



INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) Número de Publicação: **PT 1011637 E**

(51) Classificação Internacional:
A61K 9/127 (2006.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **1998.09.08**

(30) Prioridade(s): **1997.09.08 US 0925532**

(43) Data de publicação do pedido: **2000.06.28**

(45) Data e BPI da concessão: **2007.03.14**
003/2007

(73) Titular(es):

SKYEPHARMA INC.
10450 SCIENCE CENTER DRIVE SAN DIEGO,
CA 92121 **US**

(72) Inventor(es):

QIANG YE **US**
NANDINI KATRE **US**
MANTRIPRAGADA SANKARAM **US**

(74) Mandatário:

ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
R DAS FLORES 74 4 AND 1249-235 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **MODULAÇÃO DE CARGA DE DROGA EM LIPOSSOMAS MULTI-VESICULARES**

(57) Resumo:

RESUMO**"Modulação de carga de droga em lipossomas multi-vesiculares"**

Apresenta-se um processo para produzir lipossomas, por exemplo lipossomas multi-vesiculares (MVL), contendo um ou mais agentes biologicamente activos, onde a carga dos agentes activos nos lipossomas é modulada ajustando a osmolaridade do componente aquoso no qual os agentes são dissolvidos antes do encapsulamento. Para aumentar a carga de agente activo, reduz-se a osmolaridade do componente aquoso, e para diminuir a carga do agente activo, aumenta-se a osmolaridade do componente aquoso. Na produção de MVL, o processo envolve a dissolução do agente activo e de um excipiente osmótico óptimo num primeiro componente aquoso encapsulado nos lipossomas. Para uma qualquer dada concentração de droga, a osmolaridade do primeiro componente aquoso pode ser ajustada aumentando ou diminuindo a concentração ou peso molecular dos excipientes osmóticos aí utilizados. A velocidade de libertação do agente activo no meio ambiente no qual estão introduzidos os lipossomas pode ser controlada simultaneamente incorporando no componente lipídico usado na formulação pelo menos um lípido anfipático de cadeia longa. Por exemplo, o lípido anfipático pode possuir de cerca de 13 a cerca de 28 carbonos por exemplo, de cerca de 18 a cerca de 22 carbonos, na sua cadeia carbonada. A utilização do lípido anfipático de cadeia longa é particularmente útil no controlo da velocidade de libertação e da eficácia de encapsulamento para formulações de cargas de droga elevadas.

DESCRIÇÃO

"Modulação de carga de droga em lipossomas multi-vesiculares"

Antecedentes do invento

1. Campo do invento

O presente invento refere-se a um processo para controlar a carga de agentes activos em lipossomas. Mais especificamente, o presente invento refere-se a processos para modular a carga de agentes activos em lipossomas multi-vesiculares.

2. Descrição da especialidade afim

O tratamento óptimo com muitas drogas requer que o nível de droga seja mantido num nível específico durante um período de tempo prolongado. Por exemplo, o tratamento óptimo contra o cancro com antimetabolitos específicos do ciclo celular requer a manutenção de um nível citotóxico da droga durante um período de tempo prolongado. A citarabina é uma droga contra o cancro muito dependente do plano de utilização. Uma vez que esta droga mata as células apenas quando estas estão a sintetizar ADN, para um efeito terapêutico óptimo é requerida a exposição prolongada a concentrações terapêuticas da droga. A eficácia terapêutica desses agentes é ainda muitas vezes complicada pelo facto de o período de meia vida poder ser apenas de algumas horas após uma dose intravenosa ou subcutânea. Para conseguir o efeito terapêutico óptimo contra as células cancerosas com uma droga específica para a fase do ciclo celular como a citarabina, existem duas exigências importantes: primeiro, que as células cancerosas devem ser expostas a uma concentração elevada de droga sem causar danos irreversíveis importantes no hospedeiro; e segundo, que o tumor deve ser exposto à droga durante um prolongado período de tempo para maximizar o número de células cancerosas em contacto com a mesma durante a síntese de ADN, a porção susceptível do ciclo de proliferação celular. Este tipo de régimen de tratamento requer uma elevada carga de droga numa formulação de libertação lenta.

Outros determinados tipos de drogas são tão tóxicos que se torna importante manter um nível baixo de droga durante um longo período de tempo. Por exemplo, a amicacina é um antibiótico aminoglicosídeo com significativa actividade clínica contra estirpes de bactérias gram-negativas e gram-positivas. Em procedimentos terapêuticos existentes, a droga é normalmente administrada pelas vias intravenosa ou intramuscular num plano de administração de uma ou duas vezes por dia. A dose clínica mais vulgarmente utilizada é 15 mg/kg/dia, que é equivalente a uma dose diária máxima recomendada de 1 g por dia. No entanto, a administração da droga através de injeções espaçadas resulta numa exposição sistémica para os pacientes, e dependendo da droga, aumenta o risco de efeitos secundários tóxicos. Consequentemente, uma preparação de libertação lenta de depósito local para o tratamento de infecções como as confinadas a uma região local de tecido macio ou ósseo traria a vantagem de aumentar os níveis de droga nos tecidos locais, quando comparada com doses sistémicas terapêuticas, ao mesmo tempo que reduz ou evita a toxicidade sistémica da droga livre. Se a droga for muito tóxica ou o regímen de tratamento requerer uma dose terapêutica baixa, é benéfica uma carga de droga relativamente baixa numa formulação de libertação lenta.

Uma abordagem utilizada para proporcionar composições de libertação controlada para entrega de drogas é o encapsulamento em lipossomas. Entre os principais tipos de lipossomas, os lipossomas multi-vesiculares (Kim, et al., *Biochim. Biophys. Acta*; 728:339-348, 1983), são unicamente diferentes dos lipossomas unilamelares (Huang, *Biochemistry*, 8:334-352, 1969; Kim, et al., *Biochim. Biophys. Acta*; 646:1-10, 1981), dos lipossomas multilamelares (Bangham, et al., *J. Mol. Bio.*, 13:238-252, 1965), e dos lipossomas plurilamelares estáveis (Patente U.S. N.º 4522803). Ao contrário dos lipossomas unilamelares, os lipossomas multi-vesiculares contêm múltiplas câmaras aquosas. Ao contrário dos lipossomas multi-lamelares, as múltiplas câmaras aquosas dos lipossomas multi-vesiculares são não concêntricas.

A arte anterior também descreve processos para produzir lipossomas multi-vesiculares (Kim, et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 728:339-348, 1983). No entanto, a eficácia de

encapsulamento de algumas moléculas pequenas, tal como citosina arabinosídeo, também conhecido como citarabina ou Ara-C, provou ser relativamente baixa, e a velocidade de libertação de moléculas encapsuladas em fluidos biológicos foi maior do que a terapeuticamente desejável. Em EP 0280503 B1 apresenta-se um processo desenvolvido para controlar a velocidade de libertação de moléculas encapsuladas de lipossomas multi-vesiculares onde se introduz um cloridrato no processo de encapsulamento para controlar a velocidade de libertação em fluidos biológicos de agente activo. Investigação posterior, apresentada em WO 95/13796, mostrou que a velocidade de libertação de agentes a partir de lipossomas multi-vesiculares em plasma humano pode ser controlada introduzindo um ácido não clorídrico na solução aquosa na qual o agente é dissolvido antes da formação dos lipossomas multi-vesiculares.

A Patente U.S. N.º 5077056 apresenta estudos que mostram que a velocidade de libertação de agente biológico encapsulado a partir de lipossomas para um meio aquoso pode ser modulada ao introduzir protonóforos e ionóforos nos lipossomas para criar um potencial de membrana. Para além disso, conhece-se um processo (Patente U.S. N.º 5186941) para controlar a velocidade de libertação de drogas a partir de composições de vesículas em que se faz uma suspensão de lipossomas contendo um agente terapêutico encapsulado numa solução que contenha soluto suficiente para proporcionar uma osmolaridade substancialmente isotónica em relação à da solução no interior das vesículas, e hipertónica em relação ao salino fisiológico. Em lipossomas multi-vesiculares, sabe-se também (WO 96/08253) controlar a velocidade de libertação de agentes activos introduzindo um espaçador osmótico na solução aquosa onde se dissolve o agente activo antes da formação dos lipossomas multi-vesiculares.

Para além do agente biologicamente activo e dos ácidos ou espaçadores osmóticos destinados a controlar a velocidade de libertação de agente biologicamente activo a partir de lipossomas, é prática habitual encapsular juntamente compostos que se destinam a servir qualquer uma de várias funções auxiliares. Por exemplo, determinados compostos biologicamente activos detêm actividade apenas quando

mantidos a um determinado pH. Deste modo, para além do agente activo são muitas vezes necessariamente encapsulados ácidos ou tampões para controlar o pH do meio da droga. Noutros casos, é incorporado um contra-ião para potenciar a solubilidade de um agente biologicamente activo que tenha uma baixa solubilidade.

Estes processos para a produção de formulações de lipossomas com características de libertação lenta provaram, algumas vezes, ser incompatíveis com o objectivo de produzir lipossomas contendo uma carga elevada de agente activo, com boa eficácia de encapsulamento, visto ser desperdiçado pouco do agente activo dispendioso por não se conseguir capturá-lo nos lipossomas.

Deste modo, existe a necessidade de novos processos para produzir lipossomas, por exemplo lipossomas multi-vesiculares (MVL), que permitam o controlo da carga de droga, quer elevada quer baixa, enquanto mantêm a libertação lenta desejável de agente activo para armazenagem e fluidos biológicos. De particular interesse é o desenvolvimento de formulações de libertação controlada de carga elevada para péptidos e proteínas. Existe também a necessidade de novos processos para atingir esses objectivos sem sacrifício da elevada eficácia de encapsulamento para evitar o desperdício de agentes activos dispendiosos, tais como drogas e proteínas terapêuticas.

Resumo do invento

O presente invento proporciona um processo para modular a carga de agente biologicamente activo em formulações de lipossomas. A concentração de agente biologicamente activo no produto final é modulada ajustando a osmolaridade dos componentes aquosos onde o agente activo está dissolvido para encapsulamento. Verificou-se uma relação inversa entre a osmolaridade e a carga de droga, com a carga de agente activo a aumentar à medida que a osmolaridade do componente aquoso diminui. Deste modo, os lipossomas com carga de droga elevada ou com carga de droga baixa podem ser conseguidos por manipulação da osmolaridade da solução que contém droga antes do encapsulamento. Para além disso, verificou-se que a

modulação de carga de droga, em particular para atingir carga elevada de droga, pode ser conseguida sem sacrifício da elevada eficácia de encapsulamento no processo de produção ou da desejável libertação controlada de droga a partir do produto final em uso.

Os lipossomas produzidos pelo processo deste invento atingem resultados muitíssimo melhores, proporcionando uma quantidade desejada de agente activo num dado volume de formulação de lipossomas injectável ou implantável e proporciona libertação sustentada de droga a um nível terapeuticamente desejado quando introduzida num local *in vivo*. O princípio geral seguido para modular a carga de agentes activos em formulações de lipossomas é aqui ilustrado através de referências ao fabrico de lipossomas multi-vesiculares (MVL).

