

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **1998.01.29**

(30) Prioridade(s): **1997.01.31 US 792566**

(43) Data de publicação do pedido: **2000.01.19**

(45) Data e BPI da concessão: **2014.11.26**
024/2015

(73) Titular(es):

PACIRA PHARMACEUTICALS, INC.
10450 SCIENCE CENTER DRIVE SAN DIEGO,
CA 92121 US

(72) Inventor(es):

(74) Mandatário:

MARIA TERESA DELGADO
AVENIDA DA LIBERDADE, Nº 69, 3º D 1250-140 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **MÉTODO DE UTILIZAÇÃO DE LÍPIDOS NEUTROS PARA MODIFICAR A LIBERTAÇÃO IN VIVO DE LIPOSSOMAS MULTIVESICULARES**

(57) Resumo:

A VELOCIDADE DE LIBERTAÇÃO DE UM COMPOSTO ATIVO ENCAPSULADO DE UMA FORMULAÇÃO DE LIPOSSOMAS MULTIVESICULARES (MVL) É MODIFICADA POR SELEÇÃO DE UM COMPONENTE LIPÍDICO NEUTRO. UMA FAMÍLIA DE FORMULAÇÕES DE MVL CONTENDO DIFERENTES RAZÕES MOLARES DE LÍPIDOS NEUTROS DE LIBERTAÇÃO LENTA:RÁPIDA APRESENTA DIFERENTES VELOCIDADES DE LIBERTAÇÃO DEPENDENDO DA RAZÃO MOLAR DO LÍPIDO NEUTRO DE LIBERTAÇÃO RÁPIDA PARA O LÍPIDO NEUTRO DE LIBERTAÇÃO LENTA EM CADA MEMBRO. A INCUBAÇÃO EM PLASMA OU NUM MEIO DO TIPO PLASMA A TEMPERATURAS IN VIVO, DE MODO A SE OBTER UMA CURVA DE VELOCIDADES DE LIBERTAÇÃO PARA CADA UM, PERMITE A SELEÇÃO DE ENTRE OS MEMBROS DA FAMÍLIA DE UMA FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL COM UMA VELOCIDADE DE LIBERTAÇÃO IN VIVO DESEJADA.

RESUMO

"MÉTODO DE UTILIZAÇÃO DE LÍPIDOS NEUTROS PARA MODIFICAR A LIBERTAÇÃO *IN VIVO* DE LIPOSSOMAS MULTIVESICULARES"

A velocidade de libertação de um composto ativo encapsulado de uma formulação de lipossomas multivesiculares (MVL) é modificada por seleção de um componente lipídico neutro. Uma família de formulações de MVL contendo diferentes razões molares de lípidos neutros de libertação lenta:rápida apresenta diferentes velocidades de libertação dependendo da razão molar do lípido neutro de libertação rápida para o lípido neutro de libertação lenta em cada membro. A incubação em plasma ou num meio do tipo plasma a temperaturas *in vivo*, de modo a se obter uma curva de velocidades de libertação para cada um, permite a seleção de entre os membros da família de uma formulação lipossomal com uma velocidade de libertação *in vivo* desejada.

DESCRIÇÃO

"MÉTODO DE UTILIZAÇÃO DE LÍPIDOS NEUTROS PARA MODIFICAR A LIBERTAÇÃO *IN VIVO* DE LIPOSSOMAS MULTIVESICULARES"

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Esta invenção refere-se a formulações lipossomais de compostos tais como fármacos. Mais em particular, esta invenção refere-se a métodos para modificar a velocidade de libertação *in vivo* de compostos encapsulados de lipossomas multivesiculares pela escolha do lípido neutro na formulação lipossomal.

Quando se dispersam fosfolípidos e muitos outros lípidos anfipáticos cuidadosamente num meio aquoso, eles expandem, hidratam-se, e formam espontaneamente vesículas multilamelares de bicamadas concêntricas com camadas de meio aquoso a separar as bicamadas lipídicas. Estes sistemas são habitualmente referidos como lipossomas multilamelares ou vesículas multilamelares (MLV), e têm normalmente diâmetros de 0,2 a 5 μm . A sonicação de MLV resulta na formação de pequenas vesículas unilamelares (SUV) ligadas por uma única bicamada lipídica com diâmetros normalmente no intervalo de 20 a 100 nm, contendo uma solução aquosa. Os lipossomas multivesiculares (MVL) diferem das MLV e SUV no modo como são fabricados, no arranjo não concêntrico, aleatório, de câmaras contendo água dentro dos lipossomas, e na inclusão de lípidos neutros necessários para formar os MVL.

Têm sido usados durante anos vários tipos de lípidos que diferem no comprimento da cadeia, saturação, e grupo

principal, em formulações lipossomais de fármacos, incluindo os lipossomas unilamelares, multilamelares e multivesiculares mencionados acima. Os lípidos neutros usados até ao presente no fabrico de lipossomas multivesiculares limitaram-se principalmente à trioleína e à tricaprilina.

Um dos principais objetivos da área é desenvolver formulações lipossomais para a libertação *in vivo* controlada de fármacos e outros agentes ativos de interesse. Certos fármacos precisam de ser libertados de forma bastante rápida após colocação do depósito lipossomal, e outros necessitam de uma velocidade de libertação relativamente lenta ao longo de um certo período de tempo. Até agora, a velocidade de libertação de um composto biologicamente ativo de uma formulação lipossomal tem sido modificada por seleção do lípido anfipático, do lípido formador de membrana aceite, ou por manipulação da razão molar fosfolípido/colesterol. Alternativamente, esses compostos, tais como um ácido ou um espaçador de osmolaridade, foram incluídos na solução aquosa para encapsulação, para ajudar à modificação da velocidade de libertação do composto encapsulado biologicamente ativo (patente WO 96 082 35).

O controlo das velocidades de libertação de formulações lipossomais é complicado pelo facto de muitos agentes biologicamente ativos, tais como proteínas, necessitarem de ser armazenados a temperaturas baixas, isto é, a cerca de 4 °C, para manterem a atividade completa. Infelizmente, algumas formulações lipossomais que apresentam excelentes velocidades de libertação a temperaturas *in vivo* desintegram-se bastante rapidamente a tais temperaturas de

armazenamento.

Assim, há necessidade de mais e melhores métodos para selecionar formulações lipossomais que maximizem o controle sobre a velocidade de libertação do composto ativo encapsulado, ao mesmo tempo que proporcionam estabilidade de vida útil por longos períodos de tempo a temperaturas de armazenamento de cerca de 4 °C, por exemplo entre 2 e 10 °C.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Em geral, a invenção apresenta um método para modificar a velocidade de libertação de um composto biologicamente ativo, tal como um fármaco, que é encapsulado numa formulação lipossomal multivesicular, utilizando na formulação um componente lipídico neutro com uma razão molar selecionada de um lípido neutro de libertação lenta para um lípido neutro de libertação rápida, em que a proporção do lípido neutro de libertação rápida é aumentada para aumentar a velocidade de libertação do composto biologicamente ativo. Alternativamente, a proporção do lípido neutro de libertação lenta na razão molar pode ser aumentada para diminuir a velocidade de libertação do composto biologicamente ativo. Em geral, a razão molar lípido neutro lento:rápido encontra-se no intervalo de cerca de 1:1 a 0:1, por exemplo de 1:4 a 1:100, ou de 1:4 a 1:27, e a razão molar do componente lipídico neutro para o componente lipídico total (todos os lípidos no lipossoma) encontra-se no intervalo de cerca de 0,01 a cerca de 0,21.

Para modificar a velocidade de libertação *in vivo*, o ponto de fusão do componente lipídico neutro está à temperatura

in vivo à qual se pretende usar a formulação ou abaixo dela, bem como à temperatura à qual se pretende armazenar a formulação ou abaixo dela.

Os lípidos neutros de libertação lenta úteis no novo método desta invenção são, por exemplo, a trioleína, tripalmitoleína, trimiristoleína, trilaurina, e a tricaprina, sendo a trioleína a mais preferida. Lípidos neutros de libertação rápida úteis incluem, p. ex., a tricaprilina e a tricaproína, e misturas das mesmas. Porém, a tricaproína e outros lípidos semelhantes, não são normalmente usados como o único lípido neutro numa formulação de lipossomas multivesiculares destinados a uso *in vivo*.

Numa outra forma de realização, a presente invenção fornece uma composição lipossomal que compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto biologicamente ativo encapsulado numa formulação lipossomal multivesicular, em que a formulação compreende um componente lipídico neutro compreendendo uma razão molar de lípido neutro de libertação lenta para lípido neutro de libertação rápida de cerca de 1:1 a 1:100, por exemplo de cerca de 1:3 a 1:54, 1:4 a 1:27, ou de cerca de 1:4 a 1:18.

Ainda numa outra forma de realização, a invenção apresenta um método para selecionar uma formulação lipossomal multivesicular para encapsular um composto biologicamente ativo selecionado de modo a se obter um perfil de velocidades de libertação desejado do composto ativo *in vitro* e/ou uma velocidade de libertação terapêutica desejada *in vivo*. Nesta forma de realização da invenção é preparada uma família de formulações de MVL que encapsulam

o composto biologicamente ativo selecionado, em que cada membro da família utiliza um componente lipídico neutro com uma razão molar lípido neutro lento:rápido diferente, geralmente no intervalo de 1:0 a 0:1. Por exemplo, pode preparar-se uma família de formulações utilizando razões molares de lípido neutro lento:rápido de 1:0, 1:1, 1:4, 1:18, 1:27, 1:100, 0:1. Cada membro da família de formulações é incubado no meio em que se pretende obter a velocidade de libertação desejada, isto é, num meio de armazenamento à temperatura de armazenamento ou em plasma humano, num meio do tipo plasma, ou num meio fisiológico no qual se pretende que a substância fisiologicamente ativa seja libertada, tal como fluido cérebro-espinhal (CSF) à temperatura do corpo. Deste modo é obtido um perfil de velocidades de libertação para cada formulação. Depois seleciona-se a formulação com razão lípido neutro lento:rápido que origina o perfil de velocidades de libertação desejado nas condições desejadas para a substância biologicamente ativa selecionada.

Salvo definição em contrário, todos os termos técnicos e científicos usados neste documento têm o mesmo significado que habitualmente entendido por um perito na técnica à qual esta invenção pertence. Embora possam ser usados métodos e materiais semelhantes ou equivalentes aos descritos neste documento na prática ou ensaios da presente invenção, os métodos e materiais preferidos são descritos abaixo.

A prática desta invenção proporciona a vantagem de uma formulação de lipossomas multivesiculares poder ser selecionada de modo a ter uma libertação relativamente rápida *in vivo* que não comprometa o desejo de libertação lenta nas condições de armazenamento. O método da invenção,

por conseguinte, proporciona uma base racional para se obter uma velocidade de libertação desejada através da seleção do componente lipídico neutro usado no fabrico dos MVL sem comprometer o desejo da formulação ter uma velocidade lenta nas condições de armazenamento. Adicionalmente, o controlo da velocidade de libertação em condições *in vivo* opera mais ou menos independentemente da composição da fase aquosa encapsulada ou da combinação dos outros lípidos nas formulações.

Esta descoberta é específica dos lipossomas multivesiculares, uma vez que outros tipos de lipossomas não contêm lípidos neutros no componente lipídico e/ou não incorporam os lípidos neutros em vesículas não concêntricas, compactadas.

Outras características e vantagens da invenção serão evidentes a partir da descrição detalhada que se segue, e a partir das reivindicações.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 é um gráfico que compara as velocidades de libertação do fator de estimulação de colónias de granulócitos humano, recombinante (G-CSF rhu), de lipossomas multivesiculares (MVL) formulados com diferentes razões molares de trioleína para tricaprilina (V, 100:0; Δ , 50:50; o, 25:75; $\square$, 10:90; 0, 0:100) como lípido neutro quando incubados a 37 °C em plasma humano a 60% em solução salina.

A Figura 2 é um gráfico que mostra os resultados de um estudo farmacodinâmico que compara a duração da elevação dependente do G-CSF rhu no número de

leucócitos no sangue periférico de *hamsters* sírios dourados após a injeção subcutânea de 100 ug/kg de GM-CSF rhu em solução salina (∇), numa formulação de MVL com trioleína apenas 100:0 (o), numa pré-injeção de uma formulação de MVL com trioleína apenas solubilizada com Tween™ 20 (Δ), e numa formulação de MVL com tricapriline apenas 0:100 ($\square$).

A Figura 3 é um gráfico que compara as velocidades de libertação do GM-CSF rhu de MVL formulados com diferentes razões molares de trioleína para tricapriline (Δ , 100:0; o, 25:75; $\square$, 10:90) como lípidos neutros quando incubados a 37 °C em plasma humano a 60% em solução salina.

A Figura 4 é um gráfico que mostra um estudo farmacocinético de níveis de GM-CSF rhu em sangue venoso, amostras de plasma de ratinhos depois de uma injeção subcutânea de 1 mg/kg de GM-CSF rhu na formulação com MVL de trioleína apenas, 100:0, (o) e na formulação com MVL de trioleína:tricapriline 25:75 (D). O nível de GM-CSF rhu em plasma-EDTA foi determinado por ELISA. LOQ é o limite de quantificação.

A Figura 5 é um gráfico que mostra as velocidades de libertação do IGF-1 rhu de lipossomas multivesiculares formulados com vários triglicéridos como componente lipídico neutro quando incubados a 37 °C em plasma humano a 60% em solução salina. Os lípidos neutros usados no fabrico de MVL foram: ($\square$) trioleína, (o) tripalmitoleína, (Δ) tricapriline, (∇) trilaurina, e (0) tricaprina.

A Figura 6 é um gráfico que mostra os resultados de um estudo farmacocinético dos níveis do IGF-1 rhu em soro

de rato depois de injeção subcutânea de 6,25 mg/kg de IGF-1 rhu na formulação com MVL de tripalmitoleína (o) e na formulação com MVL de tricaprilina (Δ). O nível do IGF-1 rhu em soro foi determinado por ELISA.

A Figura 7 é um gráfico que mostra a libertação de insulina rhu e sacarose marcada com ^{14}C coencapsulante de MVL fabricados com o lípido neutro trioleína ou tricaprilina, quando incubados a 37 °C em soluções salinas contendo plasma humano a 60%. (D) sacarose retida por uma formulação com MVL de trioleína; (o) insulina retida por uma formulação com MVL de trioleína; (Δ) sacarose retida por uma formulação com MVL de tricaprilina; e (V) insulina retida por uma formulação com MVL de tricaprilina.

A Figura 8 é um gráfico que compara as velocidades de libertação de morfina de MVL formulados com diferentes razões molares de trioleína para tricaprilina como lípidos neutros quando incubados a 37 °C em plasma humano a 60% em solução salina. (D) trioleína:tricaprilina 10:0, 10 lotes; ($\odot$, o) trioleína:tricaprilina 1:4, 2 lotes; (Δ) trioleína:tricaprilina 1:9; (V) trioleína:tricaprilina 0:10.

A Figura 9 mostra os resultados de um estudo farmacocinético de formulações de morfina com MVL fabricados com diferentes razões molares de trioleína para tricaprilina, e injetadas no espaço epidural de cães Beagle. A libertação de morfina pelos MVL foi determinada medindo o nível de morfina no fluido cérebro-espinhal adjacente, separado por membrana dura. (0) 5 mg de morfina (sulfato) em solução salina; (V) 40 mg de morfina na formulação com MVL de

trioleína:tricaprilina 10:0; (o) 20 mg de morfina na formulação com MVL de trioileína:tricaprilina 1:4; (□) 20 mg de morfina na formulação com MVL de trioileína:tricaprilina 1:9; e (Δ) 20 mg de morfina na formulação com MVL de trioileína:tricaprilina 0:10.

A Figura 10 é um gráfico que resume numa transformação de Arrhenius os resultados de um estudo que determina o efeito da temperatura de armazenamento na velocidade de libertação de morfina de 2 lotes da formulação com MVL de trioileína:tricaprilina 1:9. Os MVL foram armazenados em solução salina normal a 4 °C, 26 °C, 37 °C, e 41 °C. As ordenadas representam a velocidade de libertação da morfina dos MVL expressa em termos da quantidade libertada por dia, como percentagem da quantidade total de morfina na suspensão de MVL; as abcissas representam $1/\text{temperatura de armazenamento} \times 10^4 \text{ (}^\circ\text{K)}^{-1}$.

