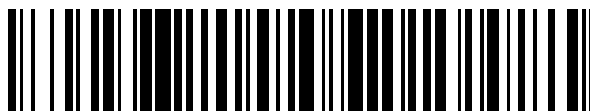


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 826 879**

51 Int. Cl.:

A61K 9/127 (2006.01)
A61K 9/19 (2006.01)
A61K 47/10 (2007.01)
A61K 47/12 (2006.01)
A61K 47/18 (2007.01)
A61K 47/24 (2006.01)
A61K 47/28 (2006.01)
A61K 31/12 (2006.01)
A61K 36/9066 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.03.2018 E 18386004 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2020 EP 3533442**

54 Título: **Procedimiento para la producción de vehículos lipídicos**

30 Prioridad:

28.02.2018 GR 20180100082

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

19.05.2021

73 Titular/es:

**NIKOLAOS A. FIKIORIS KAI SIA ETAIREIA
 PERIORISMENIS EFTHINIS WITH
 DISTINGUISHING TITLE IN TOUCH HEALTH
 E.P.E. (100.0%)
 11 Merlin Str.
 10671 Athens, GR**

72 Inventor/es:

**NAZIRIS, NIKOLAOS;
 PIPPA, ANASTASIA-GEORGIA y
 DEMETZOS, COSTAS**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
 Bemerkungen) en el folleto original publicado por
 la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 826 879 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

Procedimiento para la producción de vehículos lipídicos

Campo técnico

La presente invención se refiere a un procedimiento para producir vehículos lipídicos, tales como liposomas.

5 Antecedentes de la técnicaSistemas de suministro de ingredientes bioactivos lipídicos

Los sistemas de suministro de ingredientes bioactivos a base de lípidos han mostrado un gran potencial en el suministro de ingredientes bioactivos poco solubles en agua, tales como fármacos, principalmente lipófilos, con varios productos comercializados con éxito. Las estructuras de los vehículos lipídicos (p.ej., de doble capa, cúbicos, hexagonales, etc.) dependen de la concentración de fosfolípido/lípido que interviene en el procedimiento y de su geometría, que está relacionada con su estructura química (D. Papahadjopoulos, J.C. Watkins, Phospholipid model membrane, Permeability properties of hydrated liquid crystals, *Biochim. Biophys. Acta* 135, 639 (1967); J. Milhaud, New insights into water-phospholipid model membrane interactions, *Biochim. Biophys. Acta* 1663, 19 (2004); D.D. Lasic, et al., Spontaneous vesiculation, *Adv. Colloid. Interface Sci.* 89-90, 337 (2001)). Por esta razón, pueden atrapar ingredientes bioactivos hidrófobos, hidrófilos o incluso anfifílicos. La predisolución de ingredientes bioactivos en lípidos, tensioactivos o mezclas de lípidos y tensioactivos omite la etapa de disolución, que es un factor limitante potencial de la velocidad de absorción oral de ingredientes bioactivos poco solubles en agua y, en consecuencia, de su eficacia. Sin embargo, los lípidos no solo varían en estructura y propiedades fisicoquímicas, sino también en su vía de digestibilidad y absorción; por lo tanto, la selección de excipientes lipídicos y la forma de dosificación tiene un profundo efecto sobre los aspectos biofarmacéuticos y farmacocinéticos de los ingredientes bioactivos, incluida la absorción y distribución dentro del organismo. Estos efectos se pueden observar tanto in vitro como in vivo (C. Demetzos, *Pharmaceutical Nanotechnology: Fundamentals and practical applications*. Springer ISBN 978-981-10-0791-0 (2016)).

Liposomas

Los liposomas son estructuras cerradas, pseudo-esféricas que constan de una o más bicapas lipídicas, que encierran medio acuoso en su interior y se caracterizan como dispersiones coloidales termodinámicamente inestables (D. Papahadjopoulos, J.C. Watkins, Phospholipid model membrane, Permeability properties of hydrated liquid crystals, *Biochim. Biophys. Acta* 135, 639 (1967); J. Milhaud, New insights into water-phospholipid model membrane interactions, *Biochim. Biophys. Acta* 1663, 19 (2004); D.D. Lasic, et al., Spontaneous vesiculation, *Adv. Colloid. Interface Sci.* 89-90, 337 (2001); V. Guida, Thermodynamics and kinetics of vesicles formation processes, *Adv. Colloid. Interface Sci.* 161 (1-2), 77 (2010); C. Puglia, F. Bonina, Lipid nanoparticles as novel delivery systems for cosmetics and dermal pharmaceuticals, *Expert Opin. Drug Deliv.* 9.429 (2012)). Las bicapas lipídicas están formadas principalmente por fosfolípidos y colesterol, sin excluir el uso de otros biomateriales, p.ej. polímeros, como unidades estructurales liposomales. Los fosfolípidos, por su naturaleza anfifílica, se orientan y autoensamblan dentro del medio acuoso, de modo que sus cabezas polares terminan hacia el medio acuoso, mientras que sus cadenas de hidrocarburos lipofílicas quedan protegidas de la conexión con las moléculas de agua, desarrollando interacciones hidrofóbicas entre ellos. Este comportamiento viene definido por sus características geométricas y más específicamente, por su parámetro crítico de empaquetamiento:

$$C_{PP} = \frac{V}{a_0 l_c}$$

donde V es el volumen de la cola del tensioactivo, l_c es la longitud de la cadena de carbono y a_0 es el área de equilibrio por molécula en la superficie del agregado. Por ejemplo, las moléculas con parámetro de empaquetamiento $1/2 < CPP < 1$ tienen forma de cono truncado y se autoensamblan en vesículas bicapa (J.N. Israelachvili et al., Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers, *J. Chem. Soc., Far. Trans. 2: Mol. Chem. Phys.*, 72, 1525 (1976)); R. Nagarajan, Molecular Packing Parameter and Surfactant Self-Assembly: The Neglected Role of the Surfactant Tail, *Langmuir*, 18, 31 (2002)).

45 Sobre la superficie liposomal, pueden unirse moléculas pequeñas o macromoléculas, p.ej. polímeros, péptidos, ligandos específicos de receptor y anticuerpos; aquellas cambian las propiedades fisicoquímicas de la superficie. Este hecho es muy importante, y define la funcionalidad del nanosistema, que depende de sus características fisicoquímicas inmediatamente después de la producción, así como de la estabilidad física en el tiempo.

50 Hay varios tipos de liposomas, en base a su tamaño, número de bicapas, carga, propiedades superficiales y funcionalidad (D. Papahadjopoulos, et al., Sterically stabilized liposomes: Improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 11460 (1991); M. Riaz, Liposome Preparation Method, *J. Pharm. Sci.* 19 65 (1996); Y.P. Patil, S. Jadhav, Novel Methods for liposome preparation. *Chem Phys. Lipids* 177: 8-18 (2014)). Durante los últimos años, la investigación relacionada con los liposomas creció con fuerza, ya que se desarrollaron vehículos de transporte y administración con fines terapéuticos (es decir, administración de

medicamentos/productos farmacéuticos y biofarmacéuticos). Los liposomas exhiben una serie de propiedades biológicas importantes, algunas de las cuales son la capacidad para la inclusión de moléculas de fármacos tanto hidrófilas como hidrófobas, la provisión de protección para estas moléculas, la capacidad de administración a células específicas o compartimentos celulares, pero también la biocompatibilidad que les caracteriza, junto con la personalización flexible de sus propiedades fisicoquímicas y biológicas.

Debido a su doble naturaleza (bicapa liposómica y núcleo hidrófilo), los liposomas pueden utilizarse como vehículos para ingredientes bioactivos tanto lipófilos como hidrófilos. Dependiendo de su naturaleza, pueden colocarse varios ingredientes bioactivos dentro de la bicapa lipídica o en la sección hidrófila de los liposomas. En el primer caso, el ingrediente bioactivo se incorpora a las bicapas de los liposomas, mientras que en el segundo caso, el ingrediente bioactivo se encapsula dentro del interior acuoso de los liposomas. Se ha informado que cambiar su composición de lípidos (fosfolípidos y, en general, lípidos de estructura diferente), el potencial ζ , el tamaño y la distribución de tamaños es crucial y podría definir el comportamiento liposomal in vivo e in vitro (C. Demetzos, Pharmaceutical Nanotechnology: Fundamentals and practical applications. Springer ISBN 978-981-10-0791-0 (2016)).

La producción de vehículos lipídicos mediante el autoensamblaje y la organización estructural, en función de las características estructurales y geométricas, las propiedades fisicoquímicas y el contenido energético de los biomateriales, es un hecho importante que define el desarrollo de productos farmacéuticos finales. Está directamente relacionada con las características fisicoquímicas, la estabilidad física, la capacidad de atrapamiento de ingredientes bioactivos, la velocidad de liberación y la eficacia de los vehículos, según su perfil de absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME).