A carga de droga em lipossomas é modulada controlando a osmolaridade da solução aquosa que é encapsulada durante o fabrico dos lipossomas. A osmolaridade é a soma das concentrações molares de solutos presentes na solução aquosa, incluindo a substância biologicamente activa e quaisquer moléculas auxiliares, tais como os excipientes osmóticos usados para diminuir a velocidade de libertação de agente activo. Se o soluto estiver presente numa forma dissociada, ionizada, ou agregada, a osmolaridade define-se como a soma das concentrações molares das formas dissociadas, ionizadas ou agregadas. A contribuição para a osmolaridade de uma solução feita por qualquer soluto na solução é aproximadamente equivalente à concentração do soluto na solução a dividir pelo seu peso molecular. Assim, como princípio geral, quanto maior for o peso molecular de um soluto, menor será a osmolaridade do soluto, e menor será a contribuição desse soluto para a osmolaridade total da solução.

Sabe-se bem que o nível de carga de droga em lipossomas é directamente proporcional à concentração de agente biologicamente activo. Consequentemente, um nível elevado de agente activo deve ser dissolvido numa solução aquosa a encapsular para obter lipossomas com um elevado nível de carga de droga. No entanto, a carga não pode ser sempre

aumentada através da adição de uma outra concentração de agente activo. Outros solutos diferentes do agente biologicamente activo presente na solução aquosa usada durante o fabrico de lipossomas tendem a reduzir a quantidade de agente biologicamente activo que pode ser carregada nos lipossomas. Deste modo, se a solução também contiver excipientes osmóticos necessários para regular a solubilidade ou bioactividade do agente activo, os efeitos benéficos dos excipientes osmóticos auxiliares na solução devem ser equilibrados com os seus efeitos adversos na carga de droga.

Para potenciar a carga de droga, a osmolaridade da solução aquosa pode ser diminuída, sem diminuir a concentração de agente activo aí dissolvido, quer reduzindo a concentração de excipientes osmóticos quer substituindo um excipiente osmótico de baixo peso molecular por um excipiente osmótico de peso molecular mais elevado de função comparável, quer ambos. Por exemplo, se o excipiente osmótico for um tampão usado para obter a solubilidade de uma determinada concentração de agente biologicamente activo, será seleccionado um tampão de elevado peso molecular para obter carga elevada de agente activo. De modo semelhante, para diminuir a carga nessa situação, seria utilizado um tampão de menor peso molecular.

Embora esses princípios funcionem na produção de todos os tipos de lipossomas, são aqui ilustrados em formulações de MVL contendo esses vários agentes activos como citarabina, leuprolida, encefalina, morfina, e factor de crescimento I de tipo insulínico (IGF-I). Nesses estudos verificou-se que, para qualquer concentração seleccionada de agente biologicamente activo, a carga de droga durante o fabrico pode ser modulada eficazmente em MVL fazendo variar as contribuições dos excipientes osmóticos na solução para a osmolaridade total de um primeiro componente aquoso. Este princípio é aqui ilustrado nos exemplos ajustando a concentração de um excipiente osmótico modelo usado vulgarmente em formulações lipossómicas, quer sacarose quer glicilglicina. Por este processo, podem ser produzidas as formulações de MVL com uma larga gama de níveis de carga para qualquer determinado agente biologicamente activo.

No processo de fabrico de lipossomas multi-vesiculares (MVL) possuindo carga de droga controlada, é misturado um componente lipídico contendo pelo menos um lípido anfipático e um lípido neutro, dissolvidos num ou mais solventes orgânicos, com um primeiro componente aquoso imiscível contendo um ou mais agentes biologicamente activos a encapsular e, opcionalmente, um ou mais excipientes osmóticos, tais como uma molécula auxiliar. A carga de agente activo na formulação final dependerá da osmolaridade total deste primeiro componente aquoso, que é a soma da contribuição da osmolaridade de cada um dos solutos dissolvidos no primeiro componente aquoso, incluindo o agente activo e qualquer um dos excipientes osmóticos. Logo que a osmolaridade do primeiro componente aquoso seja ajustada para atingir a carga desejada de agente activo no produto final, forma-se uma emulsão de água em óleo ao misturar os dois componentes imiscíveis. A emulsão de água em óleo é então misturada num segundo componente aquoso imiscível para formar esférulas de solvente. O solvente orgânico é finalmente removido das esférulas de solvente, por exemplo por evaporação, para provocar a sua agregação em MVL. No passo final do processo, faz-se a suspensão de MLV num meio aquoso, tal como salino normal. Aumentando ou diminuindo o volume do meio de suspensão dos MVL contendo o agente activo, pode ser obtida uma composição contendo uma dose de agente activo terapeuticamente eficaz baseado no peso por volume de formulação.

Assim que a osmolaridade do primeiro componente aquoso foi ajustada para atingir a desejada carga de agente activo no produto final, forma-se uma emulsão água em óleo por mistura dos dois componentes imiscíveis. A emulsão água em óleo é depois misturada num segundo componente aquoso imiscível para formar esférulas de solvente. O solvente orgânico é finalmente removido das esférulas de solvente, por exemplo por evaporação, para as obrigar a agregar em MVL. No passo final do processo, os MVL são suspensos num meio aquoso, tal como um salino normal. Uma composição contendo uma dose terapeuticamente eficaz do agente activo baseada em peso por volume de formulação pode ser obtida aumentando ou diminuindo o volume de meio em que os MVL contendo o agente activo são suspensos.

Para manter uma elevada eficácia de encapsulação (ou percentagem de rendimento) durante a formulação dos MVL e assegurar que a libertação de agente activo utilizado se dê a uma velocidade terapêuticamente eficaz lenta, o componente lipídico contém um lípido anfipático, ou mais, possuindo de cerca de 13 a cerca de 28, por exemplo, cerca de 18 a 22, carbonos na sua cadeia carbonada.

Breve descrição dos desenhos

A FIGURA 1 é um gráfico que mostra a percentagem de IGF-I retido em MVL durante a incubação *in vitro* (velocidade de libertação) ao longo de 7 dias em plasma a 37°C. Durante o fabrico do seu concentrado a sacarose ou glicilglicina como excipiente osmótico variou no componente aquoso para controlar a carga de droga. \diamond = 80 mg/ml de IGF-I e 2,5% (p/v) de sacarose (113,5 mOsm); ∇ = 80 mg/ml de IGF-I e 1% (p/v) de glicilglicina (113,5 mOsm); + = 50 mg/ml de IGF-I e 1% (p/v) de sacarose (63,5 mOsm). As barras de erro representam o desvio padrão.

A FIGURA 2 é um gráfico que mostra a concentração de IGF-I ao longo de 8 dias em soro (ng/ml) de ratinhos macho após uma injeção subcutânea de 10 mg de MVL contendo 80 mg/ml de IGF-I e 2,5% (p/v) de sacarose (113,5 mOsm) no componente aquoso. Os dados representam a média dos dados de três ratinhos.

Descrição de concretizações preferidas

Neste invento, proporciona-se um processo pelo qual se efectua a modulação da quantidade de agente biologicamente activo encapsulado por unidade de volume de formulação de lipossomas ajustando a osmolaridade do componente aquoso encapsulado contendo a droga. Neste processo, uma redução na osmolaridade do componente aquoso no qual está dissolvido o agente activo antes do encapsulamento produz uma maior concentração de agente activo na suspensão final de MVL numa base de peso por volume, e vice-versa.

Existem pelo menos três tipos de lipossomas. A expressão "lipossomas multi-vesiculares (MVL)" conforme é usada ao

longo da especificação e reivindicações significa vesículas de lípido microscópicas, produzidas pelo Homem, compreendendo membranas de lípido envolvendo múltiplas câmaras aquosas não concêntricas. Pelo contrário, "os lipossomas multi-lamelares ou vesículas (MVL)" possuem múltiplas membranas concêntricas "casca de cebola", entre as quais existem compartimentos aquosos concêntricos do tipo concha. Os lipossomas multi-lamelares e os lipossomas multi-vesiculares possuem, de modo característico, diâmetros médios de comprimento ponderado na gama dos micrómetros, normalmente de 0,5 a 25 μm . A expressão "lipossomas unilamelares ou vesículas (UVL)" conforme aqui é usada refere-se a estruturas lipossómicas que possuem uma única câmara aquosa, normalmente com um diâmetro médio que varia de cerca de 20 a 500 nm.

Os lipossomas multi-lamelares e unilamelares podem ser produzidos por vários processos relativamente simples. A arte anterior descreve várias técnicas para produzir UVL e MVL (por exemplo as Patentes U.S. N.º 4522803 para Lenk; 4310506 para Baldeschweiler; 4235871 para Papahadjopoulos; 4224179 para Schneider; 4078052 para Papahadjopoulos; 4394372 para Taylor; 4308166 para Marchetti; 4485054 para Mezei; e 4508703 para Redziniak).

Pelo contrário, a produção de lipossomas multi-vesiculares requer vários passos de processo. Resumidamente, o processo preferido para produzir MVL é o seguinte: No primeiro passo faz-se uma emulsão de "água em óleo" dissolvendo pelo menos um lípido anfipático e pelo menos um lípido neutro num ou mais solventes orgânicos voláteis para o componente lipídico. Ao componente lipídico adiciona-se um primeiro componente aquoso imiscível contendo um agente biologicamente activo a encapsular e uma ou mais moléculas auxiliares *i.e.*, excipientes osmóticos, que proporcionam propriedades úteis e benéficas aos MVL. Emulsiona-se a mistura, e depois mistura-se com um segundo componente aquoso imiscível para formar uma segunda emulsão. Mistura-se a segunda emulsão quer mecanicamente, através de energia ultra-sónica, atomização em pulverizador, e outros do género, quer por suas combinações, para formar esférulas de solvente em suspensão no segundo componente aquoso. As esférulas de solvente contêm múltiplas gotículas aquosas com

o agente biologicamente activo a encapsular nelas dissolvido (ver Kim *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta* 728:339-348, 1983). Para uma revisão compreensiva de vários processos de preparação de ULV e MLV, referência a Szoka, *et al.*, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9:465-508, 1980.

A expressão "esférula de solvente" conforme é utilizada ao longo da especificação e reivindicações significa uma gotícula esferóide microscópica de solvente orgânico, dentro da qual estão múltiplas gotículas mais pequenas de solução aquosa. As esférulas de solvente estão em suspensão e totalmente imersas numa segunda solução aquosa.

A expressão "lípidio neutro" significa um óleo ou gordura que não possui nenhuma capacidade de formar membranas só por si e que lhe falta um grupo de "cabeça" hidrofílica.

A expressão "lípidio anfipático" significa uma molécula que possui um grupo de "cabeça" hidrofílica e grupo de "cauda" hidrofóbica e que possui capacidade de formar membranas.

A expressão "lípidio zwitteriónico" significa um lípidio anfipático com uma carga bruta de zero a pH 7,4.

A expressão "lípidio aniónico" significa um lípidio anfipático com uma carga bruta negativa a pH 7,4.

