

67 764

Ref: ST.601

TLC-135A

PATENTE Nº 87 545

"Processo de preparação de composições lipossômicas compreendendo metabolito de ácido araquidónico"

para que

THE LIPOSOME COMPANY, INC.,
pretende obter privilégio de
invenção em Portugal.

R E S U M O

O presente invento refere-se ao processo de preparação de composições lipossômicas, compreendendo estas composições um metabolito do ácido araquidónico tal como uma prostaglandina, preferencialmente a prostaglandina E_1 , um lípido e um protector de secagem tal como um sacarídeo. Os lipossomas podem ser cheios com a prostaglandina, passivamente, ou usando um gradiente de concentração transmembrana, preferencialmente usando um gradiente de pH transmembrana. Com esta técnica, as eficiências de retenção atingem os 50 a 100% e a velocidade de libertação da prostaglandina dos lipossomas é reduzida. O tamanho do lipossoma é mantido após liofilização e reconstituição.

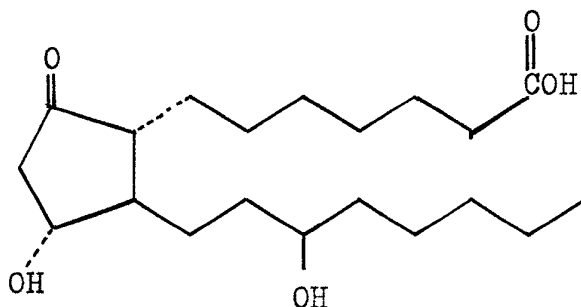
MEMÓRIA DESCRITIVAPEDIDO AFIM DOS EUA

Este pedido é uma continuação-em-parte do pedido de patente copendente Nº 053 305, depositado a 22 de Maio de 1987.

ANTECEDENTES DO INVENTO

O presente invento é dirigido a formulações e métodos de preparação de lipossomas associados a metabolitos do ácido araquidónico. Estes metabolitos do ácido araquidónico também incluem os compostos estruturalmente análogos, inibidores de enzimas sintéticos e o próprio ácido araquidónico. Uma classe destes metabolitos do ácido araquidónico é constituída pelo grupo dos agentes bioactivos conhecidos como prostaglandinas. Este invento revela particularmente lipossomas associados com prostaglandinas, usando a prostaglandina E_1 . O termo prostaglandina inclui também os compostos sintéticos estruturalmente relacionados com as prostaglandinas naturais.

As prostaglandinas são substâncias encontradas essencialmente em todos os tecidos humanos e fluidos corporais e produzem um espectro largo de efeitos abrangendo praticamente todas as funções biológicas. Estas substâncias são derivadas dos ácidos gordos essenciais com 20 átomos de carbono (sendo o precursor mais abundante o ácido araquidónico) e são sintetizados biologicamente em estruturas tais com as da subclasse E_1 das prostaglandinas com 20 carbonos ("PGE₁") cuja fórmula é a seguinte:



As outras subclasses de prostaglandinas são designadas por letras e distinguem-se por substituições no anel ciclopentano.

Estas subclasses são as séries prostaglandina E e F_2 , as quais são as mais extensivamente estudadas, sendo as subclasses A, B e C derivadas das E's. As prostaglandinas A a F são consideradas "prostaglandinas primárias"; as estruturas das prostaglandinas G_2 e H_2 (os endoperóxidos cíclicos) e os tromboxanos A_2 e B_2 foram mais recentemente estabelecidas (Goodman et al., eds., The Pharmacological Basis of Therapeutics, MacMillan Publishing Co., New York, pp. 668-676). Outros agentes bioactivos que podem ser usados na invenção são as prostaciclina e os leucotrienos.

As prostaglandinas têm diversas acções fisiológicas tais como acção vasodilatadora, melhoramento da circulação sanguínea periférica e antilipólise. As prostaglandinas são terapêuticamente indicadas em muitas situações, que incluem mas não estando limitadas a ductus arteriosus, estimulação das contracções uterinas conducentes à indução do parto e também do aborto, tratamento da asma brônquica, e supressão da ulceração gástrica nos animais. São também usadas na profilaxia da arterioesclerose.

Os lipossomas são membranas lipídicas com duas camadas, completamente fechadas, encerrando no seu interior um volume aquoso. Os lipossomas podem ser vesículas unilamelares (possuindo uma só bicamada de membrana) ou vesículas multilamelares (estruturas do tipo cebola caracterizadas por bicamadas membranares múltiplas, cada uma separada da seguinte por uma camada aquosa). A bicamada é composta por duas monocamadas lipídicas possuindo uma região hidrofóbica ("cauda") e uma região hidrofílica ("cabeça"). A estrutura da bicamada membranar é tal que as "caudas" hidrofóbicas (não polares) das monocamadas lipídicas se orientam em direcção ao centro da bicamada enquanto que a "cabeça" hidrofílica se orienta em direcção à fase aquosa.

A preparação original de lipossomas de Bangham et al. (J. Mol. Biol., 1965, 12:238-252) envolve a suspensão de fosfolípidos num solvente orgânico o qual é depois evaporado até à secura deixando um filme de fosfolípido no vaso reacção. Em seguida, adiciona-se uma quantidade apropriada de fase aquosa, a

mistura é deixada a "inchar" e os lipossomas resultantes que são constituídos por vesículas multilamelares (MLVs) são dispersos por meios mecânicos. Esta técnica constitui a base para o desenvolvimento de pequenas vesículas unilamelares submetidas a tratamento sônico descritas por Papahadjopoulos et al. (Biochim. Biophys. Acta., 1968, 135:624-638), e de grandes vesículas unilamelares.

As vesículas unilamelares podem ser produzidas usando um equipamento de extensão por um método descrito em Cullis et al., Pedido PCT Nº WO 86/00238, 16 de Janeiro 1986, de título "Extrusion Technique for Producing Unilamellar Vesicles" incorporado aqui para referência. As vesículas produzidas por esta técnica, designadas por LUVETS, são extrusadas sob pressão através de um filtro de membrana. As vesículas podem também ser produzidas por uma técnica de extrusão através de um filtro de 200 nm, sendo estas vesículas conhecidas como VET₂₀₀s.

Outra técnica usada para a formação de lipossomas é o processo de "evaporação em fase inversa" (REV) de Papahadjopoulos (Patente Americana Nº 4 235 871, concedida a 25 de Novembro de 1980). Este processo forma vesículas oligolamelares lipídicas em que o material aquoso a encapsular é adicionado a lípidos num solvente orgânico, de modo a formar uma emulsão do tipo água-em-óleo. O solvente orgânico é removido, formando um gel. O gel é disperso num meio aquoso convertendo-o numa suspensão. Ainda outra técnica consiste no processo de diálise com detergente (Enoch et al., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. 76:145). Neste processo, o lípido é misturado com um detergente tal como o desoxicolato em solução aquosa, submetido a tratamento sônico, sendo o detergente removido por filtração em gel. Uma outra técnica é a técnica de infusão em etanol de Batzri et al. (1973, Biochim. Biophys. Acta., 298:1015), para a formação de vesículas unilamelares pequenas, em que uma solução de lípidos em etanol é injectada na fase aquosa desejada formando lipossomas com um diâmetro de cerca de 30 nm a cerca de 2 µm. O etanol residual pode depois ser removido por rotoevaporação.

Outra classe de lipossomas que pode ser utilizada no presente invento é a dos caracterizados por possuírem uma distribuição lamelar do soluto substancialmente igual. Nesta classe os lipossomas denominam-se vesículas plurilamelares estáveis (SPLV) como definido na Patente Americana Nº 4 522 803, Lenk, et al., vesículas monofásicas como descritas na Patente Americana Nº 4 558 579, Foutain et al., e vesículas multilamelares congeladas e descongeladas (FATMLV) em que as vesículas são expostas a pelo menos um ciclo de congelação e descongelação; este procedimento é descrito em Bally et al., Publicação PCT Nº 87/00043, 15 de Janeiro de 1987, sob o título "Multilamellar Liposomes Having Improved Trapping Efficiencies". Incorpora-se aqui para referência a parte mais importante destas referências.

Num sistema de distribuição de uma droga através de lipossomas, um agente bioactivo, tal como uma droga, é retido no lipossoma ou é-lhe associado sendo depois administrado ao paciente a tratar. Ver por exemplo, Rahman et al., Patente Americana Nº 3 993 754; Sears, Patente Americana Nº 4 145 410; Papahadjopoulos et al., Patente Americana Nº 4 235 871; Schnieder, Patente Americana Nº 4 114 179; Lenk et al., Patente Americana Nº 4 522 803; e Fountain et al., Patente Americana Nº 4 588 578.

