



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 283 071**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **98945975 .5**

86 Fecha de presentación : **08.09.1998**

87 Número de publicación de la solicitud: **1011637**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **28.06.2000**

54 Título: **Modulación de la carga de medicamentos en liposomas multivesiculares.**

30 Prioridad: **08.09.1997 US 925532**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.10.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.10.2007

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

72 Inventor/es: **Ye, Qiang;**
Katre, Nandini y
Sankaram, Mantripragada

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 283 071 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

Modulación de la carga de medicamentos en liposomas multivesiculares.

5 **Antecedentes de la invención**1. **Campo de la invención**

10 La presente invención se relaciona con un método para controlar la carga de agentes activos en los liposomas. Más particularmente, la presente invención se relaciona con métodos para modular la carga de agentes activos en liposomas multivesiculares.

2. **Descripción del arte relacionado**

15 El tratamiento óptimo con muchos medicamentos requiere que el nivel del medicamento se mantenga a un valor especificado durante un periodo de tiempo prolongado. Por ejemplo, un tratamiento anticáncer óptimo con antime-
tabolitos de células de ciclo específico requiere el mantenimiento de un nivel citotóxico del medicamento durante
un periodo de tiempo prolongado. La citarabina es una droga anticáncer altamente dependiente del esquema de su-
ministro. Debido a que esta droga mata las células solo cuando éstas se encuentran sintetizando ADN, se requiere
20 una prolongada exposición a concentraciones terapéuticas de la droga para lograr un efecto terapéutico óptimo. La
efectividad terapéutica de tales agentes a veces se complica por el hecho de que su vida media, luego de una dosis
intravenosa o subcutánea, puede ser tan corta como solo unas pocas horas. Para lograr efectos terapéuticos óptimos
contra las células cancerosas con un medicamento de fase específica de ciclo celular como la citarabina existen dos
requerimientos principales: primero, las células cancerígenas tienen que estar expuestas a una alta concentración de
25 la droga sin que se haga un daño significativo irreversible a las células huésped; y segundo, el tumor tiene que estar
expuesto a la droga durante un periodo de tiempo prolongado con el fin de maximizar el número de células cancerí-
genas contactadas durante la síntesis del ADN, la porción susceptible del ciclo de proliferación celular. Esta clase de
tratamiento requiere una alta carga de medicamento en una formulación de liberación lenta.

30 Otros ciertos tipos de drogas son tan tóxicas que es importante mantener un nivel bajo de las mismas durante un pe-
riodo de tiempo extendido. Por ejemplo, la amikacina es un antibiótico aminoglicósido con una actividad clínicamente
significativa contra cepas de ambas bacterias, gram negativas y gram positivas. Bajo procedimientos terapéuticos exis-
tentes la droga es administrada normalmente mediante ruta intravenosa o intramuscular en un esquema de una o dos
veces por día. La dosis clínica más comúnmente usada es 15 mg/kg/día, que es equivalente a una dosis diaria máxima
35 recomendada de 1g por día. Sin embargo, la administración del medicamento mediante inyecciones espaciadas resulta
en una exposición sistémica a los pacientes y, dependiendo de la droga, en un riesgo potenciado de efectos tóxicos
colaterales. En consecuencia, una preparación de punto local y lento suministro para el tratamiento de infecciones tales
como las confinadas a una región local de tejido suave o hueso sería ventajosa para aumentar los niveles de la droga
en tejidos locales, en comparación con dosis sistémicas terapéuticas, a la vez que para reducir o evitar la toxicidad
40 sistémica de la droga libre. Si la droga es altamente tóxica o el régimen de tratamiento requiere una dosis terapéutica,
es beneficiosa una formulación de liberación lenta.

Una estrategia que ha sido empleada para proveer composiciones de liberación controlada de la droga es la encapsu-
lación liposómica. Entre los principales tipos de liposomas, los liposomas multivesiculares (Kim, *et al.*, *Biochim.*
45 *Biophys. Acta*, 728: 339-348, 1983) son diferentes de los liposomas unilamelares (Huang, *Biochemistry*; 8: 334-352,
1969; Kim, *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*; 646: 1-10, 1981), de los liposomas multilamelares (Bangham, *et al.*, *J. Mol.*
Bio., 13: 238-252, 1965) y de los liposomas plurilamelares (Patente U.S N° 4'522.803). En contraste a los liposomas
unilamelares, los multivesiculares contienen múltiples cámaras acuosas. En contraste a los liposomas multilamelares,
las múltiples cámaras acuosas de los liposomas multivesiculares no son concéntricas.

50 El arte anterior también describe métodos para la producción de liposomas multivesiculares (Kim, *et al.*, *Biochim.*
Biophys. Acta, 728: 339-348, 1983). Sin embargo se comprobó que la eficiencia de encapsulación de algunas moléculas
pequeñas tales como la citosina arabinosa, también conocida como citarabina o Ara-C, es relativamente baja y la
rata de liberación de moléculas encapsuladas en fluidos biológicos es más rápida que lo que se desea desde el punto
55 de vista terapéutico. EP 0 280 503 B1 revela un método desarrollado para controlar la tasa de liberación de moléculas
encapsuladas de los liposomas multivesiculares donde un clorhidrato es introducido durante el proceso de encapsula-
ción con el fin de controlar la tasa de liberación en los fluidos biológicos (del agente activo). Investigación adicional,
revelada en WO 95/13796, ha mostrado que la tasa de liberación de agentes desde los liposomas multivesiculares en
plasma humano puede ser controlada introduciendo un ácido no clorhídico a la solución acuosa en la cual el agente se
60 disuelve antes de formar el liposoma multivesicular.

La patente US N° 5'077.056 revela estudios que muestran que la tasa de liberación del agente biológico encapsula-
do desde el liposoma al ambiente acuoso, puede ser modulado introduciendo protonóforos o ionóforos a los liposomas
para crear un potencial de membrana. Adicionalmente se conoce un método (Patente U.S N° 5'186.941) para controlar
65 la rata de liberación de los medicamentos a partir de composiciones vesiculares donde los liposomas que contienen un
agente terapéutico encapsulado son suspendidos en una solución que contiene suficiente soluto para suministrar una
osmolaridad substancialmente isotónica con respecto a la de la solución en el interior de las vesículas, e hipertónica
con respecto al suero fisiológico. En los liposomas multivesiculares también se sabe (WO 96/08253) que controla la

tasa de liberación de agentes activos introduciendo un espaciador osmótico en la solución acuosa en la cual el agente activo se disuelve antes de la formación de los liposomas multivesiculares.

Adicionalmente a los agentes biológicamente activos y a los ácidos o espaciadores osmóticos cuya intención es la de controlar la rata de liberación del agente biológicamente activo de los liposomas, es práctica común el coencapsular compuestos adicionales para cumplir cualquiera de un número de funciones de soporte. Por ejemplo, ciertos compuestos biológicamente activos retienen su actividad solamente cuando se les mantiene a un determinado pH. Así, los ácidos o soluciones amortiguadoras a menudo son necesariamente encapsuladas, adicionalmente al agente activo, con el fin de controlar el pH del ambiente del medicamento. En otros casos se incorpora un contraión para aumentar la solubilidad de un agente biológicamente activo que presenta una baja solubilidad.

Estos métodos para la producción de formulaciones liposómicas con características de lenta liberación algunas veces han resultado ser incompatibles con el propósito de producir liposomas que contengan una alta carga de agente activo con buena eficiencia de encapsulación de tal manera que sea poca la pérdida del costoso agente activo al no lograrse su captura dentro de los liposomas.

De esta manera existe la necesidad de nuevos métodos para la producción de liposomas, por ejemplo liposomas multivesiculares (LMVs) que permitan el control de la carga del medicamento, ya sea alta o baja, mientras que se mantenga la liberación lenta deseable del agente activo hacia los fluidos biológicos y de almacenamiento. De interés particular es el desarrollo de formulaciones de alta carga y liberación controlada para péptidos y proteínas. También existe la necesidad de nuevos métodos para alcanzar estos objetivos sin sacrificar la alta eficiencia de encapsulación con el fin de evitar la pérdida de costosos agentes activos tales como drogas y proteínas terapéuticas.

Resumen de la invención

La presente invención provee un método para modular el cargado de agente biológicamente activo en formulaciones liposómicas. La concentración del agente biológicamente activo en el producto final es modulada ajustando la osmolaridad del componente acuoso en el que se disuelve el agente activo para su encapsulación. Una relación inversa entre la osmolaridad y la carga del fármaco ha sido descubierta donde la carga del agente activo aumenta al disminuir la osmolaridad del componente acuoso. Así, se pueden lograr liposomas, ya sea con alta carga de fármaco o con baja carga de fármaco, mediante manipulación de la osmolaridad de la solución que contiene el medicamento antes de la encapsulación del mismo. Más aún, se ha descubierto que la modulación de la carga del fármaco, particularmente para alcanzar una alta carga de medicamento, puede lograrse sin sacrificar ni la alta eficiencia de encapsulación en el método de fabricación, ni la liberación controlada deseable del fármaco a partir del producto final en uso.

Los liposomas obtenidos por el método de esta invención logran resultados enormemente mejorados suministrando una cantidad deseable del agente activo dentro de un volumen dado de la formulación inyectable o implantable de liposoma y suministra la liberación sostenida del fármaco a un nivel terapéutico deseable cuando es introducido a un lugar *in vivo*. El principio general seguido para modular la carga de agentes activos en formulaciones liposómicas es ilustrado aquí por referencia a la fabricación de liposomas multivesiculares (LMVs).

La carga de fármacos en los liposomas se modula controlando la osmolaridad de la solución acuosa que es encapsulada durante la fabricación de los liposomas. La osmolaridad es la suma de las concentraciones molares de los solutos presentes en la solución acuosa, incluyendo las sustancias biológicamente activas y cualquier molécula de soporte, tal como excipientes osmóticos utilizados para frenar la tasa de agente activo. Si el soluto está presente en una forma disociada, ionizada o agregada, la osmolaridad se define como la suma de las concentraciones molares de las formas disociada, ionizada o agregada. La contribución hecha por cualquier soluto en solución a la osmolaridad de la solución es aproximadamente equivalente a la concentración del soluto en solución dividida por su peso molecular. Así, como principio general, entre mayor sea el peso molecular de un soluto, menor es su osmolaridad y menor su contribución a la osmolaridad total de la solución.

Es bien sabido que el nivel de carga de fármaco en los liposomas es directamente proporcional a la concentración del agente biológicamente activo. De acuerdo a esto, un alto nivel del agente activo tiene que ser disuelto en una solución acuosa que va a ser encapsulada con el fin de obtener liposomas con un alto nivel de carga de fármaco. Sin embargo, la carga no siempre puede ser aumentada por adición de una concentración adicional del agente activo. Solutos diferentes al agente activo, presentes en la solución acuosa, utilizados durante la obtención de los liposomas, tienden a reducir la cantidad del agente biológicamente activo que puede ser cargada en los liposomas. Por lo tanto si la solución también contiene excipientes osmóticos, necesarios para regular la solubilidad o bioactividad del agente activo, los efectos benéficos de los excipientes osmóticos de soporte en la solución tienen que ser balanceados con relación a sus efectos adversos sobre la carga del fármaco.