Procedimientos de preparación de liposomas y otras nanopartículas a base de lípidos

Los métodos para producir liposomas incluyen varias técnicas, tales como el método de evaporación en fase inversa, el método de sonicación, el método de extrusión, el método de prensa francesa, el método de homogeneización, el método de inyección de etanol, el método de deshidratación-rehidratación, de los cuales una técnica típica es el método Bangham (método de hidratación de película fina) (D. Papahadjopoulos, et al., Sterically stabilized liposomes: Improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 11460 (1991); M. Riaz, Liposome Preparation Method, J. Pharm. Sci. 19 65 (1996); Y.P. Patil, S. Jadhav, Novel Methods for liposome preparation. Chem Phys. Lipids 177: 8-18 (2014)). Según el método Bangham, se obtiene una suspensión que contiene liposomas de la siguiente manera: se disuelve al menos un fosfolípido en un disolvente orgánico, tal como cloroformo, y se coloca la disolución dentro de un recipiente, tal como un matraz de fondo redondo; luego, al evaporar el cloroformo, se forma temporalmente una membrana lipídica en el fondo del recipiente, sobre la cual se agrega una disolución acuosa, tal como un tampón, y se mezcla el recipiente. De esta manera, se producen vesículas multilaminares (MLV) y se procesan posteriormente mediante técnicas de reducción de tamaño y homogeneización, para obtener liposomas, que son pequeñas vesículas unilaminares (SUV).

Más recientemente, tuvo lugar una nueva categorización de las técnicas de preparación de liposomas, como se describe a continuación. Los métodos convencionales de preparación de vesículas unilaminares gigantes (GUV) son: hidratación suave de una película de fosfolípidos, electroformación (la película de fosfolípidos se deposita sobre electrodos y posteriormente se hidrata durante un par de horas en presencia de un campo eléctrico) y ciclos de congelación-descongelación. Para la preparación de las MLV, se utilizan los siguientes protocolos: hidratación de película de fosfolípidos bajo flujo hidrodinámico (vacío), método de disolventes-esférulas e hidratación de proliposomas. Las SUV y las vesículas unilaminares grandes (LUV) se preparan mediante los siguientes métodos: evaporación en fase inversa, inyección de disolvente orgánico con fosfolípidos disueltos en una fase acuosa, diálisis con detergente y reducción de tamaño y lamelalidad de las MLV. Para la ampliación, la microfluídica es el método de preparación de liposomas y sistemas basados en lípidos. La microfluídica implica el flujo de fluido en canales que tienen dimensiones de sección transversal típicamente en el intervalo de 5-500 nm. En la última década, se han desarrollado varias técnicas novedosas basadas en microfluídica para producir liposomas. Las características de los sistemas de microfluídica que pueden utilizarse para la producción de liposomas incluyen la capacidad de dispensar con precisión volúmenes de nanolitros, control preciso sobre la posición de la interfaz, mezcla axial dominada por difusión y modo de funcionamiento continuo a volúmenes bajos. Adicionalmente, el documento US20100239521 describe un procedimiento para la producción de un complejo de un ingrediente bioactivo en un portador polimérico o lipídico. El procedimiento comprende proporcionar una zona de complejación provista con un medio acuoso que contiene el material portador, agitar y calentar el medio, añadir el ingrediente bioactivo al medio acuoso y recuperar el complejo portador del ingrediente bioactivo. El documento WO2005084641 describe un procedimiento similar al del documento US20100239521, en el que además, un gas inerte atraviesa el medio acuoso.

El documento US 2008/274172 A1 se refiere a un método para preparar liposomas con al menos dos fosfolípidos distribuidos uniformemente, sin utilizar disolventes orgánicos.

Los procedimientos de la técnica anterior para la producción de vehículos lipídicos tienen una serie de desventajas. Así, en muchos de esos procedimientos se utilizan disolventes orgánicos clorados y otros disolventes orgánicos volátiles. Sin embargo, estos disolventes representan un peligro para la seguridad y la salud, y es deseable evitar su uso. Además, muchos procedimientos de la técnica anterior son complejos y/o requieren una cantidad considerable de recursos, tiempo y esfuerzo. Además, el tamaño y el índice de polidispersidad de los portadores conseguidos por

la mayoría de los procedimientos de la técnica anterior no son satisfactorios y, por esta razón, se necesitan etapas adicionales, tales como ultrafiltración.

La presente invención proporciona un procedimiento para la producción de vehículos lipídicos que aborda con éxito las desventajas de los procedimientos de la técnica anterior.

5 Compendio de la invención

La presente invención proporciona el procedimiento de la reivindicación 1 para la producción de vehículos lipídicos, en donde el procedimiento comprende agitar una mezcla de un lípido y un promotor en un medio líquido que comprende agua y un poliol líquido, calentar la mezcla en dos etapas, en donde la temperatura de la mezcla en la segunda etapa es más alta que la temperatura en la primera etapa, y dejar que la mezcla se enfríe hasta la temperatura ambiente.

El procedimiento utiliza, además del choque mecánico causado por la agitación, un choque térmico causado por el aumento de temperatura en la segunda etapa de calentamiento. Esto conduce a la formación de vehículos lipídicos y liposomas con características deseables, tales como tamaño e índice de polidispersidad (PDI).

El procedimiento permite la producción de vehículos lipídicos y liposomas sin utilizar disolventes orgánicos clorados u otros volátiles. Además, el procedimiento no requiere el uso de sonicación o centrifugación. Además, el procedimiento no requiere el uso de presión reducida.

Breve descripción de los dibujos

El Ejemplo 9 no es según la invención.

La Figura 1 muestra la distribución y el análisis de picos por A) intensidad (D_I), B) volumen (D_V) y C) número (D_N) de liposomas con glicerina al 20% del Ejemplo 1.

La Figura 2 muestra la distribución y el análisis de picos por A) intensidad (D_I), B) volumen (D_V) y C) número (D_N) de liposomas con una relación molar de colesterol de 1,8 del Ejemplo 2.

La Figura 3 muestra la estabilidad de tamaño de los liposomas del Ejemplo 3.

La Figura 4 muestra la estabilidad de PDI de los liposomas del Ejemplo 3.

25 La Figura 5 muestra la estabilidad de tamaño de los liposomas del Ejemplo 6.

La Figura 6 muestra la estabilidad de PDI de los liposomas del Ejemplo 6.

La Figura 7 muestra la distribución y el análisis de picos por A) intensidad (D_I), B) volumen (D_V) y C) número (D_N) de liposomas con glicerina al 20% del Ejemplo 9.

Descripción detallada de la invención

30 La presente invención proporciona un procedimiento para la producción de vehículos lipídicos, preferiblemente liposomas, que comprende las siguientes etapas:

a) proporcionar una mezcla de un lípido anfílico y un promotor en un medio líquido que comprende agua y un poliol líquido, en donde el promotor se selecciona entre dipalmitoilfosfatidilglicerol, dioleoiltrimetilamoniopropano, colesterol, ácidos grasos, aminas de ácidos grasos, poloxámeros, polietilenglicol con peso molecular superior de 600 y mezclas de los mismos, y el poliol líquido se selecciona de glicerina, propilenglicol, polietilenglicol con peso molecular inferior a 600 y mezclas de los mismos,

b) agitar y calentar la mezcla en una primera etapa de calentamiento a 30-80°C,

c) agitar y calentar la mezcla en una segunda etapa de calentamiento a una temperatura 10-50°C más alta que la temperatura de la primera etapa de calentamiento y

40 d) dejar que la mezcla se enfríe hasta la temperatura ambiente.

La invención está definida por las reivindicaciones. Cualquier tema que quede fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona solo con fines informativos.

Un "vehículo lipídico" se define en este documento como un sistema de administración de ingrediente bioactivo (por ejemplo, fármaco, nutracéutico, cosmecéutico, etc.) principalmente de naturaleza lipídica, que se compone principalmente de lípidos anfílicos, tales como fosfolípidos o tensioactivos no iónicos. También puede contener pequeñas cantidades de promotores de autoensamblaje, tales como biomateriales lipídicos anfílicos o lipofílicos (por ejemplo, esteroides) y biomateriales no lipídicos anfílicos o lipofílicos (por ejemplo, polímeros).

Un "liposoma" se define en el presente documento como una subcategoría de vehículos lipídicos, y más específicamente, una vesícula en forma de esfera de tamaño hasta 800 nm, que consiste en al menos una bicapa lipídica y que comprende principalmente fosfolípidos.