O uso de lipossomas na administração de drogas tem levantado problemas no que diz respeito tanto à encapsulação de droga como à libertação da droga durante a terapia. No que diz respeito à encapsulação, tem havido necessidade contínua de aumentar as eficiências de retenção de modo a minimizar a carga lipídica a apresentar ao doente. Adicionalmente, as eficiências de retenção elevadas significam que apenas uma pequena quantidade de droga foi perdida no processo de encapsulação, o que constitui uma vantagem importante quando se lida com drogas caras. No que diz respeito à libertação da droga, tem-se constatado que muitas drogas são rapidamente libertadas dos lipossomas após encapsulação. Esta libertação rápida diminui os efeitos benéficos da encapsulação em lipossoma. Assim, têm-se sido feitos esforços contínuos pelos especialistas na matéria pa-

ra encontrar maneiras de reduzir a velocidade de libertação das drogas dos lipossomas.

Para lá destes problemas da encapsulação e libertação, há o problema dominante de encontrar uma maneira comercialmente aceitável de fornecer lipossomas contendo droga ao clínico. Embora a produção e enchimento de lipossomas numa base "à medida do necessário" seja um procedimento aceitável sob o ponto de vista experimental, é, em geral pouco exequível sob o ponto de vista clínico. Como tal, há uma necessidade significativa e constante destes métodos em que os lipossomas, com ou sem as drogas encapsuladas, podem ser expedidos, armazenados e, em geral, movimentados através dos canais de distribuição comercial convencionais sem danos substanciais.

SUMÁRIO DO INVENTO

O presente invento revela um procedimento de encapsulação que aumenta significativamente a partição e a subsequente retenção da prostaglandina no lipossoma, e a estabilidade da formulação de prostaglandina retida no lipossoma. Mais especificamente, os lipossomas são formados inicialmente numa solução aquosa de pH relativamente básico, sendo o pH depois ajustado a um pH relativamente ácido. Depois da acidificação da solução lipossômica externa a prostaglandina fica associada aos lipossomas. Esta associação pode efectuar-se por partição nas membranas lipossômicas e através delas. Este procedimento resulta surpreendentemente em 50 a 100% de retenção da prostaglandina nos lipossomas. O sistema tampão usado para atingir esta retenção é portanto designado por tampão activador de partição.

Os lipossomas resultantes são reduzidos em tamanho a uma distribuição homogênea de tamanho. Após ajuste do pH, a solução resultante pode ser desidratada ou liofilizada e guardada até ao seu uso, altura em que pode ser re-hidratada usando uma solução aquosa. Este processo requer a adição de um protector de secagem antes do processo de secagem (desidratação ou liofilização) que mantém o tamanho da partícula de lipossoma após

-7-

re-hidratação. Na ausência deste protector de secagem as forças que mantêm a integridade do lipossoma quando numa suspensão aquosa são removidas. Este protector pode ser um sacarídeo como a sacarose, dextrose, maltose, manose, galactose, rafinose, tre-halose ou lactose. O manitol pode ser usado em conjunção com quaisquer dos sacarídeos. Podem também usar-se outras substâncias tais como a albumina, dextrano ou o álcool polivinílico.

Podem usar-se lípidos baratos no presente invento e podem atingir-se facilmente eficiências de retenção de cerca de 50% e superiores (preferencialmente 80-100%) para uma grande gama de composições de lípidos. Outra vantagem única deste processo de incorporação dirigido pelo pH é a de que há uma redução na velocidade à qual a droga é libertada dos lipossomas resultando no aumento de estabilidade comparativamente aos lipossomas com prostaglandina retida passivamente (sem gradiente de pH). Esta redução da velocidade de libertação do agente bioactivo retido é mediada pela diferença de pH das soluções aquosas (o sistema tampão activador da partição) usadas nas preparações. Como tal, o tampão ou sistema tampão activador de partição ajuda a retenção da prostaglandina nos lipossomas.

Como tal a presente invenção revela uma composição lipossómica que compreende um metabolito do ácido araquidónico que é preferencialmente uma prostaglandina, um lípido, um protector de secagem e um tampão ou sistema tampão activador de partição. A prostaglandina é preferencialmente a prostaglandina E_1 . Os lipossomas podem possuir um potencial químico transmembrantar tal como um gradiente de concentração, que é preferencialmente um gradiente de pH. O sistema tampão activador de partição compreende duas soluções, sendo uma, uma solução de protector de secagem, preferencialmente uma solução de sacarídeo, e a segunda, preferencialmente uma solução de ácido cítrico. A solução de sacarídeo é preferencialmente de dextrose, sacarose ou maltose qualquer dos quais pode ser combinado com manitol. Podem usar-se outros protectores como o dextrano, álcool polivinílico ou albumina. O pH da solução protectora é preferencialmente relativamente básico, a pH de cerca de 3-pH de cerca de 11, mais

preferencialmente a pH de cerca de 7. A solução protectora de secagem, preferencialmente uma solução de sacarídeo, está presente em cerca de 5% a cerca de 20% em peso, mais preferencialmente em cerca de 10% a cerca de 12%. A solução de lipossoma pode depois ser reduzida em tamanho por exemplo, um procedimento de extrusão ou homogeneização. A solução resultante pode ser seca por um procedimento de desidratação ou liofilização. A solução de ácido cítrico tem preferencialmente um pH de cerca de 2,5 a cerca de 4,5 mais preferencialmente pH 3,0.

Os lípidos compreendem preferencialmente os fosfolípidos, com mais preferência a fosfatidilcolina, com a maior preferência a fosfatidilcolina do ovo. Os lipossomas têm um diâmetro de, preferencialmente, 100 a 500 nm e com maior preferência de cerca de 200 nm. A retenção da prostaglandina nos lipossomas é de cerca de 50 a cerca de 100%, mais particularmente entre cerca de 60 e 100%. A composição lipossômica pode ser injectada intravenosamente num paciente. As composições farmacêuticas das prostaglandinas lipossômicas podem ser feitas através da sua mistura com um veículo ou diluente farmacêutico.

A razão poder al lípido/prostaglandina nas composições do presente invento é de cerca de 150:1 a 1000:1, de preferência de cerca de 300:1 a 800:1, preferencialmente cerca de 600:1. As composições lipossômicas de prostaglandina do invento também podem ser liofilizadas.

Os lipossomas do invento podem ser preparados por associação da prostaglandina com o lípido por meio de um gradiente de pH transmembranar. Este gradiente pode ser obtido formando primeiro os lipossomas num meio aquoso básico, adicionando a prostaglandina à suspensão aquosa, e acidificando, em seguida, o meio (aquoso) externo dos lipossomas. O meio básico externo pode ser uma solução de um sacarídeo, enquanto a acidificação pode ser conseguida pelo uso de uma solução ácida tal como uma solução de ácido cítrico.

Os lipossomas do invento podem ser reduzidos em tamanho até uma distribuição uniforme de tamanhos extrusando-os através

de filtros com trajectos lineares ou tortuosos, ou por homogeneização. Este passo de redução de tamanho é executado, preferencialmente, antes da adição da prostaglandina, do passo de secagem e da formação do gradiente de pH transmembranar.

Alternativamente, os lipossomas do invento, podem ser preparados utilizando uma técnica passiva de enchimento, em que o lípido é misturado com uma solução aquosa do protector de secagem que também contém a prostaglandina. Este lípido pode ter a forma de um filme seco de lípido. Estes lipossomas de enchimento passivo também podem ser liofilizados.

DESCRIÇÃO DETALHADA DO INVENTO

Os lipossomas deste invento apresentam metabolitos do ácido araquidónico, especificamente prostaglandinas, em associação com lipossomas. Esta associação inclui a retenção da prostaglandina no lipossoma, e a associação potencial da prostaglandina com a superfície da membrana externa ou interna do lipossoma.

Como foi discutido acima, os lipossomas da invenção podem ser formados por qualquer dos métodos conhecidos para formação de lipossomas, mas eles são preferencialmente cheios com agente bioactivo de acordo com os procedimentos para agentes anti-neoplásticos ionizáveis, referidos por Bally et al., Pedido PCT Nº 86/01102 de 27 de Fevereiro de 1986 incorporado aqui como referência. Esta técnica permite o enchimento dos lipossomas com agentes bioactivos ionizáveis em que se cria um gradiente de concentração transmembranar através das membranas dos lipossomas e a droga é introduzida nos lipossomas por meio deste gradiente. O gradiente de concentração transmembranar (iónico) é gerado por criação de um gradiente de concentração de uma ou mais espécies carregadas (p.e Na^+ , Cl^- , K^+ , Li^+ , H^+) através das membranas dos lipossomas. Estes gradientes iónicos são preferencialmente gradientes de pH (H^+). Estes gradientes de pH podem levar à incorporação de agentes bioactivos ionizáveis (drogas, tais como prostaglandinas) através das membranas dos lipossomas.

