INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) *Número de Publicação:* **PT 707472 E**

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)
A61K009/127 A

(12) ***FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO***

(22) *Data de depósito:* 1994.07.08

(30) *Prioridade:* 1993.07.08 US 88742

(43) *Data de publicação do pedido:*
1996.04.24

(45) *Data e BPI da concessão:*
2001.03.14

(73) *Titular(es):*
THE LIPOSOME COMPANY, INC.
ONE RESEARCH WAY, PRINCETON FORRESTAL CENTER
PRINCETON NEW JERSEY 08540 US

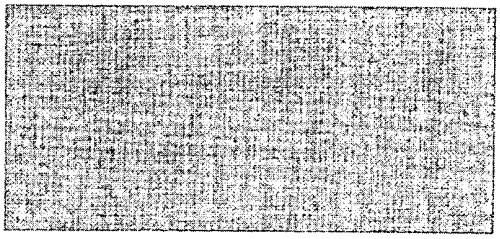
(72) *Inventor(es):*
LAURA M. EDGERLY-PFLUG US

(74) *Mandatário(s):*
ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
RUA DAS FLORES 74 4/AND. 1294 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* PROCESSO PARA CONTROLAR A DIMENSÃO DE LIPOSSOMAS

(57) *Resumo:*

PROCESSO PARA CONTROLAR A DIMENSÃO DE LIPOSSOMAS



707472

DESCRIÇÃO

"Processo para controlar a dimensão de lipossomas"

O presente invento destina-se genericamente a um processo de produção de lipossomas e, em particular, a um processo no qual a dimensão de partícula da população de lipossomas é controlado pela quantidade de solvente orgânico.

São bem conhecidos os processos de formação de vesículas de lipossoma para a associação de um agente bioactivo. Tal como aqui utilizado, o termo "associação" significa agente bioactivo que está encapsulado dentro do lipossoma e agente bioactivo que, enquanto não encapsulado, permanece com o lipossoma e dele não é facilmente separado.

Alguns processos de formação de lipossomas empregam um solvente orgânico para dissolver um lípido isolado, ou o lípido e um agente bioactivo, tal como uma droga. Por exemplo, em Bally *et al.*, patente U.S. Nº 5,077,056, os lípidos são dissolvidos num solvente orgânico e combinados com um meio aquoso para formar lipossomas. Depois, um agente bioactivo tal como uma droga, é carregado nos lipossomas pré-formados, utilizando um gradiente de concentração trans-membrana. Por outro lado, em Lenk *et al.*, patente U.S. Nº 5,082,664, um lípido e um agente bioactivo são dissolvidos em conjunto num solvente orgânico, e combinados com um meio aquoso para formar lipossomas associados com o agente bioactivo. Em particular, o lípido e o agente bioactivo (*e.g.* drogas lipófilas tais como as prostaglandinas) são co-dissolvidas num solvente orgânico miscível com a água, tal como o etanol, adicionado então lentamente a uma solução aquosa, a qual pode adicionalmente conter um protector de secagem e/ou um tampão, tal como discutido na patente de Lenk *et al.*.

Outro processo para formar lipossomas emprega a injecção de etanol e é discutido em Batzri *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta*, 298: 1015 (1973). O processo de injecção de etanol tem sido utilizado para formar lipossomas tendo a eles associado um agente bioactivo lipófilo ou hidrófilo. Ao formar lipossomas contendo um agente bioactivo lipófilo (*e.g.* prostaglandina), um conservante opcional e o agente bioactivo são adicionados ao lípido contendo etanol. A mistura resultante é então adicionada lentamente a um meio aquoso. Este processo forma lipossomas que retêm o meio aquoso. Os processos de injecção de etanol, bem como outros processos de formação de lipossomas, que utilizam um lípido carregado dessalinizado são revelados em Popescu *et al.*, patente U.S. Nº 5,154,930, incorporada neste

fascículo por referência. Um processo para controlar a distribuição da dimensão dos lipossomas resultantes num processo de infusão de etanol é discutido em Aitcheson *et al.*, patente U.S. Nº 4,994,213.

Para a formação de lipossomas tendo um agente bioactivo hidrófilo a eles associado (*e.g.* antibióticos de aminoglicósido, tal como gentamicina), o agente bioactivo é adicionado à fase aquosa. O lípido e o etanol são combinados para formar uma solução que é adicionada à fase aquosa e a mistura resultante é processada para formar lipossomas. A fase aquosa pode ser uma solução de um ou mais protectores de secagem, com ou sem um conservante.