5 Un "lípidio anfifílico" se define en el presente documento como una molécula de naturaleza anfifílica que contiene una parte lipídica y tiene un parámetro de empaquetamiento entre 1/2 y 1, lo que la hace capaz de formar vehículos lipídicos y preferiblemente liposomas. Los ejemplos de lípidos anfifílicos naturales y/o sintéticos según la presente invención incluyen fosfolípidos, tales como fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC), fosfatidilcolina de huevo (eggPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dipalmitoilfosfatidiletanolamina (DPPE), diestearoilfosfatidiletanolamina (DSPE), 10 dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), lípidos de éter, cardiolipinas o cualquier tipo de fosfolípido modificado con ácido graso o con grupos de cabeza que forme vesículas. También incluyen esfingolípidos, tales como ceramidas y lípidos adyuvantes, tales como dimetildioctadecilamonio (DDA). También pertenecen a esta categoría tensioactivos iónicos o no iónicos, tales como lípidos de sorbitán y polisorbatos, que formen niosomas. Son posibles las mezclas de todas las moléculas mencionadas anteriormente.

15 Un "promotor" se define en el presente documento como una molécula o sustancia que se añade en pequeñas cantidades en los vehículos, facilita el procedimiento de autoensamblaje de los lípidos anfifílicos en masa mencionados anteriormente y mejora el perfil fisicoquímico, termodinámico y biofísico de los vehículos finales. Un promotor, como regulador de la fluidez, estabilizará la estructura del vehículo y la hará más funcional. Los ejemplos de promotores incluyen dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG) y dioleoiltrimetilamoniopropano (DOTAP), esteroides, tales como colesterol, 20 moléculas anfifílicas cargadas o no, ácidos grasos y aminas de ácidos grasos, tales como estearilamina, así como los análogos PEGilados de los anteriores. Los polímeros, tales como los polímeros sensibles a estímulos, los poloxámeros y los polietilenglicoles (PEG) con un peso molecular superior a 600 también pertenecen a esta categoría. También son posibles las mezclas de todos los promotores mencionados anteriormente. Preferiblemente, el promotor es estearilamina.

25 El término "poliol líquido" se define en el presente documento como un compuesto orgánico soluble en agua, que es líquido a 25°C y comprende múltiples grupos hidroxilo. El poliol líquido impulsa/mejora el proceso de hidratación del/de los lípidio(s) anfifílico(s), facilitando su autoensamblaje en vehículos más pequeños y gestionando el contenido termodinámico de los vehículos lipídicos y liposomas. En los casos en los que los vehículos lipídicos se someten a liofilización, el poliol líquido también juega un papel clave en la estabilidad física y crioprotección de los vehículos 30 lipídicos durante el procedimiento de liofilización y reconstitución. Los polioles líquidos según la presente invención incluyen glicerina (glicerol), propilenglicol (PG), PEG con un peso molecular inferior a 600 y mezclas de los mismos. Preferiblemente, el poliol líquido es glicerina.

35 Un "ingrediente bioactivo" se define en el presente documento como un ingrediente que tiene un efecto sobre un organismo, tejido o célula vivos. Los ejemplos son medicamentos o ingredientes farmacéuticos activos (API), nutracéuticos, cosmeceúticos, etc. Más de un ingrediente bioactivo puede encapsularse o incorporarse en los vehículos lipídicos y liposomas y administrarse dentro del organismo por vía oral (per os), intravenosa (i.v.) u otra forma de administración.

40 El presente enfoque es adecuado para preparar diversos vehículos lipídicos y liposomas en ausencia de disolventes orgánicos clorados y otros volátiles. Los ejemplos de estos vehículos son liposomas, liposomas mixtos/quiméricos, niosomas, niosomas mixtos/quiméricos y liposomas injertados con polímero. Preferiblemente, los vehículos lipídicos producidos mediante el procedimiento de la presente invención son liposomas.

45 Generalmente, el procedimiento depende de la fluidez/movilidad de los materiales cristalinos líquidos por encima de su temperatura de transición de fase (T_m), así como su rigidez por debajo de ese punto. Como resultado, es adecuado para producir estructuras compuestas p. ej. de fosfolípidos. Específicamente, los vehículos lipídicos se forman debido a la hidratación de las moléculas del medio acuoso y las moléculas de codisolvente, el choque mecánico, resultante del procedimiento de agitación y el choque térmico, proveniente del aumento de temperatura.

50 Preferiblemente, la concentración total de lípidio(s) anfifílico(s) y promotor(es) dispersos en el medio líquido varía entre 5-100 mg/ml. El término "mg/ml" hace referencia a mg de las sustancias en cuestión por ml del medio líquido. El término "medio líquido" hace referencia al sistema del medio acuoso en masa (por ejemplo, agua) y codisolvente(s) (es decir, poliol(es) líquido(s)).

Preferiblemente, la concentración de poliol es hasta 30% v/v del medio líquido. El término "% v/v" hace referencia a ml de poliol por 100 ml del medio líquido. Más preferiblemente, la concentración de poliol es 10-30% v/v del volumen del medio líquido.

55 Preferiblemente, el peso total del/de los promotor(es) varía entre 0,1-20,0% p/p del peso total de los lípidos anfifílicos. El término "% p/p" hace referencia a mg de promotor(es) por 100 mg de lípidio(s) anfifílico(s).

En la primera etapa de calentamiento del procedimiento de la presente invención, la mezcla del/de los lípidio(s) anfifílico(s) con el/los promotor(es) en el medio líquido se calienta por encima de la temperatura de transición principal de los lípidos anfifílicos (T_m), concretamente a 30-80°C, mientras se agita. En la segunda etapa de calentamiento, la

temperatura de la mezcla se aumenta en 10-50°C y la mezcla se agita adicionalmente. Preferiblemente, la velocidad de agitación y la temperatura se mantienen estables durante cada etapa. Preferiblemente, en la segunda etapa de calentamiento, la temperatura de la mezcla se aumenta en 20-40°C, en comparación con la temperatura de la primera etapa de calentamiento. Más preferiblemente, en la segunda etapa de calentamiento, la temperatura de la mezcla se aumenta en 25-35°C, en comparación con la temperatura de la primera etapa de calentamiento. Preferiblemente, la agitación y el calentamiento de la primera etapa de calentamiento se llevan a cabo durante 0,5-2 horas. Preferiblemente, la agitación y el calentamiento de la segunda etapa de calentamiento se llevan a cabo durante 0,5-4 horas. Preferiblemente, la velocidad de agitación en ambas etapas de calentamiento es 400-1000 rpm. En la etapa final del procedimiento, la mezcla se enfría hasta la temperatura ambiente (25°C), preferiblemente con una velocidad de enfriamiento no superior a 5°C/min. El nivel de temperatura, la velocidad de agitación y la duración y velocidad de calentamiento o enfriamiento pueden afectar a las propiedades fisicoquímicas de los vehículos lipídicos y liposomas preparados. Sin embargo, el ajuste de estos parámetros se encuentra dentro del conocimiento habitual de un experto en la técnica.

Dependiendo de su composición, los vehículos lipídicos producidos por el procedimiento de la presente invención alcanzan aproximadamente 100 nm, con un índice de polidispersidad (PDI) de 0,200, sin reducción de tamaño ni procesamiento adicional. Esto representa una gran ventaja sobre los procedimientos de la técnica anterior que utilizan extrusión a través de filtros o métodos similares. Se observa que las propiedades fisicoquímicas de los vehículos producidos dependen de la T_m del lípido anfílico utilizado. Por ejemplo, HSPC tiene una temperatura de fusión muy alta de aproximadamente 52°C, mientras que eggPC tiene una temperatura de transición mucho más baja de 23°C y está en fase cristalina líquida a temperatura ambiente. El método produce, en pocas y sencillas etapas, vehículos lipídicos de diámetro pequeño y uniforme. Son adecuados para administración oral (per os), así como intravenosa (i.v.) y otros tipos de administración.

Aunque no es necesario, los vehículos lipídicos producidos según la presente invención pueden someterse a métodos de reducción de tamaño, que incluyen sonicación, homogeneización y extrusión. En los casos de bajo contenido de poliol y en los casos de composiciones que den como resultado vehículos de grandes diámetros y alta polidispersidad, los vehículos pueden mejorarse mediante tales métodos, con el fin de utilizarlos en per os, i.v. u otros tipos de administración. Un ciclo de extrusión es suficiente para mejorar los vehículos en este enfoque, lo que significa un bajo consumo de energía y, en consecuencia, un bajo coste económico.