Para potenciar la carga del fármaco, la osmolaridad de la solución acuosa puede ser disminuida sin disminuir la concentración del agente activo disuelto en ella, ya sea reduciendo la concentración de los excipientes osmóticos o reemplazando un excipiente osmótico de bajo peso molecular por un excipiente osmótico de mayor peso molecular y de función comparable o haciendo ambas cosas. Por ejemplo, si el excipiente osmótico es una solución amortiguadora utilizada para lograr la solubilidad de un agente biológicamente activo, se selecciona una solución amortiguadora de alto peso molecular con el fin de obtener una alta carga del agente activo. Por el contrario, para disminuir la carga en tal situación se emplearía un tampón de menor peso molecular.

Aunque estos principios son operativos en la obtención de todo tipo de liposomas, se ilustran aquí en formulaciones de LMV que contienen varios agentes activos tales como citarabina, leuprolida, encefalina, morfina y factor de crecimiento I (IGF-I) tipo insulina. En estos estudios se encontró que, para cualquier concentración seleccionada de agente biológicamente activo, la carga de fármaco durante la fabricación puede ser modulada efectivamente en LMVs variando las contribuciones hechas por los excipientes osmóticos en la solución a la osmolaridad total de un primer componente acuoso. Este principio es ilustrado en los presentes ejemplos ajustando la concentración de un excipiente osmótico modelo comúnmente usado en las formulaciones liposómicas, ya sea sacarosa o glicilglicina. Por este método las formulaciones LMV pueden ser producidas con un rango más amplio de niveles de carga para cualquier agente biológicamente activo.

En el método de fabricación de liposomas multivesiculares (LMVs) que tienen carga controlada de fármaco, un componente lipídico que contiene al menos un lípido anfipático y un lípido neutro disueltos en uno o más solventes orgánicos se mezcla con un primer componente acuoso inmiscible que contiene uno o más agentes biológicamente activos para ser encapsulados y, opcionalmente, uno o más excipientes osmóticos tales como una molécula de soporte. El cargado del agente activo a la formulación final dependerá de la osmolaridad total del primer componente acuoso, la cual es la suma de las osmolaridades aportadas por cada uno de los solutos disueltos en el primer componente acuoso, incluyendo al agente activo y cualquier excipiente osmótico.

Una vez que la osmolaridad del primer componente acuoso ha sido ajustada para alcanzar la carga deseada del agente activo en el producto final, se forma una emulsión agua en aceite mediante el mezclado de los dos componentes inmiscibles. La emulsión agua en aceite se mezcla entonces con un segundo componente acuoso inmiscible para formar esférulas de solvente. El solvente orgánico es finalmente removido de las esférulas solventes, por ejemplo, por evaporación para hacer que formen agregados en los LMVs. En la etapa final del proceso se suspenden los LMVs en un medio acuoso, tal como una solución salina normal. Una composición que contenga una dosis terapéuticamente efectiva de agente activo, en una base peso a volumen de la formulación, se puede obtener incrementando o disminuyendo el volumen del medio en el cual los LMVs que contienen el agente activo son suspendidos.

Para mantener una alta eficiencia de encapsulamiento (o porcentaje de producido) durante la formulación de los LMVs y para asegurar que la liberación del agente activo en uso se hace a una tasa terapéutica efectiva baja, el componente lipídico contiene uno o más lípidos anfipáticos con, desde aproximadamente 13 a unos 28, por ejemplo entre unos 18 y 22, átomos de carbono en la cadena carbonada.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una gráfica que muestra el porcentaje de IGF-I retenido en los LMVs durante incubación *in vitro* (tasa de liberación) durante 7 días, en plasma, a 37°C. Durante la fabricación el concentrado utilizado, sacarosa o glicilglicina, como excipiente osmótico fue variado en el componente acuoso para controlar la carga del fármaco. ∇ = 80 mg/mL IGF-I y 2,5% p/v sacarosa (113,5 mOsm); = 80 mg/mL IGF-I y 1% p/v glicilglicina (113,5 mOsm); + = 50 mg/mL IGF-I y 1% p/v sacarosa (63,5 mOsm). Las barras de error representan la desviación estándar.

La Figura 2 es una gráfica que representa la concentración de IGF-I durante 8 días, en suero, (ng/mL) de ratas macho luego de una inyección subcutánea de 10 mg de LMVs que contenían 80 mg/mL IGF-I y 2,5% p/v de sacarosa (113,5 mOsm) en el componente acuoso. Los datos representan el promedio de datos para tres ratas.

Descripción de las modalidades preferidas

En esta invención, se provee un método donde la cantidad de agente biológicamente activo encapsulado por unidad de volumen de formulación liposómica se modula ajustando la osmolaridad del componente acuoso encapsulado que contiene la droga. En éste método una reducción en la osmolaridad del componente acuoso en el que se disuelve el agente activo antes de la encapsulación produce una concentración aumentada del agente activo en la suspensión final LMV en base peso a volumen y viceversa.

Hay por lo menos tres tipos de liposomas. El término "liposomas multivesiculares (LMV)", tal como se usa en las especificaciones y reivindicaciones, significa vesículas lipídicas microscópicas artificiales que incluyen membranas lipídicas con múltiples cámaras acuosas no concéntricas. En contraste, los "liposomas o vesículas multilamelares (VML)" tienen múltiples membranas concéntricas estilo "cebolla", entre las cuales hay compartimientos acuosos concéntricos en forma de cascarón. Los liposomas multilamelares y los liposomas multivesiculares característicamente tienen diámetros medios que se sitúan en el rango de los micrómetros, usualmente entre 0,5 y 25 μm . El término "Liposomas o vesículas unilamelares (VUL)" tal como se usa aquí se refiere a estructuras liposómicas que poseen una sola cámara acuosa, usualmente con un diámetro medio en un rango entre 20 y 500 nm.

Los liposomas multilamelares y unilamelares pueden ser obtenidos por varios métodos relativamente simples. El arte anterior describe un número de técnicas para producir VUL y VML (por ejemplo la Patente U.S N° 4'522.803 a Lenk; 4'310.506 a Baldeschweiler; 4'235.871 a Papahadjopoulos; 4'224.179 a Schneider; 4'078.052 a Papahadjopoulos; 4'394.372 a Taylor; 4'308.166 a Marchetti; 4'485.054 a Mezei y 4'508.704 a Redziniak).

En contraste, la producción de liposomas multivesiculares requiere varias etapas del proceso. Brevemente, el método preferido para hacer LMV es el siguiente: En el primer paso se genera una emulsión de "agua en aceite" disolviendo

por lo menos un lípido anfipático y por lo menos un lípido neutro en uno o más solventes orgánicos volátiles para el componente lipídico. Al componente lipídico se agrega un primer componente acuoso inmiscible que contenga un agente biológicamente activo que vaya a ser encapsulado y una o más moléculas de soporte. i.e. excipientes osmóticos que suministren propiedades útiles y benéficas a los LMVs. La mezcla es emulsificada y luego mezclada con un segundo componente acuoso inmiscible para formar una segunda emulsión. La segunda emulsión se mezcla, ya sea mecánicamente, mediante energía ultrasónica, por atomización y afines o por combinación de los métodos anteriores, con el fin de obtener esférulas solventes suspendidas en el segundo componente acuoso. Las esférulas solventes contienen múltiples gotas acuosas con el agente biológicamente activo, que va a ser encapsulado, disuelto en ellas (ver Kim *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta*, 728: 339-348, 1983). Para una amplia revisión de varios métodos de preparación de VUL y VML ver Szoka, *et al. Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9: 465-508, 1980.

El término “esférula solvente” tal como se usa en las especificaciones y reivindicaciones significa una gota esférica microscópica de un solvente orgánico, dentro de la cual hay múltiples gotas más pequeñas de una solución acuosa. Las esférulas solventes están suspendidas y completamente inmersas en una segunda solución acuosa.

El término “lípido neutro” significa un aceite o grasa que no tiene capacidad de formar membrana por sí misma y a la que le falta un grupo “cabeza” hidrofílico.

El término “lípido anfipático” significa una molécula que tiene una cabeza hidrofílica y una cola hidrofóbica y que presenta la capacidad de formar membrana.

El término “lípido zwitteriónico” significa un lípido anfipático con una carga neta cero a pH 7,4.

El término “lípido aniónico” significa un lípido anfipático con una carga neta negativa a pH 7,4.

El término “lípido catiónico” significa un lípido anfipático con una carga neta positiva a pH 7,4.

Para la obtención de liposomas multivesiculares se requiere que al menos un lípido anfipático y un lípido neutro sean incluidos en el componente lipídico. Los lípidos anfipáticos pueden ser zwitteriónicos, aniónicos o catiónicos. Ejemplos de lípidos anfipáticos zwitteriónicos son las fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas, esfingomiélinas, etc. Ejemplos de lípidos anfipáticos aniónicos son los fosfatidilgliceroles, fosfatidilserinas, fosfatidilinositoles, ácidos fosfatídicos, etc. Ejemplos de lípidos anfipáticos catiónicos son el diaciltrimetil-amoniopropano y etil fosfatidilcolina. Ejemplos de lípidos neutros incluyen diglicéridos como por ejemplo dioleína, dipalmitoleína, y caprilcaprínil diglicéridos; triglicéridos tales como trioleína, tripalmitoleína, trilinoleína, tricaprilina y trilaurina; aceites vegetales tales como aceite de soya; escualeno; tocoferol; y combinaciones de éstos. Adicionalmente, el colesterol o esteroides vegetales pueden ser empleados para la fabricación de liposomas multivesiculares.

Tal como se utiliza aquí, el término “agente biológicamente activo” o “agente activo”, cuando se utiliza para describir agentes presentes en las cámaras de los liposomas multivesiculares o en la solución acuosa utilizada durante la obtención de los liposomas, incluye agentes que poseen actividad biológica orientada en el tratamiento a un estado de enfermedad particular, ya sea en la forma liberada por la vesícula o en una forma que la haga activa luego de ser liberada de la cámara vesicular. Por ejemplo, agentes biológicamente activos incluyen fármacos y pro-fármacos que son convertidos, luego de la interacción con una enzima, en un grupo activo con actividad terapéutica. Los insecticidas, pesticidas y agentes con aplicación cosmética deseable también son cobijados por el término “Agente biológicamente activo”.