-10-

De acordo com o presente invento, preparam-se lipossomas que encapsulam um primeiro meio aquoso (relativamente ácido ou básico). No caso da PGE_1 , verificou-se que um esquema de encapsulação em que o primeiro meio aquoso é relativamente básico (em comparação com o segundo meio aquoso) resulta numa maior retenção.

Para criar o gradiente de concentração ajusta-se o primeiro meio externo (por ajuste do pH externo), ou adiciona-se um segundo meio externo (o qual pode ser por exemplo, ou relativamente básico ou ácido em comparação com o meio externo original). No caso da retenção da PGE_1 , a ^{que}adição do segundo meio externo é ácido relativamente ao primeiro meio externo é preferida. Se o primeiro ou o segundo meio externo contiver um agente bioactivo ionizável tal como uma prostaglandina ionizável, dar-se-á a partição da droga nos lipossomas pelo gradiente de pH (H^+) transmembrantar (no interior básico relativamente ao exterior), de tal maneira que as razões entre os agentes bioactivos livres associados às vesículas reflectem as razões entre $[H^+]_{int}$ e $[H^+]_{ext}$. Mantém-se um gradiente iónico nos lipossomas mesmo depois de se ter completado o enchimento.

O método de enchimento por gradiente de pH transmembrantar pode ser usado com praticamente qualquer prostaglandina que possa existir em estado ionizável quando dissolvida num meio aquoso apropriado. No caso das prostaglandinas, este grupo ionizável pode ser o grupo carboxilo na cadeia do ácido gordo (Ver I acima). É preferível que a prostaglandina seja também relativamente lipofílica de modo a que se efectue a partição nas membranas dos lipossomas. São exemplos de algumas destas prostaglandinas que podem ser introduzidas nos lipossomas por este método e que portanto podem ser usadas neste invento as PGE_1 , PGE_2 , PGG e PGF , entre outras.

Para lá do enchimento dos lipossomas com uma prostaglandina simples, o método de enchimento por gradiente de pH pode ser usado para carregar várias prostaglandinas simultaneamente ou sequencialmente.

De uma maneira geral, qualquer dos métodos de formação dos lipossomas referido nos Antecedentes do Invento pode ser usado na prática do invento embora se prefiram métodos que formam vesículas unilamelares, especialmente vesículas unilamelares grandes. Preferem-se dois métodos para a formação destas vesículas unilamelares: a primeira técnica é a associação de agente bioactivo (droga, especificamente prostaglandina) com o lípido em etanol semelhante à técnica de Batzri et al., (1973, Biochim. et Biophys. Acta. 298:1015) usando um gradiente de concentração transmembranar como revelado em Bally et al., (supra) para introduzir o agente bioactivo. Nesta técnica o lípido e a prostaglandina são co-dissolvidos num solvente orgânico miscível em água, tal como o etanol a 5% do volume aquoso total, e depois adicionados lentamente a uma primeira solução aquosa. A primeira solução aquosa pode ser uma solução aquosa tal como, preferencialmente, uma solução do protector de secagem, ou um tampão, por exemplo citrato ou fosfato. Esta solução tampão pode incluir, adicionalmente, um protector de secagem. O protector de secagem pode ser um sacarídeo tal como a sacarose, maltose, lactose ou dextrose ou uma combinação de sacarídeos tal como sacarose, maltose, lactose ou dextrose com manitol. Utiliza-se preferencialmente a maltose. Podem incluir-se outros sacarídeos, por exemplo, a manose, galactose, rafinose ou trehalose. Alternativamente podem usar-se outros protectores tais como o dextrano, a albumina ou o álcool polivinílico. O pH desta primeira solução aquosa é relativamente básico (comparado com o da segunda solução aquosa, ver abaixo) por exemplo cerca de 3,0 a cerca de 11,0, mais preferencialmente cerca de 7,0. Por outras palavras, em comparação com a segunda solução aquosa, a primeira é mais básica. Alternativamente este tampão pode ser relativamente ácido (em comparação com o da segunda solução aquosa).

A solução de lipossomas resultante de uma única fase, é reduzida em tamanho para uma população homogênea, por exemplo, por extrusão através de um filtro, de preferência com um tamanho de poro de 0,2 micron, sendo o filtro do tipo de percurso

linear ou de percurso tortuoso. Esta população pode ser formada por procedimentos de extrusão de Cullis et al., Publicação PCT Nº 86/00238, de 16 de Janeiro de 1986, incorporando-se aqui as passagens relevantes para referência. Estes procedimentos de extrusão, em que os lipossomas passam através de um filtro sob pressão, permitem a formação de populações homogêneas de lipossomas no que diz respeito ao tamanho. A extrusão pode ser realizada por uma ou mais passagens através de um filtro; por exemplo um filtro de membrana de passagem linear (por exemplo, um filtro de policarbonato Nucleopore) ou um filtro de passagem tortuosa (por exemplo, um filtro membrafil Nucleopore (ésteres mistos de celulose) de 0,2 μ m de tamanho). Quando se fazem passar os lipossomas mais de uma vez através do filtro, o número de passagens requerido será determinado pelo necessário para conseguir o tamanho de lipossomas desejado, isto é preferencialmente cerca de 0,20 μ m.

Os tamanhos de filtro utilizados no invento são escolhidos de acordo com o tamanho desejado do lipossoma final. No presente invento, por exemplo, preferem-se lipossomas tendo um diâmetro médio de cerca de 0,20 μ m.

Os lipossomas do presente invento têm preferencialmente um diâmetro inferior a 500 nm, e preferencialmente têm um diâmetro de 100 nm a 300 nm. No presente invento, preferem-se os lipossomas de cerca de 200 nm uma vez que os lipossomas com aproximadamente este tamanho podem passar através do leito capilar do pulmão e são portanto capazes de passar para outros órgãos ou tecidos. Consequentemente, escolhe-se, para utilização no passo da extrusão, um filtro com um tamanho de poro de cerca de 0,20 μ m.

Outros métodos para a redução do tamanho dos lipossomas a uma distribuição de tamanho homogênea como definida acima são a exposição a ultrasons, a técnica da Prensa Francesa, o corte hidrodinâmico, homogeneização usando por exemplo um moinho de colóides ou um homogeneizador de Gaulin, ou outras técnicas de redução de tamanho. Por exemplo quando se usa o método de ho-

homogeneização de Gaulin, os lipossomas a reduzir são recirculados continuamente a partir de um reservatório, por exemplo no homogeneizador, a um caudal de 2 L/min. de maneira a que para um lote de 1 litro, se recirculem os lipossomas durante 4 minutos a cerca de 14 000 psi. Pode usar-se um permutador de calor para manter a temperatura do lote abaixo de cerca de 30°C.

Os lipossomas de tamanho reduzido resultantes são homogêneos no que diz respeito ao tamanho. Os lipossomas têm por exemplo uma distribuição de Gauss em torno de uma média de 200 nm, com uma amplitude de cerca de 20 a cerca de 500 nm.

O produto de tamanho reduzido resultante pode ser diluído com uma solução aquosa adicional, seco, e armazenado até uso, ou alternativamente, o pH pode ser alterado de modo a introduzir a droga através do gradiente de pH transmembrantar. O procedimento de redução de tamanho deve no entanto ser realizado antes do ajuste final de pH.

O segundo método, e o preferido, para a formação dos lipossomas do invento consiste, usando o método de injeção de etanol de Batzri et al., (acima), em misturar inicialmente o lípido com um conservante, hidroxitolueno butilado (BHT), por exemplo, em etanol a 5% do volume aquoso total, adicionando-se depois esta mistura lentamente a um primeiro meio aquoso. Este primeiro meio aquoso pode ser qualquer dos descritos acima, mas é preferencialmente uma solução de sacarídeo tal como, por exemplo, maltose. O pH desta primeira solução aquosa é básico relativamente à segunda solução aquosa, e está compreendido preferencialmente entre pH 3,0 e 11,0, mais preferencialmente cerca de 7,0. Este processo forma lipossomas que retêm a solução de sacarídeo.