El procedimiento de liofilización puede aplicarse a todos los vehículos producidos según la presente invención, debido a la crioprotección y lioprotección de los polioles. Los productos liofilizados permanecen estables durante largos períodos. En concentraciones de poliol superiores al 10%, la adición de medio líquido de igual volumen que el inicial conduce a la resuspensión de los vehículos lipídicos y liposomas y a la restauración de su estado fisicoquímico y propiedades iniciales, es decir, tamaño de partícula, polidispersidad y potencial ζ .

En el caso de la administración por vía oral, pueden añadirse al medio líquido edulcorantes o mezclas de los mismos, tales como azúcares, sustitutos del azúcar y aromas, durante la etapa a), b), c) o d) del procedimiento reivindicado, y sirven como factores edulcorantes, además de facilitar la liofilización, ya que sirven como crioprotectores y lioprotectores. Su propiedad edulcorante se mantiene después de la liofilización y reconstitución. Los ejemplos de azúcares son glucosa, fructosa y sacarosa, mientras que algunos sustitutos del azúcar son el aspartamo y la sacarina.

Los vehículos lipídicos producidos según la presente invención se pueden cargar con diversos ingredientes bioactivos naturales y/o sintéticos lipófilos y/o hidrófilos, tales como fármacos, nutracéuticos y cosmeceúticos. En tal caso, el/los ingrediente(s) bioactivo(s) puede(n) añadirse al medio líquido durante cualquier etapa del procedimiento reivindicado, preferiblemente durante a), b) o c). La encapsulación de ingredientes hidrófilos, la incorporación de lipófilos o la distribución de anfílicos se logra dentro de los vehículos. Sin embargo, cuando los vehículos se someten a liofilización, el/los ingrediente(s) bioactivo(s) también puede(n) añadirse al producto liofilizado, cuando los fenómenos mencionados anteriormente ocurren durante la reconstitución. Una simple mezcla de los vehículos preparados con el/los ingrediente(s) bioactivo(s) y posterior agitación o sonicación proporcionará una cantidad limitada de encapsulación o incorporación o distribución. Pueden obtenerse mejores resultados con el procedimiento de congelación-descongelación. Los ejemplos de ingredientes bioactivos incluyen medicamentos, nutracéuticos y cosmeceúticos, así como sus mezclas. Pueden ser fármacos clásicos o API, genes, proteínas, péptidos, hormonas, tales como insulina, anticuerpos, así como flavonoides, polifenoles, carotenoides, carbohidratos, prebióticos, curcuminoides, tales como curcumina, que son ingredientes del extracto de cúrcuma (*curcuma longa*), glutatión, ácido lipoico y vitaminas de los complejos B, C, D y K. Los aceites esenciales y extractos también pertenecen a esta categoría de ingredientes bioactivos. Los ingredientes bioactivos no necesitan ser estabilizados antes de la incorporación y/o encapsulación en los vehículos, y permanecen estables después del procedimiento de formulación. Además, la cooperatividad entre los biomateriales utilizados facilita su incorporación y/o encapsulación, un procedimiento que no requiere la utilización de ingredientes metálicos, etc. La temperatura del procedimiento debe ser apropiada para el ingrediente bioactivo, no afectando su estabilidad y por lo tanto, debe(n) utilizarse lípido(s) anfílico(s) apropiado(s) que se funda(n) a esa temperatura. Es posible la coadministración de más de un ingrediente bioactivo en la misma formulación de vehículos lipídicos, especialmente debido a la capacidad de estas partículas para atrapar ingredientes en diferentes compartimentos, p.ej. encapsulación de hidrófilos en el núcleo acuoso e incorporación de lipófilos o hidrófobos en la bicapa lipídica. La administración de vehículos vacíos también es valiosa para algunos fines, por ejemplo en cosméticos, donde su composición puede proporcionar hidratación o protección.

El procedimiento de la presente invención puede escalarse fácilmente y utilizarse en la industria, con o sin el uso de técnicas de reducción de tamaño, debido a parámetros de método simples, resultados precisos y repetibles, eficiencia en el tiempo, bajo coste, ausencia de disolventes orgánicos clorados y volátiles, seguridad y baja temperatura.

Ejemplos

5 La presente invención se ilustra con los siguientes ejemplos:

Ejemplo 1

Preparación de HSPC: liposomas de estearilamina

10 Se pesaron HSPC (30,0 mg) y estearilamina (0,3 mg) de relación molar 9:0,25 y se colocaron dentro de un matraz esférico grande. Se añadieron al matraz 3 ml de agua purificada con glicerina disuelta al 20/15/10% v/v y se agitó la mezcla con vórtex durante un breve período. Se colocó un imán en el interior y se calentó la mezcla a 60°C, mientras se agitaba a 700 rpm, durante un período de 1 hora, en un baño de aceite de silicona. Luego, se calentó la suspensión a 90°C durante 1 hora, con la misma agitación. La suspensión formada se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente a una velocidad de 3°C/min y se extrajo una muestra de 50 ul, que se diluyó con 2950 ul de agua de calidad HPLC y se midió con espectroscopia de correlación de fotones (PCS), para calcular el tamaño, la polidispersidad y el potencial ζ de los liposomas. Luego, se calentó la suspensión a 90°C durante 1 hora a 700 rpm, y después de enfriar, se midió otra muestra de 50 ul. Los resultados para los liposomas preparados se presentan en la Tabla 1 y la distribución de tamaño por intensidad, volumen y número de partículas con 20% de glicerina se presenta en la Figura 1, donde para cada diagrama hay tres curvas, que en este caso están muy cerca unas de otras. Las áreas de análisis de picos y los valores medios de los tres métodos se muestran a continuación:

20 Análisis de picos por intensidad

Pico	Área	Media	Anchura
1	100,0	336,3	520,3

Análisis de picos por volumen

Pico	Área	Media	Anchura
1	16,7	123,3	102,3
2	83,3	458,0	347,3

Análisis de picos por número

Pico	Área	Media	Anchura
1	96,5	77,3	64,1
2	3,5	441,1	178,5

Tabla 1

Sistema	Proporción molar	Concentración de glicerina (% v/v)	Horas a 90°C	Z _{Medio} (nm)	SD	PDI	SD	pot. z (mV)	SD
HSPC:estear	9:0,25	20%	1	275,5	4,1	0,349	0,003		
HSPC:estear	9:0,25	20%	2	230,5	4,6	0,272	0,017	51,5	2,9
HSPC:estear	9:0,25	15%	1	366,8	10,8	0,616	0,078		
HSPC:estear	9:0,25	15%	2	289,2	10,0	0,432	0,016	52,8	2,2
HSPC:estear	9:0,25	10%	1	346,9	9,4	0,567	0,080		
HSPC:estear	9:0,25	10%	2	290,4	9,7	0,484	0,055	54,5	0,6

Ejemplo 2Preparación de liposomas de eggPC:colesterol:estearilamina

Se pesaron EggPC (30,0 mg), colesterol (0,8/3,0 mg) y estearilamina (0,3 mg) de proporción molar 9:0,5:0,25 o 9:1,8:0,25 y se colocaron dentro de un matraz esférico grande. Se añadieron al matraz 3 ml de agua purificada con glicerina disuelta al 20% v/v y se agitó la mezcla con vórtex durante un breve período. Se colocó un imán en el interior y se calentó la mezcla a 60°C, mientras se agitaba a 700 rpm, durante un período de 1 hora, en un baño de aceite de silicona. Luego, se calentó la suspensión a 90°C durante 2 horas, con la misma agitación. La suspensión formada se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente a una velocidad de 3°C/min y se extrajo una muestra de 50 ul, que se diluyó con 2950 ul de agua de calidad HPLC y se midió con PCS, para calcular el tamaño y polidispersidad de los liposomas. Los resultados para los liposomas preparados se presentan en la Tabla 2, y la distribución de tamaño por intensidad, volumen y número de partículas con relación molar de colesterol de 1,8 se presenta en la Figura 2, donde para cada diagrama, hay tres curvas, que en este caso están muy cerca unas de otras. Las áreas de análisis de picos y los valores medios de los tres métodos se muestran a continuación:

Análisis de picos por intensidad

Pico	Área	Media	Anchura
1	100,0	237,5	349,3

15 Análisis de picos por volumen

Pico	Área	Media	Anchura
1	37,7	97,4	164,3
2	62,3	421,2	309,0

Análisis de picos por número

Pico	Área	Media	Anchura
1	99,4	55,1	45,3

Tabla 2

Sistema	Proporción molar	Concentración de glicerina (% v/v)	Z _{Medio} (nm)	SD	PDI	SD
EggPC:col:estear	9:0,5:0,25	20%	272,2	13,9	0,602	0,026
EggPC:col:estear	9:1,8:0,25	20%	186,0	4,8	0,382	0,007

Ejemplo 3Estabilidad física de los liposomas preparados mediante el procedimiento de la presente invención

20 Se desarrollaron liposomas que contenían HSPC:estearilamina 9:0,25, eggPC:colesterol:estearilamina 9:1,8:0,25 y DSPC:estearilamina 9:0,25, y se evaluaron para determinar su estabilidad física/coloidal, durante aproximadamente un período de 30 días, midiendo su tamaño y polidispersidad con PCS.