As preparações de lipossomas preparadas através de tais processos tipicamente contêm lipossomas possuindo uma ampla variedade de dimensões de partícula. É muitas vezes desejável reduzir a dimensão dos lipossomas maiores, para obter uma distribuição de população uni-modal, contendo uma desejada dimensão média de partícula. O termo "distribuição uni-modal de população", tal como aqui utilizado, significa que a maior parte dos lipossomas possuem uma dimensão de partícula dentro de uma gama contínua de dimensões de partícula que englobam a dimensão média da partícula. O termo "dimensão da partícula média" significa a soma dos diâmetros de cada lipossoma da população, dividido pelo número total de lipossomas.

A redução de dimensão para obter uma distribuição uni-modal da população pode ser conseguida por meio de um número de processos tais como por extrusão através de um filtro, tal como descrito em Pieter Cullis *et al.*, patente U.S. Nº 5,008,050, aqui incorporada por referência.

Um processo de dimensionamento de lipossomas por filtração através de um filtro de policarbonato Unipore™ de 200 nm é discutido em Szoka, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 4194-8 (1978). Um processamento da dimensão, baseado na extrusão de lipossomas através de uma série de membranas uniformes de policarbonato do tipo poro linear, é descrito em Hunt *et al.*, patente U.S. Nº 4,529,561.

A patente U.S. Nº 4,737,323 descreve um processo para dimensionar lipossomas por extrusão através de um filtro cerâmico assimétrico. Tais filtros são desenhados para operação a pressão relativamente elevada, e podem ser contra-lavados para evitar a obstrução. A patente U.S. Nº 4,927,637 descreve um processo para dimensionar lipossomas fazendo-os passar através de um filtro de polímero possuindo uma construção do tipo teia de "percurso sinuoso".

Um tipo alternativo de meio filtrante é descrito em Furneaux *et al.*, patente U.S. Nº 4,687,551. Esta patente revela uma folha de filtro que compreende uma película anódica de óxido de alumínio possuindo poros ramificados que se estendem de uma superfície da película até à outra. Esta película é única por incluir um sistema de poros maiores que se estendem a partir de uma face e um sistema de poros mais pequenos que se extenuem a partir da outra face. O sistema de poros maiores intercomunica com o sistema de poros menores, de tal forma que as extremidades internas de um ou mais poros menores estão ligadas à extremidade interna de um poro maior e não há substancialmente poros maiores que terminem dentro da película.

A aplicação de uma película porosa de óxido de alumínio para a redução da dimensão de lipossomas é revelada em Royden M. Coe *et al.*, pedido U.S. de Nº de Série 771,267, apresentado em 4 de Outubro de 1991.

A homogeneização é outro processo para a redução da dimensão de lipossomas. Num processo simples de homogeneização, uma suspensão de lipossomas é repetidamente bombada sob pressão elevada através de um pequeno orifício ou câmara de reacção, até ser atingida uma desejada distribuição de dimensão.

O pedido PCT publicado, Nº WO-A-90 11780 revela um processo para a preparação de lipossomas possuindo uma dimensão directamente proporcional à força iónica da solução em que são formados. O processo compreende a dissolução de uma solução de lípidos formadores de lipossomas num solvente aprótico e a injecção da solução resultante numa solução aquosa.

Em *Biochemistry*, vol.16, nº17, 1977, pp. 3932-3935, descreve-se um processo de injecção modificado, para formar lipossomas de diâmetro variável de um modo controlado. O raio das vesículas produzidas de acordo com o referido processo pode depender de vários factores, incluindo a velocidade da injecção, a concentração de lípido no tampão e no álcool, e a concentração final de álcool no tampão.

O pedido PCT publicado, Nº WO-A-89 11335 descreve um processo para a preparação de lipossomas com uma desejada distribuição de dimensões, dissolvendo lípidos numa mistura solvente de etanol-água, em que a razão água:solvente da mistura é elevada por osmose inversa. A dimensão média dos lipossomas pode ser variada selectivamente fazendo variar a força iónica e a composição de lípido da mistura.

Os procedimentos de redução da dimensão anteriormente descritos para o controlo da dimensão do produto de lipossoma final são demorados e aumentam significativamente o custo de produção de lipossomas. Como tal, constituiria um avanço significativo na arte, o proporcionar de um processo para a preparação de lipossomas em que a preparação inicial de lipossomas possuísse uma população de lipossomas com uma distribuição mais uniforme da dimensão do que a obtida através dos processos convencionais de formação de lipossomas. Como consequência, os dispendiosos e demorados procedimentos de dimensionamento pós-produção podem ser reduzidos ou até eliminados.