A solução de lipossomas resultante é reduzida em tamanho a uma população homogênea por qualquer dos métodos descritos acima, mas preferencialmente pelo método de homogeneização de Gaulin descrito. Formam-se lipossomas de cerca de 20-500 nm, de preferência tendo um diâmetro de cerca de 300 nm a cerca de 500 nm ou preferencialmente com um tamanho médio de 200 nm.

-14-

O produto lipossoma de tamanho reduzido resultante pode ser filtrado esterilmente através de um filtro Millipak de 0,2 μ m (Millipore, Inc., Bedford, MA). Os lipossomas de tamanho reduzido e filtrados resultantes são depois misturados com o agente bioactivo que foi dissolvido em etanol. Por exemplo a prostaglandina, dissolvida em etanol, é adicionada a uma solução de lipossomas agitada. O produto prostaglandina-lipossoma pode então ser filtrado esterilmente através de um filtro de 0,2 μ m. O produto também pode ser diluído com uma solução aquosa adicional, e/ou seco (desidratado) e armazenado até ao seu uso. Nas concretizações preferidas, o produto de tamanho reduzido é introduzido em frascos, liofilizado, e armazenado até ao seu uso.

Imediatamente antes da sua utilização, pode reconstituir-se o produto liofilizado com uma solução aquosa de pH ácido ou básico relativamente ao primeiro meio aquoso. Este segundo meio aquoso é de preferência relativamente ácido. A adição deste meio aquoso dá origem ao gradiente de pH.

Independentemente do procedimento de formação dos lipossomas usado, para formar o gradiente de pH transmembranar, adiciona-se a uma solução lipossómica, um meio externo compreendendo uma solução aquosa com um segundo pH (um segundo meio externo) tendo um pH relativamente ácido em relação ao primeiro meio externo. O pH desta segunda solução aquosa é geralmente de cerca de 2,5 a cerca de 4,5, preferencialmente de cerca de 3,0 a 3,5, mais preferencialmente pH de cerca de 3,0. Depois do ajuste do primeiro meio externo por, por exemplo, adição desta segunda solução aquosa o pH da solução de lipossoma é de cerca de 3,0 a cerca de 4,5, preferencialmente de cerca de 3,0. Alternativamente, se a primeira solução aquosa for relativamente ácida, a segunda solução aquosa será relativamente básica.

Este ajuste do pH do meio externo promoverá a partição do agente bioactivo (prostaglandina) para dentro e através das membranas de lipossoma. Através do uso do par de tampões activa-

-15-

dores de partição deste invento com os gradientes de pH descritos acima, a eficiência de retenção da prostaglandina é de cerca de 50 a 100%, mais especificamente de 60 a 100%, e mais preferencialmente de 80 a 100%.

Sem compromisso com nenhuma teoria, crê-se que o papel do protector de secagem na formulação é manter o tamanho e integridade dos lipossomas durante o processo de secagem, e depois da re-hidratação. Quando se omite o protector de secagem da formulação dos lipossomas, os lipossomas re-hidratados têm uma eficiência de retenção baixa (à volta de cerca de 30% e inferior), e o tamanho dos lipossomas a seguir à liofilização não se mantém.

O procedimento de liofilização ou desidratação pode ser levado a cabo antes ou depois do estabelecimento do gradiente de pH. É levado a cabo, preferencialmente, antes do estabelecimento do gradiente de pH, e muito preferencialmente, o primeiro meio aquoso é relativamente básico e o segundo relativamente ácido. Neste caso, realiza-se a re-hidratação da formulação lipossoma-prostaglandina seca usando a segunda solução (relativamente ácida), estabelecendo-se então o gradiente de concentrações introduzindo eficazmente a prostaglandina nos lipossomas. Se a acidificação for levada a cabo antes da desidratação ou da liofilização, esta segunda solução também pode conter o protector de secagem e conservantes tais como o BHT, e/ou o ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA). O pH desta segunda solução aquosa (acidificação) é de cerca de 1,5 a cerca de 3,5, preferencialmente de cerca de 3,0. Se, no entanto, se realizar a acidificação a seguir à desidratação ou liofilização, a re-hidratação é levada a cabo usando uma solução aquosa de pH de cerca de 2,5 a cerca de 4,5, preferencialmente de cerca de 3,0, e sem o protector de secagem. Este último método, isto é a acidificação da solução após o passo de secagem, é o preferido.

Em ambos os métodos de formação dos lipossomas, os lipossomas associados à prostaglandina resultantes podem ser desi-

dratados ou liofilizados pelos métodos correntes na arte. Este procedimento de secagem requer a adição de um protector de secagem à suspensão de lipossoma. Este protector de secagem evita a reorganização dos lípidos no lipossoma, de modo a que o tamanho e conteúdo sejam mantidos durante o procedimento de secagem e através da re-hidratação. São qualidades apropriadas para estes protectores de secagem o serem fortes aceitadores de ligações de hidrogénio e o facto de possuírem características estereoquímicas que conservam o espaçamento intramolecular dos componentes da bicamada do lipossoma. Verificou-se que um grupo de protectores de secagem, os açúcares sacarídeos são especialmente úteis na manutenção do tamanho das partículas dos lipossomas após re-hidratação, quando incluídos nas formulações de lipossomas. Este grupo específico de sacarídeos compreende, por exemplo, dextrose, sacarose e maltose, que podem ser usadas em cerca de 5 a 20 por cento, preferencialmente a cerca de 10 por cento em peso da fase aquosa. Outros sacarídeos que podem ser usados são os açúcares manose, galactose, rafinose, tre-halose, lactose ou trioses. Pode usar-se o manitol em conjunção com qualquer dos sacarídeos, mas verificou-se surpreendentemente, que, quando usado sózinho, o manitol não é eficaz na manutenção do tamanho dos lipossomas. Pode usar-se o manitol em conjunto com os sacarídeos numa concentração de cerca de 0-2%, preferencialmente numa concentração de 1%. A concentração total de sacarídeo usada varia entre cerca de 5% e cerca de 20%, preferencialmente 10 e 12%, mais preferencialmente cerca de 10%. Podem incluir-se conservantes adicionais tais com BHT ou EDTA nas formulações a, por exemplo, 0,02 mg de BHT por μ l de etanol e, por exemplo, 0,01% de EDTA em 10% de dextrose. Podem usar-se outras substâncias como a ureia, albumina, dextrano ou álcool polivinílico.

Após re-hidratação do produto desidratado ou liofilizado, pode adicionar-se uma solução aquosa como por exemplo água destilada (se se tiver estabelecido o gradiente de pH antes da liofilização). No caso em que os lipossomas foram liofilizados na sua solução aquosa externa original, a re-hidratação é leva-

-17-

da a cabo usando uma segunda solução aquosa que estabelecerá o gradiente de pH como descrito abaixo (uma solução que seja relativamente ácida ou básica). No método preferido, o gradiente de pH estabelece-se pela adição de uma solução aquosa relativamente ácida à formulação, tal como, preferivelmente, uma solução de ácido cítrico. Em todos os casos, a reconstituição pode ser realizada a cerca de 20 a 30°C, preferencialmente a 25°C, sendo as soluções diluídas como for necessário e administradas.

No presente invento, o termo lípido como aqui usado refere-se a qualquer material adequado que resulte numa bicamada após mistura com um meio aquoso de tal maneira que uma porção hidrofóbica do material lipídico se oriente em direcção à bicamada enquanto uma porção hidrofílica se oriente em direcção à fase aquosa. Os lípidos incluem compostos altamente hidrofóbicos tal como os triglicerídeos, esteróis como o colesterol, e lípidos anfipáticos. Os lípidos preferidos para uso nas formulações de lipossomas do presente invento são os fosfolípidos tais como a fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilglicerol (PG), ácido fosfatídico (PA), fosfatidilinositol (PI), esfingomielina (SPM), e similares, sós ou em combinações. Os fosfolípidos podem ser sintéticos ou derivados de origens naturais tal como de ovo ou soja. Nas concretizações preferidas, usa-se o fosfolípido, fosfatidilcolina do ovo (EPC). Os lipossomas também podem conter outros componentes esteróides tais como o coprostanol, colestanol ou colestano, e combinações de EPC e colesterol. Os lipossomas também podem conter glicolípidos.