A expressão "lípidio catiónico" significa um lípidio anfipático com uma carga bruta positiva a pH 7,4.

Para produzir lipossomas multi-vesiculares, requer-se que pelo menos um lípidio anfipático e um lípidio neutro a incluir no componente lipídico. Os lípidos anfipáticos podem ser lípidos zwitteriónicos, aniónicos, ou catiónicos. Exemplos de lípidos anfipáticos zwitteriónicos são as fosfatidilcolinas, as fosfatidiletanolaminas, esfingomiélinas etc. Exemplos de lípidos anfipáticos aniónicos são fosfatidilgliceróis, fosfatidilserinas, fosfatidilinositóis, ácidos fosfatídicos, etc. Exemplos de lípidos anfipáticos catiónicos são diacil-trimetilamoniopropano e etil-fosfatidilcolina. Exemplos de lípidos neutros incluem diglicéridos, tais como dioleína,

dipalmitoleína, e diglicéridos mistos de caprilincaprina; triglicéridos, tais como trioleína, tripalmitoleína, trilinoléina, tricaprilina, e trilaurina; óleos vegetais, tais como óleo de soja; esqualeno; tocoferol; e suas combinações. Adicionalmente, podem ser utilizados colesterol ou esteróis de plantas na produção de lipossomas multi-vesiculares.

Conforme é aqui utilizada, a expressão "agente biologicamente activo" ou "agente activo" quando usado para descrever agentes presentes nas câmaras de lipossomas multi-vesiculares ou na solução aquosa usada durante a produção de lipossomas, inclui agentes que possuam actividade biológica apontada para o tratamento de um determinado estado de doença, quer na forma libertada de vesículas, quer numa forma que se torna activa após a libertação a partir da câmara da vesícula. Por exemplo, os agentes biologicamente activos incluem drogas e pró-drogas que são convertidas numa porção activa com actividade terapêutica por interacção com uma enzima. Os insecticidas, pesticidas, e agentes com aplicação cosmética desejada estão também englobados pela expressão "agente biologicamente activo".

A expressão "excipiente osmótico" significa qualquer molécula de soluto biologicamente compatível numa solução aquosa que não seja o agente biologicamente activo. Tanto os electrólitos como os não electrólitos funcionam como excipientes osmóticos. Ao determinar se qualquer determinada molécula funcionará como excipiente osmótico ou ao determinar a concentração de excipiente osmótico numa solução, por exemplo uma encapsulada dentro de um lipossoma multi-vesicular, deve ser tido em consideração se, nas condições da solução (por exemplo, pH), a molécula está totalmente ou parcialmente ionizada. Deve também ser determinado se a membrana lipídica será permeável a essas iões (Mahendra K. Jain, van Nostrand Reinhold Co., "The Bimolecular Lipid Bilayer Membrane", 1972, 470 pp.). Um perito na arte analisará que para usar no presente invento, o excipiente osmótico deve ser seleccionado de modo a evitar que os que provariam ser tóxicos ou de outro modo prejudiciais a um sujeito submetido a terapia que utilize o lipossoma. Os peritos na arte podem facilmente avaliar a solubilidade de um

dado excipiente osmótico para utilizar no presente invento sem recurso a experimentação indevida.

Determinados excipientes osmóticos possuem actividade biológica inerente, e muitos facilitam a actividade biológica do agente biologicamente activo. Por exemplo, os iões cálcio podem ser co-encapsulados como contra-ião para aumentar o período de vida de prateleira ou para facilitar a biodisponibilidade de uma droga, mas não são suficientes para conseguir a utilidade terapêutica ou outra da formulação de MVL. Em adição, podem estar presentes vários estabilizantes. Determinados agentes vulgarmente classificados como excipientes podem realmente possuir actividade biológica directa de muito ligeira a bastante significativa. Por exemplo, o vulgar excipiente manitol pode também actuar biologicamente como diurético. Mesmo a água pode actuar biologicamente para curar desidratação, mas quando esses compostos são utilizados como excipientes osmóticos em vez de agentes activos, estes são relativamente alternáveis com outros que executam a mesma função auxiliar.

Os excipientes osmóticos, que podem ser utilizados para formar lipossomas multi-vesiculares e para modular a carga de droga do agente encapsulado a partir de lipossomas multi-vesiculares incluem, mas não se limitam a glucose, sacarose, trealose, succinato, glicilglicina, ácido glucónico, ciclodextrina, arginina, galactose, manose, maltose, manitol, glicina, lisina, citrato, sorbitol, dextrano, e suas combinações adequadas. O Quadro 1 a seguir compara a osmolaridade de soluções de sacarose e glicilglicina a diferentes concentrações.

QUADRO 1

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

¹ Os dados da sacarose são do Handbook of Physics and Chemistry, 67th Edition.

² Os dados da glicilglicina são calculados com base na concentração molar.

Os entendidos na matéria podem facilmente indagar e visionar várias combinações de excipientes que podem ser utilizadas nas vesículas do invento sem recurso a experimentação indevida.

Conforme é aqui utilizada, a expressão “quantidade ou nível terapêuticamente eficaz” significa a quantidade de um agente biologicamente activo necessário para induzir um efeito farmacológico desejado. A quantidade pode variar muitíssimo de acordo com a eficácia de um determinado agente activo, da idade, peso, e resposta de um determinado hospedeiro, assim como da natureza e gravidade dos sintomas do hospedeiro. Consequentemente, não existe nenhuma limitação crítica superior ou inferior à quantidade de agente activo. A quantidade terapêuticamente eficaz a utilizar no actual invento pode facilmente ser determinada pelos peritos na especialidade.

Conforme é aqui utilizada, a expressão “carga de droga” significa, num sentido quantitativo geral, a quantidade de agente biologicamente activo colocado na suspensão de produto lipossoma. É, portanto, uma medida da quantidade de agente activo disponível numa unidade de volume de formulação de lipossomas a ser entregue ao paciente durante a utilização. Mais especificamente, “carga de droga” significa a razão entre a droga encapsulada por unidade de volume de suspensão

de lipossomas e a percentagem em volume encapsulado nos próprios lipossomas. É aproximadamente igual à concentração de agente activo na suspensão a dividir pelo lipócrito da suspensão para uma baixa percentagem de droga livre.

$$\text{Carga de droga} = \frac{\text{Droga encapsulada por unidade de volume de suspensão de lipossoma}}{\text{Percentagem de volume encapsulado em lipossomas}}$$

$$= \frac{(\text{Concentração de droga de suspensão de lipossomas})}{\text{Lipócrito}}$$

Conforme é aqui utilizada, a expressão “percentagem de encapsulamento de droga, ou de outro composto” significa a razão entre a quantidade de composto a encapsular na suspensão final do processo de produção dos lipossomas e a quantidade total de composto a encapsular utilizada na primeira solução aquosa do processo a multiplicar por 100.

$$\text{Percentagem de encapsulamento de composto} = \frac{(\text{Quantidade de composto encapsulado})}{(\text{Quantidade de composto introduzido antes do encapsulamento})} \times 100$$

Conforme aqui é utilizado, o termo “lipócrito” que é definido em analogia a “hematócrito”, significa a razão entre o volume ocupado pelos lipossomas e o volume total de suspensão a multiplicar por 100.

$$\text{Lipócrito (em percentagem)} = \frac{[\text{Volume ocupado pelos lipossomas}]}{[\text{Volume total de suspensão de lipossomas}]} \times 100$$

Conforme é aqui usada, a expressão “percentagem de droga livre” significa a razão entre a quantidade de droga no exterior dos lipossomas na suspensão final de lipossomas e a quantidade total de droga na suspensão final (o produto final) a multiplicar por 100.

$$\text{Percentagem de droga livre} = \frac{(\text{Quantidade de droga exterior aos lipossomas no produto final})}{(\text{Quantidade de droga no produto final})} \times 100$$

$$\approx (1 - \text{Lipócrito}) \times \frac{\text{Concentração de droga exterior aos lipossomas}}{\text{Concentração de droga de suspensão de lipossomas}}$$

Os processos para determinar esses parâmetros estão ilustrados no Exemplo 7 deste pedido.

Sempre que possível, a utilização de excipientes osmóticos é reduzida ao mínimo ou evitada para atingir cargas elevadas de agente biologicamente activo. Neste caso, a carga de droga depende directamente da concentração de agente activo na solução a encapsular, visto ser a osmolaridade grandemente atribuível ao agente activo. Quando não for possível utilizar uma primeira solução aquosa sem excipientes osmóticos, a osmolaridade do primeiro componente aquoso pode ser diminuída substituindo excipientes de baixo peso molecular por excipientes osmóticos de elevado peso molecular, como por exemplo tampão ou estabilizante de menor peso molecular por um possuindo um elevado peso molecular. Também, ao escolher um contra-ião negativo para uma droga, um contra-ião que possua um menor peso mecânico pode ser substituído por um de elevado peso molecular. Por exemplo, em cloridrato de morfina, o ião de cloro pode ser substituído por sulfato ou por um ião negativo com ainda maior peso molecular tal como o fosfato.

Pelo contrário, quando for desejável produzir uma formulação com baixa carga de agente biologicamente activo, como quando o agente biologicamente activo é tóxico a concentrações elevadas, a osmolaridade da primeira solução aquosa pode ser aumentada escolhendo excipientes osmóticos de baixo peso molecular para aumentar a sua osmolaridade.

O limite inferior para a osmolaridade do primeiro componente aquoso pode ser próximo de zero, como no caso em que o agente biologicamente activo é uma proteína ou outra macromolécula de elevado peso molecular e não se utilizam quaisquer excipientes osmóticos. Por outro lado, a osmolaridade do primeiro componente aquoso pode algumas vezes ser tão elevada como cerca de 1000 mOsm ou superior sem efeito prejudicial ou tóxico na utilização uma vez que muitos dos excipientes conseguem passar para fora do lipossoma durante o processo de fabrico. De modo geral, embora a osmolaridade do primeiro componente aquoso esteja no intervalo de cerca de 0,01 mOsm a cerca de 1100 mOsm, por exemplo no intervalo de cerca de 5 mOsm a cerca de 400 mOsm.

A osmolaridade do componente aquoso encapsulado no produto lipossómico final é geralmente isotónico em relação

ao meio aquoso no qual os lipossomas MVL são guardados (tal como NaCl a 0,9% em peso, ou solução salina normal) ou no qual são introduzidos os MVL para utilizar, tal como soro ou outro meio aquoso fisiologicamente relevante. No entanto, a osmolaridade do componente aquoso no produto final de MVL pode ser hipertónico para proporcionar uma óptima diminuição da velocidade de libertação do agente biologicamente activo dos lipossomas. Deste modo, no âmbito deste invento está contemplado o facto de o componente aquoso no produto de MVL final poder ser hipotónico, isotónico ou hipertónico em relação ao meio aquoso onde é guardado ou ao meio aquoso para onde o agente biologicamente activo deverá ser libertado.