25 HSPC (30,0 mg) y estearilamina (0,3 mg) de relación molar 9:0,25, eggPC (30,0 mg), colesterol (3,0 mg) y estearilamina (0,3 mg) de relación molar 9:1,8:0,25 y DSPC (30,0 mg) y estearilamina (0,3 mg) de relación molar 9:0,25 se pesaron y se colocaron dentro de matraces esféricos grandes independientes. Se añadieron al matraz 3 ml de agua purificada con glicerina disuelta al 20% v/v y se agitó la mezcla con vórtex durante un breve período. Se colocó un imán en el interior y se calentó la mezcla a 60°C, mientras se agitaba a 700 rpm, durante un período de 1 hora, en un baño de aceite de silicona. Luego, se calentó la suspensión a 90°C durante 1 hora, con la misma agitación. La suspensión formada se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente a una velocidad de 3°C/min y se extrajo una muestra de 50 ul, que se diluyó con 2950 ul de agua de calidad HPLC, y se midió por PCS, para calcular el tamaño y polidispersidad de los liposomas. Las mediciones se repitieron durante un período de 30 días para evaluar la estabilidad física/coloidal de los liposomas, y los resultados se presentan en las Figuras 3 y 4.

Ejemplo 4Reducción de tamaño y heterogeneidad de tamaño de gran cantidad de liposomas

5 Se prepararon liposomas de EggPC/DPPC/HSPC:estearilamina de proporción molar 9:0.25 mezclando 2000,0/1000,0/500,0 mg de EggPC/DPPC/HSPC y 5,0/10,0/20,0 mg de estearilamina, agregando 200/100/50 ml de agua purificada con glicerina disuelta al 10%/15%/20% v/v y calentando a 90°C durante 2 horas, como se describe en el Ejemplo 1. Las preparaciones finales se sometieron a extrusión a través de filtros de policarbonato de tamaño de poro de 200 nm. Se midieron con PCS el tamaño y la polidispersidad antes y después de la extrusión, y se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3

Sistema	Proporción molar	Concentración de glicerina (% v/v)	Extrusión	Z _{Medio} (nm)	SD	PDI	SD
EggPC:estear	9:0,25	10%	Antes	353,5	5,5	0,627	0,032
EggPC:estear	9:0,25	10%	Después de 1 pase	136,9	3,2	0,287	0,012
EggPC:estear	9:0,25	10%	Después de 2 pases	106,1	2,1	0,287	0,005
EggPC:estear	9:0,25	10%	Después de 5 pases	94,3	2,2	0,282	0,012
EggPC:estear	9:0,25	10%	Después de 10 pases	84,6	2,0	0,307	0,002
DPPC:estear	9:0,25	15%	Antes	250,2	11,0	0,402	0,026
DPPC:estear	9:0,25	15%	Después de 1 pase	155,5	4,2	0,254	0,032
DPPC:estear	9:0,25	15%	Después de 2 pases	125,9	2,4	0,182	0,018
DPPC:estear	9:0,25	15%	Después de 5 pases	127,1	2,3	0,174	0,004
DPPC:estear	9:0,25	15%	Después de 10 pases	134,6	2,1	0,204	0,010
HSPC:estear	9:0,25	20%	Antes	245,6	3,5	0,302	0,013
HSPC:estear	9:0,25	20%	Después de 1 pase	141,6	3,2	0,232	0,009
HSPC:estear	9:0,25	20%	Después de 2 pases	179,3	3,7	0,209	0,013
HSPC:estear	9:0,25	20%	Después de 5 pases	147,8	2,9	0,170	0,027
HSPC:estear	9:0,25	20%	Después de 10 pases	146,4	2,9	0,179	0,017

10 Ejemplo 5Liofilización de liposomas

15 Las preparaciones del Ejemplo 1 se liofilizaron y reconstituyeron. Se congelaron muestras de 500 ul de cada preparación con hielo seco y acetona y se liofilizaron inmediatamente a 1-10 Pa (10^{-2} - 10^{-1} mbar). El resultado del procedimiento dependió de la cantidad de glicerina dentro de la formulación. Cantidades más altas de glicerina condujeron a un producto similar a un gel, mientras que cantidades más bajas dieron polvo. La reconstitución se logró agregando la misma cantidad de volumen de agua purificada inicial c.s. 500 ul. Se diluyeron muestras de 50 ul con 2950 ul de agua de calidad HPLC y se midieron con PCS para calcular el tamaño, la polidispersidad y el potencial ζ de los liposomas. Los resultados se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4

Sistema	Proporción molar	Concentración de glicerina (% v/v)	Z _{Medio} (nm)	SD	PDI	SD	pot. z (mV)	SD
HSPC:estear	9:0,25	20%	228,3	1,6	0,294	0,021	42,3	0,7
HSPC:estear	9:0,25	15%	304,8	1,3	0,559	0,016	49,2	1,9

Incorporación de molécula bioactiva lipofílica y estabilidad física del complejo

5 Se añadió curcumina a la mezcla lipídica inicial del Ejemplo 1, en relaciones molares 9:0,25:0,8, 9:0,25:1 y 9:0,25:2 para HSPC:estearilamina:curcumina. La concentración de lípidos totales estuvo entre 10-50 mg/ml. La concentración de glicerina varió entre 5-20% v/v. Para cada caso, se colocó un imán en el interior y se calentó la mezcla a 60°C, mientras se agitaba a 700 rpm, durante un período de 1 hora, en un baño de aceite de silicona. Luego, se calentó la suspensión a 90°C durante 2 horas, con la misma agitación. La suspensión formada se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente a una velocidad de 3°C/min y se extrajo una muestra de 50 ul, que se diluyó con 2950 ul de agua de calidad HPLC y se midió con PCS, para calcular el tamaño y polidispersidad de los liposomas. Los resultados se presentan en la Tabla 7. La primera y tercera preparaciones también se evaluaron para determinar su estabilidad física/coloidal, repitiendo las mediciones durante un período de 30 días, y los resultados se presentan en las Figuras 5 y 6.

Tabla 7

Sistema	Proporción molar	Conc. de lípidos (mg/ml)	Conc. de glicerina (% v/v)	Z _{Medio} (nm)	SD	PDI	SD
HSPC:estear:curc	9:0,25:0,8	10	20%	277,9	5,3	0,468	0,056
HSPC:estear:curc	9:0,25:1	33	5%	459,3	11,5	0,842	0,032
HSPC:estear:curc	9:0,25:1	50	10%	539,4	5,8	0,706	0,126

Ejemplo 7

15 Este ejemplo no está relacionado con la presente invención. Muestra los resultados de un procedimiento en el que no se utiliza ningún promotor y el calentamiento se lleva a cabo en una sola etapa.

20 Se pesaron HSPC o eggPC (150,0 mg) y se colocaron dentro de un matraz esférico grande. Se observa que la T_m es sustancialmente diferente para los dos lípidos, a saber, 52°C para HSPC y 23°C para eggPC. Se añadieron al matraz 5 ml de agua purificada con glicerina disuelta al 3% v/v y se agitó la mezcla con vórtex durante un breve período. Se colocó un imán en el interior y se calentó la mezcla a 60°C, mientras se agitaba a 700 rpm, durante un período de 1 hora, en un baño de aceite de silicona. La suspensión formada se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente con una velocidad de 3°C/min y se extrajo una muestra de 50 ul, que se diluyó con 2950 ul de agua de calidad HPLC y se midió con PCS, para calcular el tamaño de partícula y la polidispersidad. Los resultados se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8

Sistema	Concentración de glicerina (% v/v)	Z _{Medio} (nm)	SD	PDI	SD
HSPC	3%	1886,8	397,6	1,000	0,000
EggPC	3%	3828,0	1068,0	1,000	0,000

Ejemplo 8

Este ejemplo no está relacionado con la presente invención. Muestra los resultados de un procedimiento en el que se utiliza un promotor y el calentamiento se lleva a cabo en una sola etapa.

