidad de hallar una toxicidad inesperada.

Ejemplo 6

Estudios farmacocinéticos

La farmacocinética *in vivo* de las formulaciones de LMV de bupivacaína y clorhidrato de bupivacaína libre se compararon tras una única dosis intracutánea de 1 ml de la formulación de LMV que contiene 1,0 por ciento (p/v) de bupivacaína o una dosis de 0,5 por ciento (p/v) de clorhidrato de bupivacaína no encapsulada administrada a un grupo de cobayas. Se seleccionó la menor concentración para clorhidrato de bupivacaína porque los animales de 400-600 gramos no pudieron tolerar una dosis de concentración de 1,0% del fármaco no encapsulado. Para los animales que recibieron clorhidrato de bupivacaína libre, las muestras se recogieron a 0 y 30 minutos y a las 1, 3, 6 y 9 horas de la inyección, mientras que en los animales que recibieron las formulaciones de LMV de bupivacaína las muestras se obtuvieron 0, 6, 12, 18, 24, 48 y 72 horas después de la inyección. En cada punto de tiempo, primero se anestesió con halotano a 3 o más animales y después se desangraron mediante punción cardíaca. Se obtuvieron muestras de suero mediante centrifugación de sangre entera coagulada. Se recogió piel de alrededor del punto de inyección con márgenes de 3 cm, junto con una capa de 2-3 mm del tejido subcutáneo subyacente. Las muestras de piel y de suero se conservaron congeladas a -20°C hasta su análisis.

La cantidad de bupivacaína total restante en el punto de la inyección se obtuvo picando el tejido, seguido por homogeneización *in toto* en agua usando un homogeneizador Polytron (Brinkman, Littau, Suiza). Se extrajo la bupivacaína del homogeneizado y se analizó mediante HPLC usando un procedimiento previamente publicado (Le Guevello y col., J. Chromatography 622:284-290, 1993). La concentración de bupivacaína en suero se determinó mediante extracción, seguida por HPLC (Le Guevello y col., *ant.*) Como patrón interno se usó tetracaína introducida en cada muestra antes de la extracción. El límite de detección del ensayo fue 20 ng/ml.

Los datos farmacocinéticos obtenidos de las muestras se analizaron usando un modelo no compartimental (software WinNonlin, Scientific Consulting, Inc., Apex, NC). Los parámetros calculados fueron la cantidad del fármaco restante en el punto de la inyección, el área debajo la curva "cantidad frente al tiempo" (AUC) y la semivida del fármaco ($t_{1/2}$). Además de la AUC y la semivida, también se dio a conocer la concentración máxima ($C_{máx}$) para la farmacocinética de bupivacaína en suero.

Se usó un análisis de la varianza de una vía (ANOVA) para determinar por separado la dependencia de la dosis para las diferentes formulaciones del fármaco y ruta de administración (mediante LMV o en fármaco libre), así como para la comparación entre formulaciones. Se usaron pruebas de Student-Newman-Keuls en todos los análisis ANOVA. Los parámetros farmacocinéticos obtenidos mediante estos procedimientos se resumen en la Tabla 2 siguiente.

TABLA 2

Parámetros farmacocinéticos tras una única inyección intracutánea de 1,0% de DepoBupivacaína o 0,5% de clorhidrato de bupivacaína		
	Bupivacaína encapsulada en LMV	Clorhidrato de bupivacaína
Concentración del fármaco administrada	1,0%	0,5%
Cantidad máxima (mg), Piel	11,6	3,8
$t_{1/2}$ (h), Piel	12	1,3
AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{h}$), Piel	236	2,9
$C_{máx}$ ($\mu\text{g}/\text{ml}$), Suero	2,9	6,5
$t_{1/2}$ (h), Suero	20,5	2,1
AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{ml}^{-1}$), Suero	56,1	21,2
r^2 Piel	0,97	0,85
r^2 , Suero	0,89	0,93

La “concentración de fármaco administrada” está en unidades de peso del anestésico por volumen de LMV. La “cantidad máxima” muestra la cantidad máxima de la sustancia indicada en la muestra de piel. La “ $C_{\text{máx}}$ ” es la concentración máxima de la sustancia indicada en suero. El “ $t^{1/2}$ ” es la semivida del fármaco. El “área AUC” es el área bajo la curva “cantidad frente a tiempo”. El “ r^2 ” es el cuadrado del coeficiente de correlación de la muestra.

Como muestran estos resultados, tras la administración intracutánea de la formulación de LMV, la cantidad total del fármaco en el tejido del punto de inyección disminuyó con una semivida de 12 horas en comparación con 1,3 horas del clorhidrato de bupivacaína no encapsulada. La concentración máxima en suero de bupivacaína tras una única dosis intracutánea de la formulación de LMV 1,0% se dividió por 2,2 (por 4,4 cuando se corrigió para la dosis) en comparación con la observada tras la concentración de 0,5% de clorhidrato de bupivacaína. De igual forma, la semivida terminal en suero para las formulaciones de LVM de 1,0 por ciento (p/v) fue de 20,5 horas en comparación con 2,1 horas para el clorhidrato de bupivacaína no encapsulada a una concentración de 0,5 por ciento (p/v).