A osmolaridade da solução salina normal é semelhante à do plasma humano e ao de outros meios *in vivo*, tal como o fluido cerebrospinal, líquido sinovial, e espaços subcutâneos e intramusculares. Deste modo, pode ser utilizada solução salina como modelo de previsão de libertação de droga dos MVL nesses meios. Porque a utilização preferida dos MVL do invento é a injeção ou implantação *in vivo* em tecidos ou cavidades do corpo (por exemplo, depósitos de droga), são normalmente guardados num meio tal como solução salina normal, salino com tampão de fosfato, ou outros meios osmoticamente semelhantes.

A velocidade de libertação de agentes activos dos MVL aumenta geralmente quando baixa a osmolaridade do primeiro componente aquoso usado durante o fabrico. No entanto, baixar a osmolaridade do primeiro componente aquoso pode ter um efeito negativo na libertação sustentada e na eficácia de encapsulamento. Este efeito negativo pode ser ultrapassado usando no componente lipídico um ou mais lípidos anfipáticos possuindo de cerca de 13 a cerca de 28 carbonos, por exemplo de cerca de 18 a 22 carbonos. Esta regra geral mantém-se se a cadeia carbonada do lípido anfipático estiver saturada, ou se contiver uma ou mais ligações duplas. De modo geral, no entanto, ao seleccionar os lípidos a usar na formulação de um lipossoma multi-vesicular deve ter-se presente que é possível utilizar um solvente orgânico com um ponto de ebulição inferior ao utilizar-se um lípido com um dado número de átomos de carbono na cadeia carbonada, se o lípido contiver pelo menos uma ligação dupla na cadeia carbonada. Os lípidos

anfipáticos preferidos para usar na produção de lipossomas multi-vesiculares deste invento são lípidos naturais. Os efeitos benéficos na eficácia de encapsulamento e na libertação sustentada de agente biologicamente activo a obter através da utilização desses lípidos anfipáticos de cadeia longa durante o fabrico de MVL são apresentados no Pedido de Patente U.S. co-pendente de N.º de série 08/723583, preenchido a 1 de Outubro, 1996, intitulado "*Method for Producing Liposomes With Increased Percent of Compound Encapsulated*" (Processo para produzir lipossomas com maior percentagem de composto encapsulado), que aqui se introduz na sua integralidade.

Segue-se uma lista representativa de lípidos anfipáticos de cadeia longa úteis na prática deste invento. Esta lista é ilustrativa e pretende-se que não limite de modo algum o âmbito do invento. São também incluídas as abreviaturas usadas para fazer referências a fosfolípidos neste pedido e na literatura científica.

DOPC ou DC18:1PC = 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina
DLPC ou DC12:0PC = 1,2-dilauroil-*sn*-glicero-3-fosfocolina
DMPC ou DC14:0PC = 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina
DPPC ou DC16:0PC = 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina
DSPC ou DC18:0PC = 1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina
DAPC ou DC20:0PC = 1,2-diaraquidoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina
DBPC ou DC22:0PC = 1,2-dibehenoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina
DC16:1PC = 1,2-dipalmitoleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina
DC20:1PC = 1,2-dieicosenoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina
DC22:1PC = 1,2-dierucoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina
DPPG = 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol
DOPG = 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol

Muitos tipos diferentes de solventes hidrofóbicos voláteis tais como éteres, hidrocarbonetos, hidrocarbonetos halogenados, fluidos super-críticos incluindo mas não se limitando a CO₂, NH₃, e *freons* podem ser utilizados como solvente para a fase lipídica. Por exemplo, são satisfatórios, o éter dietílico, o éter isopropílico e outros éteres, o diclorometano, o clorofórmio, o tetra-hidrofurano, éteres halogenados, ésteres e suas combinações.

Os compostos terapêuticos biologicamente activos, ou drogas, para encapsulamento nos processos e composições deste invento podem ser seleccionados a partir do grupo geral que consiste em agentes antineoplásicos, agentes anti-infecciosos, hormonas, anti-depressivos, agentes anti-inflamatórios, agentes anti-virais, agentes anti-nociceptivos, ansiolíticos e biológicos.

Exemplos representativos de agentes antineoplásicos úteis nas composições e processos do presente invento incluem metotrexato, taxol, factor de necrose tumoral, clorambucil, interleucinas, etoposido, citarabina, fluorouracilo e vimblastina.

Exemplos representativos de agentes anti-infecciosos úteis nas composições e processos do presente invento incluem amicacina, pentamidina, metronidazol, penicilina, cefalexina, tetraciclina e cloranfenicol.

Exemplos representativos de agentes anti-virais úteis na composição e processos do presente invento incluem didesoxicitidina, zidovudina, aciclovir, interferões, didesoxiinosina, e ganciclovir.

Exemplos representativos de ansiolíticos e sedativos úteis nas composições e processos do presente invento incluem benzodiazepinas tais como Diazepam, barbituratos tais como fenobarbital, e outros compostos tais como a buspirona e haloperidol.

Exemplos representativos de hormonas úteis nas composições e processos do presente invento incluem estradiol, prednisona, insulina, hormona de crescimento, eritropoietina e prostaglandinas.

Exemplos representativos de anti-depressivos úteis nas composições e processos do presente invento incluem fluoxetina, trazodona, imipramina e doxepina.

Exemplos representativos de antinociceptivos úteis nas composições e processos do presente invento incluem bupivacaína, hidromorfina, oxicodona, fentanil, morfina e

meperidina.

O termo "biológicos" engloba ácidos nucleicos (ADN e ARN), proteínas de glucosaminoglicanos e péptidos, e inclui compostos tais como citoquinas, hormonas (pituitária, adrenal, e hormonas hipofisárias), factores de crescimento, vacinas etc. Com particular interesse são interleucina-2, factor de crescimento 1 do tipo insulínico (IGF-I), interferões, insulina, heparina, leuprolida, factor estimulante de colónias de granulócitos (G-CSF), factor estimulante de colónias de macrófagos de granulócitos (GM-CSF), factor de necrose tumoral, inibina, factor alfa e beta de crescimento tumoral, substância inibidora de mülleriana, calcitonina, vacina de hepatite B, vacinas de ADN ou ARN, ADN para transferência de genes e oligonucleótidos anti-sensoriais.

O agente biologicamente activo pode ser utilizado no presente invento em várias formas, tais como complexos moleculares ou sais biologicamente aceitáveis. Exemplos representativos desses sais são sais de succinato, cloridrato, bromato, sulfato, fosfato, nitrato, citrato, glucuronato, borato, acetato, maleato, tartarato, salicilato, e metais (e.g. alcalinos ou alcalino-terrosos), amónia ou sais de amina (e.g. amónia quaternária) e outros do género. Para além disso, podem também ser utilizados como agente biologicamente activo os derivados de agentes activos como os seus ésteres, amidas e éteres que possuam características de retenção e libertação desejáveis, mas que sejam facilmente hidrolisados *in vivo* pelo pH fisiológico ou enzimas.

A concentração do agente biologicamente activo encapsulado pode variar de cerca de alguns picomoles a cerca de algumas centenas de milimoles. A concentração desejável de agente biologicamente activo variará de acordo com características como a doença a tratar, a idade e a condição do paciente, e com as propriedades do agente em particular. No caso em que o agente está normalmente associado a efeitos secundários tais como toxicidade, é geralmente desejável produzir um MVL com uma menor concentração de agente e utilizar uma maior concentração de excipiente osmótico. A inter-relação desses vários parâmetros pode ser facilmente

avaliada pelo perito na especialidade ao seleccionar e produzir uma determinada composição de MVL sem recurso a experimentação indevida.

As formulações de carga elevada obtidas pelo processo deste invento são particularmente úteis na indústria farmacêutica para reduzir a quantidade de formulação de lipossomas que deve ser administrada a um sujeito (*i.e.* intramuscularmente ou subcutaneamente) para atingir uma concentração terapêutica desejada de droga na corrente sanguínea. No entanto, o limite superior útil na quantidade de droga encapsulada num dado volume de suspensão de lipossomas pode ser ditado pelo lipócrita da suspensão. Conforme um perito na especialidade verificará, pode ser difícil injectar uma suspensão contendo lipossomas se o lipócrita da suspensão for demasiado elevado.

O intervalo de dosagem correcta de agente biologicamente activo, para utilizar *in vivo* em humanos, em lipossomas multi-vesiculares deste invento inclui o intervalo de 0,001-6000 mg/m² de área de superfície corporal. Embora possam ser administradas doses fora do intervalo de dosagem anterior, este intervalo engloba a amplitude de utilização para praticamente todos os agentes biologicamente activos. No entanto, para um determinado agente terapêutico, a concentração preferida pode ser facilmente averiguada conforme foi previamente descrito.

As formulações de MVL podem ainda ser diluídas para obter uma formulação de depósito de libertação lenta injectável, de qualquer dosagem total terapêuticamente eficaz, por adição de meio de suspensão ou de qualquer transportador fisiologicamente aceitável. Os transportadores adequados vulgares incluem soluções, suspensões e emulsões, aquosas ou não aquosas. Exemplos de soluções não aquosas são propilenoglicol, polietilenoglicol, óleos vegetais, tais como azeite, e ésteres orgânicos injectáveis tais como o oleato de etilo. Os transportadores aquosos incluem a água, soluções, emulsões ou suspensões, aquosas alcoólicas, incluindo salino e meio tamponizado. Os veículos parentéricos incluem solução de cloreto de sódio, dextrose de Ringer, dextrose, e solução de Ringer com lactose. Os veículos intravenosos incluem

repositores de fluido e nutrientes, repositores de electrólitos (tais como os à base de dextrose de Ringer), e outros do género. Os conservantes e outros aditivos podem também estar presentes, tais como, agentes anti-microbianos, antioxidantes e quelantes, e gases inertes (ver, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16th Ed., A. Oslo ed., Mack, Easton, PA. 1980).

Os lipossomas multi-vesiculares podem ser administrados por qualquer via desejada; por exemplo, pela via intratumoral, intra-articular (nas articulações), intra-ocular, intramuscular, intratecal, intraperitoneal, subcutânea, intravenosa, intra-linfática, oral e submucosa. Os lipossomas multi-vesiculares podem ser modificados usando processos bastante conhecidos na arte ligando-lhes, directa ou indirectamente, por exemplo por meio de uma molécula de excipiente ou péptido, ligandos específicos para um alvo, tais como anticorpos e outros ligandos de proteínas específicos de receptores, para conferir especificidade para o órgão ou célula alvo (Malone, et al., *Proc. Natal. Acad. Sci. USA.*, 86:6077, 1989; Gregoriadis, *Immunology Today*, 11(3):89,1990; ambos incorporados por referência).

Conduziu-se uma série de experiências para mostrar que o efeito da osmolaridade na carga de droga é inverso e depende de outros parâmetros usados durante o processo de fabrico, exceptuando a quantidade de agente activo, que é directamente proporcional à quantidade de agente activo que pode ser colocado numa formulação lipossómica. Esses dois parâmetros devem contudo ser equilibrados para obter qualquer nível de carga desejado. Por exemplo, no Exemplo 1, mostrou-se que a citarabina pode ser encapsulada em MVL usando um misturador com vórtice e um primeiro componente aquoso contendo 40 mg/ml de citarabina em ácido cítrico a 20 mM e quantidades de sacarose na gama de zero a 8,0 por cento em peso/volume (% p/v). A osmolaridade estimada correspondente da primeira composição aquosa nesta gama de formulações foi 185,9 a 446,9 mOsm. O intervalo de carga de droga correspondente (Quadro 2) foi de 61,7 a 21,0 mg/ml com uma % de rendimento do processo de encapsulamento permanecendo relativamente constante.