Constituiria um avanço adicional na arte o proporcionar de um processo de fabrico de lipossomas que possa resultar numa distribuição uni-modal da população de lipossomas, englobando uma desejada e pré-seleccionada dimensão média de partícula.

Sumário do invento

O presente invento destina-se genericamente a um processo de fabrico de lipossomas por dissolução de um lípido num solvente orgânico. A concentração do solvente orgânico é seleccionada de acordo com uma desejada dimensão média de partícula. A população de lipossomas resultante possui uma distribuição mais uniforme da dimensão de partícula do que os processos anteriores, em que a concentração do solvente orgânico não era seleccionada como é necessário no presente invento.

De acordo com o presente invento, é proporcionado um processo para a produção de uma população de lipossomas utilizando lípido num sistema solvente de fase única, em que os lipossomas possuem uma desejada dimensão média de partícula, processo que compreende o testar da dimensão de uma população de lipossomas em teste, a uma concentração de solvente em teste, e o formar de uma população de lipossomas por meio da adição ao lípido de uma concentração do solvente seleccionada, para formar a desejada dimensão média de partícula.

O presente processo pode reduzir ou eliminar a necessidade de procedimentos dispendiosos e demorados de redução da dimensão, para obter uma distribuição uni-modal da população de lipossomas englobando uma desejada dimensão média de partícula. De acordo com um aspecto do invento, é escolhida uma desejada dimensão média de partícula, e a concentração do solvente orgânico seleccionado, as quais irão produzir uma distribuição uni-modal da população de lipossomas englobando uma desejada dimensão média de partícula, sem se ter que confiar nos extensos procedimentos de filtração pós-produção. Para

além disso, a selecção da dimensão média de partícula pode também determinar o número relativo de lipossomas, pelo que há mais lipossomas por unidade de peso de lípido com lipossomas mais pequenos, e menos lipossomas por unidade de peso de lípido com maiores lipossomas.

Numa concretização particular do presente invento, o passo de selecção da concentração inicial do solvente compreende:

(a) formar uma primeira amostra de teste de uma população de lipossomas a partir de um sistema solvente que tem uma concentração inicial pré-seleccionada de solvente;

(b) formar uma segunda amostra de teste a partir de um sistema solvente que tem uma diferente concentração inicial pré-seleccionada de solvente;

(c) determinar as dimensões médias de partícula dos lipossomas na primeira e segunda amostras de teste;

(d) seleccionar a concentração do solvente a ser utilizado para formar lipossomas em processos subsequentes baseado na qual a dimensão média da partícula determinada está mais próxima da desejada dimensão média de partícula; e

(e) repetir os passos de (a) a (d) até que seja encontrada uma concentração de solvente que proporcione uma população de lipossomas com uma dimensão média de partícula aceitavelmente próxima da desejada dimensão média de partícula.

Descrição detalhada do invento

O presente invento está em parte baseado na premissa da verificação de que, dentro de uma gama da razão do peso de lípido para o volume de solvente orgânico empregue, a dimensão das partículas dos lipossomas irá variar inversamente dentro de uma primeira gama de concentrações do solvente orgânico, e directamente dentro de uma segunda gama de concentrações do solvente orgânico, onde as concentrações na segunda gama são maiores do que as concentrações na primeira gama. O limite superior da razão é o ponto em que o lípido já não se dissolve no solvente orgânico. O limite inferior é o ponto em que os lipossomas já não se formarão, devido à presença de solvente em excesso.

A concentração do solvente orgânico empregue no presente invento para formar

lipossomas está correlaciona com a dimensão das partículas dos lipossomas resultantes e, portanto, proporciona um processo simples para obter uma distribuição da população de lipossomas englobando uma desejada dimensão média de partícula, preferivelmente uma distribuição uni-modal da população de lipossomas. Verificou-se em geral que, dentro de uma gama de razões de lípido para solvente orgânico, à medida que aumenta a concentração do solvente orgânico adicionado à mistura reaccional, a dimensão média da partícula da população de lipossomas diminui numa primeira gama de concentrações, após o que a dimensão média da partícula irá aumentar numa segunda gama de concentrações, maior do que a primeira gama de concentrações, até um ponto em que os lipossomas já não serão capazes de se formar, devido à excessiva presença de solvente. A mínima dimensão média de partícula ocorrerá aproximadamente na junção da primeira e segunda gamas de concentração.