No caso do enchimento dos lipossomas através de um gradiente de pH em que o primeiro meio externo é básico, os meios aquosos adequados incluem tampões e podem incluir embora não se limitem a, por exemplo, tampões de ácido cítrico, ácido succínico ou ácido maleico ajustados a pH 3,0 a cerca de 11,0, preferencialmente a cerca de pH 7,0. Noutros casos em que o primeiro tampão usado é básico, podem usar-se tampões tais como os tampões de fosfato ou cloreto de sódio aquoso a 0,9% a

pH 7-9 . Pode usar-se em alternativa um tampão de carbonato ou bicarbonato de sódio. Podem ser incluídas nesta mistura ou outras soluções salinas tamponadas a cerca de pH 8 . Estas soluções salinas tamponadas incluem solução salina tamponada com fosfato "PBS," tampões de hidrocloreto de tris-(hidroximetil)-aminometano ("tris") ou ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'2-etanossulfônico (HEPES), ou glicina. Mais preferencialmente, a primeira solução aquosa é uma solução do protector de secagem, i.e., a solução de sacarídeo, por exemplo, com cerca de 5 a 20% de maltose (preferencialmente com cerca de 10% de maltose) a pH de cerca de 7,0. Esta solução pode ainda incluir EDTA ou um conservante similar (BHT) em qualquer concentração aceitável para os produtos farmacêuticos (de preferência cerca de 0,01% em EDTA).

Para estabelecer o gradiente de pH, adiciona-se um segundo meio externo (preferencialmente depois do passo da desidratação), ou ajusta-se o pH do primeiro meio a um pH ácido. Estes segundos meios externos que podem substituir o primeiro meio externo podem incluir tampões tais como, por exemplo, o ácido cítrico, ácido láctico ou ácido fosfórico a cerca de pH 2,5 a 4,5, mais preferencialmente a cerca de pH 3,0 . Pode também usar-se uma solução salina (0,9%) que tenha sido ajustada ao pH apropriado (como acima) com por exemplo ácido clorídrico aquoso 0,1 N. De preferência o pH do meio externo é ajustado por adição de aproximadamente um volume igual de solução de ácido cítrico (pH de cerca de 2,5 a cerca de 4,5, preferencialmente 3,0) à solução de lipossomas. Em qualquer dos casos, o pH final da solução externa dos lipossomas é de cerca de 2,5 a cerca de 4,5, preferencialmente 3,0-3,5, mais preferencialmente 3,0. Esta solução de ácido cítrico pode também conter cerca de 5% a 20% em peso de protector de secagem (o sacarídeo, de preferência maltose, de preferência a 10% em peso), e conservantes tais como o BHT e/ou EDTA em concentrações aceitáveis para produtos farmacêuticos (preferencialmente 0,01% de EDTA e 0,02 mg de BHT por ml de solução final).

No caso do primeiro meio externo ser relativamente ácido

pode usar-se um tampão de ácido cítrico fosfato de pH entre cerca de 5 e cerca de 6 ou cloreto de sódio aquoso a 0,9% com pH ajustado a cerca de 3,0 com HCl, ou qualquer das outras soluções ácidas mencionadas acima. O meio relativamente básico usado para estabelecer o gradiente de concentrações pode ser neste caso um tampão de fosfato a cerca de pH 8,0, cloreto de sódio aquoso, (0,9%) ajustado a pH de cerca de 7-10 com hidróxido de sódio, carbonato de sódio, tampão bicarbonato, ou qualquer das soluções básicas acima mencionadas.

Os lipossomas são preparados de preferência com um meio inicial básico, preferencialmente solução sacarídica básica de pH entre cerca de 7 e cerca de 8 mais preferencialmente a pH de cerca de 7,0. O gradiente de concentrações estabelece-se por adição do segundo tampão (relativamente ácido), de preferência ácido cítrico 0,01M, a pH de cerca de 2,5 a 4,5, o qual, quando adicionado ao primeiro meio externo (relativamente básico), origina um pH final de cerca de 3,0. Estes pares de soluções relativamente básicos/relativamente ácidos (pares de tampões) aumentam a partição da prostaglandina nos lipossomas. O gradiente de concentrações pode ser estabelecido antes ou de pois da desidratação ou liofilização, embora, como referido acima, este passo de desidratação ou liofilização seja preferencialmente levado a cabo antes da acidificação da preparação.

No presente invento, pode alternativamente encher-se os lipossomas através de uma técnica passiva (sem gradiente de pH) em que a solução aquosa pode compreender soluções aquosas tais com a água destilada, tampões aquosos ou um protector de secagem, como por exemplo, uma solução de sacarídeo tal como uma solução de dextrose ou maltose. Estes métodos podem incluir aqueles que formam lipossomas conhecidos por vesículas multilamelares (MLV), vesículas plurilamelares estáveis (SPCV), vesículas unilamelares grandes formadas por um procedimento de extrusão (LUVETS) e outros procedimentos de formação de lipossomas conhecidos na arte. O processo de formação das SPLVs é revelado em Lenk et al., Patente Americana nº 4 522 803, concedida a 11 de Junho de 1985 e o procedimento para LUVET revelado

em Cullis, et al., Publicação PCT Nº 86/00238 de 16 de Janeiro de 1986, incorporando-se aqui as porções relevantes dessas publicações para referência. Neste caso, os lipossomas são formados sem a intervenção de um gradiente de concentrações. Nesta técnica alternativa de formação dos lipossomas do invento, pode adicionar-se uma solução aquosa contendo o protector de secagem e a prostaglandina a um filme seco que contenha quais quer dos lípidos adequados, usados no invento como discutido acima. Este filme de lípido pode revestir um recipiente tal como um tubo, uma seringa ou um frasco. A suspensão de lipossoma que resulta pode ser desidratada ou liofilizada como descrito anteriormente.

As razões ponderais lípido/prostaglandina usadas no presente invento podem ser tão altas como 1000:1 . Situam-se preferencialmente entre cerca de 1000:1 a cerca de 150:1 mais preferencialmente entre cerca de 900:1 e 200:1; mais preferencialmente são de cerca de 600:1 . Razões ponderais lípido/droga de cerca de 150:1 ou superiores resultam em retenções de PGE, superiores a 60%, e podem resultar em retenções de 80-100% .

A desidratação ou liofilização dos lipossomas do presente invento pode ser levada a cabo por quaisquer dos métodos conhecidos na arte para desidratação ou liofilização de lipossomas. Para a desidratação, por exemplo, os lipossomas podem ser secos de acordo com os procedimentos de Janoff et al., Publicação PCT Nº 86/01103 de 27 de Fevereiro de 1986, incorporada aqui como referência.

Os lipossomas da invenção são de preferência liofilizados pipetando uma fracção alíquota dos lipossomas suspensos em água para frascos de soro (ver Exemplo 9), equipados com rolha de liofilização e colocando-os no liofilizador. Os frascos são mantidos durante cerca de 1 minuto a cerca de 24 horas, de preferência cerca de 1 hora, a uma temperatura entre 0°C e 50°C, de preferência a cerca de 10°C. A temperatura de prateleira é então descida a uma temperatura de cerca de -12°C a cerca de -80°C, de preferência -40°C, a uma velocidade de cerca de 20° a 0,005°C

-21-

por minuto, de preferência a cerca de 1°C por minuto. Os frascos foram mantidos a esta temperatura durante cerca de 0,1 horas a cerca de 120 horas, de, preferência 3 horas. Aplica-se um vácuo de cerca de 0,0 mm Hg a cerca de 100,0 mm Hg, de preferência de 0,005 mm Hg, decorridas cerca de 0,2 a cerca de 72 horas, de preferência cerca de 0,6 horas. A temperatura de prateleira é depois aumentada até cerca de -40°C a 0°C , de preferência cerca de -25°C , a uma velocidade de cerca de 20°C a cerca de $0,005^{\circ}\text{C}$ por hora, de preferência de cerca de 10°C por hora.

Os frascos são mantidos à temperatura mencionada acima (de preferência cerca de -25°C) durante cerca de 0,1 a cerca de 120 horas, preferencialmente cerca de 12 horas, após o que se aumenta a temperatura de prateleira até uma temperatura de cerca de -20°C a cerca de 0°C , preferencialmente de cerca de -10°C , a uma velocidade de cerca de 20°C a cerca de $0,005^{\circ}\text{C}$ por hora, preferencialmente de cerca de 10°C por hora, e mantida durante cerca de 0,1 a cerca de 120 horas, preferencialmente cerca de 8 horas. A temperatura de prateleira é então aumentada para entre cerca de 2°C e cerca de 40°C , de preferência cerca de 10°C , a uma velocidade de cerca de 20°C a cerca de $0,005^{\circ}\text{C}$ por hora, preferencialmente de cerca de 10°C por hora, e mantida durante cerca de 0,1 a cerca de 120 horas, preferencialmente cerca de 8 horas. A temperatura de prateleira é então aumentada até cerca de 20°C a cerca de 80°C , preferencialmente cerca de 40°C , e mantida durante cerca de 0,1, a cerca de 120 horas, preferencialmente cerca de 16 horas. Finalmente, a temperatura de prateleira é diminuída para entre cerca de 5°C a cerca de 30°C , de preferência cerca de 20°C , a uma velocidade de entre cerca de 20°C e cerca de $0,005^{\circ}\text{C}$, de preferência de cerca de 10°C por hora, mantendo-se esta temperatura até serem fechados. Os frascos são lavados com um jacto³ de hidrogénio e fechados.