Fazendo variar a concentração de agente activo e a concentração de excipiente osmótico, o invento produz formulações de MVL com uma larga gama de carga de droga para qualquer agente activo dado. Por exemplo, no Exemplo 2, encapsulou-se metencefalina em MVL usando um primeiro componente aquoso contendo 40 ou 5 mg/ml de metencefalina em ácido cítrico a 20 mM, e 0,25, ou 5% (p/v) de sacarose produzindo um intervalo de osmolaridade no primeiro componente aquoso de 35,5 a 191,5 mOsm. Os resultados desses estudos (Quadros 2 e 3) mostram que a diminuição de osmolaridade no primeiro componente aquoso resultou num aumento proporcionar na carga de droga, se a quantidade de agente activo na primeira solução aquosa fosse 40 mg/ml ou 5 mg/ml. Em adição, foram obtidas formulações de MVL contendo tão pouco como 6,4 mg/ml ou tanto quanto 61,7 mg/ml de droga usando o processo do invento. Esses resultados ilustram a larga aplicabilidade do princípio subjacente ao invento reivindicado.

Realizaram-se outros estudos usando no primeiro componente aquoso concentrações de IGF-I variando de 10 a 80 mg/ml, com ou sem HCl a 100 mM ou ácido cítrico a 25 mM, a pH constante. Verificou-se que a solubilidade e a biodisponibilidade de IGF-I encapsulado vararam de acordo com o pH do primeiro componente aquoso. Os estudos mostraram que até cerca de 300 mg/ml de IGF-I é solúvel a um pH inferior a 5. Para todas as concentrações de IGF-I testadas, na gama de pH em que a droga é solúvel, a carga de droga variou em conformidade com a osmolaridade. Para concentrações de IGF-I na gama de 40 a 300 mg/ml, a solubilidade foi maior no intervalo de 2 a 4,8; ao passo que a gama de solubilidade útil para concentrações de IGF-I na gama de cerca de 1 mg/ml a cerca de 33 mg/ml foi de cerca de 1 a cerca de 5.

Adicionalmente, as formulações de IGF-I produzidas compararam os efeitos na carga de droga da substituição de um açúcar (sacarose) por um não açúcar (glicilglucose) como excipiente osmótico. Em várias formulações, o lípido anfipático de cadeia longa usado para conferir propriedades de libertação lenta às formulações foi também trocado de DEPC para DOPC, sem alteração significativa do rumo da modulação da carga de droga ajustando a osmolaridade do primeiro componente aquoso. Para ilustrar que o processo deste invento

é independente de variáveis como o tamanho do lote e o processo de mistura usado durante o processo de produção, as formulações de MVL foram produzidas em tamanhos de lote diferentes e com tipos de misturadora diferentes. A comparação dos resultados destes testes nos Quadros 6A a 6F mostrou que a relação inversa entre a osmolaridade e a carga de droga não é dependente do carácter químico de qualquer dos excipientes osmóticos no primeiro componente aquoso, e que, para concentração de droga constante, a tendência de maior carga de droga com menor osmolaridade é consistente, embora os tamanhos de lote e os processos de mistura diferentes possam originar níveis de carga um tanto diferentes.

Os exemplos que se seguem ilustram o modo como o invento pode ser praticado. Compreenda-se, no entanto, que os exemplos se destinam a ilustração, e que o invento não deve ser entendido como estando limitado a qualquer um dos materiais ou condições aqui específicas.

Exemplo 1

Preparação de Formulações de Lipossomas

Em todos os processos de produzir MVL aqui ilustrados, no primeiro passo, preparou-se uma emulsão de "água em óleo" misturando um componente lipídico com um primeiro componente aquoso. O componente lipídico continha 0,5-4 ml de DOPC ou DEPC 13,20 mM, colesterol 19,88 mM, DPPG 2,79 mM, e trioleína 2,44 mM (Avant Polar Lipids Inc., Alabaster, AL) em clorofórmio (Spectrum Chemical Manufacturing Corp., Gardena, CA) como solvente. Misturou-se um volume igual (0,5-4 ml) de uma primeira solução aquosa contendo citarabina, leuprolida, morfina, encefalina, ou IGF-I e concentrações variadas de um excipiente osmótico com o componente lipídico usando uma variedade de misturadoras para determinar o efeito da osmolaridade na carga e a percentagem de rendimento das várias combinações testadas.

Preparação de MVL contendo citarabina

Para a citarabina, o componente lipídico continha DEPC, preferentemente ao DOPC, e prepararam-se quatro primeiras

soluções aquosas diferentes, cada uma contendo 40 mg/ml de citarabina (Upjohn Co., Kalamazoo, MI) em ácido cítrico 20 mM (Sigma Chemical) e 0, 2, 5 ou 8% (p/v) de sacarose, como agente osmótico excipiente. Formou-se uma emulsão do lípido e os primeiros componentes aquosos, misturando 0,5 ml do primeiro componente aquoso com 0,5 ml do componente lipídico usando uma misturadora de vórtice Baxter® a uma velocidade máxima (nível 10) durante 6 minutos. À primeira emulsão resultante, adicionou-se respectivamente 2,5 ml de uma solução contendo 4% em peso de glucose e lisina 40 mM (Spectrum Chemicals). Efectuou-se a emulsão da mistura resultante para formar uma segunda emulsão com a misturadora de vórtice Baxter® a uma velocidade máxima (nível 10) durante 4 segundos. Transferiu-se a segunda emulsão resultante, uma emulsão dupla “água em óleo em água”, para agitação em turbilhão suave para um frasco Erlenmeyer de 250 ml contendo 10 ml de uma solução de 4 por cento em peso de glucose e lisina a 40 mM. Para evaporar o solvente orgânico (clorofórmio) das partículas, fez-se passar azoto gasoso sobre a segunda emulsão a 37°C durante 20 minutos com agitação suave. Lavaram-se, duas vezes, os lipossomas multi-vesiculares resultantes com 50 ml de salino normal por centrifugação a 600×g numa centrifugadora de bancada, e depois fez-se de novo uma suspensão em 0,5-4 ml de salino normal. A osmolaridade estimada (mOsm), percentagem de rendimento e carga de droga dessas formulações são apresentadas no Quadro 2 que se segue.

QUADRO 2

Primeira Solução Aquosa			Suspensão final de lipossomas		
Citarabina (mg/ml)	Sacarose (% p/v)	Outro	Osmolaridade Estimada (mOsm)	% de Rendimento	Carga de Droga (mg/ml)
40	8,0	Ácido Cítrico 20 mM	446,9	57,1	21,0
40	5,0	Ácido Cítrico 20 mM	341,9	62,6	30,8
40	2,0	Ácido Cítrico 20 mM	245,9	77,3	45,2
40	0,0	Ácido Cítrico 20 mM	185,9	69,6	61,7

Estes resultados mostram que a carga de droga pode ser modulada por variação da osmolaridade da primeira solução aquosa, com uma diminuição da osmolaridade a resultar num aumento da carga de droga. O aumento na carga de droga atingido com a diminuição da osmolaridade não resulta numa variação significativa na percentagem de rendimento na formulação de MVL.

Exemplo 2

Preparação de Formulações de Lipossomas Multi-vesiculares contendo Metencefalina

Preparou-se conforme se fez no Exemplo 1 um componente lipídico contendo DEPC, preferentemente ao DOPC. O primeiro componente aquoso continha 5 mg/ml de metencefalina (um pentapéptido) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) em ácido cítrico 25 mM e 0, 2,5 ou 5% (p/v) de sacarose, como excipiente osmótico. Realizaram-se os restantes passos descritos no Exemplo 1 para obter MVL contendo metencefalina em suspensão em salino normal. A osmolaridade estimada (mOsm), percentagem de rendimento, e carga de droga dessas formulações são apresentadas no Quadro 3 que se segue.

QUADRO 3

Primeira Solução Aquosa			Suspensão final de lipossomas		
Encefalina (mg/ml)	Sacarose (% p/v)	Outro	Osmolaridade Estimada (mOsm)	% de Rendimento	Carga de Droga (mg/ml)
5	5,0	Ácido Cítrico 25 mM	191,5	77,5	6,4
5	2,5	Ácido Cítrico 25 mM	111,5	71,8	13,4
5	0,0	Ácido Cítrico 25 mM	35,5	72,5	50,8

Os dados no Quadro 3 mostram, de novo, que a carga de metencefalina é modulada pela variação da osmolaridade da primeira solução aquosa, com a diminuição da osmolaridade a resultar em maior carga de droga. Assim, o efeito é independente da droga carregada. A percentagem de rendimento não é alterada significativamente por uma diminuição na osmolaridade. Verificou-se também o efeito na carga de droga

obtida pela variação da osmolaridade do primeiro componente aquoso quando o DEPC é substituído por DOPC no componente lipídico durante o fabrico.

Exemplo 3

Preparação de Formulações de Lipossomas Multi-vesiculares contendo Leuprolida

Preparou-se um componente lipídico contendo DOPC, preferentemente ao DEPC, como no Exemplo 1, exceptuando o facto de que continha leuprolida e uma concentração molar três vezes maior de todos os quatro lípidos no componente lipídico. O primeiro componente aquoso continha 15 mg/ml de acetato de leuprolida (Bachem Bioscience Inc., King of Prussia, PA) em ácido fosfórico 100 mM e 4,0 ou 6,0% (p/v) de sacarose, como excipiente osmótico. Seguiram-se os procedimentos do Exemplo 1 para obter MVL contendo leuprolida, exceptuando o facto de se ter misturado 4 ml de primeiro componente aquoso com 4 ml do componente lipídico usando o homogeneizador TK Autohomogenizer K a uma velocidade de 9000 rpm durante 8 minutos para obter a primeira emulsão. À primeira emulsão, adicionou-se, respectivamente, 16 ml de uma solução contendo 4% em peso de glucose e lisina 40 mM (Spectrum Chemicals). Efectuou-se a emulsão da mistura resultante para formar uma segunda emulsão com o TK Autohomogeneizer K a uma velocidade de 4000 rpm durante 1 minuto. A osmolaridade estimada (mOsm), percentagem de rendimento, e carga de droga dessas formulações são apresentadas no Quadro 4 que se segue.