El término “excipiente osmótico” significa cualquier molécula soluto biológicamente compatible en una solución acuosa que no es el agente biológicamente activo. Tanto los electrolitos como los no electrolitos actúan como excipientes osmóticos. Para determinar si una molécula en particular funcionará como un excipiente osmótico o para determinar la concentración del excipiente osmótico en una solución, por ejemplo una encapsulada dentro de un liposoma multivesicular, se tiene que considerar si bajo las condiciones al interior de la solución (por ejemplo pH), la molécula se encuentra ionizada parcial o completamente. También se debe determinar si tales iones permearán la membrana lipídica (Mahendra K. Jain, van Nostrand Reinhold Co., *The Bimolecular Lipid Bilayer Membrane*, 1972, 470 pp.). Alguien experto en el arte apreciará que para su uso en la presente invención, el excipiente osmótico tiene que ser seleccionado de tal forma que se evite aquellos probadamente tóxicos o perjudiciales a un sujeto sometido a terapia con el liposoma. Aquellos con experiencia en el arte pueden evaluar fácilmente la adecuabilidad de un excipiente osmótico dado para uso en la presente invención sin tener que recurrir a experimentación innecesaria.

Ciertos excipientes osmóticos presentan actividad biológica inherente y muchos facilitan la actividad biológica del agente biológicamente activo. Por ejemplo, los iones calcio pueden ser co-encapsulados como contraiones con el fin de aumentar la vida de almacenamiento o para facilitar la biodisponibilidad de un fármaco, pero no son suficientes para llevar a cabo la utilidad terapéutica u otra de la formulación LMV. Adicionalmente pueden estar presentes varios estabilizantes, ciertos agentes comúnmente clasificados como excipientes pueden en realidad poseer actividad biológica desde muy modesta hasta muy significativa. Por ejemplo, el excipiente común manitol puede actuar también biológicamente como un diurético. Aún el agua puede actuar biológicamente para curar la deshidratación, pero cuando estos compuestos se usan como excipientes osmóticos en lugar de como agentes activos, son relativamente intercambiables con otros que realizan la misma función de soporte.

ES 2 283 071 T3

Los excipientes osmóticos, que pueden ser utilizados para formar liposomas multivesiculares y para modular la carga del agente encapsulado de los liposomas multivesiculares incluyen, pero no están limitados a, glucosa, sacarosa, trehalosa, succinato, glicilglicina, ácido glucónico, ciclodextrina, arginina, galactosa, manosa, manitol, glicina, lisina, citrato, sorbitol, dextrán y combinaciones adecuadas de éstos. La Tabla 1 abajo, compara la osmolaridad de soluciones de sacarosa y de glicilglicina a diferentes concentraciones.

TABLA 1

Sacarosa o glicilglicina (% p/v)	Osmolaridad para la sacarosa (mOsm)	Osmolaridad para la glicilglicina (mOsm)
0,5	15	38
1,0	30	76
1,5	45	114
2,0	60	152
2,5	76	189
3,0	91	227
4,0	123	303
5,0	156	379
6,0	190	455
7,0	225	530
8,0	261	606

¹Los datos para la sacarosa son tomados de *Handbook of Physics and Chemistry*, 67^{ava} edición

²Los datos para la glicilglicina son calculados con base a la concentración molar.

Aquellos con experiencia ordinaria en el arte pueden corroborar y dilucidar varias combinaciones de excipientes que pueden ser utilizados en las vesículas de la invención sin tener que recurrir a experimentación innecesaria.

Tal como se emplea aquí, el término “cantidad o nivel terapéuticamente efectivo” significa la cantidad de un agente biológicamente activo necesaria para inducir un efecto farmacológico deseado. La cantidad puede variar grandemente de acuerdo a la efectividad del agente activo en particular, la edad, el peso y la respuesta del huésped individual así como la naturaleza y severidad de los síntomas del huésped. Es así como no existe un límite crítico superior o inferior para la cantidad de agente activo. La cantidad terapéuticamente efectiva a emplearse en la presente invención puede ser determinada fácilmente por aquellos con experiencia en el arte.

Tal como se usa aquí, “carga del fármaco” significa, en un sentido cuantitativo general, la cantidad de agente biológicamente activo cargado en el producto de suspensión liposómica. Es por lo tanto una medida de la cantidad de agente activo disponible en una unidad de volumen de la formulación liposómica que va a ser suministrada al paciente durante el uso. Más particularmente, “carga del fármaco” significa la tasa de fármaco encapsulado por unidad de volumen de la suspensión liposómica al porcentaje de volumen encapsulado en los mismos liposomas. Este es aproximadamente igual a la concentración del agente activo en la suspensión dividido entre el lipocrito de la suspensión para fármaco libre en bajo porcentaje.

$$\text{Carga de la droga} = (\text{Fármaco encapsulado por unidad de volumen de la suspensión liposómica}) / (\text{porcentaje volumen encapsulado en el liposoma}) \approx (\text{Concentración del fármaco de la suspensión liposómica}) / \text{Lipocrito}$$

Tal como se usa aquí, “porcentaje de encapsulación del fármaco, u otro compuesto” significa la tasa de la cantidad de compuesto que va a ser encapsulado en la suspensión final del proceso de fabricación del liposoma a la cantidad total de compuesto que va a ser encapsulado usada en la primera solución acuosa del proceso multiplicado por 100.

$$\text{Porcentaje de encapsulación} = [(\text{cantidad de compuesto encapsulado}) / (\text{Cantidad de compuesto introducido antes de la encapsulación})] \times 100$$

Tal como se utiliza aquí, “lipocrito”, que se define en analogía al hematocrito, significa la tasa del volumen ocupado por los liposomas al volumen de suspensión total multiplicado por 100.

$$\text{Lipocrito} = [(\text{Volumen ocupado por los liposomas}) / (\text{Volumen total de la suspensión liposómica})] \times 100$$

Tal como se usa aquí, “porcentaje de fármaco libre” significa la tasa de la cantidad de fármaco externo a los liposomas en la suspensión liposómica final a la cantidad total de fármaco en la suspensión final (el producto final) multiplicado por 100.

ES 2 283 071 T3

Porcentaje de fármaco libre = [(Cantidad de fármaco por fuera de los liposomas en el producto final)/(Cantidad del fármaco en el producto final)] X 100 \approx (1-lipocrito) X [(Concentración del fármaco por fuera de los liposomas)/(Concentración del fármaco en la suspensión liposómica)]

5 Los métodos para la determinación de estos parámetros se ilustran en el ejemplo 7 de esta solicitud.

Siempre que sea posible, el uso de excipientes osmóticos se reduce a un mínimo o se evita con el fin de lograr una alta carga del agente biológicamente activo. En este caso, la carga del fármaco es directamente dependiente de la concentración del agente activo en la solución que va a ser encapsulada puesto que la osmolaridad es atribuible en gran medida al agente activo. Cuando no es posible el utilizar una primera solución acuosa libre de excipientes osmóticos, la osmolaridad del primer componente acuoso puede ser disminuida substituyendo excipientes osmóticos de alto peso molecular por excipientes de bajo peso molecular como por ejemplo soluciones tampón o estabilizantes de alto peso molecular por otro de menor peso molecular. Igualmente, al escoger un contraión negativo para un fármaco, se puede substituir uno de alto peso molecular por otro que tenga menor peso mecánico. Por ejemplo, en el caso del clorhidrato de morfina el ión cloruro puede ser substituido por sulfato o por un ión negativo con un peso molecular aún mayor tal como fosfato.

20 Contrario a lo anterior, cuando se desea producir una formulación de baja carga de agente biológicamente activo, como en el caso cuando este último es tóxico a altas concentraciones, la osmolaridad de la primera solución acuosa puede ser aumentada escogiendo excipientes osmóticos de bajo peso molecular con el fin de incrementar su osmolaridad.

25 El límite inferior para la osmolaridad del primer componente acuoso puede estar cercano a cero, como en el caso en el que el agente biológicamente activo es una proteína de alto peso molecular u otra macromolécula y no se emplean excipientes osmóticos. Del otro lado, la osmolaridad del primer componente acuoso algunas veces puede ser tan alta como unos 1000 mOsm o mayor sin que se tengan efectos contraproducentes o tóxicos en el uso puesto que muchos de los excipientes pueden salir del liposoma durante el proceso de su obtención. Generalmente, sin embargo la osmolaridad del primer componente acuoso se encuentra en el rango de entre aproximadamente 0,01 mOsm a cerca de 1100 mOsm, por ejemplo en el rango entre cerca a 5 mOsm a cerca de 400 mOsm.

30 La osmolaridad del componente acuoso encapsulado en el producto liposómico final es generalmente isotónico con relación al ambiente acuoso en el cual son almacenados los LMVs (tales como NaCl 0,9% en peso, o solución salina normal) o en el cual se introducen los LMVs para su utilización, tal como suero u otro ambiente acuoso fisiológicamente relevante. Sin embargo, la osmolaridad del componente acuoso en el producto LMV final puede ser hipertónica con el fin de proveer una disminución óptima en la tasa de liberación del agente biológicamente activo desde los liposomas. Por lo tanto, dentro del objetivo de la invención se contempla que el componente acuoso en el producto LMV pueda ser hipotónico con respecto al medio de almacenamiento o al ambiente acuoso en el cual será liberado el agente biológicamente activo.

40 La osmolaridad de una solución salina normal es similar a la del plasma humano y otros ambientes *in vivo* tales como fluido cerebrospinal, fluido sinovial y espacios subcutáneos e intramusculares. Por lo tanto una solución salina puede emplearse como modelo predictivo de la liberación de fármacos LMV en tales ambientes. Debido a que el uso preferido de los LMVs de la invención es para inyecciones *in vivo* o implantes en tejidos o cavidades corporales (por ejemplo como puntos de fármacos), usualmente se almacenan en un medio tal como una solución salina normal, solución salina amortiguada con fosfato u otro medio osmóticamente similar.

50 La rata de liberación del agente activo a partir de las LMVs se incrementa generalmente bajando la osmolaridad del primer componente acuoso utilizado durante la fabricación. Sin embargo, el disminuir la osmolaridad del primer componente acuoso puede tener un efecto negativo sobre la liberación sostenida y la eficiencia de encapsulación. Este efecto negativo puede ser superado utilizando en el componente lipídico uno o más lípidos anfipáticos que tengan entre aproximadamente 13 y 28 átomos de carbono, por ejemplo entre unos 18 y 22 carbonos. Esta regla general se cumple sea o no saturada la cadena carbonada del lípido anfipático o contenga o no uno o más enlaces dobles. Generalmente, sin embargo, al seleccionar los lípidos que se van a emplear en la formulación del lípido multivesicular se debe tener en mente que es posible usarse un solvente orgánico con un punto de ebullición más bajo cuando se utiliza un lípido con un número dado de carbonos en la cadena carbonada si el lípido contiene al menos un doble enlace en la cadena carbonada. Los lípidos anfipáticos preferidos para uso en la formación de liposomas multivesiculares de esta invención son lípidos de ocurrencia natural. Los efectos benéficos sobre la eficiencia de encapsulamiento y liberación sostenida del agente biológicamente activo que se pueden lograr utilizando dichos lípidos anfipáticos de cadena larga de los LMVs se revelan en la Aplicación para Patente U.S pendiente Serial N° 08/723.583, diligenciada el 1° de octubre de 1996, titulada "Método para la producción de liposomas con porcentaje incrementado del compuesto encapsulado" incorporado aquí íntegramente.