O presente invento proporciona uma via relativamente simples para obter uma distribuição da população de lipossomas, preferivelmente uma distribuição uni-modal da população de lipossomas englobando uma desejada dimensão média de partícula, sem a necessidade de procedimentos de redução da dimensão que requerem numerosos passos através de filtros classificadores, tal como mencionado anteriormente em relação aos processos da arte antecedente.

Um tipo particular de material lípido para utilização neste invento é o que é de carácter anfipático. O carácter hidrófilo pode ser concedido à molécula através da presença de grupos fosfato, carboxílico, sulfato, amino, sulfidrilo, nitro e semelhantes. A hidrofobicidade pode ser conferida pela inclusão de grupos que incluem, mas não estando limitados a, grupos de hidrocarboneto alifático saturados e insaturados de cadeia longa, e tais grupos substituídos por um ou mais grupos aromáticos, cicloalifáticos ou heterocíclicos. Os compostos anfipáticos preferidos são fosfoglicéridos, cujos exemplos representativos incluem fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico, dimiristoílfosfatidilglicerol e difosfatidilglicerol, isolados ou em combinação com outros lípidos. Também poderiam ser utilizados compostos sintéticos saturados, tais como dimiristoílfosfatidilcolina, dipalmitoílfosfatidilcolina, ou distearoílfosfatidilcolina ou espécies insaturadas tais como dioleoílfosfatidilcolina ou dilinoleoílfosfatidilcolina. Outros compostos sem fósforo, tais como membros das famílias dos esfingolípidos e glicosfingolípidos, também estão dentro do grupo designado por lípidos.

Uma variedade de colesteróis e outros esteróis e os seus derivados solúveis em água

também têm sido utilizados para formar lipossomas; ver especificamente Janoff *et al.*, patente U.S. Nº 4,721,612 e as referências aí incluídas, todas aqui incorporadas por referência. Diversos tocoferóis e os seus derivados solúveis em água têm igualmente sido utilizados para formar lipossomas, tal como revelado em Janoff *et al.*, patente U.S. Nº 4,861,580, aqui incorporada por referência. Os preferidos deste grupos são o hemi-succinato de colesterol e o hemi-succinato de tocoferol.

São empregues neste invento solventes orgânicos solúveis em água. Tais solventes incluem alcanóis inferiores, tais como metanol, etanol, propanol, butanol, álcool isoamílico, isopropanol, 2-metoxietanol, acetona e semelhantes. O etanol é particularmente preferido.

Os lipossomas do presente invento podem ser formulados com um agente bioactivo. os agentes bioactivos, os quais podem estar associados com os lipossomas preparados de acordo com o presente invento, incluem ácidos nucleicos, polinucleótidos, compostos antibacterianos, compostos antivirais, compostos antifúngicos, compostos antiparasíticos, compostos tumoricidas, proteínas, toxinas, enzimas, hormonas, neurotransmissores, glicoproteínas, imunoglobulinas, imunomoduladores, corantes, rádio-marcadores, compostos rádio-opacos, compostos fluorescentes, polissacáridos, moléculas de ligação a receptores celulares, anti-inflamatórios, agentes anti-glaucómicos, compostos midriáticos, anestésicos locais e semelhantes. Exemplos específicos de tais agentes activos e sua incorporação em lipossomas podem ser vistos em Lenk *et al.*, patente U.S. Nº 4,588,578; Fountain *et al.*, patente U.S. Nº 4,588,578; Janoff *et al.*, patente U.S. Nº 4,861,580 e 4,897,384; e Lenk *et al.*, patente U.S. Nº 5,082,664; cada qual aqui incorporada por referência.

Os agentes bioactivos que encontram aplicação particularmente eficaz no presente invento são agentes bioactivos lipófilos, em particular metabolitos de ácido araquidónico, incluindo os seus análogos estruturais e inibidores sintéticos de enzimas. Uma classe de tais metabolitos de ácido araquidónico é o grupo de agentes bioactivos conhecido por prostaglandinas, incluindo, sem estar limitado a, prostaglandina E_1.

Os agentes bioactivos hidrófilos, tais como os antibióticos de aminoglicósido e seus análogos estruturais, são exemplos de agentes bioactivos hidrófilos. estes incluem gentamicina, estreptomicina, di-hidrostreptomicina, tobramicina, neomicina B, paromicina, ribostamicina, lividomicina, canamicina, viomicina, sisomicina, netilmicina e amicacina, bam como análogos e derivados destes. A gentamicina é o antibiótico de aminoglicósido preferido.