QUADRO 4

Primeira Solução Aquosa			Suspensão final de lipossomas		
Encefalina (mg/ml)	Sacarose (% p/v)	Outro	Osmolaridade Estimada (mOsm)	% de Rendimento	Carga de Droga (mg/ml)
15	6,0	Ácido Fosfórico 100 mM	328,6	56,2	10,9
15	4,0	Ácido Fosfórico 100 mM	216,6	54,1	17,9

Como nos Exemplos 1 e 2 anteriores, a carga de leuprolida, um péptido de 9 aminoácidos, é modulada fazendo variar a osmolaridade da primeira solução aquosa, com uma diminuição de osmolaridade a resultar em maior carga de droga. Manteve-se uma percentagem de rendimento semelhante através da gama de osmolaridade testada. Este resultado mostra também ser independente do tipo de misturadora utilizado para criar a primeira e a segunda emulsão no fabrico dos MVL.

Exemplo 4

Preparação de Formulações de Lipossomas Multi-vesiculares contendo Morfina

Preparou-se como no Exemplo 1 um componente lipídico contendo DEPC, preferentemente ao DOPC. O primeiro componente aquoso continha 17 mg/ml de sulfato de morfina (Mallinckrodt Chemical Inc., St. Louis, MO) em ácido clorídrico 10 mM e 0,2; 2,5 ou 5,0% (p/v) de sacarose, como excipiente osmótico. Realizaram-se os restantes passos descritos no Exemplo 1 para obter MVL contendo sulfato de morfina em suspensão em salino normal. A osmolaridade estimada (mOsm), percentagem de rendimento, e carga de droga dessas formulações são apresentadas no Quadro 5 que se segue.

QUADRO 5

Primeira Solução Aquosa			Suspensão final de lipossomas		
Sulfato de Morfina (mg/ml)	Sacarose (% p/v)	Outro	Osmolaridade Estimada (mOsm)	% de Rendimento	Carga de Droga (mg/ml)
17	4,8	HCl 10 mM	258,7	39,2	13,3
17	1,8	HCl 10 mM	162,7	58,5	23,1
17	0,2	HCl 10 mM	114,7	48,1	29,0

Mais uma vez, se fez a modulação da carga de morfina, uma droga lipossolúvel, fazendo variar a osmolaridade da primeira solução aquosa, onde uma diminuição na osmolaridade resulta numa maior carga de droga. A percentagem de rendimento da formulação de MVL foi substancialmente equivalente ao longo

do intervalo de osmolaridade testado.

Exemplo 5

Preparação de Formulações de Lipossomas Multi-vesiculares contendo IGF-I

1. Preparação de MVL à escala de 0,5 ml

Preparou-se como no Exemplo 1 um componente lipídico contendo DEPC, preferentemente ao DOPC. O primeiro componente aquoso continha 50 mg/ml de IGF-I e 0,25; 0,5; 1,0; 2,5; ou 5,0% (p/v) de sacarose, como excipiente osmótico. Realizaram-se os restantes passos descritos no Exemplo 1 para obter MVL contendo IGF-I em suspensão em salino normal. A osmolaridade estimada (mOsm), percentagem de rendimento, e carga de droga dessas formulações são apresentadas no Quadro 6A que se segue.

QUADRO 6A

Primeira Solução Aquosa			Suspensão final de lipossomas		
IGF-I (mg/ml)	Sacarose (% p/v)	Outro	Osmolaridade Estimada (mOsm)	% de Rendimento	Carga de Droga (mg/ml)
20	5,0	HCl 100 mM	347,0	51,6	37,7
20	2,5	HCl 100 mM	267,0	47,5	46,1
50	2,5	HCl 100 mM	271,0	44,6	45,7
50	0,0	HCl 100 mM	195,0	53,4	73,2

Embora a carga de IGF-I fosse consistente com os resultados obtidos quando se utilizou ácido cítrico como tampão, o IGF-I apresentou a mesma degradação nos estudos conduzidos para caracterizar a proteína encapsulada.

2. Preparação de MVL à escala de 4 ml

Preparou-se como no Exemplo 1 um componente lipídico contendo DOPC, preferentemente ao DEPC. Um primeiro conjunto de formulações utilizou um primeiro componente aquoso continha 20 mg/ml de IGF-I (Chiron Corp., Emeryville, CA) em

ácido clorídrico 100 mM, e 2,5; ou 5,0 %(p/v) de sacarose, como excipiente osmótico. Um segundo conjunto usou 50 mg/ml de IGF-I em ácido clorídrico 100 mM, e 0 ou 2,5 %(p/v) de sacarose, como excipiente osmótico. Seguiram-se os procedimentos do Exemplo 1 para obter MVL contendo IGF-I, exceptuando o facto de se misturar 4 ml de primeiro componente aquoso com 4 ml do componente lipídico usando um TK Autohomogenizer K a uma velocidade de 9000 rpm durante 8 minutos para obter a primeira emulsão. À primeira emulsão, adicionou-se, respectivamente, 16 ml de uma solução contendo 4% em peso de glucose e lisina 40 mM (Spectrum Chemicals). Efectuou-se a emulsão da mistura resultante para formar uma segunda emulsão com o TK Autohomogeneizer K a uma velocidade de 4000 rpm durante 1 minuto. A osmolaridade estimada (mOsm), percentagem de rendimento, e carga de droga dessas formulações usando uma misturadora de vórtice e DEPC, um lípido possuindo uma cadeia de 22 carbonos, são apresentados no Quadro 6B que se segue.

QUADRO 6B

Primeira Solução Aquosa			Suspensão final de lipossomas		
IGF-I (mg/ml)	Sacarose (% p/v)	Outro	Osmolaridade Estimada (mOsm)	% de Rendimento	Carga de Droga (mg/ml)
50	5,0	0,0	162,7	57,0	49,8
50	2,5	0,0	82,7	62,4	76,8
50	1,0	0,0	36,7	54,9	97,4
50	0,5	0,0	21,7	66,0	157,1
50	0,25	0,0	14,2	67,0	159,4
	0		6,7	N/A	

O Quadro 6B mostra que a carga obtida com o procedimento com a misturadora TK foi semelhante às que foram obtidas quando se utilizou uma misturadora de vórtice para produzir as emulsões. No entanto, os estudos conduzidos para caracterizar a proteína encapsulada apresentaram uma presença mais elevada de oligómeros de IGF-I na ausência de um tampão ácido.

3. Preparação de uma formulação de MVL à escala de 3 ml

Preparou-se como no Exemplo 1 um componente lipídico contendo DEPC, preferentemente ao DOPC. O primeiro componente

aquoso continha uma das três formulações: (1) 30 mg/ml de IGF-I em ácido cítrico 25 mM, e 0 ou 2,5% (p/v) de sacarose como excipiente osmótico, (2) ou 50 mg/ml de IGF-I em ácido cítrico a 25 mM e 2,5; 1,0; 0,5 ou 0% (p/v) de sacarose, (3) ou 50 mg/ml de IGF-I sem ácido cítrico, e 0 ou 0,5% (p/v) de sacarose. Seguiram-se os procedimentos do Exemplo 1 para obter os MVL contendo IGF-I, exceptuando o facto de se ter misturado 3 ml do primeiro componente aquoso com 3 ml do componente lipídico usando um Omni Mixer ES a uma velocidade de 10000 rpm durante 12 minutos para obter a primeira emulsão. À primeira emulsão, adicionou-se 20 ml de uma solução contendo 4% em peso de glucose e lisina 40 mM (Spectrum Chemicals), respectivamente. Efectuou-se a emulsão da mistura resultante para formar uma segunda emulsão com o Omni Mixer ES a uma velocidade de 4500 rpm durante 2 minutos. A osmolaridade estimada (mOsm), percentagem de rendimento, e carga de droga dessas formulações são apresentadas no Quadro 6C que se segue.

QUADRO 6C

Primeira Solução Aquosa			Suspensão final de lipossomas		
IGF-I (mg/ml)	Sacarose (% p/v)	Outro	Osmolaridade Estimada (mOsm)	% de Rendimento	Carga de Droga (mg/ml)
30	2,5	Ácido Cítrico 25 mM	106,8	69,2	54,8
30	0,0	Ácido Cítrico 25 mM	30,8	57,2	132,2
50	0,5	0,0	21,7	80,0	171,4
50	0,0	0,0	6,7	72,7	267,5
50	2,5	Ácido Cítrico 25 mM	109,5	60,3	82,5
50	1,0	Ácido Cítrico 25 mM	63,5	72,3	138,2
50	0,5	Ácido Cítrico 25 mM	48,5	71,5	174,2
50	0,0	Ácido Cítrico 25 mM	33,5	65,8	175,7

Os resultados no Quadro 6C mostram uma modulação semelhante de carga de droga por osmolaridade para qualquer das concentrações de droga testadas.

Exemplo 6*Preparação de IGF-I encapsulado à escala de 125 ml*

Preparou-se como para outras formulações de droga, um componente lipídico padrão contendo DEPC, preferentemente ao DOPC. O primeiro componente aquoso continha 15 mg/ml de IGF-I dissolvido numa solução de 5% de sacarose/citrato de amónio 20 mM, ou numa solução de 8% de sacarose/citrato de amónio 20 mM. Misturou-se 125 ml da primeira solução aquosa com 125 ml do componente lipídico usando um sistema de vasos de mistura duplos de elevado cisalhamento para obter a primeira emulsão. Este sistema de mistura modela o processo de escala de produção, e é usado para ampliar as formulações de droga encapsulada. Misturaram-se o componente aquoso e o orgânico, a uma velocidade de 8000 rpm durante 30 minutos no vaso da primeira emulsão. Depois, bombeou-se a primeira emulsão a uma velocidade de 167 ml/min para uma corrente de fluido que consistia de hidróxido de amónio 0,04 N em solução de glicina a 1,5% a fluir a 2400 ml/min, e misturou-se usando uma misturadora estática, em linha, para obter a segunda emulsão. O caudal total através da misturadora estática foi 2567 ml/min. A este caudal, esgotou-se a primeira emulsão em 90 segundos. Misturou-se a segunda emulsão com solução de lisina à entrada do vaso receptor e depois aspergiu-se imediatamente com azoto para o desprover de solvente orgânico. A osmolaridade estimada (mOsm), percentagem de rendimento, e carga de droga e % de droga livre para essas formulações são apresentadas no Quadro 7 que se segue.

QUADRO 7

Primeira Solução Aquosa				Suspensão final de lipossomas				
IGF-I (mg/mL)	Sacarose (% p/v)	Outro	Osmolaridade Estimada	% Rendimento	Suspensão (mg/ml)	% Lipócrito	Carga de Droga (mg/ml)	% de IGF-I livre
15	8,0	Citrato de amónio 20 mM	~321 mOsm	42	5,1	41,8	12,2	0,18
15	5,0	Citrato de amónio 20 mM	~216 mOsm	56	5,8	36,7	15,8	0,24

Os resultados no Quadro 7 anterior mostram um aumento semelhante na carga de droga pela menor concentração de sacarose como para as outras formulações de droga testadas.

Exemplo 7

Efeito da substituição de glicilglicina como excipiente osmótico

Preparou-se como no Exemplo 1, um componente lipídico contendo DEPC, preferentemente ao DOPC. O primeiro componente aquoso continha 10 mg/ml de IGF-I em ácido cítrico 25 mM, e 0, 1,0 ou 2,0% (p/v) de glicilglicina como excipiente osmótico. Efectuaram-se os restantes passos descritos no Exemplo 1 para obter MVL contendo IGF-I em suspensão em solução salina normal. A osmolaridade estimada (mOsm), percentagem de rendimento, e carga de droga dessas formulações são apresentadas no Quadro 6D que se segue.