65 Una lista representativa de lípidos anfipáticos de cadena larga utilizados en la práctica con esta invención se da a continuación. Esta lista es ilustrativa y no pretende de ninguna manera limitar el objetivo de la invención. También se incluyen las abreviaturas utilizadas para hacer referencia a los fosfolípidos en esta aplicación y en la literatura científica.

ES 2 283 071 T3

DOPC o DC 18:1 PC = 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina

DLPC o DC 12:0PC = 1,2-dilauroil-sn-glicero-3-fosfocolina

5 DMPC o DC 14:0PC = 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina

DPPC o DC 16:0PC = 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina

10 DSPC o DC 18:0PC = 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina

DAPC o DC20:0PC = 1,2-diarquidoil-sn-glicero-3-fosfocolina

DBPC o DC22:0PC = 1,2-dibehenoil-sn-glicero-3-fosfocolina

15 DC16:1PC = 1,2-dipalmitoleoil-sn-glicero-3-fosfocolina

DC20:1PC = 1,2-dieicosenoil-sn-glicero-3-fosfocolina

20 DC22:1PC = 1,2-dierucoil-sn-glicero-3-fosfocolina

DPPG = 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol

DOPG = 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol.

25 Muchos tipos diferentes de solventes hidrofóbicos tales como éteres, hidrocarburos, hidrocarburos halogenados, fluidos supercríticos incluyendo pero no limitado al CO₂, NH₃ y freones, pueden ser utilizados como el solvente de fase lípida. Por ejemplo, dietil éter, isopropil y otros éteres, diclorometano, cloroformo, tetrahidrofurano, éteres halogenados, ésteres y combinaciones de estos son satisfactorias.

30 Los compuestos biológicamente activos terapéuticos, o fármacos, para encapsulación en los métodos y composiciones de esta invención pueden ser seleccionados del grupo general consistente de agentes anti-neoplásticos, agentes anti-infecciosos, hormonas, antidepresivos, agentes anti-inflamatorios, agentes antivirales, agentes anti-nociceptivos, ansiolíticos y biológicos.

35 Ejemplos representativos de agentes anti-neoplásticos útiles en las composiciones y métodos de la presente invención incluyen matotrexato, taxol, factor tumor necrosis, clorambucil, interleucinas, etopósido, citarabina, fluorouracilo y vinblastina.

40 Ejemplos representativos de agentes anti-infecciosos útiles en las composiciones y métodos de la presente invención incluyen amikacina, pentamidina, metronidazol, penicilina, cefalexina, tetraciclina y cloranfenicol.

Ejemplos representativos de agentes antivirales útiles en la composición y métodos de la presente invención incluyen dideoxicitidina, zidovudina, aciclovir, interferones, dideoxinosina y ganciclovir.

45 Ejemplos representativos de ansiolíticos y sedantes útiles en las composiciones y métodos de la presente invención incluyen benzodiacepinas tales como diazepam, barbitúricos tales como fenobarbital y otros compuestos tales como buspirona y haloperidol.

50 Ejemplos representativos de hormonas útiles en las composiciones y métodos de la presente invención incluyen estradiol, prednisona, insulina, hormona del crecimiento, eritropoetina y prostaglandinas.

Ejemplos representativos de antidepresivos útiles en las composiciones y métodos de la presente invención incluyen fluoxetina, trazodona, imipramina y doxepina.

55 Ejemplos representativos de antinociceptivos útiles en las composiciones y métodos de la presente invención incluyen bupivacaína, hidromorfina, oxicodona, fentanilo, morfina y meperidina.

60 El término "biológicos" incluye ácidos nucleicos (ADN y ARN), proteínas glucosaminoglicanos y péptidos e incluye compuestos tales como citocinas, hormonas (hormonas pituitaria, adrenal e hipofiseal), factores de crecimiento, vacunas, etc. De interés particular son la interleucina-2, factores-1 de crecimiento tipo insulina (IGF-I), interferones, insulina, heparina, leuprolida, factores que estimulan colonias de granulocitos, factores que estimulan colonias macrófagas de granulocito (GM-CSF), factores de necrosis de tumores, inhibina, factores alfa y beta del crecimiento de tumores, sustancias inhibitoras de muleria, calcitonina, vacuna para la hepatitis B, vacunas de ADN o ARN, ADN para transferencia de genes y oligonucleótidos antisentido.

65 El agente biológicamente activo puede ser empleado en la presente invención en varias formas tales como en complejos moleculares o sales biológicamente aceptables. Ejemplos representativos de tales sales son succinato, clorhidrato, bromhidrato, sulfato, fosfato, nitrato, citrato, glucuronato, borato, acetato, maleato, tartrato, salicilato, sales

metálicas (p. ej., álcalis o tierras alcalinas) sales de amonio o de aminas (ej., amonio cuaternario) y las similares. Adicionalmente se pueden emplear como agentes biológicamente activos derivados de agentes activos tales como ésteres, amidas y éteres de éstos que tengan características deseables de retención y liberación pero que sean fácilmente hidrolizables por pH fisiológico o enzimas *in vivo*.

5 La concentración del agente biológicamente activo encapsulado puede variar desde unos pocos picomoles a varios milimoles. La concentración deseable de agente biológicamente activo variará dependiendo de características tales como la enfermedad que se va a tratar, edad y condición del paciente y propiedades particulares del agente. En el caso en que el agente está normalmente asociado con efectos laterales tales como toxicidad, generalmente es deseable producir un LMV con una concentración más baja del agente y utilizar una concentración más alta del excipiente osmótico. La interrelación de estos diferentes parámetros puede ser evaluada fácilmente por alguien con experiencia en el arte seleccionando y produciendo un LMV dado sin tener que recurrir a experimentos innecesarios.

15 Formulaciones con alta carga obtenidas por el método de esta invención son particularmente útiles en la industria farmacéutica para reducir la cantidad de formulación liposómica que tiene que ser administrada a un individuo (ej., intramuscular o subcutáneamente) para lograr una concentración terapéutica del fármaco en el torrente sanguíneo. Sin embargo, el límite superior útil de la cantidad de fármaco encapsulada en un volumen dado de suspensión liposómica puede ser dictado por el lipocrito de la suspensión. Como puede apreciar un experto en el arte, puede ser difícil inyectar una suspensión que contenga liposomas si el lipocrito de la suspensión es muy alto.

20 El rango apropiado para la dosificación del agente biológicamente activo en liposomas multivesiculares de esta invención para uso *in vivo* en humanos incluye el rango 0,001 - 6.000 mg/m² de área superficial corporal. Mientras que dosis por fuera de este rango pueden ser suministradas, este rango representa el ancho de uso para prácticamente todos los agentes biológicamente activos. Sin embargo, para un agente terapéutico en particular, la concentración preferida puede ser fácilmente calculada como se describió previamente.

30 Las formulaciones LMV pueden ser adicionalmente diluidas con el fin de obtener una formulación inyectable de liberación lenta de cualquier dosis total terapéuticamente efectiva por adición de un medio de suspensión o de cualquier vehículo fisiológicamente aceptable. Vehículos comunes aceptables incluyen soluciones acuosas y no acuosas y emulsiones. Ejemplos de soluciones no acuosas son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas en agua, emulsiones o suspensiones incluyendo medios salinos y tamponados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer y solución de Ringer lactosada. Los vehículos intravenosos incluyen reaprovisionamiento fluido y nutriente, reaprovisionamiento de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer) y similares. También puede haber presencia de preservativos y otros aditivos tales como antimicrobiales, antioxidantes, agentes quelatantes y gases inertes (ver, *Remington's Pharmaceutical Science*, 16 ed., Oslo, ed., Mack, Easton. PA. 1980)

40 Los liposomas multivesiculares pueden ser administrados por cualquier ruta deseada; por ejemplo intratumoral, intrarticular (en las articulaciones), intraocular, intramuscular, intratecal, intraperitoneal, subcutánea, intravenosa, intralinfática, oral y submucosal. Los liposomas multivesiculares pueden ser modificados utilizando métodos ampliamente conocidos en el arte adhiriendo, ya sea directa o indirectamente por ejemplo mediante una molécula excipiente o péptido, ligantes de objetivo específico, tales como anticuerpos y otros ligantes receptores de proteína específica con el fin de impartir especificidad de objetivo celular o de órgano (Malone, *et al.*, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA.*, 86:6077, 1989; Gregoriadis, *Immunology Today*, 11(3):89, 1990; ambos incorporados por referencia).

50 Se efectuó una serie de experimentos para mostrar que el efecto de la osmolaridad sobre la carga de fármaco es inverso e independiente de otros parámetros usados durante el proceso de fabricación, a excepción de la cantidad de agente activo, la cual es directamente proporcional a la cantidad de agente activo que puede ser cargado en la formulación liposómica. Estos dos parámetros, por lo tanto, tienen que ser balanceados para obtener cualquier nivel de carga deseado. Por ejemplo, en el Ejemplo 1 se mostró que la citarabina puede ser encapsulada en LMVs usando un mezclador vortex y un primer componente acuoso que contenga 40 mg/mL de citarabina en ácido cítrico 20 mM y cantidades de sacarosa en el rango de cero a 8,0 por ciento peso a volumen (% p/v). La correspondiente osmolaridad estimada de la primera composición acuosa en este rango de las formulaciones era de 185,9 a 446,9 mOsm. El correspondiente rango de carga de fármaco (Tabla 2) era de 61,7 a 21,0 mg/ml con un % de producido del proceso de encapsulación que permanecía relativamente constante.

60 Al variar la concentración del agente activo y la concentración del excipiente osmótico, la invención produce formulaciones LMV con un amplio rango de carga de fármaco para cualquier agente activo. Por ejemplo, en el Ejemplo 2 se encapsuló met-enkefalina en LMVs utilizando un primer componente acuoso que contenía 40 ó 5 mg/mL de met-enkefalina en ácido cítrico 20 mM, y 0, 2,5 ó 5% p/v de sacarosa, produciendo un rango de osmolaridad en el primer componente acuoso entre 35,5 y 191,5 mOsm. Los resultados de estos estudios (Tablas 2 y 3) muestran que el disminuir la osmolaridad en el primer componente acuoso resulta en un incremento proporcional en la carga del fármaco, ya sea que la cantidad del agente activo en la primera solución acuosa sea 40 mg/mL ó 5 mg/mL. Adicionalmente, formulaciones LMV que contienen tan poco como 6,4 mg/mL o tanto como 61,7 mg/mL del fármaco fueron obtenidas utilizando el método de la invención. Estos resultados ilustran la amplia aplicabilidad del principio que subyace en la invención reivindicada.