A Figura 11 é um gráfico que mostra a citosina-arabonosídeo (AraC) retida em MVL incubados em plasma humano a 37 °C. As formulações com MVL usaram como componente lipídico neutro (□) trioileína apenas; (o) trioileína:tricaprilina, 1:4; (V) trioileína:tricaprilina, 1:9; (x) trioileína:tricaprilina, 1:18; (Δ) trioileína:tricaprilina, 1:27; e (0) tricaprilina apenas.

A Figura 12 é um gráfico que mostra o efeito da razão de lípido neutro na libertação da citosina-arabinosídeo de MVL incubados em plasma humano a 37 °C quando os MVL foram formulados com o componente fosfolipídico principal, DOPC, substituído por DSPC. As formulações foram (□) DOPC e trioileína apenas; (Δ) DOPC trioileína:tricaprilina, 1:9; (0) DOPC e

tricaprilina apenas; (o) DSPC e trioleína apenas; (V) DSPC, trioleína:tricaprilina 1:9; e (+) DSPC e tricaprilina apenas.

A Figura 13 é um gráfico que mostra o efeito da razão dos lípidos neutros na libertação de sacarose marcada com ^{14}C de MVL incubados em plasma humano a 37 °C quando os MVL foram formulados com o componente fosfolipídico principal, DOPC, substituído por DEPC. As formulações de DOPC foram (□) trioleína apenas; (Δ) trioleína:tricaprilina 1:9; e (o) tricaprilina apenas. As formulações da DSPC foram (V) trioleína apenas; (+) trioleína:tricaprilina, 1:9; e (0) tricaprilina apenas.

A Figura 14 é um gráfico que mostra o efeito de se usar tricaproína apenas como componente lipídico neutro ou em combinação com trioleína, na libertação de sacarose marcada com ^{14}C de MVL incubados em plasma humano a 37 °C. As formulações foram (o) trioleína apenas; (Δ) trioleína:tricaproína 1:4; (V) trioleína:tricaproína 1:9; (0) trioleína:tricaproína 1:18; e (+) tricaproína apenas.

A Figura 15 é um gráfico que mostra a libertação *in vitro* de um oligonucleótido 15-mer de MVL preparados com trioleína (□) ou tricaprilina (o) como lípido neutro. Os MVL foram incubados em fluido cérebro-espinhal de rato (CSF) a 37 °C.

A Figura 16 é um gráfico que mostra a libertação durante a incubação em plasma humano de sacarose marcada com ^{14}C , de MVL contendo também plasmídeo de E. coli PBR 322 e cloridrato de lisina. A libertação de sacarose foi usada como um indicador substituto da libertação de plasmídeo. Os MVL foram fabricados com (o) trioleína ou (Δ) tricaprilina como lípido neutro.

A Figura 17 é um gráfico que mostra a liberação de sacarose marcada com ^{14}C durante a incubação em plasma humano, de MVL fabricados com tripalmitoleína e tricaprilina como componentes lipídicos neutros. A razão de lípidos neutros usada nas formulações com MVL foram (o) tripalmitoleína apenas; (+) tripalmitoleína:tricaprilina 1:1; (0) tripalmitoleína:tricaprilina 1:2; (V) tripalmitoleína:tricaprilina 1:4; (Δ) tripalmitoleína:tricaprilina 1:9; e ($\square$) tricaprilina apenas.

A Figura 18 é um gráfico que mostra a quantidade de tetracaína que permanece no sítio da injeção subcutânea de ratinhos injetados com MVL contendo tetracaína, fabricados com um componente lipídico neutro de (*) trioleína; (X) trioleína:tricaprilina 10:90; (+) trioleína:tricaprilina 5:95; (0) trioleína:tricaprilina 2:98; (V) trioleína:tricaprilina 1:99; ou (o) tricaprilina.

As Figuras 19A-D são gráficos que mostram a liberação de compostos biologicamente ativos encapsulados em MVL durante o armazenamento em solução salina normal a temperaturas de 2-8 (nominal 4), 25, 32, e 37 °C. Os MVL foram fabricados com tricaprilina (Figuras 19A e 19C) ou tricaprina (Figuras 19B e 19D) como componente lipídico neutro, e com citosina-arabinosídeo (Figuras 19A e 19B) ou morfina, (Figuras 19C e 19D) como composto biologicamente ativo.

A Figura 20 é uma representação de Arrhenius dos gráficos nas Figuras 19A e 19B, que mostra a dependência da velocidade de liberação da citosina-arabinosídeo da temperatura de armazenamento, de MVL fabricados com ($\square$) tricaprilina, ponto de fusão (p.f.)

8 °C; ou (o) tricaprina, p.f. 31,5 °C, como componente lipídico neutro. As abcissas é o inverso da temperatura de armazenamento, °K.

DESCRIÇÃO DETALHADA

É fornecido um método para modificar a velocidade de libertação de um composto biologicamente ativo, tal como um fármaco, encapsulado numa formulação lipossomal multivesicular por seleção do lípido neutro, ou de uma combinação de lípidos neutros, usados para fabricar os lipossomas multivesiculares (MVL).

Existem pelo menos três tipos de lipossomas. O termo "lipossomas multivesiculares (MVL)", tal como usado ao longo da especificação e das reivindicações, designa partículas de 1-200 µm, artificiais, parcialmente constituídas por membranas lipídicas englobando múltiplas câmaras aquosas não concêntricas. Em contraste, as "vesículas ou lipossomas multilamelares" (MLV) têm múltiplas membranas concêntricas "casca de cebola", entre as quais existem compartimentos aquosos concêntricos do tipo concha. Os lipossomas multilamelares possuem caracteristicamente diâmetros médios na gama dos micrómetros, normalmente de 0,5 a 25 µm. O termo "lipossomas ou vesículas unilamelares (ULV)", tal como usado neste documento, refere-se a estruturas lipossomais com uma única câmara aquosa, normalmente com uma gama de diâmetros médios de cerca de 20 a 500 nm.

Os lipossomas multilamelares e unilamelares podem ser preparados por vários métodos relativamente simples. O estado da técnica descreve várias técnicas para produzir

ULV e MLV (por exemplo Patente U.S. N° 4,522,803 para Lenk; 4,310,506 para Baldeschweiler; 4,235,871 para Papahadjopoulos; 4,224,179 para Schneider, 4, 078, 052 para Papahadjopoulos; 4, 394, 372 para Taylor 4,308,166 para Marchetti; 4,485,054 para Mezei; e 4,508,703 para Redziniak).

Em contraste, a produção de lipossomas multivesiculares requer várias etapas processuais. Resumidamente, o método preferido para fabricar MVL é tal como se segue: a primeira etapa consiste em preparar uma emulsão "água-em-óleo" capturando num componente lipídico composto por pelo menos um lípido anfipático e pelo menos um lípido neutro, num ou mais solventes orgânicos voláteis para o componente lipídico, um primeiro componente aquoso imiscível e uma substância biologicamente ativa que se pretende encapsular, e adicionando opcionalmente, a um ou ambos os componentes lipídicos e ao primeiro componente aquoso, um ácido ou outro excipiente para modular a velocidade de libertação das substâncias biologicamente ativas encapsuladas dos MVL. A mistura é emulsionada e depois misturada com um segundo componente aquoso imiscível, para formar uma segunda emulsão. A turbulência requerida para formação da segunda emulsão é fornecida mecanicamente, por energia ultrassónica, atomização por bicos e semelhantes, ou por combinações das mesmas, para formar esférulas de solvente suspensas no segundo componente aquoso. As esférulas de solvente contêm múltiplas gotículas aquosas com a substância a ser encapsulada nelas dissolvida (ver Kim *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta*, 728:339-348, 1983). Para uma revisão abrangente de vários métodos de preparação de ULV e MLV, refira-se Szoka, *et al.*, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 9:465-508, 1980.

O termo "esférula de solvente", tal como usado ao longo da especificação e das reivindicações, designa uma gotícula esferoide microscópica de solvente orgânico, dentro da qual estão múltiplas gotículas mais pequenas de solução aquosa. As esférulas de solvente estão suspensas e totalmente imersas numa segunda solução aquosa.

O termo "lípidio neutro" designa um óleo ou gordura que não tem qualquer capacidade de formação de membranas por si mesmo, e que carece de um grupo "principal" hidrofílico.

O termo "lípidio anfipático" designa uma molécula que tem um grupo "principal" hidrofílico e um grupo de "cauda" hidrofóbico, e que possui capacidade de formação de membranas.

O termo "lípidio zwitteriónico" designa um lípidio anfipático com uma carga global de zero a pH 7,4.

O termo "lípidio aniónico" designa um lípidio anfipático com uma carga negativa global a pH 7,4.

O termo "lípidio catiónico" designa um lípidio anfipático com uma carga positiva global a pH 7,4.

Tal como aqui utilizado, a "vida útil" de uma formulação lipossomal está relacionada com a velocidade de libertação da substância encapsulada de uma formulação lipossomal numa solução de armazenamento, por exemplo numa solução salina normal (cloreto de sódio a 0,9%), a uma temperatura de armazenamento, por exemplo a 4 °C.

Em geral, para se preparar lipossomas multivesiculares, é necessário que pelo menos um lípido anfipático e um lípido neutro sejam incluídos no componente lipídico. Os lípidos anfipáticos podem ser lípidos zwitteriônicos, aniônicos, ou cationicos. Exemplos de lípidos anfipáticos zwitteriônicos são as fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas, esfingomielinas, etc. Exemplos de lípidos anfipáticos aniônicos são os fosfatidilgliceróis, fosfatidilserinas, fosfatidilinositóis, ácidos fosfatídicos, etc. Exemplos de lípidos anfipáticos cationicos são o diaciltrimetilamoniopropano e a etilfosfatidilcolina. Exemplos de lípidos neutros são a trioleína e a tripalmitoleína, a trimiristoleína e a tricaprilina. No novo método, a velocidade de libertação do composto biologicamente ativo é modificada pela utilização no fabrico dos lipossomas multivesiculares de um componente lipídico neutro que proporciona a velocidade de libertação desejada no tipo de fluido em que se pretende usar os MVL. Para a utilização *in vivo*, por conseguinte, a velocidade de libertação dos MVL tem que ser determinada em plasma ou num meio do tipo plasma, porque a velocidade de libertação do composto biologicamente ativo dos MVL para certos lípidos neutros pode diferir bastante dependendo de se a libertação é em solução salina ou em plasma.

Tal como usado neste documento, o termo "componente lipídico neutro" designa o lípido neutro, ou a mistura de lípidos neutros usada no fabrico dos lipossomas multivesiculares.

Tal como usado neste documento, o termo "meio do tipo plasma", designa uma solução sintética que inclui, para além da solução salina normal, pelo menos alguns dos

constituintes proteicos ou lipídicos do plasma sanguíneo ou componentes de outros fluidos biológicos, tais como o fluido cérebro-espinhal (CSF), ou fluidos intestinais. Por exemplo, uma solução salina normal contendo plasma humano citrado ou albumina de soro bovino (BSA) é um exemplo de um "meio do tipo plasma" tal como o termo é usado neste documento.

O termo "condições *in vivo*" designa a injeção ou colocação efetiva de MVL num corpo vivo, e inclui a chamada incubação "ex vivo" de MVL em plasma ou num meio do tipo plasma à temperatura do corpo (isto é, a 37 °C para humanos).

Embora o componente lipídico neutro possa compreender um único lípido neutro, geralmente o componente lipídico neutro compreende uma mistura de um lípido neutro de libertação lenta e de um lípido neutro de libertação rápida num intervalo de razões molares de cerca de 1:1 a 1:100, p. ex. de cerca de 1:4 a 1:18, em que a velocidade de libertação do composto biologicamente ativo diminui proporcionalmente ao aumento da razão lípido neutro de libertação lenta para lípido neutro de libertação rápida. Por conveniência, a razão molar do lípido neutro de libertação lenta para o lípido neutro de libertação rápida é referida neste documento como "razão molar de lípido neutro lento:rápido".

O "lípido neutro de libertação lenta" usado na prática desta invenção pode ser selecionado de entre triglicéridos com unidades éster de ácidos gordos monoinsaturados contendo de cerca de 14 a 18 carbonos na cadeia acíclica e que têm geralmente um peso molecular de cerca de 725 a 885, e aqueles com unidades éster de ácidos gordos saturados

contendo de cerca de 10 a 12 carbonos na cadeia acíclica e que têm geralmente um peso molecular de cerca de 725 a 885, e misturas dos mesmos. Ésteres de colesterol tais como o oleato de colesterol e ésteres de propilenoglicol. Os lípidos neutros de libertação lenta preferidos para uso no método desta invenção são a trioleína, tripalmitoleína, trimiristoleína, trilaurina, e tricaprina, sendo a trioleína ou a tripalmitoleína os mais preferidos. Quando se contempla o uso *in vivo*, usam-se geralmente na prática desta invenção a trilaurina e outros lípidos neutros com um ponto de fusão acima de 37 °C, apenas em mistura com um ou mais lípidos neutros, em que a mistura tem uma temperatura de fusão de 37 °C ou inferior, e preferencialmente inferior. Um perito na técnica saberá como determinar o ponto de fusão de uma mistura de lípidos, tal como uma mistura de triglicéridos.

O "lípido neutro de libertação rápida" usado na prática desta invenção pode ser selecionado de entre triglicéridos com unidades éster de ácidos gordos monoinsaturados contendo de cerca de 6 a 8 carbonos na cadeia acíclica e que têm um peso molecular de cerca de 387 a 471, e misturas dos mesmos. No entanto, foi descoberto surpreendentemente que o uso de um componente lipídico neutro em MVL contendo um ou mais lípidos neutros com uma cadeia acíclica de seis ou menos carbonos (especialmente o uso de tricaproína como o único lípido neutro) resulta em libertação rápida dos compostos encapsulados por contacto com o ambiente *in vivo*. Por conseguinte, os lípidos neutros com uma cadeia acíclica de seis ou menos carbonos devem ser usados apenas em combinação com um ou mais lípidos neutros com uma unidade acíclica de cadeia mais longa. Os lípidos neutros de libertação rápida preferidos são a tricaprilina, e misturas

de tricaprilina e tricaproína, ou triglicéridos de cadeia mista C₆ a C₈. Os diésteres de propilenoglicol com unidades acílicas de oito ou dez carbonos, oleato de colesterol e octanoato de colesterol, podem também ser usados como lípidos neutros.

Um fator de importância igual à razão molar de lípidos neutros é a seleção de um componente lipídico neutro com um ponto de fusão abaixo da temperatura à qual se pretende armazenar e usar os MVL. Uma vez que muitos compostos biologicamente ativos altamente desejáveis em aplicações terapêuticas requerem uma temperatura de armazenamento baixa para prevenir a deterioração rápida, o componente lipídico neutro deve ser selecionado de modo a ter um ponto de fusão abaixo da temperatura de armazenamento desejada, bem como abaixo da temperatura à qual a formulação será usada *in vivo*.

Os resultados dos testes de temperaturas de armazenamento foram determinados por inspeção das partículas microscopicamente, e medindo por ensaios químicos as quantidades de material encapsulado libertado. Tal como se vê nestes estudos (Figura 20), os MVL armazenados a uma temperatura acima do ponto de fusão do componente lipídico neutro sofrem uma reorganização estrutural das membranas, isto é, em alguns casos, acompanhada de libertação rápida ("dumping") do conteúdo encapsulado. Este fenómeno é referido neste documento como "efeito do ponto de fusão". O tempo para o início do efeito do ponto de fusão depende da composição dos lípidos neutros e dos ingredientes da fase aquosa encapsulada. Certos compostos encapsulados, tais como a IL-2, parecem interagir com MVL de um modo tal que atrasam em horas ou mesmo dias, o começo do "congelamento"

a temperaturas abaixo do ponto de fusão do lípido neutro, influenciando talvez a formação nos MVL de um estado intermediário "meta-estável". No entanto, mesmo formulações com um tal início retardado sofrem eventualmente a transição morfológica característica do efeito do ponto de fusão. Os Exemplos 15 e 16 abaixo ilustram o efeito do ponto de fusão nas velocidades de libertação de compostos biologicamente ativos encapsulados de MVL armazenados a uma temperatura abaixo do ponto de fusão (Figuras 19A-D e 20). Para distinguir entre os dois estados de transição morfológica, o efeito de início retardado é referido neste documento como "o efeito da temperatura".