Se pesaron HSPC (50,0 mg) y estearilamina o DPPG (0,5 o 1,3 mg respectivamente) de relación molar 9:0,25 y se colocaron dentro de un matraz esférico grande. Se añadieron al matraz 5 ml de agua purificada con glicerina disuelta

al 3% v/v y se agitó la mezcla con vórtex durante un breve período. Se colocó un imán en el interior y se calentó la mezcla a 60°C, mientras se agitaba a 700 rpm, durante un período de 1 hora, en un baño de aceite de silicona. La suspensión formada se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente a una velocidad de 3°C/min y se extrajo una muestra de 50 ul, que se diluyó con 2950 ul de agua de calidad HPLC y se midió con PCS, para calcular el tamaño de partícula, la polidispersidad y el potencial ζ . Los resultados se presentan en la Tabla 9.

5

Tabla 9

Sistema	Proporción molar	Concentración de glicerina (% v/v)	Z _{Medio} (nm)	SD	PDI	SD	pot. z (mV)	SD
HSPC:estear	9:0,25	3%	702,3	31,7	1,000	0,000	15,7	9,3
HSPC:DPPG	9:0,25	3%	825,6	18,0	1,000	0,000	-29,2	1,2

Ejemplo 9

Este ejemplo no está relacionado con la presente invención. Muestra un procedimiento en el que la segunda etapa de calentamiento se lleva a cabo a la misma temperatura que la de la primera etapa de calentamiento.

10 Se pesaron HSPC (30,0 mg) y estearilamina (0,3 mg) de relación molar 9:0,25 y se colocaron dentro de un matraz esférico grande. Se añadieron al matraz 3 ml de agua purificada con glicerina disuelta al 20/15/10/5% v/v y se agitó la mezcla con vórtex durante un breve período. Se colocó un imán en el interior y se calentó la mezcla a 60°C, mientras se agitaba a 700 rpm, durante un período de 2 horas, en un baño de aceite de silicona. La suspensión formada se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente con una velocidad de 3°C/min y se extrajo una muestra de 50 ul, que se diluyó con 2950 ul de agua de calidad HPLC y se midió con PCS, para calcular el tamaño de partícula y la polidispersidad. Luego, se calentó la suspensión a 60°C durante otra hora, a 700 rpm y después de enfriar, se midió otra muestra de 50 ul. Los resultados se presentan en la Tabla 10, y la distribución de tamaño por intensidad, volumen y número de partículas con 20% de glicerina se presenta en la Figura 7, donde para cada diagrama, hay tres curvas. Las áreas de análisis de picos y los valores medios de los tres métodos se muestran a continuación:

15

20 Análisis de picos por intensidad

Pico	Área	Media	Anchura
1	79,7	654,6	1359,4
2	20,3	8799,7	5920,4

Análisis de picos por volumen

Pico	Área	Media	Anchura
1	5,7	899,9	523,3
2	94,3	9825,2	10972,1

Análisis de picos por número

Pico	Área	Media	Anchura
1	100,0	90,3	95,4

Tabla 10

Sistema	Proporción molar	Concentración de glicerina (% v/v)	Horas a 60°C	Z _{Medio} (nm)	SD	PDI	SD
HSPC:estear	9:0,25	20%	2	498,6	33,0	0,820	0,134
HSPC:estear	9:0,25	20%	3	484,1	37,5	0,814	0,188
HSPC:estear	9:0,25	15%	2	615,8	26,1	0,797	0,351

ES 2 826 879 T3

HSPC:estear	9:0,25	15%	3	522,4	31,5	0,768	0,227
HSPC:estear	9:0,25	10%	2	576,4	28,2	0,825	0,185
HSPC:estear	9:0,25	10%	3	539,6	120,3	0,875	0,126
HSPC:estear	9:0,25	5%	2	724,9	12,0	1,000	0,000
HSPC:estear	9:0,25	5%	3	806,0	60,6	1,000	0,000

La composición de los primeros seis vehículos lipídicos de la Tabla 10 es la misma que la composición de los vehículos de la Tabla 1 (Ejemplo 1). El procedimiento de este Ejemplo difiere del procedimiento del Ejemplo 1 en que no hay aumento de temperatura en la segunda etapa de calentamiento. Los resultados muestran que la falta de salto de temperatura afecta negativamente a las propiedades de los vehículos lipídicos obtenidos.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la producción de vehículos lipídicos que comprende las siguientes etapas:
 - a) proporcionar una mezcla de un lípido anfílico y un promotor en un medio líquido que comprende agua y un poliol líquido, en donde el promotor se selecciona de dipalmitoilfosfatidilglicerol, dioleoiltrimetilamonopropano, colesterol, ácidos grasos, aminas de ácidos grasos, poloxámeros, polietilenglicol con peso molecular superior a 600 y mezclas de los mismos y el poliol líquido se selecciona de glicerina, propilenglicol, polietilenglicol con peso molecular inferior a 600 y mezclas de los mismos,
 - b) agitar y calentar la mezcla en una primera etapa de calentamiento a 30-80°C,
 - c) agitar y calentar la mezcla en una segunda etapa de calentamiento a una temperatura 10-50°C más alta que la temperatura de la primera etapa de calentamiento y
 - d) dejar que la mezcla se enfríe hasta temperatura ambiente.
2. Un procedimiento para la producción de vehículos lipídicos, según la reivindicación 1, en donde los vehículos lipídicos se seleccionan de liposomas y niosomas.
3. Un procedimiento para la producción de vehículos lipídicos, según la reivindicación 1 o 2, en donde los vehículos lipídicos son liposomas.
4. Un procedimiento para la producción de vehículos lipídicos, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el lípido anfílico se selecciona de fosfolípidos, lípidos de éter, cardiolipinas, esfingolípidos, tensioactivos iónicos o no iónicos, lípidos adyuvantes, y mezclas de los mismos.
5. Un procedimiento para la producción de vehículos lipídicos, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el lípido anfílico se selecciona de fosfatidilcolina de soja hidrogenada, fosfatidilcolina de huevo, dipalmitoilfosfatidilcolina, diestearoilfosfatidilcolina, dimiristoilfosfatidilcolina, dioleoilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidiletanolamina, diestearoilfosfatidiletanolamina, dioleoilfosfatidiletanolamina, fosfolípido modificado con ácido graso o grupo de cabeza, ceramidas, dimetildioctadecilamonio, lípidos de sorbitán, polisorbatos, y mezclas de los mismos.
6. Un procedimiento para la producción de vehículos lipídicos, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el promotor es estearilamina.
7. Un procedimiento para la producción de vehículos lipídicos, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el poliol líquido es glicerina.
8. Un procedimiento para la producción de vehículos lipídicos, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la concentración del poliol líquido es hasta el 30% v/v del medio líquido.
9. Un procedimiento para la producción de vehículos lipídicos, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la concentración del poliol líquido es el 10% - 30% v/v del medio líquido.
10. Un procedimiento para la producción de vehículos lipídicos, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la temperatura de la mezcla de la segunda etapa de calentamiento es 20-40°C más alta que la temperatura de la primera etapa de calentamiento.
11. Un procedimiento para la producción de vehículos lipídicos, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde en la etapa d) la mezcla se enfría a una velocidad no superior a 5°C/min.
12. Un procedimiento para la producción de vehículos lipídicos, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el procedimiento comprende además añadir al medio líquido un ingrediente bioactivo.
13. Un procedimiento para la producción de vehículos lipídicos, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el procedimiento comprende además someter la mezcla después de la etapa d) a liofilización.