QUADRO 6D

Primeira Solução Aquosa			Suspensão final de lipossomas		
IGF-I (mg/ml)	Glicilglicina (% p/v)	Outro	Osmolaridade Estimada (mOsm)	% de Rendimento	Carga de Droga (mg/ml)
10	2,0	Ácido Cítrico 25 mM	180,1	64,0	10,4
10	1,0	Ácido Cítrico 25 mM	104,1	53,0	13,0
10	0,0	Ácido Cítrico 25 mM	28,1	41,7	24,4

É apresentada uma modulação osmótica da carga de droga semelhante para formulações usando um espaçador osmótico não açúcar, a glicilglicina, em vez de sacarose. Deste modo, os dados do Quadro 6D mostram que o efeito da osmolaridade sobre a carga de droga é independente da estrutura química do excipiente osmótico usado.

Comparação de excipientes osmóticos diferentes à mesma força osmótica

Produziram-se MVL no processo do Exemplo 1 contendo IGF-I encapsulado com 2,5% p/v de sacarose ou com 1,0% p/v de

glicilglicina como excipientes osmóticos a uma força osmótica aproximadamente igual. Para comparação, introduziu-se 2,5% p/v de sacarose ou 1,0% p/v de glicilglicina como excipiente osmótico no primeiro componente aquoso contendo 80 mg/ml de IGF-I e ácido cítrico 25 mM.

Seguiram-se os procedimentos do Exemplo 1 para obter o MVL contendo IGF-I, exceptuando o facto de se ter misturado 3 ml do primeiro componente aquoso com 3 ml do componente lipídico usando um Omni Mixer ES a uma velocidade de 10000 rpm durante 12 minutos para obter a primeira emulsão. À primeira emulsão, adicionaram-se, respectivamente, 20 ml de uma solução contendo 4% em peso de glucose e lisina 40 mM (Spectrum Chemicals). Efectuou-se a emulsão da mistura resultante para formar uma segunda emulsão com o Omni Mixer ES a uma velocidade de 4500 rpm durante 2 min.

Para determinar se o efeito sobre a carga de droga é atribuível somente à osmolaridade do primeiro componente aquoso, efectuou-se uma terceira formulação conforme se descreveu anteriormente, exceptuando o facto de se ter diminuído proporcionalmente as concentrações do excipiente osmótico e do IGF-I (de 80 mg/ml de IGF-I e 2,5% de sacarose para 50 mg/ml de IGF-I e 1,0% de sacarose). Nesta formulação, o segundo componente aquoso substituiu 1,5% de glicina e lisina 40 mM em vez de 4% de glucose e lisina 40mM usada no Exemplo 1. O Quadro 6E a seguir compara a osmolaridade estimada, percentagem de rendimento e carga de droga na suspensão final de lipossomas para essas três formulações.

Uma comparação da osmolaridade estimada (mOsm), percentagem de rendimento e carga de droga dessas formulações encontra-se no Quadro 6E a seguir.

QUADRO 6E

Primeira Solução Aquosa				Suspensão final de lipossomas	
IGF-I (mg/ml)	Espaçador osmótico (% p/v)	Outro	Osmolaridade Estimada (mOsm)	% de Rendimento	Carga de Droga (mg/ml)
80 (A)	Sacarose a 2,5%	Ácido Cítrico 25 mM	113,5	85,9	145,1
80 (B)	Glicilglicina a 1%	Ácido Cítrico 25 mM	113,5	77,4	156,4
50 (C)	Sacarose a 1%	Ácido Cítrico 25 mM	63,5	75,7	142,5

Os dados no Quadro 6E mostram que a osmolaridade do excipiente osmótico é a variável eficaz do resultado pois dois espaçadores osmóticos diferentes, a uma força osmótica aproximadamente igual, mas a concentrações molares não iguais, produzem um efeito comparável sobre a carga de droga.

Exemplo 8

Determinação da percentagem de encapsulamento (ou percentagem de rendimento), lipócrito, percentagem de droga livre, distribuição de tamanhos de partículas e carga de droga

Os Quadros 2 a 6A-E mostram a osmolaridade estimada (mOsm), percentagem de rendimento, e carga de droga (mg/ml) para as formulações lipossômicas descritas nos Exemplos 1-6 anteriores. Esses parâmetros foram obtidos do seguinte modo:

A percentagem de encapsulamento de droga (ou percentagem de rendimento) foi calculada como razão percentual entre a quantidade de droga na suspensão final de lipossomas e a quantidade total de droga usada na primeira solução aquosa. Assim, a percentagem de rendimento de droga foi calculada como a razão entre a concentração de droga na suspensão final a multiplicar pelo volume de suspensão final e a concentração de droga na primeira solução aquosa a multiplicar pelo volume da primeira solução aquosa. O lipócrito foi calculado, por analogia com hematócrito, como a razão percentual entre o volume de pelota e o volume de suspensão (ver em seguida as condições para obter o volume de pelota).

A percentagem de droga livre foi calculada como razão percentual entre a quantidade de droga no sobrenadante e a quantidade de droga na suspensão final. A percentagem de droga livre pode também ser calculada como razão percentual entre a concentração de droga no sobrenadante e na suspensão, a multiplicar por (1-lipócrito). A carga de droga, que mede a quantidade de droga encapsulada em cada unidade de volume encapsulado, é aproximadamente igual a, e pode ser estimada (assumindo uma baixa percentagem de droga livre) como a razão entre a concentração de droga de suspensão final de lipossomas e o lipócrito. Essas variáveis foram determinadas como se descreve a seguir, com mais pormenor.

Para calcular o lipócrito, tomou-se cerca de 50 μ l de suspensão de lipossomas multi-vesiculares num tubo capilar, e fechou-se a extremidade do tubo enquanto se assegurava que a suspensão não continha quaisquer bolhas de ar. Fez-se girar a suspensão numa centrífugadora a 600 \times g durante 10 minutos para obter uma camada de pelota e uma camada sobrenadante. A razão percentual entre o comprimento do tubo ocupado pela pelota e o ocupado pela suspensão origina o lipócrito.

Para utilizar na determinação da quantidade de droga livre numa formulação, obteve-se o sobrenadante por centrifugação de cerca de 0,2 ml de suspensão durante 3 minutos a 600 \times g num tubo de centrifugação Eppendorf®. Para as formulações de citarabina e de morfina, retirou-se 25-50 μ l de sobrenadante e pipetou-se para um tubo de vidro contendo 1 ml de álcool isopropílico:ácido clorídrico 1N (Fisher Chemical, Fair Lawn, NJ) a 3:1 em v/v e misturou-se rigorosamente para obter uma solução límpida. Mediu-se a absorvância a 280 nm para a citarabina, ou a 285 nm para a morfina num espectrofotómetro (Hitachi® U-2000). Para as formulações de leuprolida, retirou-se 50 μ l do sobrenadante e pipetou-se para um tubo de vidro contendo 2 ml de álcool isopropílico:água a 1:1 titulou-se até pH 10, usando hidróxido de amónio 0,1 N, seguido de mistura rigorosa para obter uma solução límpida. Mediu-se então a absorvância a 280 nm num espectrofotómetro (Hitachi® U-2000). Para a encefalina e o IGF-I, retirou-se 25-50 μ l do sobrenadante e pipetou-se para um tubo de vidro contendo 1 ml de álcool isopropílico:ácido cítrico 2N (Sigma Chemical) a 3:1 em v/v,

seguido de mistura rigorosa para obter uma solução límpida. Mediu-se a absorvância a 275 nm para a encefalina e a IGF-I num espectrofotómetro (Hitachi® U-2000). Utilizando um padrão de absorvância de referência estabelecido com base em soluções de droga de concentração conhecida na mesma solução dissolvente, calcularam-se as concentrações de droga na suspensão e no sobrenadante.

A distribuição de tamanhos de partícula e o diâmetro médio da partícula foram determinados pelo processo de difracção de radiação laser usando um Analisador de Tamanho de partícula LA-500 ou LA-910 da Horiba Inc. (Irvine, CA). O diâmetro de partícula médio ponderado em volume para todas as formulações estudadas foi geralmente na gama de cerca de 6 a 18 µm.

Exemplo 9

Libertação in vitro e in vivo de formulações de IGF-I com carga de droga elevada, percentagem de rendimento elevada

Confirmou-se a integridade físico-química do IGF-I encapsulado através de um teste SDS-PAGE usando gel Novex® NuPage e por um teste de RP-HPLC usando uma coluna simétrica C18. Extractou-se a proteína encapsulada usando IPA:Ácido cítrico 2N a 75:25. Confirmou-se a bioactividade do IGF-I encapsulado através de um bioensaio mitogénico usando a linhagem celular MG-63 de osteossarcoma humano e o corante brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) segundo o processo de W. Lopaczynski et al., *Regulatory Peptides*, 48:207-216, 1993. As células MG-63 foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC# CRL 1427), e determinou-se a resposta mitogénica dependente da dose de células MG-63 quiescentes à adição de IGF-I. Confirmou-se ser a bioactividade de IGF-I extractado aproximadamente equivalente à de um padrão não encapsulado.

Experimentação in vitro:

Resumidamente, iniciou-se e conduziu-se uma experiência de libertação *in vitro* do seguinte modo: diluiu-se 20 vezes uma suspensão de MVL contendo cerca de 50 mg/ml de IGF-I em

plasma humano contendo 0,01% de NaN_3 ; usou-se uma amostra de 0,5 ml num tubo Eppendorf® de tampa de rosca para cada ponto temporal, e incubaram-se as amostras em condições dinâmicas/rotativas a 37°C. Tiraram-se amostras de pontos temporais em vários instantes e lavaram-se com 0,9 ml de solução salina normal. Obtiveram-se então as pelotas de partículas por centrifugação numa micro-centrifugadora a 16000 g durante 4 minutos e guardaram-se a -20°C até à análise por RP-HPLC usando uma coluna simétrica C18. A Figura 1 mostra alguns dados de libertação *in vitro* em plasma obtidos para as três formulações de IGF-I representativas listadas no Quadro 6E. Esses dados indicam que se atinge uma libertação sustentada de IGF-I durante um período de vários dias para formulações de IGF-I com carga de droga elevada, rendimento elevado.

Experimentação *in vivo*:

Injectaram-se, subcutaneamente, ratinhos machos, com as três formulações de MVL apresentadas no Quadro 6E para obter informação à cerca das características de libertação *in vivo*. Cada ratinho recebeu uma dose de 10 mg de IGF-I, e cada uma das formulações testadas foi injectada em três ratinhos. Colheram-se amostras de sangue (0,2 ml) nos instantes zero, e 1, 3, 5 e 7 dias após a injeção na veia da cauda dos ratinhos e deixaram-se coagular. Obteve-se então o soro por centrifugação, e guardou-se a -70°C antes do teste quanto à concentração de IGF-I usando um kit de ELISA para IGF-I, DSL-10-5600 (Diagnostic Systems Laboratories Inc., Webster, TX) segundo as instruções do fabricante.