Na seleção do componente lipídico neutro de acordo com a prática desta invenção, é geralmente preferido que o componente lipídico neutro tenha um ponto de fusão à temperatura à qual se pretende armazenar e usar os MVL ou abaixo dela (para prevenir a perda rápida do composto ativo encapsulado durante o armazenamento ou durante o uso *in vivo*) devido ao efeito do ponto de fusão. A temperatura do ponto de fusão de um componente lipídico neutro compreendendo uma mistura de lípidos neutros, e assim a temperatura do efeito do ponto de fusão nos MVL contendo o componente lipídico neutro, pode ser prontamente determinada preparando a mistura de interesse e submetendo-a progressivamente a temperaturas mais baixas até que se observe que a mistura "congela". Um método de realizar este procedimento é divulgado em J. B. Rossell, *Advances in Lipid Research*, 5:353-408, 1967. Um perito na técnica estará consciente de outras aproximações que podem ser usadas para se obter esta informação. No entanto, deve ser lembrado que o efeito do ponto de fusão na formulação lipossomal como um todo pode ser influenciado pelos outros

lípidos nos MVL, bem como pelos ingredientes na primeira solução aquosa.

A Tabela 1 abaixo lista o número de carbonos nas cadeias acílicas, o peso molecular, e as temperaturas dos pontos de fusão de lípidos neutros representativos que podem ser usados na prática desta invenção.

Tabela 1

Propriedades Físicas de Lípidos Neutros				
Lípido neutro	Éster de Ácido Gordo	Peso Molec.	Viscosidade cP	P.F. °C
Triglicéridos				
Trioleína	C18:1 9C	885	74	5
Tripalmitoleína	C16:1 9C	801		≤ 5
Trimiristoleína	C14:1 9C	725	≤5	
Trilaurina	C12	639		45,5
Tricaprina	C10	555		31,5
Tricaprilina	C8	471	20-28	8,3
Tricaproína	C6	387		≤ 0
Captex 355	C8, C10 misto	Média 496		≤ 5
Diéster de Propilenoglicol				
Captex 200	C8, C10 misto	Média 345	9-13	≤ 5

(continuação)

Propriedades Físicas de Lípidos Neutros
--

Lípido neutro	Éster de Ácido Gordo	Peso Molec.	Viscosidade cP	P.F. °C
Éster de Colesterol				
Oleato de Colesterol	C18:1 9C	651		44-47
Octanoato de Colesterol	C8	512		110

Num método da invenção, a velocidade de libertação do composto biologicamente ativo é modificada por utilização no fabrico dos lipossomas multivesiculares, de um componente lipídico neutro que compreende trioleína ou tripalmitoleína, ou uma mistura das mesmas, como lípido neutro de libertação lenta, e por seleção de uma razão molar lípido neutro de libertação lenta para lípido neutro de libertação rápida no intervalo de cerca de 1:0 a 0:1. A velocidade de libertação do composto ativo aumenta com o aumento da proporção do lípido neutro de libertação rápida na razão molar. Em geral, a razão molar entre o componente lipídico neutro e a soma de todos os lípidos na formulação com MVL encontra-se no intervalo de cerca de 0,01 a cerca de 0,21. O lípido neutro de libertação rápida preferido para uso em tais formulações com trioleína e/ou tripalmitoleína é a tricaprilina.

Para além do efeito do ponto de fusão, para o qual contribui em parte o componente lipídico neutro, as características da fase aquosa encapsulada nos MLV, em particular a interação química do composto ativo com os lípidos nos MVL, podem também influenciar a velocidade de libertação do composto biologicamente ativo. Para tomar

este fator adicional em consideração durante a formulação, numa forma de realização, esta invenção proporciona um método para adaptar o componente lipídico neutro à fase aquosa de interesse.

Na primeira etapa do método, para determinar como o componente lipídico neutro funciona com qualquer fase aquosa específica (isto é, uma contendo um composto biologicamente ativo de interesse), prepara-se uma família de formulações com MVL contendo a fase aquosa de interesse, em que cada membro da família de formulações contém uma diferente razão molar de lípido neutro de libertação lenta:rápida dos lípidos neutros de libertação lenta e rápida selecionados, de tal modo que a família, como um todo, representa uma progressão gradual de tais razões, por exemplo 1:1, 1:2, 1:4, 1:9, 1:18, 1:27, 1:100, etc.

As velocidades de libertação *in vivo* correspondentes às várias razões molares lípido neutro lento:rápido incorporadas nos membros individuais da família de formulações com MVL são determinadas incubando separadamente cada membro da família *in vitro* em plasma ou num meio do tipo plasma à temperatura *in vivo*, isto é, 37 °C para humanos, durante um período de horas, ou mesmo dias.

Qualquer um dos métodos ilustrados nos Exemplos, ou outros conhecidos dos peritos na técnica, pode ser usado para determinar em pontos do tempo progressivos a quantidade acumulada de uma ou mais substâncias encapsuladas com a fase aquosa que tenha(m) sido libertada(s) durante a incubação. Para facilitar a realização desta determinação, pode incluir-se na fase aquosa na altura da encapsulação,

uma substância radioativa, tal como sacarose marcada com ^{14}C . No entanto, é preferível selecionar o composto biologicamente ativo de interesse como a substância cuja velocidade de libertação é monitorizada e registada. É recomendado que a informação sobre a velocidade de libertação seja obtida desta maneira para cada membro da família de formulações a ser testada.

A partir da informação sobre a velocidade de libertação determinada por este procedimento, pode representar-se um gráfico que mostra uma curva de libertação, ou "perfil de velocidades de libertação" para cada membro da família de formulações, para mostrar as suas características individuais de libertação *in vivo*, em que as ordenadas do gráfico indicam a quantidade acumulada da substância de interesse que foi libertada ou retida, e as abcissas indicam os pontos de tempo progressivos nos quais a quantidade libertada ou retida é medida. Gera-se assim uma família de curvas de velocidades de libertação correspondente, em que cada curva da família ilustra as características de libertação da sua correspondente razão molar lípido neutro lento:rápido quando usada com a fase aquosa a ser testada.

O perito na técnica pode então selecionar a formulação com as características de libertação mais desejáveis para a aplicação terapêutica particular de interesse, para se obter o controlo desejado sobre a libertação da substância de interesse (isto é, um composto biologicamente ativo), de modo a libertar uma quantidade terapeuticamente eficaz do composto ativo no indivíduo ao qual se pretende administrar a formulação com MVL. Um perito na técnica pode assim selecionar uma formulação com MVL, em particular uma com a

razão molar lípido neutro lento:rápido mais vantajosa, para administrar uma dose terapeuticamente eficaz ao longo do período de tempo ótimo, de modo a maximizar o efeito terapêutico do fármaco ou de outro composto biologicamente ativo administrado durante a terapia.

Por exemplo, se se desejar produzir uma formulação com MVL que liberte um composto ativo particular *in vivo* num período de tempo relativamente curto, isto é, ao longo de várias horas após a administração, seleciona-se o componente lipídico neutro que dá origem a uma curva de libertação indicando tais características de libertação quando armazenado *in vitro* em plasma, ou numa composição do tipo plasma, a cerca de 37 °C. A proporção do lípido neutro de libertação rápida na razão será comparativamente grande nesta circunstância. Por outro lado, quando se deseja produzir uma formulação com MVL que liberte o seu composto ativo *in vivo* ao longo de um período de tempo relativamente longo, isto é, ao longo de dezenas de horas depois da administração, mesmo até 200 horas após administração, seleciona-se o componente lipídico neutro que dá origem a uma curva de libertação indicando tais características de libertação quando incubado em condições *in vivo*. Neste caso, a proporção do lípido neutro de libertação lenta na razão molar será comparativamente grande, e em alguns casos o componente lipídico neutro não conterá de todo qualquer lípido neutro de libertação rápida.

A estabilidade de vida útil das formulações deve também ser determinada por incubação das formulações no meio de armazenamento contemplado, a qualquer que seja a temperatura de armazenamento que seja necessária para assegurar a integridade do composto biologicamente ativo

durante um período de tempo adequado. Por conveniência, os testes de estabilidade de vida útil podem também ser conduzidos em plasma ou em meio do tipo plasma, mas um perito na técnica será capaz de substituir um meio de armazenamento adequado diferente, tal como solução salina normal, para uso com o composto biologicamente ativo de interesse, se desejado. Uma vez que muitos compostos biologicamente ativos requerem armazenamento a temperaturas no intervalo de cerca de 2 a 8 °C, é recomendado que os testes de estabilidade de vida útil sejam conduzidos a uma temperatura neste intervalo.

Estes procedimentos são ilustrados nos Exemplos deste pedido. Por exemplo, em formulações contendo misturas de trioleína e tricaprilina, quando o componente lipídico neutro foi mantido constante e foram feitos aumentos graduais na razão de trioleína para tricaprilina, foram obtidas formulações com MVL caracterizadas por uma libertação cada vez mais lenta, tal como ilustrado no Exemplo 14 (Figura 18). No Exemplo 13, preparou-se uma família graduada de formulações encapsulando sacarose e lisina-HCl, e contendo misturas de tripalmitoleína e tricaprilina. Criou-se uma família graduada de formulações com razões molares tripalmitoleína:tricaprilina de 0:1, 1:0, 1:9, 1:4, 1:2, e 1:1, mantendo constante a quantidade de tripalmitoleína e fazendo aumentos graduais na quantidade de tricaprilina. Neste Exemplo, foi obtida uma libertação cada vez mais rápida para cada aumento gradual na proporção de tricaprilina no componente lipídico neutro.

Deve notar-se em particular que, de forma diferente da maior parte de outros tipos de lipossomas, as características exatas de libertação *in vivo* no que diz

respeito a formulações com MVL não podem ser previstas a partir de estudos de libertação *in vitro* conduzidos em solução salina. Por exemplo, MVL formulados com tricaproína, um triglicérido apenas com 6 carbonos nas suas unidades acílicas, como único lípido neutro não foram estáveis em condições *in vivo* (em soluções contendo plasma ou albumina do soro a 37 °C, mas foram estáveis nas condições de armazenamento (em solução salina a 2-8 °C até uma semana). No entanto, as formulações contendo razões molares tricaproína:trioleína de 4:1, 9:1, e 18:1 foram estáveis em condições *in vivo* durante pelo menos 4 dias, e deram origem a um conjunto graduado de curvas de velocidades de libertação (Figura 14).

Numa outra forma de realização, a presente invenção proporciona composições lipossomais que compreendem uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto biologicamente ativo encapsulado numa formulação com lipossomas multivesiculares, em que a composição compreende um componente lipídico neutro com uma razão molar entre o lípido neutro de libertação lenta e o lípido neutro de libertação rápida no intervalo de razões molares de cerca de 0:1 a 1:0, por exemplo de 1:1 a 1:100, e em geral de cerca de 4:1 a 27:1. A razão molar do componente lipídico neutro para a soma dos lípidos na formulação com MVL encontra-se geralmente no intervalo de cerca de 0,01 a cerca de 0,21.

Os lípidos anfipáticos preferidos para uso na preparação de lipossomas multivesiculares são fosfolípidos com números pares de carbonos na cadeia carbonada, porque esses fosfolípidos são lípidos naturais encontrados no corpo e não produzem metabolitos tóxicos. Segue-se uma lista

representativa de lípidos anfipáticos preferidos para uso na prática desta invenção. Incluem-se também abreviaturas que podem ser usadas para fazer referência a fosfolípidos particulares neste pedido.

DOPC ou DC18:1PC = 1,2-di-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina

DLPC ou DC12:0PC = 1,2-di-lauroil-*sn*-glicero-3-fosfocolina

DMPC ou DC14:0PC = 1,2-di-miristoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina

DPPC ou DC16:0PC = 1,2-di-palmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina

DSPC ou DC18:0PC = 1,2-di-stearoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina

DAPC ou DC20:0PC = 1,2-di-araquidoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina

DBPC ou DC22:0PC = 1,2-di-behenoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina

DC16:1PC = 1,2-di-palmitoleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina

DC20:1PC = 1,2-di-eicosenoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina

DEPC ou DC22:1PC = 1,2-di-erucoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina

DPPG = 1,2-di-palmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol

DOPG = 1,2-di-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol

O termo "composto biologicamente ativo", tal como usado neste documento, designa um composto químico que é conhecido na técnica como tendo utilidade para modular processos biológicos de modo a se alcançar um efeito desejado em modulação ou tratamento de uma condição patológica indesejável existente num ser humano, tal como um efeito médico, agrícola ou cosmético. Assim, os compostos biologicamente ativos são geralmente selecionados de entre as amplas categorias de medicamentos, fármacos, radioisótopos, produtos agrícolas e cosméticos.

Os compostos ou fármacos terapêuticos biologicamente ativos para encapsulação nos métodos e composições desta invenção incluem agentes antineoplásicos, agentes anti-infecciosos,

hormonas, antidepressivos, agentes antivirais, agentes antinocicetivos, ansiolíticos e agentes biológicos.

Exemplos representativos de agentes antineoplásicos úteis nas composições e métodos da presente invenção incluem o metotrexato, fator de necrose tumoral, clorambucil, interleucinas, etoposídeo, citarabina, fluorouracilo e vimblastina.

Exemplos representativos de agentes anti-infeciosos úteis nas composições e métodos da presente invenção incluem a pentamidina, metronidazol, penicilina, cefalexina, tetraciclina e o cloranfenicol.

Exemplos representativos de agentes antivirais úteis nas composições e métodos da presente invenção incluem a didesoxicitidina, zidovudina, aciclovir, interferões, didesoxiinosina e o ganciclovir.

Exemplos representativos de ansiolíticos e sedativos úteis nas composições e métodos da invenção incluem as benzodiazepinas tais como o diazepam, barbituratos tais como o fenobarbital, e outros compostos tais como a buspirona e o haloperidol.

Exemplos representativos de hormonas úteis nas composições e métodos da presente invenção incluem o estradiol, prednisona, insulina, hormona do crescimento, eritropoietina e prostaglandinas.

Exemplos representativos de antidepressivos úteis nas composições e métodos da presente invenção incluem a fluoxetina, trazodona, imipramina e a doxepina.

Exemplos representativos de agentes antinocicetivos úteis nas composições e métodos da presente invenção incluem a hidromorfina, oxicodona, fentanilo, morfina e a meperidina.

O termo "agentes biológicos" engloba ácidos nucleicos (DNA e RNA), proteínas e péptidos, e inclui compostos tais como as citocinas, hormonas (hormonas pituitária e hipofisária), fatores de crescimento, vacinas, etc. São de particular interesse a interleucina-2, fator de crescimento do tipo insulina 1, interferões, insulina, heparina, leuprolida, fator de estimulação de colónias de granulócitos (GCSF), fator estimulante de colónias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), fator de necrose tumoral, inibina, fator de crescimento tumoral alfa e beta, substância inibidora Mülleriana, calcitonina, e vacina da hepatite B.

O composto biologicamente ativo pode ser empregado na presente invenção em várias formas, tais como complexos moleculares ou sais biologicamente aceitáveis. Exemplos representativos de tais sais são o succinato, cloridrato, bromidrato, sulfato, fosfato, nitrato, borato, acetato, maleato, tartarato, salicilato, sais de metais (p. ex. alcalinos ou alcalinoterrosos), sais de amónio ou de aminas (p. ex. amónio quaternário), e outros semelhantes. Adicionalmente, podem também ser empregados derivados das substâncias ativas tais como ésteres, amidas, e éteres, que têm características de retenção e de libertação desejáveis, mas que são prontamente hidrolisáveis *in vivo* pelo pH fisiológico ou enzimas.

Tal como usado neste documento, o termo "quantidade

terapeuticamente eficaz" designa a quantidade de um composto biologicamente ativo necessária para induzir um efeito farmacológico desejado. A quantidade pode variar muito de acordo com a eficácia de uma substância ativa particular, a idade, peso, e resposta do hospedeiro individual, bem como com a natureza e gravidade dos sintomas do hospedeiro. Consequentemente, não existe qualquer limitação crítica superior ou inferior à quantidade da substância ativa. A quantidade terapêuticamente eficaz a ser empregada na presente invenção pode ser determinada prontamente pelos peritos na técnica.

Acredita-se que o componente lipídico neutro nos MVL, que é exclusivo dos MVL entre as formulações lipossomais, interage com o ambiente *in vivo* de um modo tal que afeta a velocidade à qual os compostos encapsulados nos MVL são libertados. Em particular, os MVL com um componente lipídico neutro constituído por triglicéridos com menos de 6 carbonos na unidade acíclica interagem com o ambiente *in vivo* de modo a se tornarem completamente desestabilizados virtualmente depois de contacto com plasma sanguíneo. Por esta razão, as soluções salinas não imitam com exatidão o efeito do ambiente *in vivo* nas características de libertação do fármaco de MVL, mas foi descoberto que estudos de libertação *in vitro* conduzidos usando plasma sanguíneo ou um meio do tipo plasma, podem ser usados para determinar com exatidão as características de libertação *in vivo* de uma formulação com MVL.