ES 2 283 071 T3

Se efectuaron estudios adicionales utilizando en el primer componente acuoso concentraciones de IGF-I entre 10 y 80 mg/mL, ya fuera con o sin HCl 100 mM o ácido cítrico 25 mM a un pH constante. Se encontró que la solubilidad y biodisponibilidad del IGF-I encapsulado variaba de acuerdo al pH del primer componente acuoso. Estudios han mostrado hasta cerca a 300 mg/mL de IGF-I solubilizan a un pH por debajo de 5. Para todas las concentraciones de IGF-I probadas, en el rango de pH donde el fármaco es soluble, la carga de fármaco varía de acuerdo a la osmolaridad. Para concentraciones de IGF-I en el rango 40 a 300 mg/mL, la solubilidad fue mayor en el rango 2 a 4,8; mientras que el rango de solubilidad útil para las concentraciones de IGF-I en el rango aproximado entre 1 mg/mL y cerca de 33 mg/mL estuvo entre aproximadamente 1 y 5.

Adicionalmente, las formulaciones IGF-I hechas comparan los efectos sobre la carga de fármaco al sustituir como excipiente un azúcar (sacarosa) por un compuesto que no lo es (glicilglicina). En un número de formulaciones el lípido anfipático de cadena larga, utilizado para impartir propiedades de liberación lenta a las formulaciones, también fue cambiado de DEPC a DOPC sin cambio significativo en la tendencia de modulación de la carga de fármaco ajustando la osmolaridad del primer componente acuoso. Para ilustrar que el método de esta invención depende de variables tales como el tamaño de cochada y el método de mezclado usado durante el proceso de fabricación, las formulaciones LMV se obtuvieron en diferentes tamaños de cochada y con diferentes tipos de mezcladores. La comparación de los resultados de estas pruebas en las Tablas 6A a 6F mostraron que la relación inversa entre osmolaridad y carga de fármaco no depende del carácter químico de ninguno de los excipientes osmóticos en el primer componente acuoso, y que, para concentraciones de fármaco constantes, la tendencia de carga incrementada de fármaco con osmolaridad reducida es consistente, aunque diferentes tamaños de cochada y métodos de mezclado puedan dar diferentes niveles de carga.

Los siguientes ejemplos ilustran la manera en la cual la invención puede ser practicada. Se entiende, sin embargo, que los ejemplos son para propósito de ilustración y que la invención no debe tomarse como limitada a ninguno de los materiales específicos o condiciones de estos ejemplos.

Ejemplo 1

Preparación de formulaciones de liposomas

En todos los métodos de fabricación de LMVs ilustrados aquí, en el primer paso se preparó una emulsión de agua en aceite mezclando un componente lípido con un primer componente acuoso. El componente lípido contenía 0,5-4 mL de DOPC o DEPC 1320 mM, colesterol 19,88 mM, DPPG 2,79 mM y trioleína 2,44 mM (Avant Polar Lipids Inc., Alabaster, AL) en cloroformo (Spectrum Chemical Manufacturing Corp., Gardena, CA) como solvente. Un volumen igual (0,5-4 mL) de la primera solución acuosa que contenía citarabina, leuprolida, morfina, encefalina o IGF-I y diferentes concentraciones de un excipiente osmótico se mezclaron con el componente lípido utilizando una variedad de mezcladores con el fin de determinar el efecto de la osmolaridad sobre la carga de fármaco y el porcentaje de producido de las diferentes combinaciones probadas.

Preparación del LMV que contiene la citarabina

Para la citarabina, el componente lípido contenía DEPC en lugar de DOPC, y se prepararon cuatro diferentes soluciones acuosas primarias cada una de las cuales contenía 40 mg/mL de citarabina (Upjohn Co., Kalamazoo, MI) en ácido cítrico 20 mM (Sigma Chemical) y 0, 2, 5 u 8% p/v de sacarosa como agente excipiente osmótico. Una emulsión del lípido y de los primeros componentes acuosos se formó mezclando 0,5 mL del primer componente acuoso con 0,5 mL del componente lipídico utilizando un vortex Baxter® a la máxima velocidad (ajuste 10) durante 6 minutos. A la resultante primera emulsión se le adicionó 2,5 mL de una solución que contenía 4% p/v de glucosa y lisina 40 mM (Spectrum Chemicals) respectivamente. La mezcla resultante fue emulsificada para formar una segunda emulsión con el vortex Baxter a la velocidad máxima (ajuste 10) durante 4 segundos. La segunda emulsión resultante, una emulsión doble agua en aceite en agua, fue transferida para agitación suave a un erlenmeyer de 250 mL que contenía 10 mL de una solución al 4% en peso de glucosa y lisina 40 mM.

Para evaporar el solvente orgánico (cloroformo) de las partículas, se pasó nitrógeno gaseoso sobre la segunda emulsión a 37°C durante 20 minutos con agitación suave. Los liposomas multivesiculares resultantes se lavaron dos veces con 50 mL de solución salina normal por centrifugación a 600 x g en una centrífuga de mesa y luego se resuspendieron en 0,5-4 mL de solución salina normal. La osmolaridad estimada (mOsm), el porcentaje de producido y la carga de fármaco de estas formulaciones se muestran a continuación en la Tabla 2

TABLA 2

Primera solución acuosa				Suspensión liposómica final	
Citarabina (mg/mL)	Sacarosa (% p/v)	Otro	Osmolaridad estimada (mOsm)	% Producido	Carga de fármaco (mg/mL)
40	8,0	Acido cítrico 20 mM	446,9	57,1	21,0
40	5,0	Acido cítrico 20 mM	341,9	62,6	30,8
40	2,0	Acido cítrico 20 mM	245,9	77,3	45,2
40	0,0	Acido cítrico 20 mM	185,9	69,6	61,7

Estos resultados muestran que la carga de fármaco puede ser modulada variando la osmolaridad de la primera solución acuosa, obteniéndose un aumento en la carga de fármaco al disminuir la osmolaridad. El incremento en la carga del fármaco obtenido por disminución de la osmolaridad no representa una variación significativa en el porcentaje de producido en la formulación LMV.

Ejemplo 2

Preparación de formulaciones de liposomas multivesiculares que contienen met-enkefalina

Se preparó, como en el Ejemplo 1, un componente lípido que contiene DEPC en lugar de DOPC. El primer componente acuoso contenía 5 mg/mL de met-enkefalina (un pentapéptido) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) en ácido cítrico 25 mM y 0; 2,5 ó 5,0% p/v de sacarosa como excipiente osmótico. Los pasos restantes descritos en el Ejemplo 1 fueron efectuados para obtener LMVs que contenían met-enkefalina suspendidos en solución salina normal. La osmolaridad estimada (mOsm), el porcentaje de producido y la carga de fármaco de estas formulaciones se reporta a continuación en la tabla 3:

TABLA 3

Primera solución acuosa				Suspensión liposómica final	
Enkefalina (mg/mL)	Sacarosa (% p/v)	Otro	Osmolaridad estimada (mOsm)	% Producido	Carga de fármaco (mg/mL)
5	5,0	Acido cítrico 25 mM	191,5	77,5	6,4
5	2,5	Acido cítrico 25 mM	111,5	71,8	13,4
5	0,0	Acido cítrico 25 mM	35,5	72,5	50,8

Los datos en la Tabla 3 nuevamente muestran que la carga de met-enkefalina se modula variando la osmolaridad de la primera solución acuosa, obteniéndose un incremento en la carga de fármaco al disminuir la osmolaridad. De esta manera el efecto es independiente de la carga de fármaco. El porcentaje de producido no varía significativamente por disminución de la osmolaridad. El efecto obtenido sobre la carga de fármaco al variar la osmolaridad del primer componente acuoso se obtiene también cuando se reemplaza DEPC por DOPC en el componente lípido durante la fabricación.

Ejemplo 3

Preparación de formulaciones de liposomas multivesiculares que contienen Leuprolida

Como en el Ejemplo 1 se preparó un componente lípido que contenía DOPC en lugar de DEPC, excepto que contenía leuprolida en una concentración molar 3 veces superior a todos los cuatro lípidos en el componente lípido. El primer componente acuoso contenía 15 mg/mL de acetato de leuprolida (Bachem Bioscience Inc., King of Prussia, PA) en ácido fosfórico 100 mM y 4,0 ó 6,0% p/v de sacarosa como excipiente osmótico. Se siguieron los procedimientos del Ejemplo 1 para la obtención de LMVs que contuvieran leuprolida, excepto que se mezclaron 4 mL del primer

ES 2 283 071 T3

componente acuoso con 4 mL del componente lípido utilizando un autohomogenizador TK K a una velocidad de 9.000 rpm durante 8 minutos con el fin de obtener la primera emulsión. A la primera emulsión se le adicionó 16 mL de una solución que contenía 4% p/v de glucosa y lisina 40 mM (Spectrum Chemicals), respectivamente. La mezcla resultante fue emulsificada para formar una segunda emulsión en un autohomogenizador TK K a una velocidad de 4.000 rpm durante 1 minuto. La osmolaridad estimada (mOsm), el porcentaje de producido y la carga de fármaco de estas formulaciones se reporta a continuación en la tabla 4:

TABLA 4

Primera solución acuosa				Suspensión liposómica final	
Leuprolida (mg/mL)	Sacarosa (% p/v)	Otro	Osmolaridad estimada (mOsm)	% Producido	Carga de fármaco (mg/mL)
15	6,0	Acido fosfórico 100 mM	328,6	56,2	10,9
15	4,0	Acido fosfórico 100 mM	261,6	54,1	17,9

10

15

20

25

Al igual que en los ejemplos 1 y 2 anteriores, la carga de la leuprolida, un péptido aminoácido-9, se modula variando la osmolaridad de la primera solución acuosa obteniéndose un incremento en la carga de fármaco al reducir la osmolaridad. Un porcentaje de producido similar fue mantenido a lo largo del rango de osmolaridades ensayadas. Este resultado también se muestra independiente del tipo de mezclador utilizado para generar la primera y segunda emulsión en la fabricación de LMVs.