A Figura 2 mostra a concentração de IGF-I no soro média, ao longo do tempo, dos três ratinhos que receberam os 10 mg de IGF-I da formulação A no Quadro 6E. Esses dados indicam que se consegue atingir um nível sustentado de IGF-I no soro durante um período de muitos dias usando as formulações de IGF-I com carga de droga elevada, rendimento elevado, deste invento.

Lisboa,

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para controlar a carga de um agente biologicamente activo num lipossoma, que compreende:

- (a) a modulação da carga de um agente biologicamente activo num lipossoma, ajustando a osmolaridade de uma solução aquosa onde o agente esteja dissolvido, na qual se aumenta a osmolaridade da solução aquosa para diminuir a carga de agente, ou se diminui a osmolaridade para aumentar a carga de agente; e depois
- (b) o encapsulamento da solução aquosa no lipossoma.

2. Processo para produzir um lipossoma multi-vesicular possuindo múltiplas câmaras não concêntricas com membranas distribuídas na forma de uma rede totalmente contínua e com carga controlada de um biologicamente activo, em que o processo compreende os passos de:

- (a) formação de uma emulsão de água em óleo a partir de dois componentes imiscíveis, sendo os dois componentes imiscíveis (i) um componente lipídico compreendendo pelo menos um solvente orgânico, pelo menos um lípido anfipático, e um lípido neutro sem o grupo de cabeça hidrofílica, e (ii) um primeiro componente aquoso compreendendo pelo menos um agente biologicamente activo e possuindo uma osmolaridade seleccionada para modular a carga de agente biologicamente activo nos lipossomas multi-vesiculares;
- (b) dispersão da emulsão de água em óleo contendo o agente biologicamente activo num segundo componente aquoso para formar esférulas de solvente; e depois
- (c) remoção do solvente orgânico das esférulas de solvente para formar os lipossomas multi-vesiculares em suspensão no segundo componente aquoso; onde a diminuição da osmolaridade do primeiro componente aquoso resulta no aumento da carga de droga.

3. Processo de acordo com as reivindicações 1 ou 2, onde a solução aquosa compreende ainda um excipiente osmótico numa concentração seleccionada para modular a osmolaridade.

4. Processo de acordo com a reivindicação 3, onde o excipiente osmótico é a sacarose ou é seleccionado do grupo que consiste em glucose, glicina e glicilglicina.

5. Processo de acordo com as reivindicações 1 ou 2, onde a osmolaridade está no intervalo de cerca de 0,01 mOsm a cerca de 1100 mOsm.

6. Processo de acordo com as reivindicações 1 ou 2, onde a osmolaridade está no intervalo de cerca de 5 mOsm a cerca de 400 mOsm.

7. Processo de acordo com as reivindicações 1 ou 2, onde o agente biologicamente activo é citarabina.

8. Processo de acordo com a reivindicação 7, onde a osmolaridade da solução aquosa está no intervalo de cerca de 185 mOsm a cerca de 450 mOsm.

9. Processo de acordo com as reivindicações 1 ou 2, onde o agente biologicamente activo é morfina.

10. Processo de acordo com a reivindicação 9, onde a osmolaridade da solução aquosa está no intervalo de cerca de 114 mOsm a cerca de 260 mOsm.

11. Processo de acordo com a reivindicação 1, onde o agente biologicamente activo é encefalina.

12. Processo de acordo com a reivindicação 11, onde a osmolaridade da solução aquosa está no intervalo de cerca de 35,4 mOsm a cerca de 191,5 mOsm.

13. Processo de acordo com as reivindicações 1 ou 2, onde o agente biologicamente activo é leuprolida.

14. Processo de acordo com a reivindicação 13, onde a osmolaridade da solução aquosa está no intervalo de cerca de

261,6 mOsm a cerca de 328,6 mOsm.

15. Processo de acordo com as reivindicações 1 ou 2, onde o agente biologicamente activo é um seleccionado do grupo que consiste num agente anestésico, um agente antiasmático, um glicósido cardíaco, um anti-hipertensivo, um ácido nucleico, um antibiótico, uma vacina, um anti-inflamatório, um antiarrítmico, um antiangina, uma hormona, um anti-diabético, um antineoplásico, um imunomodulador, um antifúngico, um tranquilizante, um esteróide, um sedativo, um analgésico, um vasopressor, um antivírico, um herbicida, um pesticida, uma proteína, um péptido, um neurotransmissor, um radionuclido, e suas combinações adequadas.

16. Processo de acordo com a reivindicação 3, onde o excipiente osmótico é seleccionado

- (a) para diminuir a osmolaridade do primeiro componente aquoso, aumentando assim a carga de agente biologicamente activo; ou
- (b) para aumentar a osmolaridade do primeiro componente aquoso, diminuindo assim a carga de agente biologicamente activo.

17. Processo de acordo com a reivindicação 2, onde o componente lipídico contém pelo menos um lípido anfipático possuindo de cerca de 13 a cerca de 28 carbonos na sua cadeia carbonada.

18. Processo de acordo com a reivindicação 2, onde o componente lipídico contém pelo menos um lípido anfipático possuindo de cerca de 18 a cerca de 22 carbonos na sua cadeia carbonada.

19. Processo de acordo com a reivindicação 2, onde o lípido anfipático compreende pelo menos um lípido anfipático zwitteriónico, um lípido anfipático catiónico, ou um lípido anfipático aniónico.

20. Processo de acordo com a reivindicação 2, onde o agente biologicamente activo é encefalina.

21. Processo de acordo com a reivindicação 20, onde a osmolaridade do primeiro componente aquoso está no intervalo de cerca de 35,4 mOsm a cerca de 191,5 mOsm, e a carga de encefalina correspondente está no intervalo de 6,4 mg/ml a cerca de 50,8 mg/ml de formulação.

22. Processo de acordo com a reivindicação 2, onde o segundo componente aquoso compreende um excipiente osmótico seleccionado do grupo que consiste em glicilglicina, glucose, sacarose, trealose, succinato, ciclodextrina, arginina, galactose, manose, maltose, manitol, glicina, lisina, ácido glucurónico, citrato, sorbitol, dextrano, cloreto de sódio, e suas combinações.

23. Processo de acordo com a reivindicação 2, onde a osmolaridade do primeiro componente aquoso é seleccionada para modular a libertação a partir do lipossoma multivesicular para um meio envolvente aquoso fisiologicamente relevante.

24. Processo de acordo com a reivindicação 2, onde o lípido neutro é seleccionado do grupo que consiste em trioleína, tripalmitoleína, tricaprina, trilinoleína, trilourina, tricaprilina, esqualeno, e suas combinações.

25. Processo de acordo com a reivindicação 2, onde o solvente orgânico é seleccionado do grupo que consiste em éteres, hidrocarbonetos, hidrocarbonetos halogenados, éteres halogenados, ésteres, CO₂, NH₃, fréons e suas combinações.

Lisboa,

Características de liberação in vitro de IGF-I encapsulado em lipossomas multi-vesiculares no plasma. Estas três formulações correspondem às apresentadas no Quadro 6E: (A) diamante aberto; (B) triângulo aberto e (C) cruz, com as barras de erro a representar o desvio padrão SD. Os dados indicam uma liberação sustentada de IGF-I.

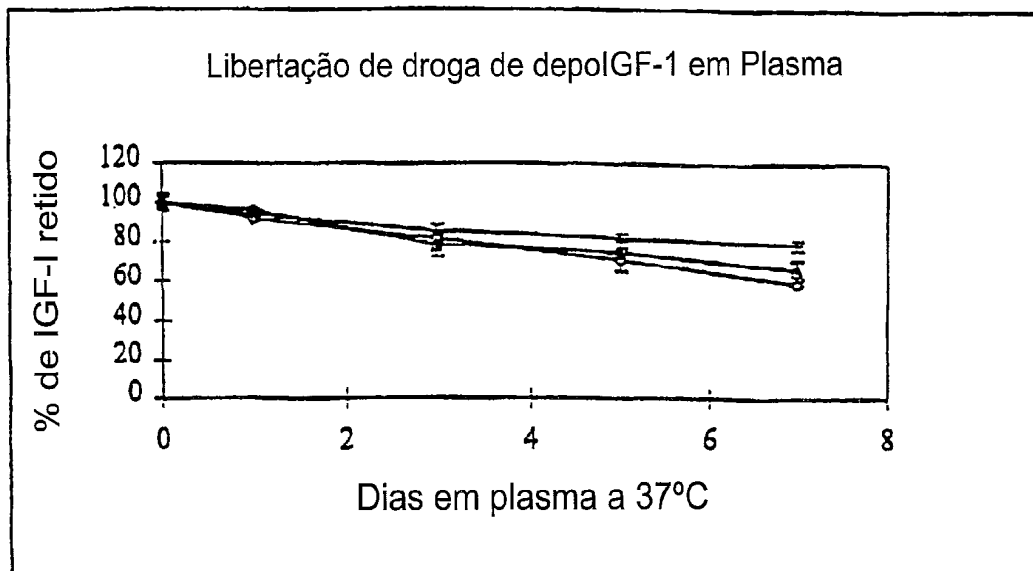


FIGURA 1

Farmacocinética in vivo de IGF-I encapsulado em lipossomas multi-vesiculares (formulação A no Quadro 6E) após uma injeção subcutânea de uma dose de 10 mg em ratinhos macho. Os dados (média de três ratinhos) demonstram uma liberação sustentada de IGF-I durante um período de uma semana.

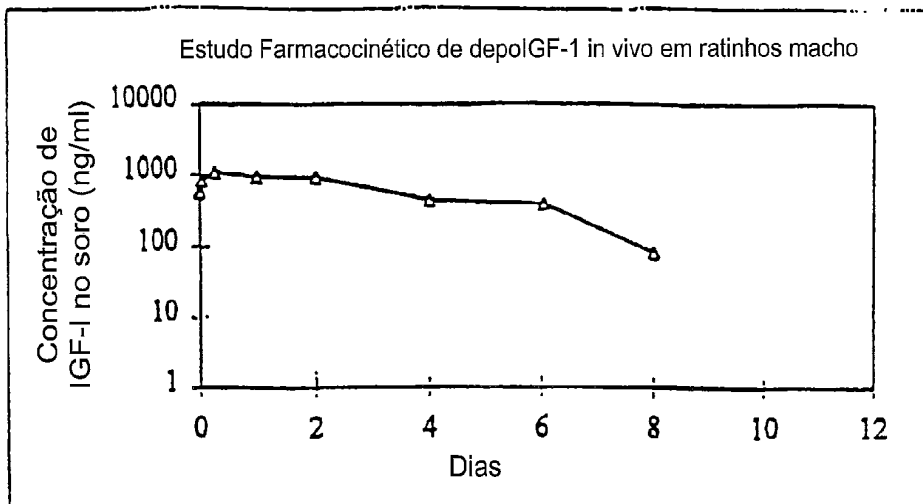


FIGURA 2