O processo de formação de lipossomas de acordo com o presente invento depende em parte de um agente bioactivo lipófilo ou hidrófilo ser associado aos lipossomas. Para lipossomas lipófilos associados, um conservante opcional tal como BHT e o agente bioactivo (*e.g.* prostaglandina E_1) são dissolvidos no solvente orgânico, e a solução é então adicionada a um meio aquoso, o qual pode conter um tampão (*e.g.* citrato ou fosfato) e/ou um protector de secagem, tal como maltose.

Se um agente bioactivo hidrófilo, tal como gentamicina, vai ser associado aos lipossomas, nesse caso a gentamicina é adicionada à fase aquosa (a qual pode conter um tampão, um protector de secagem e/ou um conservante, tal como EDTA dissódico) para formar uma solução. O lípido dissolvido no solvente orgânico é adicionado à solução aquosa. As misturas resultantes contendo o agente bioactivo, quer lipófilo ou hidrófilo, são processadas de um modo convencional, por meio de mistura vigorosa até se formar uma população de lipossomas. Em alternativa, os lipossomas podem ser preparados por adição do agente bioactivo depois de se terem formado os lipossomas.

Os lipossomas produzidos a granel através do processo do presente invento podem ser separados a partir de agente bioactivo não associado, se necessário, bem como a partir de lípido livre, sais e água, por meio da técnica comum da ultrafiltração, tal como revelada em Munir Cheryan, *Ultrafiltration Handbook*, pp. 205-213 e 377, Technomic Publishing Company (1986).

A diafiltração é um tal sistema de ultrafiltração, no qual solutos permeáveis são removidos pela adição de solvente fresco ou outra solução ao líquido de alimentação. O líquido remanescente (o retentado) contendo substâncias não-permeadas que contêm o desejado produto de lipossoma é recuperado. Um processo preferido de diafiltração é revelado em Lenk *et al.*, pedido PCT publicado Nº WO89/00846, cuja divulgação é aqui incorporada por referência.

Os sistemas de diafiltração empregam tipicamente um filtro possuindo um ou mais caminhos primários formados por uma composição de filtro poroso. O dispositivo de filtração possui uma dimensão nominal de poro tal que geralmente materiais tendo uma dimensão igual ou inferior á da dimensão nominal do poro, serão capazes de passar através do dispositivo de filtração, via caminhos secundários mais estreitos. Geralmente, os componentes maiores permanecerão nos caminhos primários e passarão através do dispositivo de filtração como parte do retentado líquido. Quando os lipossomas são preparados utilizando um sistema de diafiltração, os lipossomas passam para fora do

dispositivo de filtração através dos caminhos primários, enquanto que os solutos permeáveis passam através dos caminhos secundários mais estreitos.

O processo do presente invento é geralmente realizado por selecção de uma dimensão média de partícula desejada para o tipo de lipossomas que se vão produzir. Por exemplo, é desejável uma dimensão média de partícula de 150 a 200 nm para lipossomas associados a gentamicina. Um lote de teste de lipossomas é então preparado, utilizando uma quantidade fixa de lípido e uma concentração fixa de solvente orgânico.

A razão máxima de lípido para solvente orgânico que pode ser seleccionada tem de ser suficiente para produzir lipossomas, *i.e.*, se está presente demasiado solvente, os lipossomas não se formarão. A razão mínima é determinada pelo ponto em que o lípido já não se dissolverá no solvente. A razão da quantidade fixa de lípido para solvente orgânico deve cair entre as razões mínima e máxima.

A dimensão média de partícula do lote de teste é então determinada de um modo convencional, tal como por medição com um classificador de partículas submicrónicas (e.g. um classificador de partículas submicrónicas NICOMP, modelo 270). Se a dimensão média de partícula do lote de teste corresponde à desejada dimensão média de partícula, então o processo é conduzido utilizando a mesma razão de lípido para solvente orgânico (*i.e.* mantendo a mesma concentração de solvente orgânico) empregue para o lote de teste. Contudo, se a dimensão média de partícula do lote de teste não corresponder á desejada dimensão média de partícula, então as razões de lípido para solvente orgânico têm de mudar, tal como por modificação da concentração de solvente orgânico. A modificação na concentração do solvente orgânico está dependente da concentração inicial do solvente orgânico e da diferença entre a dimensão média de partícula do lote de teste e da desejada dimensão média de partícula.