La AUC en el punto de inyección local para la formulación de LMV fue de 81 veces (41 veces cuando se corrigió para la dosis) la del clorhidrato de bupivacaína no encapsulada y la ACU en suero fue 2,6 veces (1,3 veces cuando se corrigió para la dosis) la del clorhidrato de bupivacaína.

Las figuras 3A y 3B muestran el resultado de los estudios farmacocinéticos. La figura 3A muestra la cantidad de bupivacaína encapsulada en LMV a una concentración de 1,0 por ciento (p/v) de bupivacaína (círculos rellenos) o de clorhidrato de bupivacaína no encapsulada a una concentración de 0,5 por ciento (p/v) de bupivacaína (círculos vacíos) restante en un punto de inyección en los puntos de tiempo analizados durante un periodo de 72 horas. La figura 3B muestra la concentración en suero ($\mu\text{O}/\text{ml}$) de bupivacaína tras una única dosis intracutánea de la formulación encapsulada en LMV a 1,0 por ciento (p/v) de bupivacaína (círculos sólidos) o de clorhidrato de bupivacaína no encapsulada a una concentración de 0,5 por ciento (p/v) de bupivacaína (círculos vacíos). Cada punto de dato representa la media y el error estándar de la media (SEM) de 3 a 6 animales. Para todas las pruebas se usó un nivel de significación estadística de 0,05.

Los datos farmacocinéticos obtenidos en los ejemplos de la presente memoria descriptiva fueron consistentes con una duración prolongada del efecto anestésico. La duración de la anestesia fue 2,9 a 3,2 veces mayor para bupivacaína encapsulada en LMV y la semivida en el punto de inyección fue 9,2 veces mayor en comparación con clorhidrato de bupivacaína. La concentración máxima disminuyó 4,5 veces (normalizada a dosis equivalentes) y la semivida terminal en suero incrementó 9,8 veces tras la administración de bupivacaína encapsulada en LMV en comparación con clorhidrato de bupivacaína.

En conclusión, una única dosis intracutánea de bupivacaína encapsulada en LMV tuvo como resultado una duración prolongada de la anestesia (de hasta 28 horas) y un incremento de 9,2 veces (sin corregir para la dosis) en la semivida en el punto de la inyección local en comparación con clorhidrato de bupivacaína. La dosis máxima tolerada se incrementó 39 veces en comparación con clorhidrato de bupivacaína. Por tanto, las formulaciones de la invención tienen utilidad para la infiltración sostenida de anestesia sin la necesidad de infusión continua y pueden incrementar la satisfacción del paciente.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende un anestésico amida encapsulado en un liposoma multivesicular, comprendiendo dicho liposoma multivesicular anestésico amida; al menos un ácido seleccionado del grupo constituido por un ácido mineral diprótico, un ácido mineral triprótico y un polihidroxi carboxilato o combinaciones de los mismos; un componente lipídico que comprende al menos un lípido anfipático y al menos un lípido neutro que carece de un grupo de cabeza hidrófilo; y, opcionalmente, un colesterol y/o un esteroide vegetal.

2. La composición de la reivindicación 1, en la que el ácido es un ácido mineral triprótico.

3. La composición de la reivindicación 2, en la que el ácido mineral triprótico es ácido fosfórico.

4. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho al menos un lípido anfipático se selecciona del grupo constituido por dierycoilfosfatidilcolina y dipalmitoilfosfatidilglicerol.

5. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho al menos un lípido anfipático comprende dierycoilfosfatidilcolina.

6. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho al menos un lípido anfipático comprende dipalmitoilfosfatidilglicerol.

7. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho al menos un lípido neutro comprende tricaprilina.

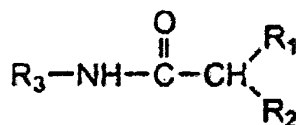
8. La composición de la reivindicación 1, en la que el anestésico amida se selecciona del grupo constituido por bupivacaína, mepivacaína, ropivacaína, lidocaína, pirrocaína, prilocaína, sus estereoisómeros y combinaciones de los mismos.

9. La composición de la reivindicación 1, en la que el anestésico amida es bupivacaína.

10. La composición de la reivindicación 1, en la que el lípido anfipático se proporciona en mezcla con colesterol.

11. La composición de la reivindicación 1, en la que el ácido es ácido fosfórico, dicho al menos un lípido anfipático comprende dierycoilfosfatidilcolina y/o dipalmitoilfosfatidilglicerol, dicho al menos un lípido neutro comprende tricaprilina, dicho anestésico amida es bupivacaína.