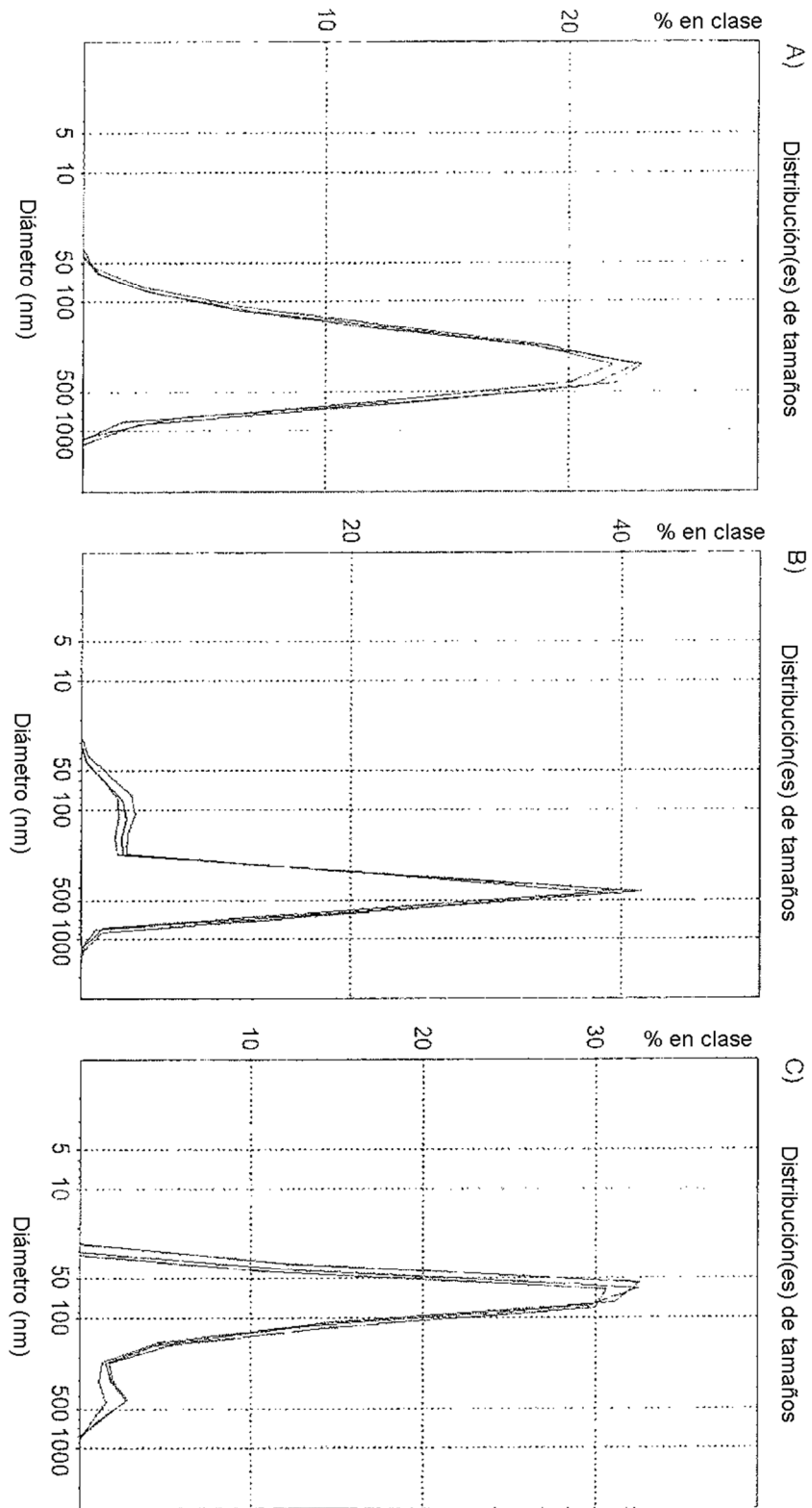


Figura 1

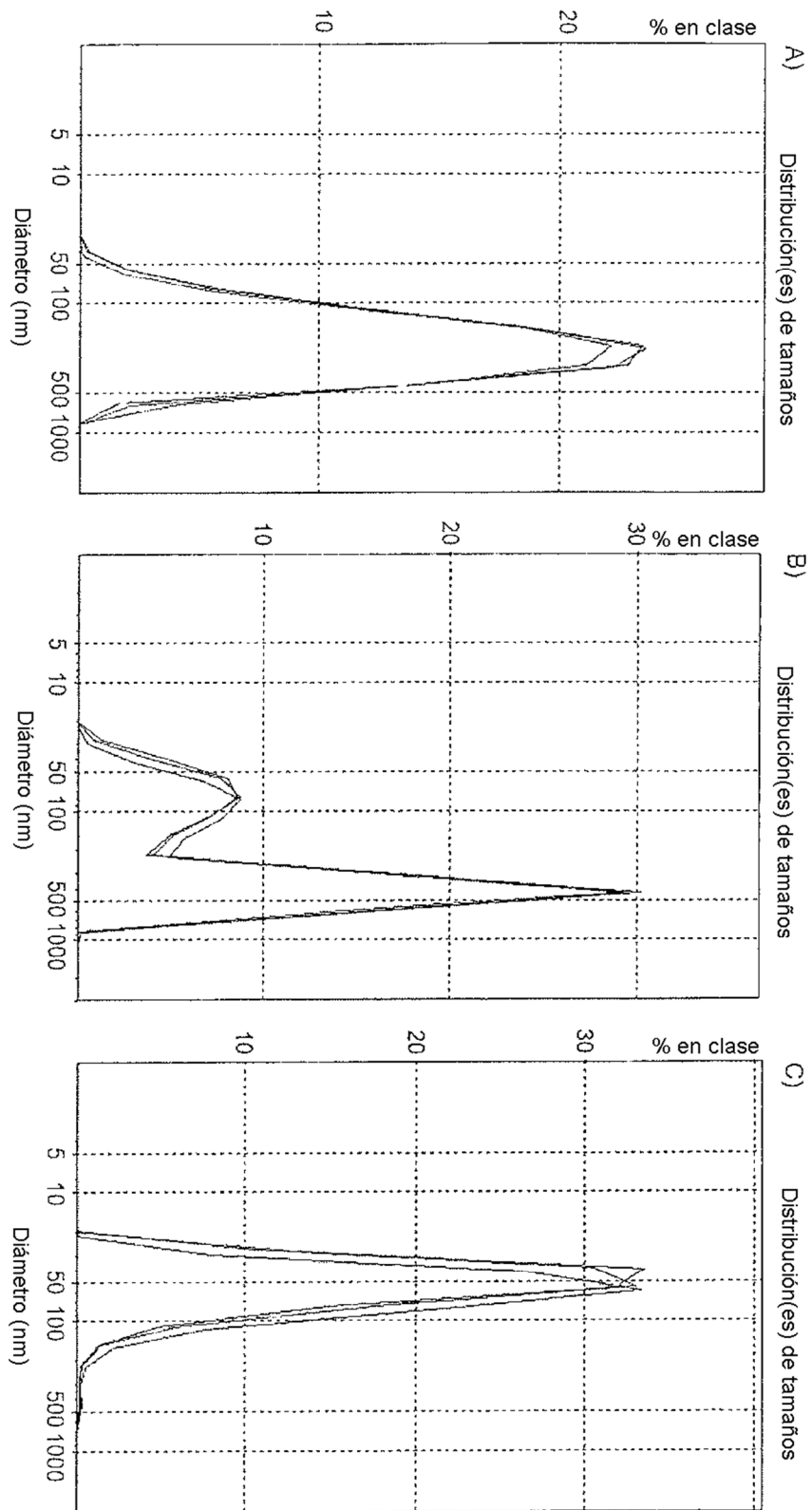


Figura 2

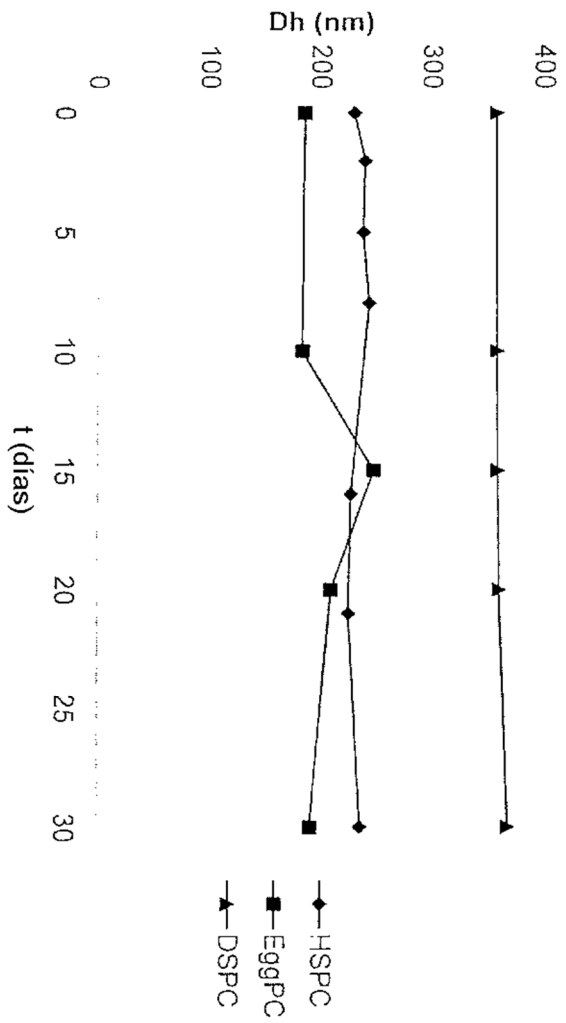


Figura 3

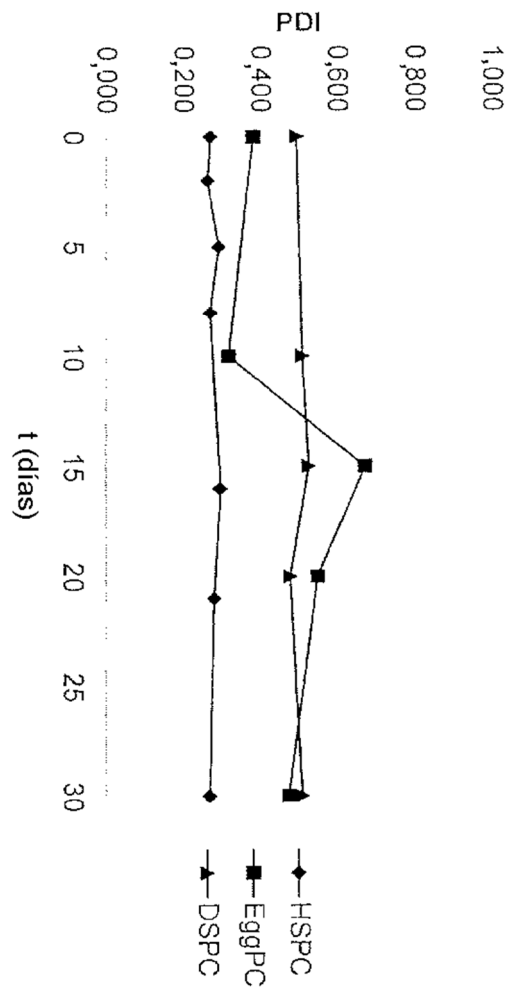