O processo do presente invento será agora explicado com referência aos dados mostrados e descritos em relação aos Exemplos.

Verificou-se que para a formação de lipossomas utilizando fosfatidilcolina de ovo como lípido e etanol como solvente, existe uma diminuição contínua e substancial na dimensão média de partícula dos lipossomas resultantes, à medida que a concentração de solvente orgânico aumenta de cerca de 0,558% para cerca de 10,0% em volume (*i.e.* a primeira gama de concentração) enquanto a quantidade de lípido permanece fixa (4,4 mg). À medida que a concentração do solvente orgânico aumenta de cerca de 10,0% para 15,0% em

volume (a segunda gama de concentração), aumenta a dimensão média de partícula dos lipossomas assim formados.

Para além de cerca de 15,0% de concentração de etanol, o lípido não formará lipossomas, mas pelo contrário irá permanecer dissolvido no etanol. De acordo com este exemplo, a razão lípido/solvente é pelo menos de 0,03 mg/ml, preferivelmente pelo menos de 0,03 a 0,80 mg/ml. Dentro desta gama, a dimensão de partícula dos lipossomas irá diminuir na primeira gama de concentrações de etanol, de cerca de 0,558% a 10,0% em volume de etanol, tal como mostrado nos Exemplos 1-3, e irá aumentar na segunda gama de concentrações de etanol, de cerca de 10,0% a 15,0% em volume, conforme mostrado nos Exemplos 3 e 4.

O processo é iniciado pela pré-selecção de uma desejada dimensão média de partícula. Por exemplo, uma dimensão média de partícula de cerca de 100 a 200 nm, preferivelmente na gama de cerca de 150 a 190 nm, é desejada para um número de produtos de lipossoma.

Um lote de teste de uma formulação de lipossoma pode ser preparado por combinação de, por exemplo, fosfatidilcolina de ovo (EPC), hidroxitolueno butilado (BHT) e etanol, e misturando estes até se formar uma mistura homogénea. Para uma aplicação tal como uma injecção, pode ser misturada maltose com água, esterilizada por filtração, e adicionada a um reactor equipado com meios para mistura, tal como um agitador. O reactor pode ser mantido, por exemplo, a temperatura ambiente. O agitador pode ser mantido, por exemplo, a 2.000 rpm durante 15 minutos. Após se completar a mistura, o conteúdo pode ser diluído com água para injecção. Como tal, como se pode verificar por este exemplo, a concentração final de etanol não precisa de ser igual à concentração de etanol utilizada para a formação dos lipossomas.

A dimensão de partícula dos lipossomas resultantes pode ser medida utilizando, por exemplo, um classificador de partículas submicrónicas.

De acordo com os resultados tabulados na Tabela 1, a dimensão de partícula diminui com o aumento do volume inicial de etanol, até cerca de 10% de etanol. De cerca de 10% a cerca de 15% de etanol, contudo, a dimensão de partícula aumenta com o aumento do volume inicial de etanol.

Se, por exemplo, 200 nm for pré-seleccionado como a desejada dimensão média de

partícula, então o lote de teste pode ser preparado a, por exemplo, uma concentração de etanol a cerca de 8% em volume, ou a uma concentração de etanol cerca de 11% em volume. Geralmente prefere-se operar de início dentro da primeira gama de concentrações de etanol (*i.e.* de 0,558 a 10% em volume), de modo a manter a quantidade de solvente tão baixa quanto possível, para reduzir custos e minimizar problemas de descarte. Como tal, é escolhida uma concentração de etanol de 8%.

A dimensão média de partícula dos lipossomas no lote de teste é determinada tal como descrito no Exemplo 1, por exemplo, utilizando um classificador de partículas submicrónicas. Se a desejada dimensão média de partícula for inferior à dimensão média de partícula para o lote de teste, nesse caso deverá ser seleccionada uma concentração de etanol superior. De modo recíproco, se a desejada dimensão média de partícula for maior que a dimensão média de partícula para o lote de teste, nesse caso deverá ser escolhida uma mais baixa concentração de etanol.

Se for escolhida uma concentração de etanol de 11% em volume, e a desejada dimensão média de partícula for inferior à dimensão média de partícula do lote de teste, então a concentração de etanol deveria ser reduzida, mas não a uma concentração inferior a 10% em volume. Reciprocamente, se a desejada dimensão média de partícula for maior que a dimensão média de partícula do lote de teste, a concentração de etanol é aumentada, mas não mais do que cerca de 15;0% em volume.