12. La composición de la reivindicación 8, en la que el anestésico amida tiene la estructura siguiente:



en la que R₁ es una alquilamina secundaria o terciaria o una alquilenamina secundaria o terciaria, R₂ es hidrógeno, alquilo o alquileo que además se une a R₁, R₃ es un sustituyente fenilo alquilsustituido.

13. La composición de la reivindicación 12, en la que R₁ y R₂ forman un sustituyente seleccionado del grupo constituido por N-alquilpiperidina y N-alquilpirrolidina.

14. La composición de la reivindicación 12, en la que R₃ es un sustituyente 2,6-dimetilfenilo.

FIGURA 1A

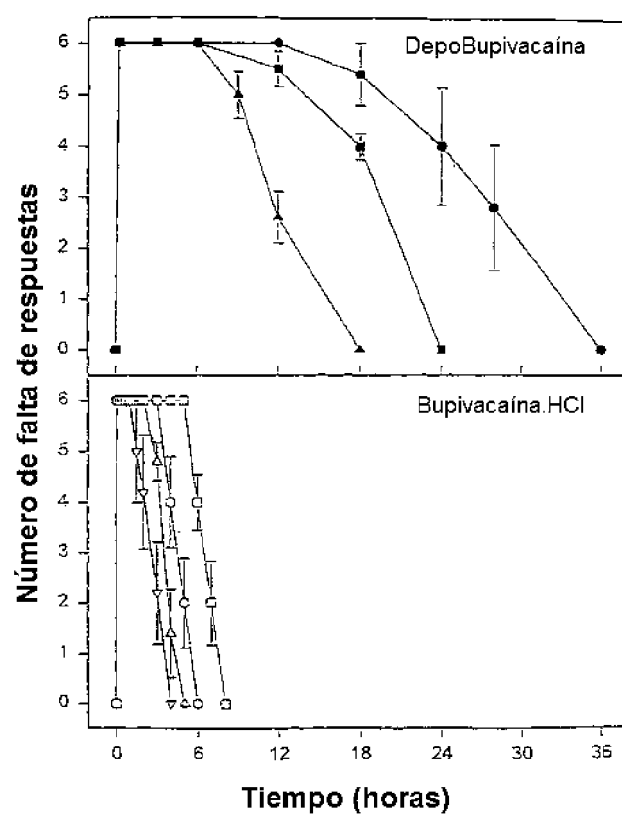


FIGURA 1B

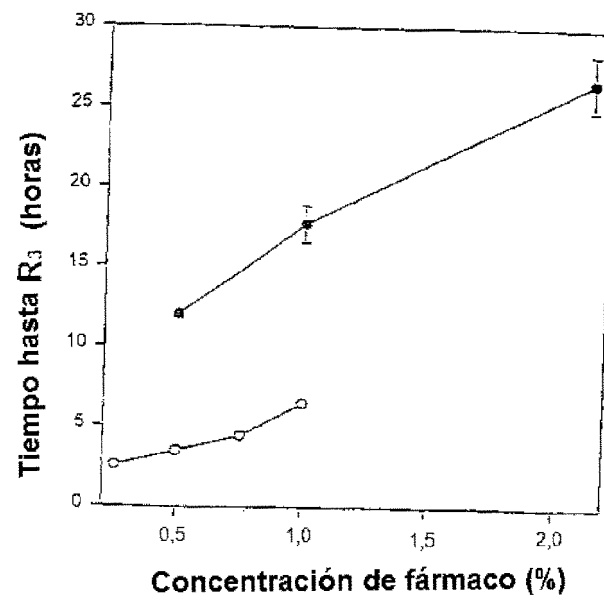


FIGURA 2

FIGURA 3A

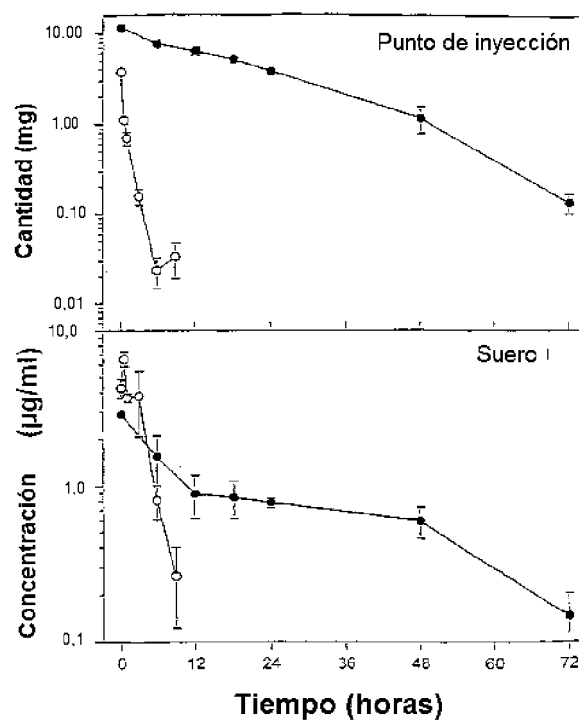


FIGURA 3B