Os exemplos que se seguem ilustram o modo segundo o qual se pode praticar a invenção no entanto, que os exemplos são para a finalidade de

Exemplo 1

MVL contendo G-CSF

1. Fabrico

Para o fabrico de lipossomas multivesiculares (MVL) contendo o fator de estimulação de colónias de granulócitos (G-CSF), a solução de combinação de lípidos continha (por mL de clorofórmio): 11 mg de DOPC, 2,3 mg de DPPG, 8,7 mg de colesterol e 2,4 mg (2,7 μmol) de trioleína ou 1,3 mg (2,7 μmol) de tricaprilina. As soluções de lípidos que continham quatro razões molares diferentes dos lípidos neutros trioleína e tricaprilina foram preparadas misturando volumes apropriados das soluções de lípidos contendo trioleína e tricaprilina. As razões molares de trioleína para tricaprilina foram de 100:0, 50:50, 25:75, 10:90, e 0:100.

A primeira solução de fase aquosa para formulações com MVL continha glicina 174 mM, HCl 100 mM, Tween80™ a 0,001%, e G-CSF a 100 $\mu\text{g/mL}$; adicionou-se 1 mL a um frasco contendo 1 mL da combinação de lípidos e emulsionou-se fixando o frasco tapado numa configuração horizontal na direção da cabeça de um misturador de vórtice (Scientific Products) e agitando à velocidade máxima (2400 oscilações/min.) durante 6 minutos.

A emulsão final (2 mL) foi dividida e transferida para dois frascos contendo 2,5 mL de glicose a 3,2% e lisina 40 mM. A emulsão foi dispersada em gotículas microscópicas fixando o frasco tapado numa configuração horizontal na direção da

cabeça de um misturador de vórtice e agitando durante 3 segundos a 2400 oscilações/min. O conteúdo dos frascos foi transferido para um frasco contendo 5 mL da glicose a 3,2%, lisina 40 mM. Removeu-se o clorofórmio das gotículas ou esférulas microscópicas transferindo o frasco para um banho de água girorrotativo a 37 °C e fazendo passar azoto gasoso sobre a superfície da suspensão a um caudal de 10-15 cfh (do inglês "cubic feet per hour" = pés cúbicos por hora) durante 10 minutos. Obtiveram-se lipossomas multivesiculares em suspensão contendo G-CSF encapsulado.

As suspensões de partículas foram diluídas de 1:4 com solução salina normal, e as partículas foram recolhidas por centrifugação a 800 X g durante 10 minutos. A solução sobrenadante foi removida por aspiração, e as partículas foram lavadas duas vezes por ressuspensão em solução salina normal fresca e centrifugação. O produto final lavado foi ressuspensão a 25% de volume de partículas empacotadas por volume total, e armazenado a 2-8 °C para estudos posteriores.

2. Velocidade de libertação *in vitro*

A velocidade de libertação *in vitro* dos MVL preparados tal como descrito acima foi determinada por incubação em soluções salinas contendo plasma humano citrado a 70% e azida de sódio a 0,1% a 37 °C. O G-CSF foi determinado na fração de partículas recolhidas por centrifugação, por solubilização das amostras em IPA a 50%, e quantificação por cromatografia líquida de alta pressão e detecção por UV usando métodos conhecidos.

A dependência da velocidade de libertação *in vitro* do G-CSF

da composição do componente lipídico neutro usado no fabrico dos lipossomas multivesiculares é mostrada na Figura 1. À medida que a razão molar entre a trioleína e a tricaprilina foi aumentada, a velocidade de libertação do G-CSF dos lipossomas multivesiculares diminuiu.

3. Velocidade de libertação *in vivo*

As formulações de G-CSF com MVL de trioleína e tricaprilina foram avaliadas num modelo farmacodinâmico em *Hamsters* Sírios Dourados. O G-CSF exógeno estimula a produção de neutrófilos (granulócitos), que pode ser avaliada ensaiando amostras de sangue quanto a um aumento no número de neutrófilos no sangue periférico e, correspondentemente, a um aumento no número de leucócitos no sangue periférico.

Por conseguinte, as formulações contendo tricaprilina ou trioleína foram avaliadas quanto à libertação num modelo farmacodinâmico de *hamsters* que mediu o pico e a duração do excesso de produção de leucócitos (granulócitos) causados pelo G-CSF rhu (Cohen *et al.* 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:2484-2488). Nestes estudos, a injeção subcutânea de uma solução de G-CSF foi usada como controlo para a bioequivalência da proteína encapsulada. A formulação de libertação rápida contendo tricaprilina foi também usada como controlo para a bioequivalência da proteína encapsulada. Em primeiro lugar, comparou-se o pico e a duração do aumento de granulócitos por injeção subcutânea de *hamsters* com formulações contendo toda a tricaprilina (razão molar lento:rápido de 0:100), com os causados por uma solução de G-CSF não encapsulado e a formulação de trioleína de duração mais longa de libertação (razão molar lento:rápido de 100:0). Para cada formulação, 3 a 5

hamsters receberam 75-100 ug de G-CSF por kg. Os resultados (Figura 2), são tais como previstos pelos estudos de libertação *in vitro*. A formulação de tricapriline proporcionou uma libertação rápida de G-CSF e estimulou uma produção de granulócitos semelhante à da solução de G-CSF não encapsulado. A formulação de trioleína teve um pico mais baixo (e mais tardio) e de maior duração.

Como controlo adicional, injetou-se um grupo de *hamsters* com a formulação de trioleína solubilizada com detergente (Tween 20™) imediatamente antes da injeção. O número de granulócitos encontrado às 24 horas para a formulação solubilizada foi semelhante ao observado como resultado de injeções das soluções de G-CSF ou da formulação contendo apenas tricapriline como lípido neutro (Figura 2).

Exemplo 2

1. Fabrico

Os lipossomas multivesiculares contendo fator de estimulação de colónias de granulócitos/macrófagos (GM-CSF) foram fabricados tal como descrito no Exemplo 1, mas usando razões molares de lípido neutro trioleína para tricapriline de 100:0, 25:75 e 10:90.

2. Libertação *in vitro* em plasma humano a 37 °C

As suspensões foram preparadas e incubadas em plasma humano a 37 °C tal como descrito no Exemplo 1. O GM-CSF que permanece encapsulado foi determinado por solubilização da fração de partículas em IPA a 50%, e quantificação por cromatografia líquida de alta pressão e deteção com UV

usando métodos conhecidos.

Os resultados do ensaio de libertação *in vitro* (Figura 3) demonstram que a substituição gradual de trioleína por tricaprilina resulta em aumentos graduais da velocidade de libertação.

3. Farmacocinética *in vitro*

Administrou-se a ratinhos BALBc (com 7 a 8 semanas de idade e pesando aproximadamente 20 gramas) injeções subcutâneas de lipossomas contendo GM-CSF fabricados com trioleína a 100% ou uma razão de 25:75 de trioleína para tricaprilina. Recolheram-se amostras de sangue antes da injeção e a 1, 2, 4, e 7 dias depois da injeção, e ensaiou-se o plasma quanto à concentração de GM-CSF usando um *kit* ELISA. A formulação fabricada com 25:75 de trioleína para tricaprilina proporcionou um nível mais elevado do pico e uma duração mais curta do GM-CSF rhu detetável comparativamente à formulação fabricada com 100% de trioleína como lípido neutro (Figura 4). Estes resultados são tal como previstos pelo ensaio *in vitro* em plasma humano a 37 °C, e mostram que a velocidade de libertação do GM-CSF encapsulado aumenta por adição de tricaprilina ao componente lipídico neutro.

Exemplo 3

Depo/IGF-1

1. Fabrico

Os lipossomas multivesiculares foram fabricados com IGF rhu (fator de crescimento do tipo insulina humano recombinante), com sacarose marcada com ^{14}C como um espaçador osmótico, e citrato de amónio como tampão. A solução de combinação de lípidos continha (por litro) 10,4 g de DOPC, 2,1 g de DPPG, 7,7 g de colesterol, e o componente triglicérido consistiu em 2,1 g de trioleína, 1,9 g de tripalmitoleína, 1,5 g de trilaurina, 1,3 g de tricaprina, ou 1,1 g de tricaprilina (razão molar, 0,34:0,07:0,52:0,06).

A primeira solução de fase aquosa continha (por mL) 16 mg de IGF-1 rhu (Chiron), sacarose a 7%, e citrato de amónio 20 mM, pH 5. Preparou-se uma primeira solução misturando a alta velocidade 5 mL da solução de combinação de lípidos com 5 mL da solução de fase aquosa a 9000 rpm durante 9 minutos a 25-27 °C. A emulsão foi cisalhada em microgotículas (esférulas) por adição de 30 mL de lisina 40 mM, solução de glicose a 4% ao recipiente de mistura e misturando a 6000 rpm durante 1 minuto. O clorofórmio foi removido das gotículas ou esférulas microscópicas transferindo a suspensão para um frasco contendo 70 mL de lisina 40 mM, solução de glicose a 3,2%, colocando o frasco num banho de água girorrotativo a 37 °C, e fazendo passar azoto gasoso sobre a superfície da suspensão com um caudal de 70 cfh durante 20 minutos para se obter as partículas de MVL em suspensão.

As suspensões foram diluídas de 1:4 com solução salina

normal, e recolheram-se as partículas por centrifugação a 800 X g durante 10 minutos à temperatura ambiente. A solução do sobrenadante foi removida por aspiração, e lavagem das partículas duas vezes ressuspensando em solução salina normal fresca e centrifugação.

2. Velocidades de libertação *in vitro*

O produto final lavado foi ressuspensado a 25% de volume de partículas empacotadas por volume total e armazenado a uma temperatura de 2-8, 25, 32, ou 37 °C durante 24 ou 48 horas. A fração de pelotas da centrifugação a 25.000 X G X 2 minutos foi solubilizada e ensaiada por HPLC para o IGF-1 retido. Do mesmo modo, cada uma das formulações contendo IGF-1 armazenadas a 2-8 °C foi avaliada dentro de 24 horas no ensaio de libertação *in vitro* descrito no Exemplo 1 e os resultados estão resumidos na Figura 5. As formulações fabricadas com trioleína (C18:1) ou tripalmitoleína (C16:1) apresentaram um perfil de velocidades de libertação semelhante. Mais de 70% do IGF-1 encapsulado foi libertado em 7 dias. A formulação fabricada com tricapriline (C8) demonstrou ter um perfil de velocidades de libertação rápido, com libertação quase completa de IGF-1 em 2 dias. As formulações fabricadas com tricapriline (C10) ou trilaurina (C12) libertaram IGF-1 de forma nitidamente mais lenta do que a formulação de trioleína padrão, menos de 50% libertado em 7 dias. Estes resultados sugerem que o comprimento da cadeia acíclica do triglicérido não se correlaciona diretamente com a velocidade de libertação do IGF-1 encapsulado *in vitro*, porque a libertação das formulações de tricapriline (C8) foi mais rápida do que a das formulações de tricapriline (C10) ou trilaurina (C12).

Deve referir-se que o armazenamento das formulações de trilaurina em solução salina durante apenas alguns dias a 2-8 °C resultou numa reorganização morfológica das partículas e numa libertação completa conjunta de materiais encapsulados. Este efeito não seria de esperar da estabilidade apresentada no ensaio de libertação *in vitro* a temperaturas mais altas. Este efeito catastrófico foi relacionado com o armazenamento da formulação a temperaturas significativamente inferiores ao ponto de congelamento do lípido neutro. Este efeito é demonstrado nos Exemplos 16 e 17 abaixo.

3. Farmacocinética *in vivo*

Ratos Sprague-Dawley macho (pesando de 250 a 300 g) foram injetados subcutaneamente com a formulação de lipossomas multivesiculares contendo IGF-1, que foram fabricados com tricaprilina ou tripalmitoleína como lípido neutro. A formulação com tricaprilina demonstrou um nível de pico mais alto de IGF-1 rhu plasmático e uma duração curta de libertação comparativamente à formulação fabricada com tripalmitoleína (Figura 6). Este resultado confirma a previsão de libertação rápida de lipossomas multivesiculares fabricados com tricaprilina com base em resultados do ensaio de libertação *in vitro*.

Exemplo 4

1. Fabrico

Para o fabrico de lipossomas multivesiculares contendo insulina rhu, a solução de combinação de lípidos continha (por mL de clorofórmio): 11 mg de DOPC, 2,3 mg de DPPG, 8,7

mg de colesterol e 2,4 mg (2,7 μmol) de trioleína ou 1,3 mg (2,7 μmol) de tricaprilina tal como indicado.

As formulações da primeira solução de fase aquosa continham sacarose marcada com ^{14}C a 7,5%, ácido cítrico 20 mM, HCl 50 mM e insulina rhu a 5 mg/mL (E. coli, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Preparou-se uma primeira emulsão misturando a alta velocidade 4 mL da solução de combinação de lípidos com 4 mL da solução de fase aquosa a 9000 rpm durante 8 minutos a 25-27 °C. A emulsão foi cisalhada em microgotículas (esférulas) por adição de uma solução ao recipiente de mistura, de 20 mL de lisina 20 mM, glicose a 4%, e misturando a 3000 rpm durante 1 minuto. O clorofórmio foi removido das gotículas ou esférulas microscópicas transferindo a suspensão para um frasco contendo 30 mL de uma solução de lisina 20 mM, glicose a 4% a 37 °C num banho de água girorrotativo, e fazendo passar azoto gasoso sobre a superfície da suspensão com um caudal de 70 pés cúbicos por hora durante 20 minutos para se obter as partículas de MVL em suspensão.

As suspensões foram diluídas de 1:4 com solução salina normal, e as partículas foram recolhidas por centrifugação a 800 X g durante 10 minutos. A solução sobrenadante foi removida por aspiração, e lavagem das partículas duas vezes por ressuspensão em solução salina normal fresca e centrifugação. O produto final lavado foi ressuspensão a 25% de volume de partículas empacotadas por volume total e armazenado a 2-8 °C para estudos posteriores.

2. Velocidades de libertação *in vitro*

O ensaio de libertação "*in vitro*" foi efetuado diluindo 1 volume de suspensão armazenada com 3,2 volumes de plasma humano citrado, e colocando 0,6 mL desta suspensão em tubos de microcentrifugadora que foram tapados e incubados em condições dinâmicas a 37 °C. Após 1, 3, 6 e 7 dias, os tubos foram centrifugados a 14.000 X g X 2 minutos, e a solução sobrenadante foi transferida para um outro tubo para bioensaio. As frações de pelotas de amostras centrifugadas foram incubadas em Nonidet® NP-40 (CalBiochem, San Diego, CA) a 1%, ácido trifluoroacético 50 mM durante 10 minutos a 37 °C. Determinou-se a sacarose marcada com ¹⁴C e a insulina retida pela fração de pelotas, respetivamente, por contagem de cintilação e HPLC de fase reversa usando métodos conhecidos. Os resultados destes estudos mostraram que os lipossomas multivesiculares fabricados com trioleína como lípido neutro libertaram tanto sacarose como insulina de forma equivalente e linear, com libertação praticamente completa em 7 dias. Em contraste, a formulação fabricada com tricaprilina reteve apenas 20 a 25% da sacarose e insulina encapsuladas, depois de apenas 1 dia de incubação em plasma (Figura 7).

Exemplo 5

1. Fabrico

Para o fabrico de lipossomas multivesiculares contendo morfina, usou-se um processo escalável, validável pelas GMP. As razões molares dos componentes lipídicos neutros trioleína para tricaprilina foram de 1:4 ou 1:9. As formulações de controlo continham trioleína ou tricaprilina como o único lípido neutro. A solução de combinação de lípidos continha (por litro) 10,2 g de DOPC, 2,0 g de DPPG,

7,6 g de colesterol, de 2,1 g a 1,1 g de triglicérido, dependendo da razão molar trioleína:tricaprilina, (razão molar, 0,34:0,07:0,52:0,06).

A primeira solução de fase aquosa continha (por litro) 21 g de sulfato de morfina pentahidratado, ácido clorídrico 0,01 N. Preparou-se uma primeira emulsão misturando a alta velocidade 0,62 l de solução de combinação de lípidos com 0,9 l de solução de fase aquosa a 8000 rpm durante 30 minutos a 25-27 °C. A emulsão foi cisalhada em microgotículas (esférulas) transferindo-a para um segundo recipiente de mistura contendo 15 litros de lisina 4 mM, solução de glicose a 5,9%, e misturando a 1250-1300 rpm durante 1,5 minutos a 45 °C. Removeu-se o clorofórmio das esférulas pulverizando a suspensão durante 50 minutos a 45 °C em intervalos escalonados: 17 minutos a 15 L/min., 5 minutos a 40 L/min., 28 minutos a 10 L/min. As partículas de MVL foram assim obtidas em suspensão. As partículas na suspensão final foram concentradas e lavadas isentas de morfina não encapsulada por filtração de fluxo cruzado ou diafiltração com 25 L de solução salina normal. O produto final lavado foi armazenado a 2-8 °C para estudos posteriores.