Figura 4

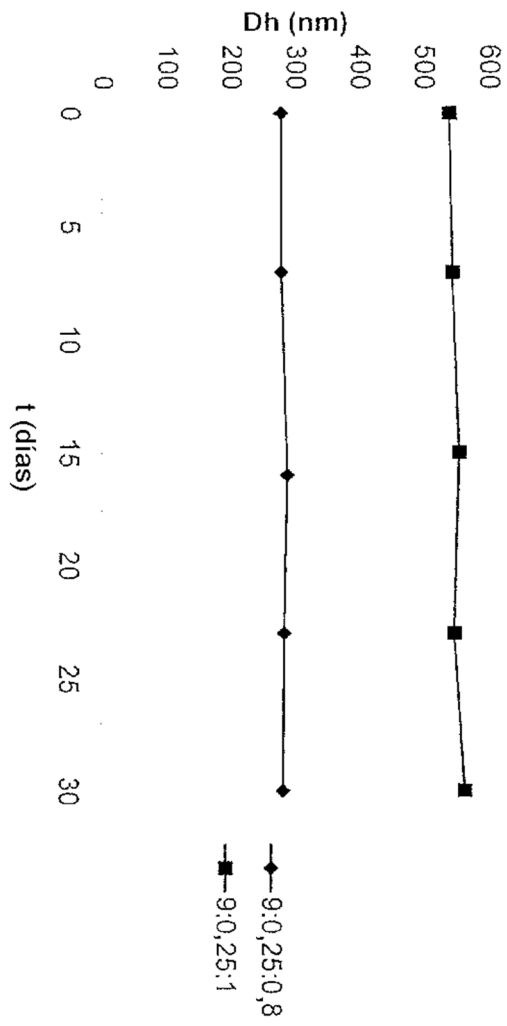


Figura 5

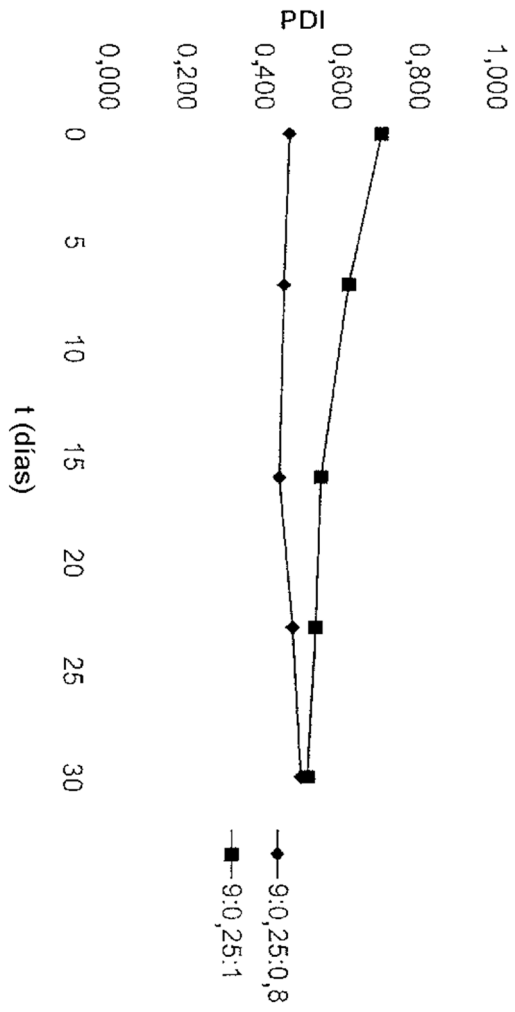


Figura 6

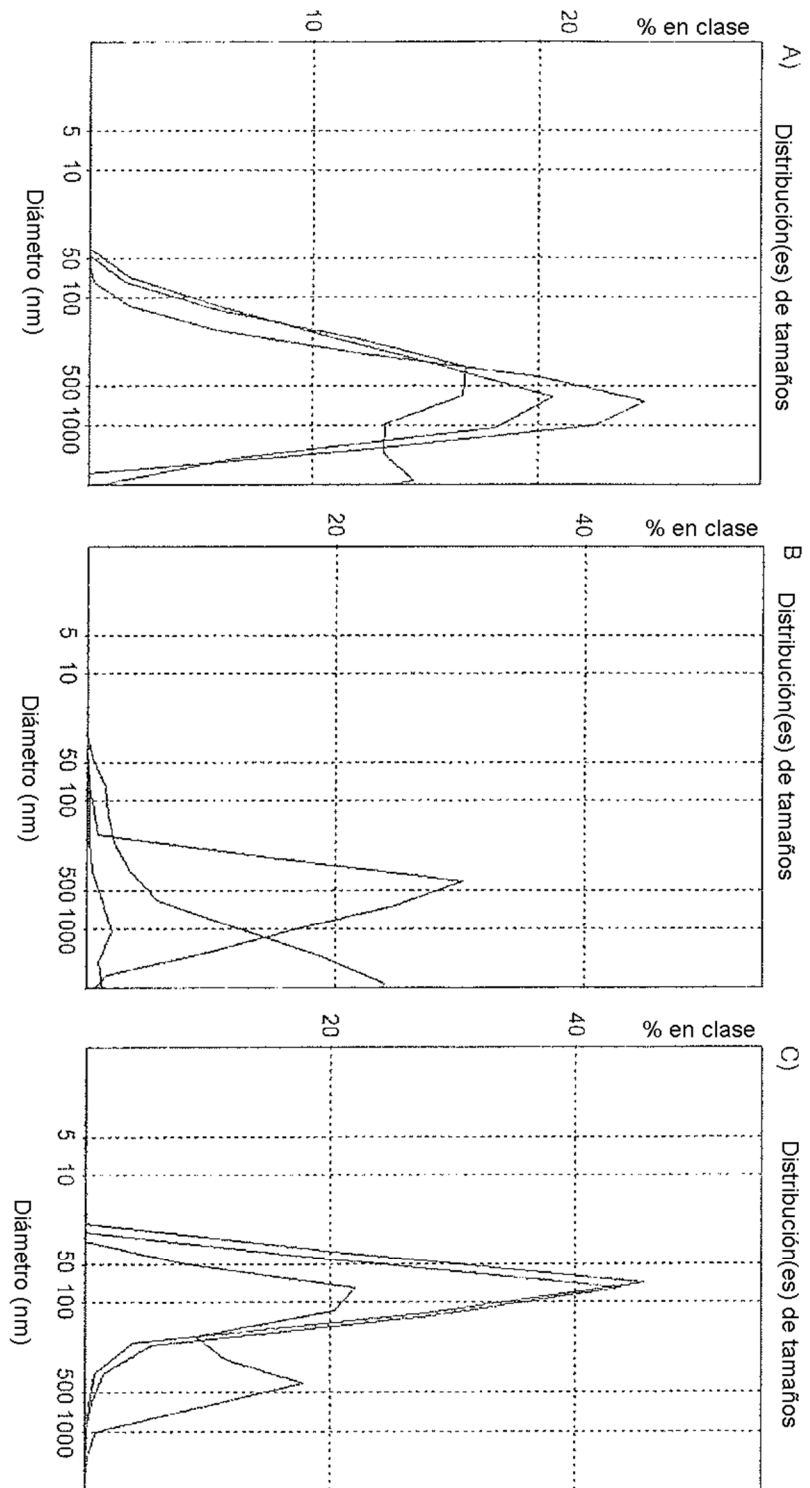


Figura 7