Ejemplo 4

30

Preparación de formulaciones de liposomas multivesiculares que contienen morfina

35

Se preparó, como en el Ejemplo 1, un componente lípido que contenía DEPC en lugar de DOPC. El primer componente acuoso contenía 17 mg/mL de sulfato de morfina (Mallinckrodt Chemical Inc., St. Louis, MO) en ácido clorhídrico 10 mM y 0,2; 2,5 ó 5,0% p/v de sacarosa como excipiente osmótico. El resto de los pasos descritos en el Ejemplo 1 fueron efectuados hasta obtener LMVs que contenían sulfato de morfina, suspendidos en solución salina normal. La osmolaridad estimada (mOsm), el porcentaje de producido y la carga de fármaco de estas formulaciones se reporta a continuación en la tabla 5:

TABLA 5

Primera solución acuosa				Suspensión liposómica final	
Morfina (mg/mL)	Sacarosa (% p/v)	Otro	Osmolaridad estimada (mOsm)	% Producido	Carga de fármaco (mg/mL)
17	4,8	Acido clorhídrico 10 mM	258,7	39,2	13,3
17	1,8	Acido clorhídrico 10 mM	162,7	58,5	23,1
17	0,2	Acido clorhídrico 10 mM	114,7	48,1	29,0

40

45

50

55

60

Nuevamente, la carga de la morfina, un fármaco liposoluble, se moduló variando la osmolaridad de la primera solución acuosa obteniéndose un incremento en la carga del fármaco al reducirse la osmolaridad. El porcentaje de producido de la formulación LMV se mantuvo substancialmente equivalente a lo largo del rango de osmolaridades ensayadas.

65

Ejemplo 5

Preparación de formulaciones de liposomas multivesiculares que contienen IGF-I

5 1. Preparación de LMVs a escala de 0,5 mL

Se preparó, como en el Ejemplo 1, un componente lípido que contenía DEPC en lugar de DOPC. El primer componente acuoso contenía 50 mg/mL de IGF-I y 0,25; 0,5; 1,0; 2,5 ó 5,0% p/v de sacarosa como excipiente osmótico. El resto de los pasos descritos en el Ejemplo 1 fueron efectuados hasta obtener LMVs que contenían IGF-I, suspendidos en solución salina normal. La osmolaridad estimada (mOsm), el porcentaje de producido y la carga de fármaco de estas formulaciones se reporta a continuación en la tabla 6A:

TABLA 6A

Primera solución acuosa				Suspensión liposómica final	
IGF-I (mg/mL)	Sacarosa (% p/v)	Otro	Osmolaridad estimada (mOsm)	% Producido	Carga de fármaco (mg/mL)
20	5,0	HCl 100 mM	347,0	51,6	37,7
20	2,5	HCl 100 mM	267,0	47,5	46,1
50	2,5	HCl 100 mM	271,0	44,6	45,7
50	0,0	HCl 100 mM	195,0	53,4	73,2

Aunque la carga de IGF-I fue consistente con los resultados obtenidos cuando se utilizó ácido cítrico como amortiguador, el IGF-I mostró cierto nivel de degradación en los estudios realizados para caracterizar la proteína encapsulada.

35 2. Preparación de LMVs a escala de 4 mL

Se preparó, como en el Ejemplo 1, un componente lípido que contenía DOPC en lugar de DEPC. Un primer conjunto de formulaciones empleadas utilizó un primer componente acuoso que contenía 20 mg/mL de IGF-I (Chiron Corp., Emeryville, CA) en ácido clorhídrico 100 mM y 2,5 ó 5,0% p/v de sacarosa como excipiente osmótico. Un segundo conjunto utilizó 50 mg/mL de IGF-I en ácido clorhídrico 100 mM y 0 ó 2,5% p/v de sacarosa como excipiente osmótico. Se siguieron los procedimientos del Ejemplo 1 para la obtención de LMVs que contuvieran IGF-I, excepto que se mezclaron 4 mL del primer componente acuoso con 4 mL del componente lípido utilizando un autohomogenizador TK K a una velocidad de 9.000 rpm durante 8 minutos con el fin de obtener la primera emulsión. A la primera emulsión se le adicionó 16 mL de una solución que contenía 4% p/v de glucosa y lisina 40 mM (Spectrum Chemicals), respectivamente. La mezcla resultante fue emulsificada para formar una segunda emulsión en un autohomogenizador TK K a una velocidad de 4.000 rpm durante 1 minuto. La osmolaridad estimada (mOsm), el porcentaje de producido y la carga de fármaco de estas formulaciones utilizando un mezclador vortex y DEPC, un lípido que tiene una cadena de 22 carbonos, se reporta a continuación en la tabla 6B:

TABLA 6B

Primera solución acuosa				Suspensión liposómica final	
IGF-I (mg/mL)	Sacarosa (% p/v)	Otro	Osmolaridad estimada (mOsm)	% Producido	Carga de fármaco (mg/mL)
50	5,0	0,0	162,7	57,0	49,8
50	2,5	0,0	82,7	62,4	76,8
50	1,0	0,0	36,7	54,9	97,4
50	0,5	0,0	21,7	66,0	157,1
50	0,25	0,0	14,2	67,0	159,4
	0		6,7	N/A	

La Tabla 6B muestra que las cargas obtenidas con el procedimiento que usa el mezclador TK son similares a aquellas obtenidas cuando se utiliza un mezclador vortex para fabricar las emulsiones. Sin embargo, los estudios

ES 2 283 071 T3

conducidos para caracterizar la proteína encapsulada muestran presencia incrementada de oligómeros IGF-I cuando no hay un tampón ácido.

3. Preparación de una formulación LMV a escala 3 mL

Se preparó, como en el Ejemplo 1, un componente lípido que contenía DEPC en lugar de DOPC. El primer componente acuoso contenía una de tres formulaciones: (1) 30 mg/mL de IGF-I en ácido cítrico 25 mM y 0 ó 2,5% p/v de sacarosa como excipiente osmótico. (2) o 50 mg/mL de IGF-I en ácido cítrico 25 mM y 2,5; 0,5 ó 0% p/v de sacarosa, (3) o 50 mg/mL de IGF-I sin ácido cítrico y 0 ó 0,5% p/v de sacarosa. Se siguieron los procedimientos del Ejemplo 1 para la obtención de LMVs que contuvieran IGF-I, excepto que se mezclaron 3 mL del primer componente acuoso con 3 mL del componente lípido utilizando un mezclador Omni ES a una velocidad de 10.000 rpm durante 12 minutos con el fin de obtener la primera emulsión. A la primera emulsión se le adicionó 20 mL de una solución que contenía 4% p/v de glucosa y lisina 40 mM (Spectrum Chemicals), respectivamente. La mezcla resultante fue emulsificada para formar una segunda emulsión en un mezclador Omni ES a una velocidad de 4.500 rpm durante 2 minutos. La osmolaridad estimada (mOsm), el porcentaje de producido y la carga de fármaco de estas formulaciones se reportan a continuación en la tabla 6C:

TABLA 6C

Primera solución acuosa				Suspensión liposómica final	
IGF-I (mg/mL)	Sacarosa (% p/v)	Otro	Osmolaridad estimada (mOsm)	% Producido	Carga de fármaco (mg/mL)
30	2,5	Acido cítrico 25 mM	106,8	69,2	54,8
30	0,0	Acido cítrico 25 mM	30,8	57,2	132,2
50	0,5	0,0	21,7	80,0	171,4
50	0,0	0,0	6,7	72,7	267,5
50	2,5	Acido cítrico 25 mM	109,5	60,3	82,5
50	1,0	Acido cítrico 25 mM	63,5	72,3	138,2
50	0,5	Acido cítrico 25 mM	48,5	71,5	174,2
50	0,0	Acido cítrico 25 mM	33,5	65,8	175,7

Los resultados en la Tabla 6C muestran una modulación de carga de fármaco por osmolaridad similar para cualquier concentración de fármaco ensayada.

50 Ejemplo 6

Preparación de IGF-I encapsulado a escala 125 ml

Se preparó un componente lípido que contenía DEPC en lugar de DOPC igual que para otras formulaciones de fármacos. El primer componente acuoso contenía 15 mg/mL de IGF-I disuelto en solución de 5% sacarosa / citrato de amonio 20 mM o en de 8% sacarosa / citrato de amonio 20 mM. Se mezclaron 125 mL de la primera solución acuosa con 125 mL de un componente lípido utilizando un sistema con recipiente de doble mezclado y alta cizalla con el fin de obtener la primera emulsión. Este sistema de mezclado modela el proceso de producción en escala y se utiliza para escalar las formulaciones de droga encapsulada. Los componentes acuoso y orgánico se mezclaron a una velocidad de 8.000 rpm durante 30 minutos en el primer recipiente de emulsión. La primera emulsión fue entonces bombeada a una rata de 167 mL/min a una corriente fluida consistente de hidróxido de amonio 0,04 N en solución de glicina 1,5% fluyendo a 2.400 mL/min y se mezcló utilizando un mezclador estático en línea con el fin de obtener la segunda emulsión. La rata de flujo total a través del mezclador estático fue de 2567 mL/min. A esta rata la primera emulsión se agotó en 90 segundos. La segunda emulsión, una vez entró en un recipiente de recepción, fue mezclada con solución de lisina y luego fue inmediatamente aspersados con nitrógeno para retirar el solvente orgánico. La osmolaridad estimada (mOsm), el porcentaje de producido y el porcentaje de fármaco libre para estas formulaciones se reporta a continuación en la Tabla 7.

TABLA 7

Primera solución acuosa				Suspensión liposómica final				
IGF-I (mg/mL)	Sacarosa (% p/v)	Otro	Osmolaridad estimada (mOsm)	% Producido	Susp (mg/mL)	% Liposito	Carga de fármaco (mg/mL)	% IGF-I libre
15	8,0	Citrato de amonio 20 mM	~ 321	42	5,1	41,8	12,2	0,18
15	5,0	Citrato de amonio 20 mM	~ 216	56	5,8	36,7	15,8	0,24

Los resultados en la Tabla 7 muestran un incremento similar en la carga de fármaco ocasionado por una disminución en la concentración de sacarosa al igual que para las otras formulaciones de fármacos ensayadas.

20 Ejemplo 7

Efecto de sustituir glicilglicina como excipiente osmótico

Se preparó, como en el Ejemplo 1, un componente lípido que contenía DEPC en lugar de DOPC. El primer componente acuoso contenía 10 mg/mL de IGF-I en ácido cítrico 25 mM y 0; 1,0 ó 2,0% p/v de glicilglicina como excipiente osmótico. Se siguieron los restantes procedimientos del Ejemplo 1 para la obtención de LMVs que contuvieran IGF-I suspendido en solución salina normal. La osmolaridad estimada (mOsm), el porcentaje de producido y la carga de fármaco de estas formulaciones se reportan a continuación en la tabla 6D:

TABLA 6D

Primera solución acuosa				Suspensión liposómica final	
IGF-I (mg/mL)	Glicilglicina (% p/v)	Otro	Osmolaridad estimada (mOsm)	% Producido	Carga de fármaco (mg/mL)
10	2,0	Acido cítrico 25 mM	180,1	64,0	10,4
10	1,0	Acido cítrico 25 mM	104,1	53,0	13,0
10	0,0	Acido cítrico 25 mM	28,1	41,7	24,4

Una modulación osmótica similar de la carga de fármaco se muestra para formulaciones que utilizan un espaciador osmótico no azucarado, glicilglicina, en lugar de sacarosa. Así el efecto de la osmolaridad sobre la carga se muestra en los datos de la Tabla 6D que es independiente de la estructura química del excipiente osmótico usado.