2. Perfis de libertação *in vitro*

Os ensaios de libertação *in vitro* foram efetuados através de uma diluição de 1:9 de suspensões que continham 8 a 15 mg de sulfato de morfina encapsulado por mL em plasma humano. As suspensões foram incubadas a 37 °C sob condições dinâmicas. Após 1, 2, 4, e 7 dias, as amostras foram diluídas de 1:4 com solução salina normal, as partículas sedimentadas por centrifugação a 800 X g X 10 min., e a

fração de partículas ensaiada para determinar a quantidade de morfina retida por solubilização da fração de pelotas com IPA a 50% e ensaio por espectrofotometria de UV usando métodos conhecidos.

A Figura 8 mostra o perfil de velocidades de liberação da liberação de morfina para estas formulações em plasma humano. Tal como se mostra em exemplos anteriores, à medida que a razão de trioleína para tricaprilina aumenta, a velocidade e a extensão da liberação de morfina diminui.

3. Farmacocinética *in vivo*

Avaliou-se a liberação *in vivo* dos lipossomas multivesiculares contendo morfina, fabricados com trioleína e tricaprilina apenas ou em combinação, em cães Beagle utilizando um modelo farmacocinético de injeção epidural. Nestes estudos, o nível de morfina libertada da formulação lipossomal injetada num sítio epidural foi determinado no plasma e num sítio intratecal adjacente (CSF, fluido cérebro-espinhal) separado do sítio epidural pela membrana meníngea espinhal. Apenas se mostram os resultados para o CSF (Figura 9).

Observa-se uma correlação entre os resultados de liberação *in vitro* sumariados na Figura 8 e os perfis de velocidades de liberação no modelo canino (Figura 9). A formulação contendo tricaprilina liberta muito rapidamente *in vivo*, com uma liberação praticamente completa em 24 horas. O Tempo de Residência Médio (MRT) para a formulação com 100% de tricaprilina foi semelhante ao da injeção de morfina não encapsulada, isto é, 2,3 h vs. 1,6 h. A inclusão de uma pequena quantidade de trioleína durante o fabrico, isto é,

uma razão molar trioleína:tricaprilina de 1:9 ou 1:4, retarda a velocidade de libertação, estendendo a duração da libertação ao longo de 4 a 5 dias, com MRT de 13,2 h e 15,3 h, respetivamente. Todas as formulações contendo tricaprilina libertam mais rapidamente do que a formulação que usa trioleína como o único lípido neutro, que tinha um MRT de 69 h neste modelo.

4. Estabilidade durante o armazenamento

A alteração gradual da composição dos lípidos neutros dos MVL para proporcionar uma família de formulações com um aumento gradual de perfis de velocidades de libertação de composto bioativo não parece comprometer a estabilidade durante o armazenamento das formulações, desde que as formulações sejam armazenadas perto ou acima do ponto de fusão da combinação de lípidos neutros. Avaliaram-se lotes da formulação de morfina com MVL de trioleína:tricaprilina 10:90, descrita acima e que liberta rapidamente tanto *in vitro* como *in vivo*, quanto à dependência da velocidade de libertação da temperatura de armazenamento. As suspensões de MVL em solução salina de armazenamento foram incubadas à temperatura normal de armazenamento, 2-8 °C (4 °C nominal) e a temperaturas elevadas, 26, 37, e 41 °C. Os resultados destes estudos são apresentados na Figura 10, um gráfico de Arrhenius que representa o logaritmo da velocidade de libertação em função de 1/Temperatura (°K). O declive do gráfico parece ser contínuo. O perfil de velocidades de libertação a temperatura elevada apoia a observação de que os MVL armazenados em solução salina a 2-8 °C têm uma libertação muito lenta (cerca de 1% da morfina encapsulada em 100 dias) e, por conseguinte, pode esperar-se que tenham uma vida útil superior a um ano, se o limite para a vida

útil for o critério de libertação de 5 ou 10% do material encapsulado. Adicionalmente, é também evidente que uma matriz fisiológica tal como plasma (Figura 9) ou o ambiente *in vivo* do espaço epidural (Figura 9) aceleram muito a libertação quando comparados com a libertação em solução salina a 37 °C, isto é, 50% da morfina encapsulada libertada por dia, *versus* menos de 1% da morfina encapsulada por dia no último.

Exemplo 6

Citosina-arabinosídeo

1. Fabrico

Fabricaram-se lipossomas multivesiculares contendo citosina-arabinosídeo (AraC) com várias substituições para o componente fosfatidilcolina da solução lipídica de fase orgânica. As substituições foram efetuadas para determinar o efeito no perfil de velocidades de libertação, de mudar o componente acílico no fosfolípido principal numa formulação com MVL contendo trioleína ou tricaprilina como lípido neutro.

Neste primeiro exemplo, a DOPC é usada para demonstrar que a velocidade de libertação num meio fisiológico de formulações com MVL contendo AraC/HCl na fase aquosa pode ser modificada ajustando a razão de trioleína para tricaprilina. As combinações de lípidos continham (por 1200 mL) 122,4 mL de DOPC a 100 mg/mL, 2,4 g de DPPG, 9,12 g de colesterol, 2,5 g de trioleína ou 1,3 g de tricaprilina, ou uma mistura dos mesmos, originando uma razão molar de trioleína para tricaprilina de 1:4, 1:9, 1:18, ou 1:27.

A primeira solução de fase aquosa continha 20 mg/mL de citosina-arabinosídeo, HCl 0,1 N. Preparou-se uma primeira emulsão misturando a alta velocidade 10 mL de combinação de lípidos e 10 mL de primeira solução de fase aquosa a 9000 rpm durante 9 minutos. A emulsão foi cisalhada em microgotículas por transferência da primeira emulsão para um segundo recipiente de mistura contendo 200 mL de glicose a 3,2%, lisina 40 mM e misturando a 2100 rpm durante 2,5 minutos. O clorofórmio foi removido transferindo a suspensão para dois frascos de 1 litro e fazendo passar azoto a 70 cfh. A suspensão final foi diluída de 1:2 com solução salina, e as partículas recolhidas por centrifugação a 800 X g X 10 min., lavadas 3 vezes, ressuspensas a 33% de lipocrit, e depois ajustadas a 10 mg/mL.

2. Libertação *in vitro* em plasma humano

Os perfis de velocidades de libertação *in vitro* das formulações com MVL de citosina-arabinosídeo (AraC) foram obtidos por diluição da suspensão de 1:9 em plasma humano e incubação das amostras a 37 °C sob condições dinâmicas. Nos pontos do tempo de 1, 2, 4, e 7 dias, adicionaram-se 1,2 mL de solução salina a amostras de 0,3 mL em triplicado, e a fração das partículas foi recolhida por centrifugação a 16.000 X g X 2 min. A fração do sobrenadante foi removida por aspiração, e a fração de partículas foi ressuspensa em 1 mL de álcool isopropílico a 50%, submetida a vórtice, incubada a 37 °C durante 10 min., centrifugada, e adicionaram-se depois 0,06 ou 0,2 mL do sobrenadante a 1,0 mL de HCl 0,1 N. A citosina-arabinosídeo foi determinada por U.V. a 280 nm com amostras.

Os perfis de libertação *in vitro* medindo a AraC retida pelas formulações de lipossomas multivesiculares são apresentados na Figura 11. A libertação da formulação que tem apenas tricapriline como lípido neutro foi rápida. À medida que a razão de tricapriline para trioleína usada no fabrico da formulação com MVL aumenta, a velocidade de libertação de citosina-arabinosídeo pelos MVL incubados em plasma diminui. Assim, cria-se uma família de curvas de velocidades de libertação com previsíveis velocidades de libertação crescentes por meio de aumentos graduais da quantidade de trioleína na razão trioleína para tricapriline.

Exemplo 7

Efeito da Substituição de Fosfatidilcolinas de Temperaturas de Transição Superiores ou Comprimentos de Cadeia Maiores por DOPC em Formulações Contendo Tricapriline

A classificação numa família de perfis de velocidades de libertação *in vitro* (tal como obtidos no Exemplo 6) em que a maior razão molar de tricapriline para trioleína resulta numa libertação mais rápida tanto em modelos *in vivo* como *in vitro* (plasma a 37 °C), permanece consistente quando uma fosfatidilcolina de temperatura de transição de fase superior ou de cadeia de maior comprimento é substituída por DOPC nas formulações do Exemplo 6. Neste exemplo, a diestearoilfosfatidilcolina (DSPC, p.f. 55 °C) foi substituída por DOPC (p.f. 0 °C).

1. Fabrico

Os parâmetros de fabrico foram ajustados para acomodar o p.f. superior da DSPC efetuando uma emulsificação a 50 °C. O fabrico de emulsões usadas para as formulações de controlo da DOPC foi realizado à temperatura ambiente. Para além disso, a concentração de HCl da primeira solução de fase aquosa foi aumentada de 36% em relação à do Exemplo 6.

A solução de combinação de lípidos continha (por litro) 10,2 g de DOPC ou 10,3 g de DSPC, 2,1 g de DPPG, 7,7 g de colesterol, e o componente triglicérido consistiu em 1,1 g de tricaprilina ou em 2,1 g de trioleína (razão molar de 0,34:0,07:0,52:0,06). Misturaram-se misturas de trioleína e tricaprilina para proporcionar as razões de 1:4, 1:9, 1:18, 1:2 de trioleína para tricaprilina para uso nas formulações.

A primeira fase aquosa continha (por mL) 20 mg de citosina-arabinosídeo e HCl 136 mM. Preparou-se uma emulsão misturando a alta velocidade 10 mL da solução de combinação de lípidos com 10 mL da solução de fase aquosa usando uma lâmina de 2 cm de diâmetro num recipiente de aço inoxidável a 9000 rpm durante 8 minutos, à temperatura ambiente (para formulações com DOPC) ou a 55 °C (para formulações com DSPC). A emulsão foi cisalhada em microgotículas transferindo-a para dentro de um frasco de vidro de Mason contendo 200 mL de glicose a 5% e lisina 40 mM e, usando uma lâmina com um diâmetro de 4 cm, misturando a 4000 rpm durante 1,5 minutos à mesma temperatura que usada para a primeira emulsificação. O clorofórmio foi removido colocando o recipiente num banho de água girorrotativo a 37 °C e fazendo passar azoto gasoso sobre a superfície da suspensão com um caudal de 70 cfh durante 20 minutos.

As suspensões foram diluídas de 1:4 com solução salina normal e recolheram-se as partículas por centrifugação a 800 x g durante 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido por aspiração, e as partículas foram depois lavadas duas vezes por ressuspensão em solução salina normal e centrifugação. As pelotas finais lavadas foram ressuspensas em solução salina normal e ajustadas a 10 mg/mL de citosina-arabinosídeo.

2. Perfis de libertação *in vitro*

O ensaio de libertação *in vitro* da AraC dos MVL foi efetuado em plasma humano, tal como descrito no Exemplo 6 acima. Tal como se mostra na Figura 12, nos MVL em que a DSPC de ponto de fusão mais elevado foi substituída por DOPC, obteve-se uma família de perfis de velocidades de libertação graduais variando a razão molar de tricaprilina para trioleína, em que as formulações de libertação mais rápida contêm uma razão molar mais elevada de tricaprilina para trioleína. Tal como se mostrou anteriormente para outras formulações com MVL, um aumento da concentração de ácido clorídrico na solução de fase aquosa (quando comparada com a contida nos MVL do Exemplo 6) pode retardar a libertação da substância ativa *in vitro*.

Exemplo 8

Sacarose

1. Fabrico

Neste exemplo, o efeito da tricaprilina na velocidade de libertação foi testado para formulações contendo sacarose a 4% como agente ativo em formulações com a dieucrilfosfatidilcolina (DEPC, mp 0 °C), uma fosfatidilcolina com um comprimento de cadeia de 22 carbonos, substituída por dioleolifosfatidilcolina (DOPC, mp 0 °C), uma fosfatidilcolina com um comprimento de cadeia de 18 carbonos.

A solução de lípidos continha (por litro) 10,2 g de DOPC ou 11,0 g de DEPC e 2,1 g DPPG, 7,7 g de colesterol, e o componente triglicérido consistiu em 1,1 g de tricaprilina ou 2,1 g de trioleína (razão molar de 0,34:0,07:0,52:0,06). Para misturas de lípidos neutros, misturaram-se combinações de lípidos contendo trioleína e tricaprilina para proporcionar estas razões molares de trioleína para tricaprilina.

A primeira fase aquosa continha sacarose a 4% (Spectrum USP/NF, Los Angeles, CA) e foi enriquecida com 40 uL de sacarose marcada com ^{14}C . Preparou-se uma primeira emulsão misturando a alta velocidade 5 mL da solução de combinação de lípidos com 5 mL da solução de fase aquosa, usando uma lâmina de 2 cm de diâmetro num recipiente de aço inoxidável a 9000 rpm durante 10 minutos à temperatura ambiente. A emulsão foi cisalhada em microgotículas por transferência para um frasco de vidro de Mason contendo 200 mL de glicose a 4% e lisina 4 mM durante 2 minutos, usando uma lâmina com 4 cm de diâmetro e misturando a 3500 rpm. O clorofórmio foi

removido das gotículas transferindo a suspensão para um frasco de cultura de 1 litro colocado num banho de água girorrotativo a 37 °C, e fazendo passar azoto gasoso sobre a superfície da suspensão com um caudal de 70 cfh durante 20 minutos.

As suspensões de partículas foram diluídas de 1:2 com solução salina normal, e recolheram-se as partículas por centrifugação a 800 x g durante 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido por aspiração, e as partículas foram lavadas duas vezes por ressuspensão em solução salina normal e centrifugação. As pelotas de partículas finais lavadas foram ressuspensas em solução salina normal e ajustadas a aproximadamente 33% de lipocrit.

2. Estudos de libertação em plasma *in vitro*

Para os estudos de libertação em plasma *in vitro*, diluíram-se as suspensões de 1:10 em plasma humano com azida de sódio a 0,1%. Incubaram-se 300 uL de alíquotas em triplicado em tubos de Eppendorf de 1,5 mL com tampa de rosca e recolheram-se nos dias 0, 1, 2, 3, e 4. As amostras foram recolhidas retirando os tubos aleatoriamente da incubadora, marcando o tubo com o dia em que é retirado, diluindo o conteúdo com 1,2 mL de solução salina normal, e centrifugando a 27.000 x g durante 5 minutos numa microcentrifugadora. O sobrenadante foi cuidadosamente removido por aspiração das pelotas de partículas. A fração de pelotas foi ressuspensa em 1 mL de IPA a 50% submetendo-a a vórtice, incubando-a a 37 °C durante 10 minutos, e submetendo-a então a vórtice. Diluiu-se então uma amostra de 50 uL com 3 mL de fluido de cintilação num frasco de

cintilação, agitou-se vigorosamente o frasco e determinou-se a sacarose por contagem de cintilação.

Tal como se pode ver dos dados contidos na Figura 13, a formulação contendo apenas tricapriline libertou toda a sacarose encapsulada num dia quando incubada em plasma. A razão de trioleína:tricapriline de 1:18 foi necessária para atingir uma velocidade de libertação intermédia para uma formulação com MVL com esta fase aquosa quando a DEPC substituiu a DOPC.

Exemplo 9

Neste exemplo, a tricaproína (C6) foi substituída por tricapriline (C8) como lípido neutro modificador da velocidade de libertação.

1. Fabrico

A solução de combinação de lípidos continha (por litro) uma combinação de 10,2 g, 2,1 g de DPPG, 7,7 g de colesterol, e o componente triglicérido consistiu em 0,9 g de tricaproína ou 2,1 g de trioleína (razão molar de 0,34:0,07:0,52:0,06). Misturaram-se misturas de soluções de lípidos contendo trioleína e tricaproína, para proporcionar soluções de lípidos contendo razões molares de trioleína para caproína de 1:4, 1:9 e 1:18. Estas formulações foram fabricadas e testadas tal como descritas no Exemplo 8.