Uma dimensão de lipossomas desejada pode ser conseguida, por exemplo, como se segue. Uma preparação de lipossomas de teste é preparada utilizando uma concentração de etanol pré-seleccionada, o que resulta numa dimensão média de partícula de teste. Se a desejada dimensão média de partícula é maior que a dimensão média de partícula de teste, e a concentração de etanol pré-seleccionada é inferior a cerca de 10% em volume, é escolhida uma concentração de etanol que é inferior à concentração de etanol pré-seleccionada, para preparação ou preparações de lipossoma subsequentes. Se a desejada dimensão média de partícula é maior que a dimensão média de partícula de teste, e a concentração de etanol pré-seleccionada é de cerca de 10% a cerca de 15% em volume, é escolhida uma concentração de etanol que é superior à concentração de etanol pré-seleccionada, para preparação ou preparações de lipossoma subsequentes.

Reciprocamente, se a concentração de etanol pré-seleccionada resulta numa dimensão média de partícula de teste em que a desejada dimensão média de partícula é mais pequena que a dimensão média de partícula de teste, e se a concentração de etanol pré-seleccionada é

inferior a cerca de 10% em volume, é escolhida uma concentração de etanol que é superior à concentração de etanol pré-seleccionada, para preparação ou preparações de lipossoma subsequentes. Se a desejada dimensão média de partícula é menor que a dimensão média de partícula de teste, e a concentração de etanol pré-seleccionada é de cerca de 10% a cerca de 15% em volume, é escolhida uma concentração de etanol que é inferior à concentração de etanol pré-seleccionada, para preparação ou preparações de lipossoma subsequentes.

Se não se consegue obter uma similaridade suficiente com desejada dimensão média de partícula dentro de uma ou duas gamas de concentração (por exemplo, a primeira gama de concentrações), então deverá ser preparado um lote de teste utilizando uma concentração de etanol dentro de outra das gamas de concentração (por exemplo, a segunda gama de concentrações). Além disso, pode ser desejável realizar mais do que um lote de teste para uma aplicação particular, se for necessária uma correlação mais precisa com a desejada dimensão média de partícula.

De acordo com o presente invento, a formação de uma população de lipossomas possuindo uma dimensão média de partícula correspondendo a uma desejada dimensão média de partícula, pode ser conseguida para uma variedade de lípidos e solventes orgânicos miscíveis em água. A gama de operação para a razão lípido para solvente orgânico, para os seleccionados lípido e solvente orgânico, pode ser determinada em rotina e o processo conduzido de acordo com os processos aqui descritos. A adição de um agente bioactivo, quer lipófilo quer hidrófilo, não irá modificar materialmente o processo, que pode ser utilizado para formar populações de lipossomas contendo agentes terapêuticos muito potentes para utilização no tratamento de animais de sangue quente, incluindo humanos.

Exemplo 1

4,4 mg de fosfatidilcolina de ovo (EPC), 0,03 mg de hidroxitolueno butilado (BHT) e 5,58 ml de etanol foram combinados e misturados, até se formar uma mistura homogénea. 100 g de maltose foram misturados com 900 ml de água para injecção (WFI), esterilizados por filtração, e adicionados a um reactor vitrificado de 3 litros, com camisa e equipado com um agitador R-100 de 3 polegadas, e o reactor foi mantido a temperatura ambiente. O agitador foi activado a .000 rpm, no momento em que a solução de EPC/BHT/etanol foi adicionada à solução de maltose contida dentro do reactor. O agitador foi mantido a 2.000 rpm durante um total de 15 minutos. Depois de completada a mistura, o conteúdo do reactor foi levado a um volume final de um litro, com água para injecção.

A dimensão de partícula dos lipossomas resultantes foi medida utilizando um classificador de partículas submicrónicas NICOMP modelo 270, e verificou-se ser maior do que 1.200 nm, o que constitui o limite de medida do dispositivo de medição da dimensão de partícula empregue.