Independentemente da técnica de desidratação ou liofilização, o procedimento reduz o conteúdo aquoso de uma amostra a menos de cerca de 2%, preferencialmente a menos de cerca de 1%. Utilizando os métodos correntes, a formulação de prostaglandina lipossômica é liofilizada até ao ponto de conter 0-2% de con-

teúdo aquoso, de preferência 0-1% de conteúdo aquoso (água).

As formulações de prostagladina-lipossoma liofilizadas podem ser estáveis durante pelo menos um ano quando armazenadas a cerca de 6°C-25°C. Conduziram-se estudos de estabilidade de acordo com os métodos do Exemplo 14 e a formulação foi analisada por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC). Não se detectaram produtos de degradação da PGE₁ após um ano de armazenagem a 6°C.

Para utilizar os lipossomas liofilizados, procede-se à sua re-hidratação por adição de uma solução aquosa, por exemplo, água destilada, água para injeção, ou tampão ou solução aquosa de pH apropriado, como descrito acima, aos lipossomas, deixando-os em repouso a re-hidratar. Os lipossomas podem ser ressuspensos na solução aquosa através de uma agitação suave da solução. A re-hidratação pode ser levada a cabo a cerca de 25°C. Se a prostaglandina tiver sido incorporada nos lipossomas antes da desidratação, e não forem desejadas mais alterações da composição, podem usar-se os lipossomas re-hidratados directamente na terapia seguindo procedimentos conhecidos de administração de drogas encapsuladas em lipossomas.

Durante a preparação dos lipossomas podem usar-se solventes orgânicos para suspender os lípidos. Os solventes orgânicos adequados são aqueles que apresentam uma variedade de polaridades e propriedades dieléctricas, que solubilizam os lípidos, e que incluem mas não se limitam ao metanol, etanol, dimetilsulfóxido (DMSO), cloreto de metileno, e misturas de solventes tais como o hexano:etanol (95:5). A mistura hexano:etanol (95:5) é de preferência usada para a suspensão inicial dos lípidos, e o etanol é preferencialmente usado durante a co-mistura do lípido com a prostaglandina. Escolhem-se os solventes de acordo com a sua biocompatibilidade, baixa toxicidade, e propriedades solubilizantes.

Os lipossomas resultantes dos processos do presente invento podem ser usados terapêuticamente em mamíferos, incluindo o homem, no tratamento de infecções ou em situações que requerem

a distribuição controlada da droga na sua forma bioactiva. Estas situações incluem mas não são limitadas a estados de doença tais como os que podem ser tratados com prostaglandinas.

O modo de administração da preparação pode determinar os sítios e as células no organismo aos quais o composto será distribuído. Os lipossomas do presente invento podem ser administrados isoladamente mas são geralmente administrados em mistura com um veículo farmacêutico seleccionado de acordo com a via de administração pretendida e a prática farmacêutica clássica. As preparações podem ser injectadas parentericamente, por exemplo, intra-arterialmente ou endovenosamente. As preparações também podem ser administradas por via oral, subcutânea ou intramuscular. No que diz respeito à administração parentérica, podem usar-se, por exemplo, na forma de uma solução aquosa estéril que pode conter outros solutos, como por exemplo sais ou glucose suficientes para formar a solução isotónica. Os lipossomas de prostaglandina E_1 do presente invento, por exemplo, podem ser dados parentericamente a uma dosagem de 5,0 ng por kg de peso do corpo por minuto, durante um período de duas horas, uma ou duas vezes por dia. Os peritos da arte podem considerar outros usos dependendo das propriedades particulares da preparação.

No que diz respeito ao modo oral da administração, as composições de lipossoma com prostaglandina deste invento podem ser usadas na forma de comprimidos, cápsulas, pastilhas, pós, xaropes, elixires, soluções e suspensões aquosas e similares. No caso dos comprimidos, os veículos que se podem usar incluem lactose, citrato de sódio e sais do ácido fosfórico. Usam-se geralmente nos comprimidos vários desintegrantes tais como o amido, e agentes lubrificantes tais como o estearato de magnésio. Para a administração na forma de cápsula, diluentes úteis são a lactose e polietileno-glicóis de alto peso molecular. Quando se pretendem suspensões aquosas para uso oral, podem adicionar-se agentes adocicantes e/ou aromatizantes.

Para administração a humanos no tratamento curativo de estados de doença que reagem à terapia com prostaglandina, o mé-

dico determinará em última análise a dosagem apropriada para cada sujeito humano, e esta variará de acordo com a idade, peso e reação do indivíduo tal como a natureza e a gravidade da doença do paciente. A dosagem da droga na forma lipossômica se rá geralmente semelhante à usada para a droga livre. Contudo em alguns casos, poderá ser necessário administrar dosagens fora destes limites.

Os exemplos seguintes são dados apenas com objectivos ilustrativos sem constituírem de modo nenhum uma limitação ao âmbito do invento.

EXEMPLO 1

Evaporou-se rotativamente uma solução de fosfatidilcolina de ovo (200 mg) em hexano:etanol (95:5) sob pressão reduzida num banho de água regulado a 37°C até se obter um filme fino nas paredes do frasco. O filme foi ressuspenso em 200,0 μ l de etanol, aos quais se adicionou 1,0 mg de PGE₁ e 2,0 mg de BHT. Esta solução etanólica foi introduzida numa seringa de tuberculina de 1,0 ml de capacidade e injectada através de uma agulha de medida 21 a cerca de 2 gotas/segundo numa solução agitada de 4,0 ml de solução aquosa de dextrose a 10% (peso/volume) com EDTA aquoso 0,01% (peso/volume), pH 7,0. Após a adição da mistura de etanol/lípido, a solução torna-se turva; esta solução foi extrusada 5 vezes através de um filtro de polycarbonato de 0,2 μ m (tipo percurso linear), seguido por mais um segundo grupo 5 extrusões através de um segundo filtro de 0,2 μ m idêntico. O tamanho de partículas dos lipossomas resultantes foi determinado e foi de 0,24 μ m $\pm$ 22%, usando-se para o efeito dispersão da luz quase-elástica (QEELS) (Nicom Particle Sizer). A suspensão foi então diluída a 100 ml com dextrose a 10%, EDTA a 0,01%, pH 7,0, pipetando-se fracções alíquotas de 1,0 ml para frascos e liofilizando-as de acordo com os procedimentos do Exemplo 9. O produto foi re-hidratado com 1,0 ml de citrato 0,01 M, ajustado a pH 3,0 com hidróxido de sódio (NaOH). O pH resultante da suspensão foi de cerca de 3,0. A retenção da PGE₁ nos liposomas foi determinada por HPLC, de acordo com as técnicas do Exemplo 8.

-25-

EXEMPLO 2

Utilizaram-se os procedimentos e materiais do Exemplo 1, mas após a determinação do tamanho das partículas, a suspensão foi diluída duas vezes com 4,0 ml de ácido cítrico a 0,01% contendo dextrose a 10% e EDTA a 0,01%, pH 2,3. Esta foi mais uma vez diluída a 100 ml com dextrose a 10% contendo EDTA a 0,01% a pH 4,5; o pH final da suspensão foi de cerca de 3,5. Pipetaram-se frações alíquotas (1,0 ml) desta suspensão para frascos e liofilizaram-se de acordo com os procedimentos do Exemplo 9. O produto foi re-hidratado com 1,0 ml de água destilada até um pH final de cerca de 3,4. Determinou-se a retenção de acordo com as técnicas do Exemplo 8.

EXEMPLO 3

Utilizaram-se os procedimentos e materiais do Exemplo 1 usando uma solução aquosa agitada contendo 4,0 ml de dextrose a 10%, EDTA a 0,01%, manitol a 1% (11% de sacarídeo no total). A retenção foi determinada de acordo com as técnicas do Exemplo 8. O tamanho das partículas de lipossoma foi determinado por QELS e era de cerca de $0,247 \mu\text{m} \pm 10\%$.