Comparación de diferentes excipientes osmóticos a igual fuerza osmótica

Se fabricaron LMVs en el método del Ejemplo 1 que contenían IGF-I encapsulado con sacarosa 2,5% p/v o glicilglicina 1,0% p/v como excipientes osmóticos a aproximadamente la misma fuerza osmótica. Para la comparación, se introdujo sacarosa 2,5% p/v o glicilglicina 1,0% p/v como excipiente osmótico en el primer componente acuoso que contenía 80 mg/mL de IGF-I y ácido cítrico 25 mM.

Los procedimientos del Ejemplo 1 fueron seguidos hasta obtener los IMVs que contenían IGF-I, excepto que 3 mL del primer componente acuoso fueron mezclados con 3 mL del componente lipídico utilizando un mezclador Omni ES a una velocidad de 10.000 rpm durante 12 minutos con el fin de obtener la primera emulsión. Se adicionó a la primera emulsión 20 mL de una solución que contenía glucosa 4% p/v y lisina 40 mM (Spectrum Chemicals) respectivamente. La mezcla resultante fue emulsionada en el mezclador Omini ES para formar una segunda emulsión a una velocidad de 4.500 rpm durante 2 minutos.

Con el fin de determinar si el efecto sobre la carga de fármaco es atribuible solamente a la osmolaridad del primer componente acuoso, se preparó una tercera formulación tal como se describió anteriormente, excepto que las concentraciones del excipiente osmótico y del IGF-I se disminuyeron proporcionalmente (de 80 mg/mL IGF-I y 2,5%

ES 2 283 071 T3

p/v sacarosa a 50 mg/mL IGF-I y 1,0% p/v sacarosa). En esta formulación el segundo componente acuoso substituyó 1,5% de glicina y lisina 40 mM en lugar de 4% de glucosa y lisina 40 mM utilizadas en el Ejemplo 1. La Tabla 6E a continuación compara la osmolaridad estimada, el % de producido y la carga de fármaco en la suspensión liposómica final para estas formulaciones.

TABLA 6E

Primera solución acuosa				Suspensión liposómica final	
IGF-I (mg/mL)	Controlador osmótico (% p/v)	Otro	Osmolaridad estimada (mOsm)	% Producido	Carga de fármaco (mg/mL)
80 (A)	Sacarosa 2,5 %	Acido cítrico 25 mM	113,5	85,9	145,1
80 (B)	Glicilglicina 1%	Acido cítrico 25 mM	113,5	77,4	156,4
50 (C)	Sacarosa 1 %	Acido cítrico 25 mM	63,5	75,7	142,5

Los datos en la Tabla 6E muestran que la osmolaridad del excipiente osmótico es el resultado variable efectivo porque dos diferentes espaciadores osmóticos, a aproximadamente igual fuerza osmótica pero a concentraciones molares no iguales, produce un efecto comparable sobre la carga de fármaco.

Ejemplo 8

Determinación del porcentaje de encapsulamiento (o porcentaje de producido), lipocrito, porcentaje de fármaco libre, distribución de tamaño de partícula y carga de fármaco

Las Tablas 2 a 6A-E muestran la osmolaridad estimada (mOsm), % de producido y carga de fármaco (mg/mL) para las formulaciones liposómicas descritas anteriormente en los Ejemplos 1 a 6. Estos parámetros se obtuvieron como se explica a continuación:

El porcentaje de encapsulación (o porcentaje de producido) del fármaco se calculó como la relación de porcentaje de la cantidad del fármaco en la suspensión liposómica final a la cantidad total de fármaco utilizado en la primera solución acuosa. De esta manera, el porcentaje de producido del fármaco fue calculado como la relación de la concentración del fármaco en la suspensión final multiplicado por el volumen de suspensión final a la concentración del fármaco en la primera solución acuosa multiplicada por el volumen de la primera solución acuosa. El lipocrito fue calculado, en analogía al hematocrito, como la relación de porcentaje del volumen de píldora al volumen de suspensión (ver condiciones más adelante para obtención del volumen de píldora).

El porcentaje de fármaco libre fue calculado como la relación de porcentaje de la cantidad de fármaco en el sobrenadante a la cantidad de fármaco en la suspensión final. El porcentaje de fármaco libre también puede ser calculado como la relación porcentual de la concentración del fármaco en el sobrenadante a la de la suspensión, multiplicado por (1-lipocrito) la carga de fármaco, lo cual es una medida de la cantidad de fármaco encapsulado en cada unidad del volumen encapsulado. Este es aproximadamente igual a, y puede ser estimado como (asumiendo un bajo porcentaje de fármaco libre), la relación de la concentración del fármaco de la suspensión liposómica final al lipocrito. Estas variables fueron determinadas como se describe en más detalle más adelante.

Con el fin de calcular el lipocrito, cerca de 50 μ L de suspensión de liposomas multivesiculares fueron tomados en un capilar y un extremo de éste fue sellado a la par que se aseguraba que la suspensión no contuviera burbujas. La suspensión fue centrifugada a 600 xg durante 10 minutos para obtener una capa de píldoras y una capa sobrenadante. La relación porcentual de la longitud del tubo ocupado por las píldoras al ocupado por la suspensión da el valor del lipocrito.

Para su uso en la determinación de la cantidad de fármaco libre en una formulación, se obtuvo sobrenadante centrifugando cerca de 0,2 mL de suspensión durante 3 minutos a 600 xg en un tubo para centrífuga Eppendorf®. Para las formulaciones de citarabina y morfina, se retiraron 25-50 μ L del sobrenadante y fueron pipeteados a un tubo de vidrio que contenía 1 ml de alcohol isopropílico: ácido clorhídrico 1N 3:1 v/v (Fisher Chemical, Fair Lawn, NJ), y se mezclaron rigurosamente hasta obtener una solución clara. La absorbancia a 280 nm para la citarabina o a 285 nm para la morfina fue medida en un espectrómetro (Hitachi® U-2000). Para las formulaciones de leuprolida, se tomaron 50 μ L del sobrenadante y se pipetearon a un tubo de vidrio que contenía 2ml de alcohol isopropílico:agua 1:1 titulado a pH 10 usando hidróxido de amonio 0,1 N, seguido de mezclada rigurosa hasta la obtención de una solución clara. La absorbancia a 280 nm fue entonces medida en un espectrofotómetro (Hitachi® U-2000). Para la encefalina y la IGF-I se tomaron 25-50 μ L de sobrenadante y se pipetearon a un tubo de virio que contenía alcohol isopropílico:ácido

cítrico 3:1 v/v (Sigma Chemical), seguido de un mezclado riguroso hasta obtener una solución clara. La absorbancia a 275 nm para la encefalina y la IGF-I fue medida en un espectrofotómetro (Hitachi® U-2000). Se calcularon las concentraciones de fármaco en la suspensión utilizando un estándar de referencia basado en soluciones de fármacos de concentraciones conocidas en las mismas soluciones disolventes.

La distribución de tamaño de partícula y el diámetro medio de partícula fueron determinados por el método de difracción de luz láser utilizando un analizador de tamaño de partícula LA-500 de Horiba Inc (Irvine, CA). Los diámetros medios de partícula para volumen ponderado para todas las formulaciones estudiadas estuvo generalmente en el rango aproximado de 6 a 18 μm .

Ejemplo 9

Liberación In Vitro e In Vivo de formulaciones IGF-I de alta carga de fármaco y alto porcentaje de producido

La integridad fisicoquímica del IGF-I encapsulado fue confirmada mediante ensayo SDS-PAGE utilizando gel Novex® Nu Page y mediante análisis RP-HPLC utilizando una columna simétrica C18. La proteína encapsulada fue extraída utilizando IPA:Acido cítrico 2N 75:25. La bioactividad del IGF-I encapsulado fue confirmada mediante un bioensayo mitogénico usando línea celular de osteosarcoma humano MG-63 y tinción de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) de acuerdo al método de W. Lopaczynski *et al.*, *Regulatory Peptides*, 48:207-216, 1993. Las células MG-63 se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC#CRL 1427) y se determinó la respuesta mitogénica dependiente de la dosis de las células MG-63 en reposo. La bioactividad del IGF-I extraído se confirmó como aproximadamente equivalente al de un estándar no encapsulado.

Experimento In Vitro: Brevemente, un experimento de liberación *in vitro* fue diseñado y realizado de la siguiente manera: Una suspensión de LMV que contenía cerca de 50 mg/mL de IGF-I fue diluida 20 veces en plasma humano que contenía NaN_3 0,01%; una muestra de 0,5 mL en un tubo eppendorf tapa rosca fue empleado para cada punto temporal y se incubaron muestras bajo condiciones de rotación dinámica a 37°C. Muestras de punto temporal e tomaron a diferentes tiempos y fueron lavadas con 0,9 mL de solución salina normal. Se obtuvieron entonces cápsulas particuladas centrifugando en una microfuge a 16000 g durante 4 minutos y se almacenaron a -20°C hasta su análisis por RP-HPLC usando una columna simétrica C18. La Figura 1 muestra algunos datos de liberación *in vitro* en plasma obtenidos para las tres formulaciones IGF-I representativas listadas en la Tabla 6E. Estos datos indican que se logra una liberación de IGF-I sostenida luego de un periodo de varios días con formulaciones IGF-I con una alta carga de fármaco y alto producido.

Experimentos in vivo: Ratas macho fueron inyectadas subcutáneamente con las tres formulaciones LMV mostradas en la Tabla 6E con el fin de obtenerse información acerca de las características de liberación *in vivo*. Cada rata recibió una dosis de 10 mg de IGF-I y cada una de las formulaciones fue inyectada en 3 ratas. Se recolectaron muestras de sangre (0,2 mL) de la vena de la cola de las ratas en los tiempos cero y a 1, 3, 5, y 7 días luego de la inyección y se dejó que coagularan. Luego se obtuvo suero por centrifugación y se almacenó a -70°C antes de analizar la concentración de IGF-I utilizando un juego IGF-I ELISA DSL-10-5600 (Diagnostic Systems Laboratories Inc., Webster, TX de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

La Figura 2 muestra el curso temporal de la concentración media de IGF-I en suero en las ratas que recibieron los 10 mg de formulación A de IGF-I en la Tabla 6E. Estos datos indican que un nivel sostenido de IGF-I en suero se puede lograr a lo largo de un período de muchos días utilizando las formulaciones IGF-I de alta carga de fármaco y alto producido de esta invención.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para controlar la carga de un agente biológicamente activo a un liposoma que incluye:

5 (a) Modulación de la carga de un agente biológicamente activo en un liposoma por ajuste de la osmolaridad de una solución acuosa en la cual se disuelve el agente, donde la osmolaridad de la solución acuosa es aumentada para disminuir la carga de agente, o disminuida para aumentarla; y luego

10 (b) Encapsulamiento de la solución acuosa en el liposoma.