A primeira fase aquosa continha sacarose a 4% (Spectrum USP/NF) e foi enriquecida com 40 uL de sacarose marcada com ^{14}C (ICN lote#54661027). Preparou-se uma primeira emulsão misturando a alta velocidade 5 mL da solução de combinação

de lípidos com 5 mL da solução de fase aquosa, usando uma lâmina com 2 cm de diâmetro num recipiente de aço inoxidável a 9000 rpm durante 10 minutos à temperatura ambiente. A segunda emulsificação foi efetuada num frasco de vidro de Mason de 400 mL contendo 200 mL de glicose a 4% e lisina 4 mM, usando uma lâmina com 4 cm de diâmetro e misturando a 3500 rpm durante 2 minutos. O clorofórmio foi removido transferindo o conteúdo do frasco para um frasco de cultura de 1 litro colocado num banho de água girorrotativo a 37 °C, e fazendo passar azoto gasoso sobre a superfície da suspensão com um caudal de 70 cfh durante 20 minutos.

As suspensões foram diluídas de 1:2 com solução salina normal, e recolheram-se as partículas por centrifugação a 800 x g durante 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido por aspiração, e as partículas foram lavadas duas vezes por ressuspensão em solução salina normal e centrifugação. As pelotas finais lavadas foram ressuspensas em solução salina normal e ajustadas a aproximadamente 33% de lipocrit em que o lipocrit em percentagem é o volume ocupado pelos lipossomas dividido pelo volume total da suspensão de lipossomas multiplicado por cem. O rendimento para cada variação no lípido neutro foi superior a 50%. Depois do fabrico, a concentração de sacarose livre a 33% de lipocrit foi aproximadamente 3% da concentração total de sacarose.

2. Perfis de libertação *in vitro*

Para os estudos de libertação em plasma *in vitro*, diluíram-se as suspensões de 1:10 em plasma humano. Incubaram-se dinamicamente 300 uL de alíquotas em triplicado em tubos de

Eppendorf com tampa de rosca e recolheram-se nos dias 0, 1, 2, 3, e 4. Recolheram-se amostras retirando tubos aleatoriamente da incubadora, marcando o tubo com o dia em que é retirado, diluindo o conteúdo com 1,2 mL de solução salina normal e centrifugando a 27.000 x g durante 5 minutos numa microcentrifugadora. O sobrenadante foi cuidadosamente removido por aspiração das pelotas. A fração de pelotas foi ressuspensa em 1 mL de IPA a 50% submetendo-a a vórtice, incubando-a a 37 °C durante 10 minutos, e submetendo-a então novamente a vórtice. Diluiu-se então uma amostra de 50 uL com 3 mL de fluido de cintilação num frasco de cintilação, agitou-se vigorosamente o frasco, e determinou-se a radioatividade da sacarose marcada com ^{14}C por contagem de cintilação.

Tal como se mostra na Figura 14, a substituição de tricaproína por tricaprilina em misturas contendo trioleína como combinação de lípidos neutros modificadores da velocidade de libertação resulta em formulações com uma família graduada de velocidades de libertação para várias razões molares trioleína:tricaproína. Quanto maior a razão molar de tricaproína para trioleína, mais rápida a libertação de sacarose. Existe uma diferença distinta entre formulações contendo tricaproína e a tricaprilina. Com esta fase aquosa, isto é, contendo sacarose como agente ativo encapsulado, as partículas multivesiculares fabricadas usando apenas tricaproína sofreram uma transformação física e libertaram o seu conteúdo em 5 minutos de diluição em plasma humano à temperatura ambiente. A diluição em solução salina contendo albumina de soro bovino a 0,5% teve o mesmo efeito. Em contraste, as formulações contendo apenas tricaprilina como lípido neutro, geralmente necessitaram de 12 ou mais horas de incubação em plasma a 37 °C para a

libertação completa do agente ativo. Não obstante a instabilidade das formulações apenas com tricaproína em plasma humano ou solução salina à temperatura ambiente. As formulações foram estáveis durante o armazenamento a 2-8 °C em solução salina durante pelo menos uma semana.

Exemplo 10

Oligonucleótidos antissentido

Este exemplo ilustra a utilização do método da invenção para encapsular oligonucleótidos antissentido.

1. Fabrico

A primeira solução de fase aquosa continha (por mL) 5, 10 ou 20 mg de um oligonucleótido antissentido IL-6 (doado por Leu Neckers, NIH, Bethesda, MD), que em alguns estudos foi biotinilado, e manitol a 5%.

Adicionou-se ácido clorídrico (0,1 mL de solução 1 N) a um frasco contendo 1 mL da combinação de lípidos do Exemplo 1, e a combinação foi emulsionada fixando o frasco tapado numa configuração horizontal na direção da cabeça de um misturador de vórtice (Scientific Products) e agitando a 2400 oscilações/min. durante 1 minuto. O restante da primeira solução de fase aquosa (0,9 mL de manitol a 5% contendo 10 mg de oligonucleótido antissentido) foi adicionado ao frasco, e continuou-se a emulsificação durante 5 minutos.

A emulsão final (2 mL) foi dividida e transferida para dois frascos contendo 2,5 mL de glicose a 3,2% e lisina 40 mM. A

emulsão foi dispersada em gotículas microscópicas fixando o frasco tapado numa configuração horizontal na direção da cabeça de um misturador de vórtice e agitando durante 3 segundos a aproximadamente 1200 rpm. O conteúdo dos frascos foi transferido para um frasco contendo 5 mL de glicose a 3,2%, lisina 40 mM, e o clorofórmio foi removido das gotículas ou esférulas microscópicas transferindo o frasco para um banho de água girorrotativo a 37 °C e fazendo passar azoto gasoso sobre a superfície da suspensão com um caudal de 15 pés cúbicos por hora durante 10 minutos.

As suspensões foram diluídas de 1:4 com solução salina normal e recolheram-se as partículas por centrifugação a 800 X g durante 10 minutos. A solução sobrenadante foi removida por aspiração, e as partículas foram lavadas duas vezes por ressuspensão em solução salina normal fresca e centrifugação. O produto final lavado foi ressuspensão a 25% de volume de partículas empacotadas por volume total e armazenado a 2-8 °C para estudos posteriores.

A recuperação do oligonucleótido encapsulado foi determinada diluindo uma amostra da suspensão de 1:1 com SDS a 0,1%, incubando a amostra num banho de água a ferver durante 2 minutos, e diluindo depois a amostra (tipicamente 1/20) em NaOH 0,1 N para determinação da absorção por UV, usando um varrimento de comprimentos de onda de 320 a 212 nm. A concentração de oligonucleótido na amostra foi calculada subtraindo o valor da absorvância A₃₂₀ medida, do valor da absorvância A₂₅₇. Uma amostra da primeira solução de fase aquosa serviu como padrão, 17,6 (A₂₅₇-1 cm) unidades por mg/mL.

2. Perfis de libertação *in vitro*

As características de libertação *in vitro* de partículas multivesiculares contendo oligonucleótidos foram determinadas medindo a quantidade de oligonucleótido que permanece na fração de partículas quando incubadas a 37 °C em fluido cérebro-espinhal de rato (CSF). Ressuspenderam-se amostras armazenadas em solução salina normal na solução de armazenamento e centrifugaram-se a 750 X g durante 10 minutos. A solução salina sobrenadante foi removida por aspiração, e as partículas ressuspensas em CSF de rato a concentrações de 0,25 a 0,5 mg do oligonucleótido por mL de CSF. As amostras foram incubadas a 37 °C sob condições estáticas. Após 0, 1, 2, 3, e 7 dias, as amostras das suspensões partícula/CSF foram removidas, diluídas 10 vezes em solução salina, centrifugadas, e o sobrenadante removido por aspiração da fração de partículas. A fração de partículas foi incubada em SDS a 0,1% e diluída com NaOH 0,1 N, e obteve-se um espectro de absorvância de UV do oligonucleótido ao longo do intervalo de 340 a 210 nm. A quantidade de oligonucleótido retido pela fração de partículas foi determinada tal como acima.

Tal como se mostra na Figura 15, a formulação de tricaprilina não libertou mais rapidamente *in vitro*, mas teve uma libertação global maior; a formulação contendo trioleína parou de libertar o fármaco em CSF de rato depois de cerca de 2,5 dias quando comparada com a libertação contínua pela formulação contendo tricaprilina.

3. Farmacocinética *in vivo*

Quando as formulações antissentido com MVL fabricados com tricapriline como lípido neutro foram testadas *in vivo* por injeção intratecal em ratos e amostras do CSF foram posteriormente examinadas microscopicamente, não foram evidentes quaisquer partículas em CSF após dois dias. As partículas de MVL fabricadas com trioleína foram evidentes aos dois dias, mas tinham uma aparência "encolhida". Não havia qualquer evidência de oligonucleótido nativo livre por meio de um ensaio de marcação na extremidade 3'.

Para melhorar a sensibilidade do ensaio *in vivo* para a concentração de oligonucleótido em CSF, o oligonucleótido foi biotinilado e o oligonucleótido biotinilado foi formulado tal como descrito acima em MVL usando trioleína ou tricapriline como lípido neutro. O que se recuperou do oligonucleótido biotinilado encapsulado foi 78% para MVL contendo trioleína e 82% para tricapriline. Quando estudado *in vivo*, o oligonucleótido biotinilado, encontrado livre no CSF libertado dos lipossomas contendo tricapriline, estava abaixo do limite de detecção após 2 dias. Esteve presente oligonucleótido biotinilado livre na amostra de CSF de rato 4 dias depois da administração das formulações contendo trioleína a uma concentração de aproximadamente 0,5 uM (resultados não apresentados). Os dados *in vivo* são consistentes com o facto dos MVL de tricapriline libertarem rapidamente oligonucleótido antissentido *in vivo*, e a formulação de trioleína proporcionar uma libertação mais sustentada dos oligonucleótidos.

Exemplo 11

MVL contendo plasmídeos

1. Fabrico

Para fabricar lipossomas multivesiculares que encapsulam o plasmídeo PBR322 de *E. coli*, a solução de combinação de lípidos continha (por litro) 10,4 g de DOPC, 2,1 g de DPPG, 7,7 g de colesterol, 2,16 g de trioleína (pm 885,40) ou 1,15 g de tricaprilina (pm 470,7) (razão molar DOPC:DPPG:Colesterol:triglicérido de 0,34:0,07:0,52;0,06).

A primeira solução de fase aquosa continha (por litro) 42 g de sacarose marcada com ^{14}C (0,6 uCi por mL), 100 mmol de lisina, 84 mmol de ácido clorídrico, pH 7,4 e 20 ug/mL de plasmídeo PBR322 (Promega, Madison, WI). Preparou-se uma primeira emulsão misturando a alta velocidade 3 mL de solução de combinação de lípidos com 3 mL de solução de fase aquosa a 9000 rpm durante 9 minutos a 25-27 °C. A emulsão foi cisalhada em microgotículas (esférulas) por adição de 20 mL de lisina 20 mM, solução de glicose a 4% ao recipiente de mistura, e misturando adicionalmente a 4000 rpm durante 2 minutos. O clorofórmio foi removido das gotículas ou esférulas microscópicas transferindo a suspensão para um frasco contendo 30 mL de uma solução de lisina 20 mM, solução de glicose a 4% num banho de água girorrotativo a 37 °C, e fazendo passar azoto gasoso sobre a superfície da suspensão com um caudal de 70 litros por hora durante 20 minutos para formar os MVL.

As suspensões de MVL foram diluídas de 1:4 com solução salina normal, e recolheram-se as partículas por centrifugação a 800 X g durante 10 minutos. A solução sobrenadante foi removida por aspiração e as partículas

lavadas duas vezes por ressuspensão em solução salina normal e centrifugação. O produto final lavado foi ressuspenso a 25% de volume de partículas empacotadas por volume total e armazenado a 2-8 °C para estudos posteriores.

2. Perfil de libertação *in vitro*

Os ensaios de libertação *in vitro* foram realizados através de uma diluição de 1:2,5 de suspensões que continham os lipossomas multivesiculares encapsulando o plasmídeo PBR322 e sacarose marcada com ^{14}C em plasma humano. Estudos anteriores tinham estabelecido que a libertação de sacarose marcada com ^{14}C era uma alternativa adequada para estimar a libertação do plasmídeo PBR322 dos MVL. As suspensões foram incubadas a 37 °C sob condições estáticas. Nos pontos temporais de 0, 1, 2, 3, 6, 10 e 17 dias, diluíram-se as amostras de 1:4 com solução salina normal, sedimentaram-se as partículas por centrifugação a 800 X g X 10 min., e ensaiou-se a fração de partículas dissolvendo amostras numa solução de contagem de cintilação e efetuando a contagem de cintilação da quantidade de sacarose marcada com ^{14}C retida pela fração de partículas.

Os resultados deste estudo apresentado na Figura 16, indicam que a formulação de plasmídeo PBR322 usando trioleína como lípido neutro foi estável sob condições *in vivo* simuladas e libertou cerca de 30% da sacarose marcada com ^{14}C encapsulada num período de 17 dias, ao passo que as partículas formuladas com tricapriline libertaram rapidamente o seu conteúdo por contacto com plasma humano a 37 °C.

Exemplo 12

No exemplo que se segue encapsularam-se sacarose e lisina-HCl, usadas como excipientes na formulação do plasmídeo PBR322, sem agente ativo adicional, para dar origem a uma família "apenas de excipientes" de formulações graduadas de libertação de sacarose usando razões molares de tripalmitoleína: tricaprilina como lípidos neutros.

1. Fabrico

Para o fabrico de lipossomas multivesiculares encapsulando apenas sacarose-lisina·HCl, a solução de combinação de lípidos continha (por litro) 10,4 g de DOPC, 2,1 g de DPPG, 7,7 g de colesterol, de 1,9 g a 1,0 g de triglicérido, dependendo da razão molar de tripalmitoleína (pm 801, C16: 1 9C):tricaprilina para dar origem a uma razão molar DOPC:DPPG:colesterol:triglicérido de 0,34:0,07:0,52:0,06. As razões molares de tripalmitoleína para tricaprilina preparadas nas formulações deste exemplo foram de 0:1, 1:0, 1:9, 1:4, 1:2, e 1:1.

A primeira solução de fase aquosa continha (por litro) 42 g de sacarose marcada com ^{14}C (1,0 μCi por mL), 100 mmol de lisina, 90 mmol de ácido clorídrico, pH 5,7. Preparou-se uma primeira emulsão misturando a alta velocidade 5 mL de solução de combinação de lípidos com 5 mL de solução de fase aquosa a 9000 rpm durante 9 minutos a 25-27 °C. A emulsão foi cisalhada em microgotículas (esférulas) por adição de 20 mL de lisina 20 mM, uma solução de glicose a 4% ao recipiente de mistura, e misturando a 5000 rpm durante 1,5 minutos. O clorofórmio foi removido das gotículas ou esférulas microscópicas transferindo a

suspensão para um frasco contendo 30 mL de lisina 20 mM, solução de glicose a 4% num banho de água girorrotativo a 37 °C, e fazendo passar azoto gasoso sobre a superfície da suspensão com um caudal de 70 pés cúbicos por hora durante 20 minutos para se obter as partículas multivesiculares em suspensão.

As suspensões foram diluídas de 1:4 com solução salina normal, e as partículas foram recolhidas por centrifugação a 800 X g durante 10 minutos. A solução sobrenadante foi removida por aspiração, e as partículas lavadas duas vezes por ressuspensão em solução salina normal fresca e centrifugação. O produto final lavado foi ressuspensão a 25% de volume de partículas empacotadas por volume total e armazenado a 2-8 °C para estudos posteriores.

2. Perfil de libertação *in vitro*

Os ensaios de libertação "*in vitro*" foram efetuados através de uma diluição de 1:9 em plasma humano de suspensões que continham lipossomas multivesiculares encapsulando sacarose marcado com ^{14}C . As suspensões foram incubadas a 37 °C sob agitação dinâmica moderada. Nos pontos temporais de 0, 1, 3, 5, 8, e 12 dias, as amostras foram diluídas de 1:4 com solução salina normal, as partículas foram sedimentadas por centrifugação a 800 X g durante 10 minutos, e a fração das partículas foi ensaiada dissolvendo em solução de contagem de cintilação e contando por cintilação a quantidade de sacarose marcada com ^{14}C retida nas partículas. Os resultados destes estudos (Figura 17) mostram que uma razão molar de 1:1 de tripalmitoleína para tricaprilina proporcionou uma velocidade de libertação um pouco mais lenta do que a tripalmitoleína apenas. Obteve-se uma

família graduada de velocidades de libertação com velocidades mais rápidas por aumento da proporção de tricaprilina no componente lipídico neutro.