EXEMPLO 4

Utilizaram-se os procedimentos e materiais do Exemplo 1 usando uma solução aquosa agitada de pH 7,4. A retenção foi determinada de acordo com as técnicas do Exemplo 8. O tamanho das partículas de lipossomas foi determinado por QELS e era de $0,288 \mu\text{m} \pm 44\%$ (diâmetro).

EXEMPLO 5

Seguiram-se os procedimentos do Exemplo 2 usando uma solução aquosa agitada de pH 7,4, e manitol a 2%, dextrose a 10% e EDTA a 0,01%. Determinou-se a retenção de acordo com as técnicas do Exemplo 8. Determinou-se o tamanho das partículas de lipossomas por QELS e era de $0,288 \mu\text{m} \pm 44\%$.

EXEMPLO 6

Seguiram-se os procedimentos e materiais do Exemplo 1 usando uma solução aquosa agitada contendo 4,0 ml de dextrose a 10%, EDTA a 0,01% e manitol a 2% (12% de sacarídeo no total). A retenção foi determinada de acordo com as técnicas do Exemplo 8.

EXEMPLO 7

Evaporou-se rotativamente fofatidilcolina do ovo (100 mg) em hexano:etanol (95:5) sob pressão reduzida até se obter um filme fino nas paredes do recipiente. O filme foi ressuspense num misturador vortex em 1,0 ml de solução de ácido cítrico 0,3M (pH 3,0), deixando-se em seguida em repouso durante uma hora à temperatura ambiente. O pH final da solução de lipossoma era de 3,5. A suspensão foi extrusada cinco vezes através de um filtro de polycarbonato de 0,2 μ m e de percurso linear, sendo o pH da suspensão resultante ajustado a 6,9 usando NaOH. A amostra foi liofilizada e re-hidratada com água. O grau de associação da PGE₁ com os lípidos foi determinado antes e depois da reconstituição pelo procedimento Ficoll utilizado no Exemplo 8.

EXEMPLO 8

Suspenderam-se os lipossomas do Exemplo 1 em 1,0 ml de solução aquosa e transferiram-se para um tubo Corex de 15 ml. Os frascos que continham os lipossomas foram lavados com 2 x 5 ml de uma solução de histopaque Ficoll (Sigma Chemical Co.) e esta foi misturada com o conteúdo do tubo Corex. O tubo foi centrifugado a 16 320xg durante 10 minutos numa centrífuga Sorvall. Os lípidos assentam no topo do Ficoll. Removeu-se do tubo toda a solução de lavagem do fundo excepto 0,5-1,0 ml e a camada de lípido usando uma bomba peristáltica. Deve-se tomar cuidado para assegurar que não fica lípido agarrado ao tubo extractor da micropipeta. Adicionou-se tetra-hidrofurano (THF) (2,5 ml) à camada de lípido deixada no tubo, misturando-se completamente. Esta solução foi transferida para um tubo Corex de 30 ml envolvido em folha de alumínio. Lavou-se o tubo Corex de 15 ml com 10,0 ml de ácido fosfórico a 0,1% e adicionou-se a

solução de lavagem à solução de lipossoma. Adicionaram-se mais 7,0 ml de ácido fosfórico a 0,1% à solução de lipossomas. Esta solução de lipossomas foi passada através de um cartucho Sep-Pak C₁₈ que tinha sido preparado por passagem através dele de 5,0 ml de metanol seguido de 10,0 ml de água destilada, a PGE₁ que se dissocia do lípido fica retida no cartucho. Fez-se passar metanol (7,0 ml) através do Sep-Pak para eluir a PGE₁ e a PGE₁ foi recolhida num pequeno frasco de fundo redondo. O metanol da preparação foi removido num evaporador rotativo sob pressão reduzida e a uma temperatura inferior a 35°C. A PGE₁ foi então dissolvida com 1,0 ml de uma fase móvel para HPLC (acetonitrilo:pH 20 (pH 2,2, com ácido fosfórico) 40:60 em volume) que continha um padrão interno de β -naftol a uma concentração de 50 μ g/ml. Esta suspensão foi depois filtrada através de um filtro de ponta de seringa de 0,45 μ m (tipo Millipore Millex HV₄) antes de ser injectada no HPLC.

O procedimento anterior foi repetido com os lipossomas dos Exemplos 2-7 anteriores.

EXEMPLO 9

Encheram-se frascos de liofilização âmbar com uma capacidade de 5,0 ml, rolhados com borracha butílica e de topo dividido (split-top) com 1,0 ml de lipossomas em suspensão aquosa, contendo PGE₁ retida. Estes frascos foram colocados em tabuleiros de aço inoxidável num liofilizador (liofilizador PV-24 Stokes) equipado com um Programador de Controlo Digital Honeywell DCP7700. Os frascos foram mantidos a 10°C durante uma hora. A temperatura de prateleira foi depois descida a -40°C a uma velocidade de 1°C por minuto. Os frascos foram mantidos a -40°C durante três horas sendo-lhes aplicado um vácuo inferior a 0,005 mm Hg a 0,6 horas, depois de atingida a temperatura de -40°C. A temperatura de prateleira foi depois aumentada até -25°C a uma velocidade de 10°C por hora e sob um vácuo inferior a 0,005 mm Hg.

Os frascos foram mantidos a -25°C durante 12 horas a menos de 0,005 mm Hg. A temperatura de prateleira foi depois

aumentada para -10°C a uma velocidade de 10°C por hora, e mantida durante 8 horas. A temperatura de prateleira foi ainda aumentada para $+10^{\circ}\text{C}$ a uma velocidade de 10°C por hora e mantida durante 8 horas. A temperatura de prateleira foi depois aumentada para 40°C e mantida durante 16 horas, a menos de 0,005 mm Hg. A temperatura de prateleira foi finalmente descida até 20°C a menos de 0,005 mm Hg a uma velocidade de 10°C por hora e mantida até ao fecho dos frascos. Os frascos foram submetidos a um jacto de azoto e fechados.

EXEMPLO 10

Mediram-se 41 ml de fosfaditilcolina do ovo numa solução 108 mg/ml em hexano:etanol (95:5) (4,428 mg EPC no total) para um frasco com uma capacidade de 500 ml, de fundo redondo, e removeu-se o hexano:etanol por evaporação rotativa num banho de água regulado a 37°C . Adicionou-se etanol (2,0 ml) contendo 30 mg de BHT ao frasco e suspendeu-se o filme de lípido seco. Adicionou-se mais 1,0 ml de etanol para suspender completamente o EPC.

Preparou-se um litro de uma solução a 10% de maltose e ajustou-se o pH a 7,4 com hidróxido de sódio 1,0 N. A solução foi esterilizada fazendo-a passar através de um filtro Millipak 40 de $0,22\text{ }\mu\text{m}$ que foi previamente molhado com água estéril.

A solução de EPC/BHT/etanol foi adicionada gota a gota, com uma seringa de 1,0 ml equipada com uma agulha de medida 21, a uma velocidade de 1,0 ml/minuto, numa solução agitada de cerca de 800 ml de maltose a 10%, numa proveta de 2000 ml. Repetiu-se esta operação para a totalidade do EPC/BHT/etanol, cerca de 8,0 ml. Depois de se ter adicionado todo o lípido, o frasco de fundo redondo foi passado duas vezes consecutivas com fracções alíquotas de cerca de 3,0 ml da solução de maltose, e adicionadas à proveta com maltose. A solução foi levada a 1000 ml por adição de solução de maltose a 10%.

EXEMPLO 11

Os lipossomas formados pelo processo do Exemplo 10 foram

homogeneizados usando o homogeneizador Gaulin Modelo 30 CD. Os lipossomas foram colocados num reservatório de 5 L fechado, ligado com tubagens ao Gaulin e um permutador de calor de 316 L, de tubo e invólucro sanitário, em aço inoxidável montado na extremidade a jusante do Gaulin, de forma a manter a temperatura de solução de lipossomas a menos de 30°C. Ligou-se uma fonte de azoto (138 KPa 20 psi) ao reservatório de 5L de modo a alimentar os lipossomas sob pressão ao Gaulin. A solução de lipossomas foi circulada através do Gaulin a uma pressão de $96,524 \times 10^{-3}$ KPa (14 000 psi) durante cerca de 4 minutos a um caudal de $1,83 \times 10^{-3} \text{ m}^3$ (meio galão) por minuto. Os lipossomas tinham um diâmetro médio de cerca de 150-200 nm a seguir à homogeneização, com uma gama de distribuição de tamanhos de cerca de 20-500 nm, medidos pela dispersão da luz quase-elástica usando um medidor de partículas Nicomp (Nicom Instruments, Inc., Goleta, CA).