2. Un proceso para producir un liposoma multivesicular que tenga múltiples cámaras no concéntricas, con membranas distribuidas como un sistema continuo y con carga controlada en su interior de un agente biológicamente activo. El proceso consistente de los siguientes pasos:

15 (a) Formación de una emulsión agua en aceite a partir de dos componentes inmiscibles, siendo los dos componentes inmiscibles (i) un componente lípido que tenga al menos un solvente orgánico, al menos un lípido anfipático y un lípido neutro sin cabeza hidrofóbica, y (ii) un componente acuoso que contenga al menos un agente biológicamente activo y que presente una osmolaridad escogida para modular la carga del agente biológicamente activo en los liposomas multivesiculares:

20 (b) Dispersión, en un segundo componente acuoso, de la emulsión agua en aceite que contiene el agente biológicamente activo con el fin de formar esférulas solventes; y luego

25 (c) Remoción del solvente orgánico de las esférulas solventes para formar los liposomas multivesiculares suspendidos en el segundo componente acuoso;

donde la osmolaridad disminuida del primer componente acuoso da como resultado una carga aumentada de fármaco.

30 3. El proceso de la reivindicación 1 ó 2 donde la solución acuosa incluye aún más un excipiente osmótico en una concentración seleccionada para modular la osmolaridad.

35 4. El proceso de la reivindicación 3, donde el excipiente osmótico es sacarosa o es seleccionado de un grupo consistente de glucosa, glicina y glicilglicina.

5. El proceso de la reivindicación 1 ó 2 donde la osmolaridad está en el rango entre unos 0,01 mOsm y cerca de 1100 mOsm.

40 6. El proceso de la reivindicación 1 ó 2 donde la osmolaridad esta en el rango entre aproximadamente 5 mOsm hasta aproximadamente 400 mOsm.

7. El proceso acorde a la reivindicación 1 ó 2 donde el agente biológicamente activo es la citarabina.

45 8. El proceso acorde a la reivindicación 7 donde la osmolaridad de la solución acuosa está en el rango de aproximadamente 185 mOsm y aproximadamente 450 mOsm.

9. El proceso acorde a la reivindicación 1 ó 2 donde el agente activo es morfina.

50 10. El proceso acorde a la reivindicación 9 donde la osmolaridad de la solución acuosa está en el rango de aproximadamente 114 mOsm y aproximadamente 260 mOsm.

11. El proceso acorde a la reivindicación 1 ó 2 donde el agente activo es encefalina.

55 12. El proceso acorde a la reivindicación 11 donde la osmolaridad de la solución acuosa está en el rango de aproximadamente 35,4 mOsm y aproximadamente 191,5 mOsm.

13. El proceso acorde a la reivindicación 1 ó 2 donde el agente activo es leuprolida.

60 14. El proceso acorde a la reivindicación 13 donde la osmolaridad de la solución acuosa está en el rango de aproximadamente 261,6 mOsm y aproximadamente 328,6 mOsm.

65 15. El proceso de acuerdo a la reivindicación 1 ó 2 donde el agente biológicamente activo se selecciona de un grupo consistente de un anestésico, un agente antiasmático, un glicósido cardíaco, un antihipertensivo, un ácido nucleico, un antibiótico, una vacuna, un antiinflamatorio, un antiarrítmico, una antiangina, una hormona, un antidiabético, un antineoplástico, un inmunomodulador, un antifúngica, un tranquilizador, un esteroide, un sedante, un analgésico, un vasopresor, un antiviral, un herbicida, un pesticida, una proteína, un péptido, un neurotransmisor, un radionúclido y combinaciones adecuadas de los anteriores.

ES 2 283 071 T3

16. El proceso de la reivindicación 3 donde el excipiente osmótico se selecciona:

(a) Para disminuir la osmolaridad del primer componente acuoso donde la carga del agente biológicamente activo es incrementada; o

(b) Para aumentar la osmolaridad del primer componente acuoso donde la carga del agente biológicamente activo es disminuida.

17. El proceso de la reivindicación 2 donde el componente lípido incluye al menos un lípido anfipático que tenga entre aproximadamente 13 y aproximadamente 28 átomos de carbono en la cadena carbonada.

18. El proceso de la reivindicación 2 donde el componente lípido incluye al menos un lípido anfipático que tenga entre aproximadamente 18 y aproximadamente 22 átomos de carbono en la cadena carbonada.

19. El proceso de la reivindicación 2 donde el componente lípido incluye al menos un lípido anfipático zwitteriónico o un lípido anfipático aniónico.

20. El proceso acorde a la reivindicación 2 donde el agente biológicamente activo es encefalina.

21. El proceso acorde a la reivindicación 20 donde la osmolaridad del primer componente acuoso está en el rango de aproximadamente 35,4 mOsm y aproximadamente 191,5 mOsm y la carga correspondiente de encefalina esta en el rango de aproximadamente 6,4 mg/mL a aproximadamente 50,8 mg/mL de la formulación.

22. El proceso acorde a la reivindicación 2 donde el primer componente acuoso incluye un excipiente osmótico seleccionado del grupo consistente de glicilglicina, glucosa, sacarosa, trehalosa, succinato, ciclodextrina, arginina, galactosa, manosa, maltosa, manitol, glicina, ácido glucurónico, citrato, sorbitol, dextrán, cloruro de sodio y combinaciones de estos.

23. El proceso acorde a la reivindicación 2 donde la osmolaridad del primer componente acuoso es escogida para modular la tasa de liberación del liposoma multivesicular a un ambiente acuoso fisiológicamente relevante.

24. El proceso acorde a la reivindicación 2 donde el lípido neutro es seleccionado del grupo consistente de trioleína, tripalmitoleína, tricaprín, trilinoleína, trilourina, tricaprilina, escualeno y combinaciones de estos.

25. El proceso acorde a la reivindicación 2 donde el solvente orgánico es seleccionado del grupo consistente de éteres, hidrocarburos, hidrocarburos halogenados, éteres halogenados, ésteres, CO₂, NH₃, freones y combinaciones de estos.

Características de liberación de IGF-I, en plasma in vivo, encapsulado en liposomas multivesiculares. Estas tres formulaciones corresponden a aquellas presentadas en la Tabla 6E: (A) diamante abierto; (B) triángulo abierto y (C) cruz, con barras de error que representan la desviación estándar. Los datos indican una liberación sostenida de IGF-I.

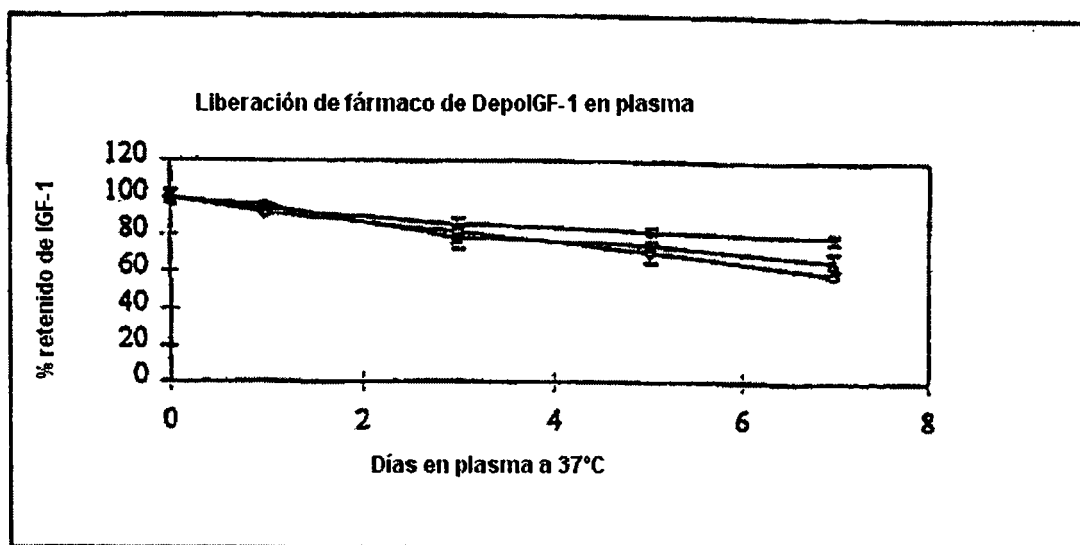


Figura 1

Farmacocinética in vivo de liposomas IGF-I encapsulados (formulación A en la Tabla 6E) luego de inyección subcutánea de una dosis de 10 mg a ratas macho. Los datos (promedio de tres ratas) demuestran una liberación sostenida de IGF-I a lo largo de una semana.

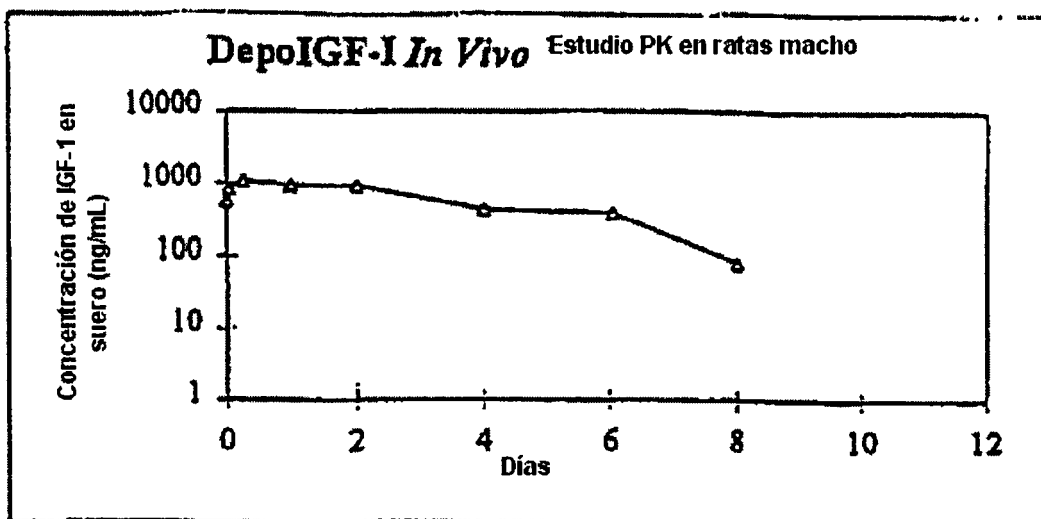


Figura 2