Exemplo 13

Anestésicos

1. Formulações de tetracaína com MVL

Para o fabrico de MVL encapsulando tetracaína, a solução de combinação de lípidos continha (por mL de clorofórmio) 15,6 mg de DOPC, 3,1 mg de DPPG, 11,5 mg de colesterol, e 12,6 g a 6,6 mg de triglicérido dependendo da razão molar de trioleína:tricaprilina. Verificou-se que a lipofilicidade da tetracaína requer que a concentração de lípido (68 $\mu\text{mol/mL}$) na combinação de lípidos seja aumentada de 2 a 1,5 vezes para se obterem formulações satisfatórias com MVL. O triglicérido foi igualmente enriquecido; a razão molar DOPC:DPPG:colesterol:triglicérido foi de 0,29:0,06:0,44:0,21. As razões molares de trioleína para tricaprilina preparadas nas formulações deste exemplo foram de 1:0, 1:10, 0,5:10; 0,2:10; 0,1:10; 0,05:10; e 0:1. A primeira solução de fase aquosa para encapsulação de tetracaína continha (por mL) 15 mg de fosfato de tetracaína e 200 mg de polímero de alfa-ciclodextrina.

Adicionou-se uma alíquota da primeira solução de fase aquosa (1 mL) a um frasco contendo 1 mL da combinação de lípidos e emulsionou-se fixando o frasco tapado numa configuração horizontal na direção da cabeça de um misturador de vórtice (Scientific Products) e agitando a 2400 oscilações/min. durante 12 minutos.

A emulsão final (1 mL) foi dividida e transferida para dois frascos contendo 2,5 mL de uma solução de glicose a 3,2%, lisina 5 mM. A emulsão foi dispersa em gotículas microscópicas fixando o frasco tapado numa configuração horizontal na direção da cabeça de um misturador de vórtice e agitando durante 3 segundos a 600-800 oscilações/min. O conteúdo do frasco foi transferido para um frasco contendo 50 mL de uma solução de glicose a 3,2%, lisina 5 mM, e o clorofórmio foi removido das gotículas ou esférulas microscópicas transferindo o frasco para um banho de água girorrotativo a 37 °C e fazendo passar azoto gasoso sobre a superfície da suspensão com um caudal de um litro por minuto durante 20 minutos.

As suspensões foram diluídas de 1:4 em volume com solução salina normal, e recolheram-se as partículas por centrifugação a 800 X g durante 10 minutos. A solução sobrenadante foi removida por aspiração, e as partículas lavadas duas vezes por ressuspensão em solução salina normal fresca e centrifugação.

2. Farmacocinética *in vivo*

As características de libertação *in vivo* das partículas multivesiculares foram determinadas em ratinhos BalbC (com 7 a 8 semanas de idade, pesando aproximadamente 20 gramas) por injeção subcutânea na região do abdómen (100 uL). Em pontos do tempo de 0, 5, e 24 horas após injeção, os ratinhos foram sacrificados, o tecido subcutâneo recolhido, homogeneizado e extraído, e os extratos ensaiados por HPLC usando a deteção por UV quanto à quantidade de tetracaína retida.

A duração de libertação desejada *in vivo* para os MVL com tetracaína foi de 24 horas. Verificou-se que as formulações que continham trioleína apenas como lípido neutro são estáveis *in vivo* e libertam durante um período demasiado longo.

Incluindo tricaprilina no componente lipídico neutro, obtiveram-se formulações com duração mais curta e perfis farmacocinéticos mais desejáveis (Figura 18). A duração de libertação desejada de 24 horas para o anestésico foi fornecida por uma formulação com uma razão de 1 de trioleína: 100 de tricaprilina.

Relação entre a Seleção de Lípidos Neutros e a Temperatura de Armazenamento Pretendida.

Tal como se mostra nos exemplos que se seguem, o ponto de fusão do lípido neutro é uma consideração importante na seleção do lípido neutro modificador da velocidade. No entanto, outros fatores têm também de ser tidos em conta, por exemplo, a composição da primeira solução de fase aquosa. A conclusão para estes exemplos é que o ponto de congelamento (fusão ou turvação) do lípido neutro ou da mistura de lípidos neutros deve ser inferior ou cerca da temperatura de armazenamento, de modo a assegurar a estabilidade de armazenamento. Se as formulações forem armazenadas a temperaturas significativamente inferiores ao ponto de congelamento do lípido neutro ou de misturas dos mesmos, as partículas de MVL sofrem uma transição morfológica física, o que resulta em perda da estrutura interna e libertação dos materiais encapsulados. Esta transição pode ocorrer dentro de algumas horas ou ao longo

de vários dias ou semanas, dependendo da composição da primeira composição de fase aquosa.

Exemplo 14

No exemplo seguinte, os MVL foram fabricados com tricaprilina ou tricaprina como componente lipídico neutro. O ponto de congelamento da tricaprilina é de 8 °C e o da tricaprina é de 31 °C. A primeira fase aquosa continha citosina-arabinosídeo ou sulfato de morfina em HCl 0,1 N. Armazenaram-se alíquotas do produto final em solução salina a 2-8, 25, 32, e 37 °C. A libertação de materiais encapsulados foi determinada ao longo do tempo de armazenamento.

1. Fabrico

Para o fabrico de MVL, a solução de combinação de lípidos continha (por litro) 10,4 g de DOPC, 2,1 g de DPPG, 7,7 g de colesterol, e o componente triglicérido consistiu em 0,93 g de tricaprilina (C8) ou 1,1 g de tricaprina (C10), (razão molar, 0,34:0,07:0,52:0,06). A primeira solução de fase aquosa continha (por mL) 20 mg de citosina-arabinosídeo em HCl 0,1 N ou 20 mg de sulfato de morfina pentahidratado em HCl 0,1 N.

Para formulações encapsulando citosina-arabinosídeo, a primeira emulsão foi preparada misturando a alta velocidade 10 mL de solução de combinação de lípidos com 10 mL de solução de fase aquosa a 9000 rpm durante 14 minutos, a 25-27 °C com uma lâmina de alto cisalhamento. Para formulações encapsulando morfina, a primeira emulsão foi preparada misturando a alta velocidade 12,5 mL da solução de

combinação de lípidos com 7,5 mL da solução de fase aquosa a 9000 rpm durante 14 minutos, a 25-27 °C. As primeiras emulsões foram cisalhadas em microgotículas (esférulas) por transferência para uma câmara de mistura contendo 200 mL de lisina 40 mM, solução de glicose a 3,2%, e misturando a 2100 rpm durante 2,5 minutos. O clorofórmio foi removido das gotículas ou esférulas microscópicas transferindo a suspensão para um frasco, colocando o frasco num banho de água girorrotativo a 37 °C, e fazendo passar azoto gasoso sobre a superfície da suspensão com um caudal de 70 cfh durante 20 minutos.

As suspensões foram diluídas de 1:4 em volume com solução salina normal, e as partículas foram recolhidas por centrifugação a 800 X g durante 10 minutos à temperatura ambiente. A solução sobrenadante foi removida por aspiração, e as partículas lavadas duas vezes por ressuspensão em solução salina normal fresca e centrifugação. O produto final lavado foi ressuspensão a 33% de volume de partículas empacotadas e armazenado.

A caracterização dos rendimentos de citosina-arabinosídeo encapsulada e livre (sobrenadante) e morfina a partir das formulações com MVL de tricapriline e tricaprina foi efetuada algumas horas pós-fabrico (Tabela 2). Os rendimentos da citosina-arabinosídeo e morfina encapsuladas foram aceitáveis, e as concentrações livres (sobrenadante) de citosina-arabinosídeo e morfina foram baixas tanto para as formulações de tricapriline como de tricaprina.

TABELA 2

Agente Ativo da Primeira Fase Aquosa	Lípido Neutro	Rendimento, %, do Agente Ativo Inicial	Concentração de Armazenamento, mg/mL	Concentração de Sobrenadante, mg/mL
Citosina-Arabinosídeo	Tricaprilina	42	7,0	0,3
	Tricaprina	37	6,2	0,2
Sulfato de Morfina	Tricaprilina	46	11,2	0,3
	Tricaprina	36	8,9	0,2

2. Perfis de libertação durante o armazenamento

As suspensões foram armazenadas a 2-8, 25, 32 ou 37 °C. Nos pontos temporais de 24, 48 e 200 horas as suspensões foram centrifugadas a 25.000 X G durante 2 minutos, e analisaram-se soluções de sobrenadante quanto ao conteúdo em citosina-arabinosídeo ou morfina através de uma diluição de 1:1 em volume com álcool isopropílico a 50%, submissão a vórtice, incubação a 37 °C durante 10 minutos, e centrifugação. As amostras de sobrenadante foram analisadas por diluição em HCl 0,1 N, e mediu-se a concentração de citosina-arabinosídeo por absorvância determinada a 280 nm, ou diluição em NaOH 0,1 N, e mediu-se a concentração de morfina por absorvância determinada a 298 nm.

Os resultados destes estudos do efeito da temperatura de armazenamento são apresentados nas Figuras 19A-D. As velocidades de libertação dos MVL contendo tricapriline (ponto de fusão de 8 °C) são muito lentas a 2-8 °C. A velocidade de libertação aumentou com o aumento da temperatura de armazenamento tal como seria de esperar, consistente com a aceleração da libertação com a elevação da temperatura (Figuras 19A e 19C). A formulação AraC-MVL

contendo tricaprina (ponto de fusão de 31 °C), no entanto, libertou o agente ativo a uma velocidade muito rápida quando armazenada abaixo do ponto de fusão do triglicérido. Com o armazenamento dos MVL de tricaprina às temperaturas mais elevadas de 25 °C e 32 °C, a velocidade de libertação diminuiu, mas com o armazenamento a 37 °C aumentou novamente (Figura 19B). Com efeito, as partículas de AraC-MVL contendo tricaprina, armazenadas abaixo da temperatura de fusão do lípido neutro tricaprina (31 °C), foram completamente desestabilizadas e libertaram a morfina encapsulada ao longo de algumas horas (Figura 19B).

Os resultados para o estudo do armazenamento de MVL contendo citosina-arabinosídeo são apresentados na Figura 20 por meio de um gráfico de Arrhenius. A formulação com MVL de tricaprina apresentou uma relação linear contínua esperada, quando se representa o logaritmo da velocidade de libertação em função da temperatura, sugerindo que um único processo é responsável pela libertação. Por outro lado, o gráfico dos dados para a formulação de tricapriline foi descontínuo, indicando que dois processos são responsáveis pela libertação no intervalo de temperaturas estudado. A temperaturas mais elevadas, acima do ponto de congelamento da tricaprina, o declive foi tal como esperado, isto é, as velocidades aumentaram com o aumento da temperatura de armazenamento. O segundo processo, o efeito do ponto de fusão, é observado abaixo do ponto de congelamento da tricaprina, em que a velocidade aparente aumentou com a diminuição da temperatura.

Uma vez mais, a comparação dos perfis de velocidades de libertação (19A-D) das partículas com citosina-arabinosídeo encapsulada como um componente de primeira fase aquosa, com

partículas com sulfato de morfina encapsulado indica que o início do efeito de desestabilização causado pelo armazenamento de formulações abaixo do ponto de fusão do lípido neutro, denominado neste documento "efeito do ponto de fusão", é dependente da composição da primeira solução de fase aquosa. O início do efeito do ponto de fusão dos MVL de tricaprina durante o armazenamento observou-se ser rápido com as formulações contendo citosina-arabinosídeo, (Figura 19B) mas necessitou de vários dias para as formulações contendo sulfato de morfina (Figura 19D). Adicionalmente, os resultados destes estudos sugerem que quanto mais abaixo do ponto de congelamento a formulação for armazenada, mais rápido o início do efeito do ponto de fusão.

Exemplo 15

Neste exemplo, a fase aquosa continha sacarose, citosina-arabinosídeo e HCl 0,1 N como espaçador osmótico. Os MVL foram fabricados com trioleína (p.f. 8 °C), tricaprina (p.f. 31 °C), ou trilaurina (p.f. 46 °C) como lípido neutro. O produto final foi armazenado a uma temperatura de 2-8 °C, 22, ou 37 °C, e a libertação de materiais encapsulados foi registada durante o tempo de armazenamento.

1. Fabrico

Para o fabrico de MVL encapsulando citosina-arabinosídeo, com sacarose como espaçador osmótico na presença de HCl 0,1 N, a solução de combinação de lípidos continha (por litro) 10,4 g de DOPC, 2,1 g de DPPG, 7,7 g de colesterol, e o componente triglicérido consistiu em 1,1 g de tricaprina

(C10), 1,3 g de trilaurina (C12), ou 1,7 g de trioleína (a razão molar DOPC:DPPG:colesterol:triglicérido foi de 0,34:0,07:0,52:0,06).

A primeira solução de fase aquosa continha (por mL) 20 mg de citosina arabinosídeo e 51,3 mg de sacarose em HCl 0,1 N. Preparou-se uma primeira emulsão misturando a alta velocidade 3 mL de solução de combinação de lípidos com 3 mL de solução de fase aquosa a 9000 rpm durante 8 minutos a 25-27 °C. A emulsão foi cisalhada em microgotículas (esférulas) por adição de 20 mL de lisina 20 mM, solução de glicose a 4% ao recipiente de mistura, e misturando a 5000 rpm durante 1,5 minutos. O clorofórmio foi removido das gotículas ou esférulas microscópicas transferindo a suspensão para um frasco contendo 70 mL de uma solução de lisina 40 mM, solução de glicose a 3,2%, colocando o frasco num banho de água girorrotativo a 37 °C, e fazendo passar azoto gasoso sobre a superfície da suspensão com um caudal de 70 cfh durante 20 minutos para formar as partículas de MVL em suspensão.

As suspensões foram diluídas de 1:4 em volume com solução salina normal, e as partículas foram recolhidas por centrifugação a 800 X g durante 10 minutos à temperatura ambiente. A solução sobrenadante foi removida por aspiração, e as partículas lavadas duas vezes por ressuspensão em solução salina normal fresca e centrifugação. O produto final lavado foi ressuspenso a 25% de volume de partículas empacotadas por volume total e armazenado a 2-8, 22, e 37 °C durante 1 ou 6 dias (dados não apresentados). A suspensão e a fração do sobrenadante obtido por centrifugação a 25.000 X G durante 2 minutos foram analisadas quanto ao conteúdo de citosina-

arabinosídeo por diluição de 1:1 em volume com álcool isopropílico a 50%, submissão a vórtice, incubação a 37 °C durante 10 minutos, e centrifugação. De seguida, adicionaram-se 0,06 ou 0,2 mL da amostra a 1,0 mL de HCl 0,1 N, e mediu-se a concentração de citosina-arabinosídeo por absorvância determinada a 280 nm.

TABELA 3

Componente Triglicérido	Temperatura de Armazenamento	Total de AraC Encapsulada	AraC no Sobrenadante a 24h	Razão de Sobrenadante para o Total
	°C	mg/mL	mg/mL	(Sobren./Total)
Trioleína, p.f. 5°C	2-8	6,0	0,4	0,06
	22	5,6	0,3	0,05
	37	5,2	0,9	0,17
Trilaurina, p.f. 46°C	2-8	3,0	2,5	0,82
	22	3,1	2,0	0,65
	37	3,0	2,3	0,78
Tricaprina, p.f. 31°C	2-8	5,6	5,0	0,90
	22	5,4	4,8	0,90
	37	6,7	0,6	0,09

Tal como se mostra nos dados da Tabela 3, o rendimento do produto dos MVL formulados usando cada um dos lípidos neutros, foi de pelo menos 3,0 mg/mL, um rendimento aceitável. A inspeção das partículas com microscopia de luz branca mostrou que as partículas eram de aparência esférica e multivesiculada imediatamente após o fabrico. No entanto,

em 24 horas de armazenamento a temperaturas abaixo do ponto de fusão do triglicérido, as partículas mudaram de aparência. Associada à mudança da aparência esteve uma perda significativa da AraC encapsulada na solução de armazenamento (sobrenadante), tal como se pode ver pelos dados na coluna 3 da Tabela 3. É de salientar que a formulação fabricada com tricaprina (p.f. 31 °C) não mudou de aparência ou perdeu AraC significativa quando armazenada a 37 °C, ao passo que a formulação com trilaurina (p.f. 46 °C) sofreu uma mudança morfológica significativa e perda do agente ativo encapsulado. Assim, na formulação de MVL para a administração *in vivo* controlada e sustentada do agente ativo encapsulado, o lípido neutro selecionado deve normalmente ter um ponto de fusão inferior ou perto da temperatura de armazenamento pretendida. Uma formulação preferida mantém uma razão sobrenadante/total de menos de 0,10 durante o armazenamento.