EXEMPLO 12

Filtraram-se os lipossomas homogeneizados (700 ml) de acordo com os procedimentos do Exemplo 11 através de um filtro Millipak de $0,2 \mu\text{m}$ e agitaram-se numa proveta de 1500 ml numa placa agitadora. Adicionou-se gota a gota uma solução etanólica de prostaglandina E_1 (3,85 mg de PGE_1 em 1,4 ml de etanol) com uma pipeta de 5,0 ml. Após a adição da PGE_1 , a suspensão foi filtrada esterilmente através de um filtro Millipak de $0,2 \mu\text{m}$ e colocaram-se fracções alíquotas de 1,0 ml em frascos de soro. Os frascos cheios foram liofilizados de acordo com o método do Exemplo 9.

EXEMPLO 13

O frasco de lipossomas de PGE_1 do Exemplo 12 foi reconstituído usando 1,0 ml de ácido cítrico estéril, pH 3,0 e o frasco foi agitado manualmente até à sua completa ressuspensão.

EXEMPLO 14

O frasco dos lipossomas liofilizados do Exemplo 12 foi ressuspenso em 1,0 ml do padrão de HPLC em fase móvel (60% de água,

-30-

pH 2,2, acetonitrilo a 40% para HPLC, contendo β -Naftol a uma concentração de 50 $\mu\text{g/ml}$). A amostra foi filtrada através de um filtro Millipore HV₄ de 0,45 μm de ponta de seringa para um frasco para HPLC com uma capacidade de 2,0 ml. A amostra foi passada no HPLC Rainin usando uma sobrecarga de equipamento de 50 μl numa circulação de carga de 20 μl a um caudal de 1,25 ml/minuto numa coluna de fase inversa de 15 cm (coluna Rainin C-18), ligada a um detector Gilson 116 ajustado para 205 nm. A coluna do cromatógrafo foi operada durante 13 minutos. Identificaram-se picos correspondentes à PGE₁ e ao β -naftol.

A concentração em PGE₁ no frasco da amostra foi calculada através de uma análise de regressão linear padrão das áreas dos picos, e comparada com uma curva padrão da PGE₁ em HPLC. Foram considerados três frascos para cada amostra testada e calculou-se a concentração média.

EXEMPLO 15

O método do Exemplo 14 foi repetido para os lipossomas preparados de acordo com os métodos do Exemplo 1 a intervalos de 1 semana, 2 semanas, 30 dias, 3 meses, 6 meses, 9 meses e 1 ano.

R E I V I N D I C A Ç Õ E S

1ª. - Processo de preparação de uma composição lipossômica, caracterizado por compreender a mistura de um metabolito derivado do ácido araquidônico, um lípido, um protector de secagem e um tampão activador de partição.

2ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o metabolito do ácido araquidônico ser a prostaglandina.

3ª. - Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por a prostaglandina compreender a prostaglandina E_1 .

4ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por os lipossomas terem um gradiente de concentração transmembrana.

5ª. - Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por o gradiente de concentração transmembrana ser um gradiente iónico.

6ª. - Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por o gradiente iónico ser um gradiente de pH.

7ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o tampão activador de partição compreender uma solução protectora de secagem e uma solução de ácido cítrico.

8ª. - Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por a solução protectora de secagem ser uma solução sacarídica.

9ª. - Processo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado por o pH da solução sacarídica estar situado entre cerca de 3,0 e cerca de 11,0.

10ª. - Processo de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por o pH da solução sacarídica ser de cerca de 7,0.

11ª. - Processo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado por o pH da solução de ácido cítrico estar compreendido entre cerca de 2,5 e cerca de 4,5.

12ª. - Processo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado por o pH da solução de ácido cítrico ser de cerca de 3,0.

13ª. - Processo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado por a solução sacarídica compreender dextrose, sacarose ou maltose.

14ª. - Processo de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por o sacarídeo compreender maltose.

15ª. - Processo de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por a solução sacarídica compreender de cerca de 5 a cerca de 20% de sacarídeo.

16ª. - Processo de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por a solução sacarídica compreender cerca de 10 a cerca de 12% de sacarídeo.

17ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o lípido ser um fosfolípido.

18ª. - Processo de acordo com a reivindicação 17, caracterizado por o fosfolípido compreender fosfatidilcolina.

19ª. - Processo de acordo com a reivindicação 18, caracterizado por a fosfatidilcolina compreender fosfatidilcolina de ovo.

20ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por os lipossomas terem um diâmetro entre cerca de 10 nm e cerca de 500 nm.

21ª. - Processo de acordo com a reivindicação 20, caracterizado por os lipossomas terem um diâmetro médio entre 150 e 200 nm.

22ª. - Processo de acordo com a reivindicação 20, caracterizado por a composição ser liofilizada.

23ª. - Processo de acordo com a reivindicação 22, caracterizado por a composição lipossômica, liofilizada, de prostaglandina, compreender um lípido, uma prostaglandina e cerca de 10% de protector de secagem.

-33-

24ª. - Processo de acordo com a reivindicação 23, caracterizado por o protector de secagem compreender um sacarídeo.

25ª. - Processo de acordo com a reivindicação 24, caracterizado por o sacarídeo compreender dextrose, sacarose ou maltose.

26ª. - Processo de preparação de uma composição lipossômica de prostaglandina, caracterizado por compreender o passo de associar a prostaglandina aos lipossomas através de um gradiente de pH transmembrana.

27ª. - Processo de acordo com a reivindicação 26, caracterizado por o gradiente de pH transmembrana ser obtido através dos seguintes passos:

a) formação dos lipossomas numa solução aquosa relativamente básica;

b) adição de uma prostaglandina à suspensão do passo (a) acima; e

c) acidificação do meio externo dos lipossomas.

28ª. - Processo de acordo com a reivindicação 27, caracterizado por o tamanho dos lipossomas do passo (a) ser reduzido.

29ª. - Processo de acordo com a reivindicação 28, caracterizado por os lipossomas serem filtrados através de um filtro do tipo de percurso sinuoso.

30ª. - Processo de acordo com a reivindicação 28, caracterizado por os lipossomas serem filtrados através de um filtro do tipo de percurso linear.

31ª. - Processo de acordo com a reivindicação 28, caracterizado por os lipossomas serem homogeneizados.

32ª. - Processo de acordo com a reivindicação 31, caracterizado por os lipossomas serem liofilizados.

33ª. - Processo de acordo com a reivindicação 32, caracterizado por a razão ponderal de lípido/prostaglandina estar entre cerca de 300:1 e 1000:1.

34ª. - Processo de acordo com a reivindicação 33, caracterizado

rizado por a razão ponderal de lípido/prostaglandina estar entre cerca de 300:1 e 800:1.

35^a. - Processo de preparação de uma composição lipossó-mica de prostaglandina compreendendo um lípido, prostaglandina E₁, e um protector de secagem, caracterizado por compreender o passo de mistura de uma solução aquosa do protector de secagem contendo a prostaglandina, com um filme de lípido, seco.

36^a. - Processo de acordo com a reivindicação 35, caracte_rizado por os lipossomas serem liofilizados.

37^a. - Processo de preparação de uma composição lipossó-mica de prostaglandina compreendendo um lípido, prostaglandi-na E₁, um protector de secagem, e um tampão activador de partição, caracterizado por compreender os seguintes passos:

- a) mistura de uma solução etanólica do lípido com uma so-lução relativamente básica de um protector de secagem;
- b) redução do tamanho dos lipossomas;
- c) mistura dos lipossomas com uma solução etanólica de progtaglandina E₁;
- d) liofilização dos lipossomas do passo c); e
- e) reconstituição dos lipossomas com uma solução de ácido cítrico, relativamente ácida.

38^a. - Processo de acordo com a reivindicação 37, caracte_rizado por o lípido ser fosfatidilcolina de ovo.

39^a. - Processo de acordo com a reivindicação 37, caracte_rizado por o protector de secagem ser um sacarídeo.

40^a. - Processo de acordo com a reivindicação 39, caracte_rizado por o sacarídeo ser dextrose, sacarose ou maltose.

41^a. - Processo de acordo com a reivindicação 40, carate_rizado por o sacarídeo ser maltose.

42^a. - Processo de acordo com a reivindicação 37, caracte_rizado por o tamanho dos lipossomas ser reduzido por homogeneização.

TLC-135A

43ª. - Processo de preparação de uma composição farmacêutica, caracterizado por se misturarem os lipossomas preparados de acordo com a reivindicação 37, com um veículo farmacêuticamente aceitável.

Lisboa, 2. MAI 1968

241 - O AGENTE OFICIAL -

On the other hand, the

Antonio J. Serrano Lopez