Exemplos 2 - 4

O procedimento exposto no Exemplo 1 foi repetido, utilizando concentrações iniciais de etanol de 5,0%, 10,0% e 15,0% em volume, respectivamente, baseadas no volume total contido no reactor. Os resultados são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1

Exemplo	Quantidade de etanol % do lote total	Dimensão média da partícula
1	0,558%	> 1.200 nm
2	5,0%	266 nm
3	10,0%	183 nm
4	15,0%	238 nm

Lisboa, 14. FEB. 2001

Por THE LIPOSOME COMPANY, INC.
- O AGENTE OFICIAL -
O ADJUNTO

Eng.º ANTÓNIO JOÃO DA CUNHA FERREIRA
Rua das Flores, 74-4.º
1200-195 LISBOA

REIVINDICAÇÕES

1 - Processo para a produção de uma população de lipossomas utilizando um lípido num sistema solvente de fase única, em que os lipossomas possuem uma desejada dimensão média de partícula, processo que compreende o testar da dimensão de uma população de lipossomas em teste, a uma concentração de solvente em teste, e o formar de uma população de lipossomas por meio da adição ao lípido de uma concentração do solvente seleccionada, para formar a desejada dimensão média de partícula.

2 - Processo para a produção de uma população de lipossomas possuindo uma desejada dimensão média de partícula, que compreende:

(a) formar uma primeira amostra de teste de uma população de lipossomas a partir de um sistema solvente que tem uma concentração inicial pré-seleccionada de solvente;

(b) formar uma segunda amostra de teste a partir de um sistema solvente que tem uma diferente concentração inicial pré-seleccionada de solvente;

(c) determinar as dimensões médias de partícula dos lipossomas na primeira e segunda amostras de teste;

(d) seleccionar a concentração do solvente a ser utilizado para formar lipossomas em processos subsequentes baseado na qual a dimensão média da partícula determinada está mais próxima da desejada dimensão média de partícula; e

(e) repetir os passos de (a) a (d) até que seja encontrada uma concentração de solvente que proporcione uma população de lipossomas com uma dimensão média de partícula aceitavelmente próxima da desejada dimensão média de partícula.

3 - Processo de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, em que a população de lipossomas possui uma distribuição uni-modal de dimensão da população.

4 - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-3, em que os lipossomas contêm adicionalmente um agente bioactivo.

5 - Processo de acordo com a reivindicação 4, em que o agente bioactivo é um metabolito de ácido araquidónico ou um antibiótico de aminoglicósido.

6 - Processo de acordo com a reivindicação 5, em que o metabolito de ácido araquidónico é uma prostaglandina.

7 - Processo de acordo com a reivindicação 6, em que a prostaglandina é prostaglandina E_1.

8 - Processo de acordo com a reivindicação 5, em que o antibiótico de aminoglicósido é uma gentamicina.

9 - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-8, em que a população de lipossomas é formada sem passar os lipossomas através de um filtro ou orifício de redução da dimensão.

10 - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-9, em que o lípido é fosfatidilcolina de ovo.

11 - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-10, em que a concentração de solvente em teste é igual ou inferior a 15%.

12 - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-11, em que o solvente é etanol.

13 - Processo de acordo com a reivindicação 12, em que uma primeira preparação de lipossomas, utilizando uma concentração de etanol pré-seleccionada, resulta numa dimensão média de partícula de teste, e a desejada dimensão média de partícula é maior que a dimensão média de partícula de teste, em que o passo seguinte compreende:

se a concentração de etanol pré-seleccionada é inferior a 10% em volume, para uma preparação de lipossomas subsequente seleccionar uma concentração de etanol que seja inferior à concentração de etanol pré-seleccionada;

e se a concentração de etanol pré-seleccionada é de 10% a 15% em volume, para uma preparação de lipossomas subsequente seleccionar uma concentração de etanol que seja superior à concentração de etanol pré seleccionada.

14 - Processo de acordo com a reivindicação 12, em que uma preparação de lipossomas em teste, utilizando uma concentração de etanol pré-seleccionada, resulta numa dimensão média de partícula de teste, e a desejada dimensão média de partícula é menor que a dimensão média de partícula de teste, em que o passo seguinte compreende:

se a concentração de etanol pré-seleccionada é inferior a 10% em volume, para uma preparação de lipossomas subsequente seleccionar uma concentração de etanol que seja superior à concentração de etanol pré-seleccionada;

e se a concentração de etanol pré-seleccionada é de 10% a 15% em volume, para uma preparação de lipossomas subsequente seleccionar uma concentração de etanol que seja inferior à concentração de etanol pré-seleccionada.

Lisboa, 11. MAR. 2001

Por THE LIPOSOME COMPANY, INC.
- O AGENTE OFICIAL -
O ADJUNTO

Eng.º ANTÓNIO J... DA CUNHA FER...
Ag. Of. Pr. Ind
Rua das Flores, ...
1200-195 LISC...