Exemplo 16

Este exemplo ilustra que certas soluções de fase aquosa são interativas com a membrana da camada lipídica dos MVL e previnem o congelamento dos lipossomas a temperaturas de armazenamento abaixo do ponto de fusão do lípido neutro. Nesses casos, a transição morfológica das partículas e a perda dos materiais encapsulados associadas ao armazenamento abaixo do ponto de fusão do lípido neutro podem ocorrer muito lentamente, ou desaparecer. Alternativamente, a libertação de materiais encapsulados é associada à ativação com o aumento da temperatura de armazenamento.

1. Fabrico

Para o fabrico de MVL encapsulando IGF rhu com sacarose marcada com ^{14}C como espaçador osmótico e citrato de amónio como tampão, a solução de combinação de lípidos continha (por litro) 10,4 g de DOPC, 2,1 g de DPPG, 7,7 g de colesterol, e o componente triglicérido consistiu em 1,3 g de tricaprina (p.f. 31 °C, C10) (a razão molar DOPC:DPPG:colesterol:triglicérido foi de 0,34:0,07:0,52:0,06).

A primeira solução de fase aquosa continha (por mL) 16 mg de IGF-1 rhu (Chiron, Foster City, CA), 7% de sacarose marcada com ^{14}C , e citrato de amónio 20 mM, pH 5. Preparou-se uma primeira emulsão misturando a alta velocidade 5 mL de solução de combinação de lípidos com 5 mL de solução de fase aquosa a 9000 rpm durante 9 minutos a 25-27 °C. A emulsão foi cisalhada em microgotículas (esférulas) por adição de 30 mL de lisina 40 mM, solução de glicose a 4% ao recipiente de mistura, e misturando a 6000 rpm durante 1 minuto. O clorofórmio foi removido das gotículas ou esférulas microscópicas transferindo a suspensão para um frasco contendo 70 mL de lisina 40 mM, solução de glicose a 3,2%, colocando o frasco num banho de água girorrotativo a 37 °C, e fazendo passar azoto gasoso sobre a superfície da suspensão com um caudal de 70 cfh durante 20 minutos para se obter as partículas de MVL.

As suspensões foram diluídas de 1:4 com solução salina normal, e as partículas foram recolhidas por centrifugação a 800 X g durante 10 minutos à temperatura ambiente. A solução sobrenadante foi removida por aspiração, e as partículas lavadas duas vezes por ressuspensão em solução salina normal fresca e centrifugação.

2. Velocidade de libertação *in vitro*

O produto final lavado foi ressuspenso a 25% de volume de partículas empacotadas por volume total e armazenado a temperaturas de 2-8, 25, 32, e 37 °C durante 24 ou 48 horas. As frações de pelotas e do sobrenadante da centrifugação a 25.000 X G durante 2 minutos foram ensaiadas quanto ao conteúdo de IGF-1 (fração de pelotas apenas) e sacarose marcada com ^{14}C .

TABELA 4

Temperatura	Retido às 24 horas		Retido às 48 horas	
°C	Sacarose marcada com ^{14}C	IGF-1	Sacarose marcada com ^{14}C	IGF-1
2-8	1,00	1,00	0,98	0,98
25	0,95	0,97	0,91	0,94
32	0,90	0,96	0,74	0,86
37	0,83	0,91	0,56	0,75

Os resultados destes estudos sumariados na Tabela 4 mostram que o conteúdo da primeira solução de fase aquosa pode prevenir ou retardar o efeito de congelamento que se mostrou no Exemplo 16 estar associado ao armazenamento de MVL contendo trilaurina como lípido neutro a uma temperatura inferior ao seu ponto de fusão de 46 °C. Os lípidos usados e o método de fabrico foram idênticos em ambas as formulações; no entanto, os componentes encapsulados da fase aquosa foram diferentes. Isto sugere que a composição da primeira fase aquosa pode modular o ponto de congelamento do triglicérido ou o efeito do ponto de fusão, prevenindo por exemplo o lípido neutro de

transitar para uma estrutura instável ou retardando marcadamente o congelamento.

A libertação em plasma das formulações com MVL contendo tricaprina e trilaurina (mostrada no Exemplo 16) foi marcadamente mais lenta que a dos MVL fabricados com tricaprilina, tal como se mostra na Tabela 4 e nos exemplos posteriores. Deve notar-se que todos os ensaios de libertação em plasma conduzidos a 37 °C foram iniciados dentro de 24 horas depois do fabrico. O armazenamento da trilaurina a 2-8 °C durante mais do que alguns dias, mas não das formulações contendo tricaprina, resultou numa mudança morfológica da aparência das partículas e libertação dos materiais encapsulados, consistente com o "efeito do ponto de fusão".

Exemplo 17

Outros lípidos neutros

Efetuuou-se uma série de estudos em que os lípidos neutros foram o decano, dodecano, esqualeno, e o alfa-tocoferol, para determinar o âmbito de lípidos neutros que podem ser usados para se obter formulações lipossomais multivesiculares.

1. Fabrico

Fabricaram-se lipossomas multivesiculares encapsulando uma combinação de glicina, sacarose e Tris-EDTA, em que a solução de combinação de lípidos continha (por litro) 10,4 g de DOPC, 2,1 g de DPPG, 7,7 g de colesterol, e o componente trioleína (6% em moles de lípido) foi

substituído com decano, dodecano, esqualeno, ou alfa-tocoferol, (razão molar DOPC:DPPG:colesterol:lípido neutro de 0,34:0,07:0,52:0,06).

A primeira solução de fase aquosa continha glicina 200 mM, Sacarose 50 mM, Tris base 1,8 mM, e EDTA 0,5 mM, pH 7,44, com uma osmolaridade de 268 mOsmol. Preparou-se uma primeira emulsão misturando a alta velocidade 3 mL da solução de combinação de lípidos com 3 mL de solução de fase aquosa a 9000 rpm durante 9 minutos a 25-27 °C. A emulsão foi cisalhada em microgotículas (esférulas) pela adição de 20 mL de lisina 20 mM, solução de glicose a 4% ao recipiente de mistura e misturando a 4000 rpm durante 1,0 minuto.

O exame das suspensões de esférulas ao microscópio indicou que as esférulas preparadas com cada um destes lípidos neutros eram normais na aparência interna quando comparadas com os controles preparados com trioleína, tripalmitoleína, ou trimiristoleína como componente lipídico neutro.

O clorofórmio foi removido das gotículas ou esférulas microscópicas transferindo a suspensão para um frasco contendo 30 mL de uma solução de lisina 40 mM, glicose a 3,2%, colocando o frasco num banho de água girorrotativo a 37 °C, e fazendo passar azoto gasoso sobre a superfície da suspensão com um caudal de 70 cfh durante 20 minutos para se obter as partículas de MVL.

Apenas os MVL preparados com esqualeno como lípido neutro sobreviveram à etapa de remoção do solvente ou posterior lavagem das partículas, e deram origem a partículas de MVL com aspeto normal após a etapa de lavagem. Durante a etapa

de remoção do solvente, as esférulas de decano, dodecano e alfa-tocoferol começaram a encolher, com lóbulos de material refratável leve a emanar da sua superfície. Abruptamente, as partículas colapsaram numa estrutura canelada. Em alguns casos recuperou-se uma pelota, embora pequena quando comparada com os controlos, da etapa de lavagem, e as partículas não tinham a aparência de composições de lipossomas multivesiculares.

REIVINDICAÇÕES

1. Um método para modificar a velocidade de libertação de um composto biologicamente ativo encapsulado num lipossoma multivesicular, em que o referido método compreende a utilização de uma mistura de trioleína ou tripalmitoleína e de um lípido neutro de libertação rápida como componente lipídico neutro numa formulação multivesicular na qual é encapsulado um composto ativo;
em que a velocidade de libertação do composto biologicamente ativo aumenta proporcionalmente à razão molar de lípido neutro de libertação rápida para a trioleína ou tripalmitoleína no componente lipídico neutro; e
em que o lípido neutro de libertação rápida é selecionado de entre o grupo que consiste em tricaprilina, tricaproína e misturas das mesmas;
em que a velocidade de libertação é *in vivo*, e o componente lipídico neutro tem um ponto de fusão à temperatura *in vivo* ou abaixo dela, e à temperatura de armazenamento ou abaixo dela.
2. O método da reivindicação 1, em que o lípido neutro de libertação rápida é a tricaprilina, e a razão molar de trioleína ou tripalmitoleína para tricaprilina se encontra no intervalo de 1:1 a 1:100.
3. O método da reivindicação 1, em que a razão molar da trioleína ou tripalmitoleína para o lípido neutro de libertação rápida se encontra no intervalo de 1:1 a 1:27.

4. O método da reivindicação 1, em que a libertação é *in vivo*, e o lípido neutro de libertação rápida é a tricaprilina.

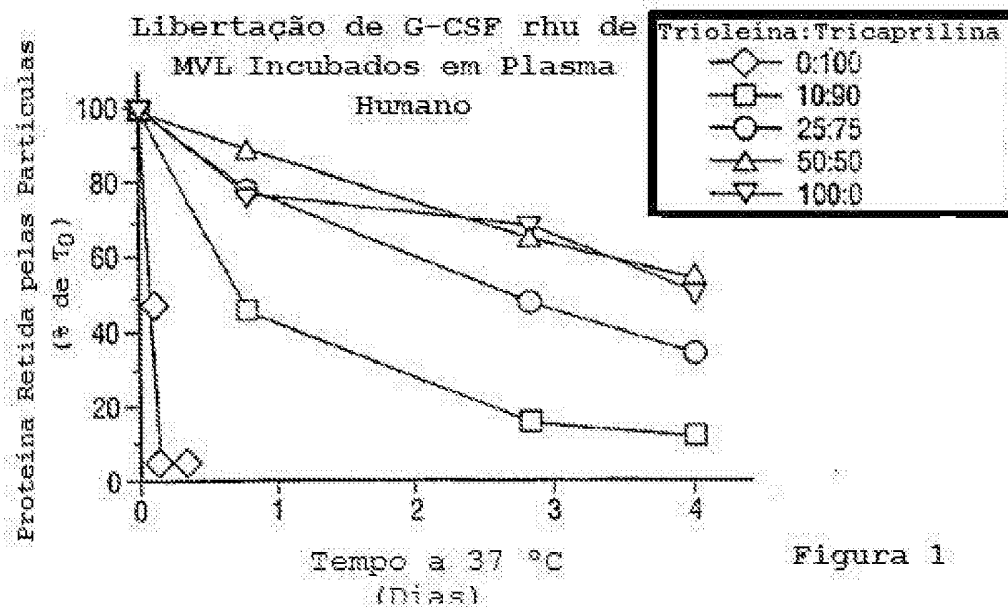


Figura 1

Formulações com MVL de Lípidos Neutros de G-CSF num Modelo Farmacodinâmico de *Hamsters*

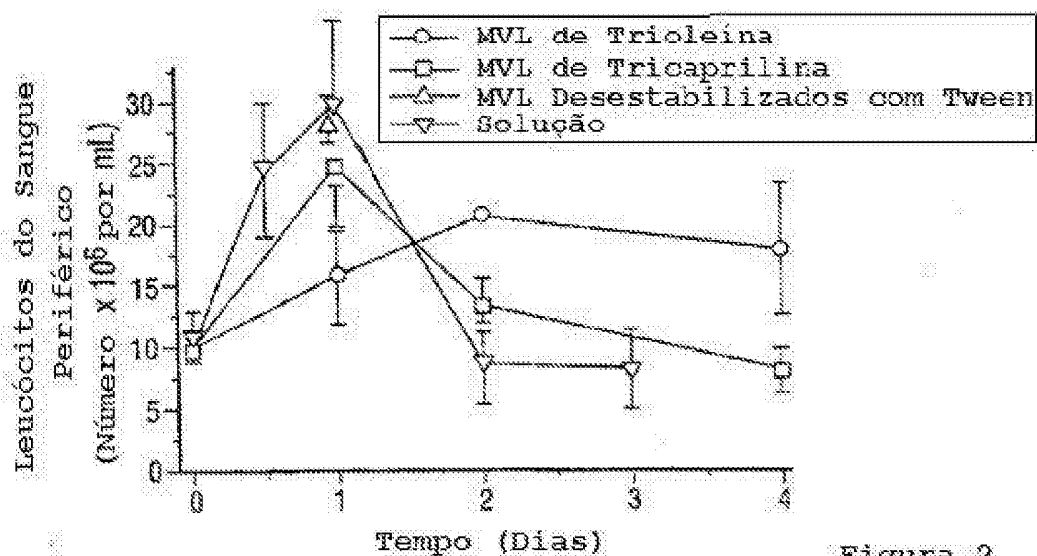


Figura 2

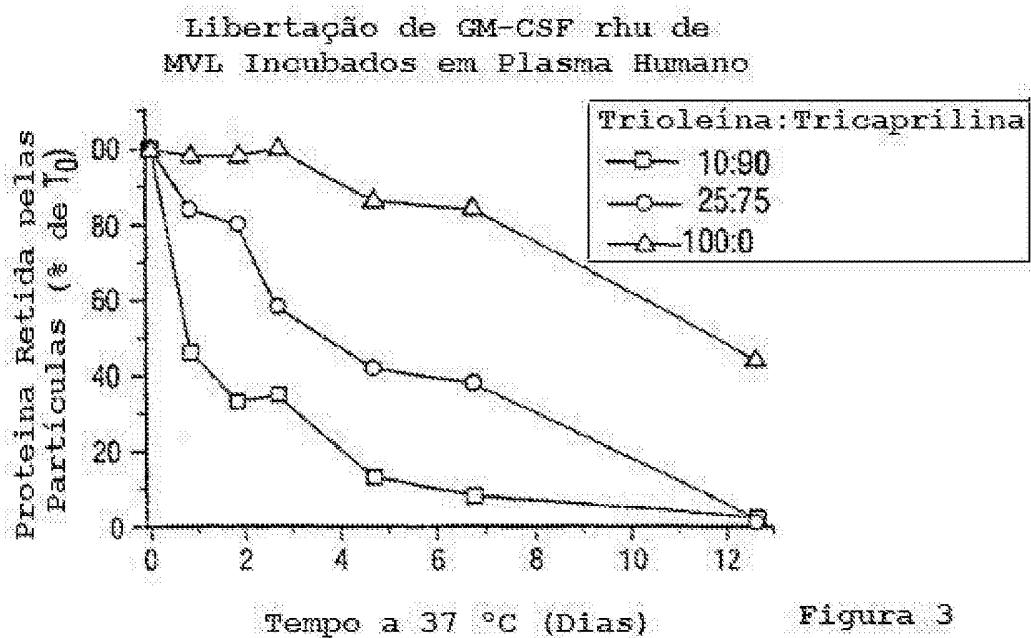


Figura 3

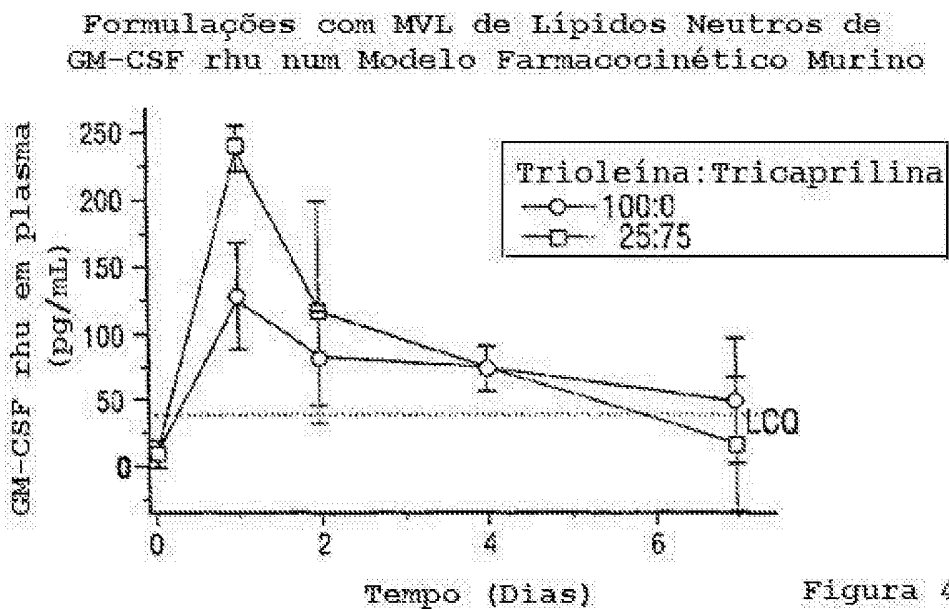
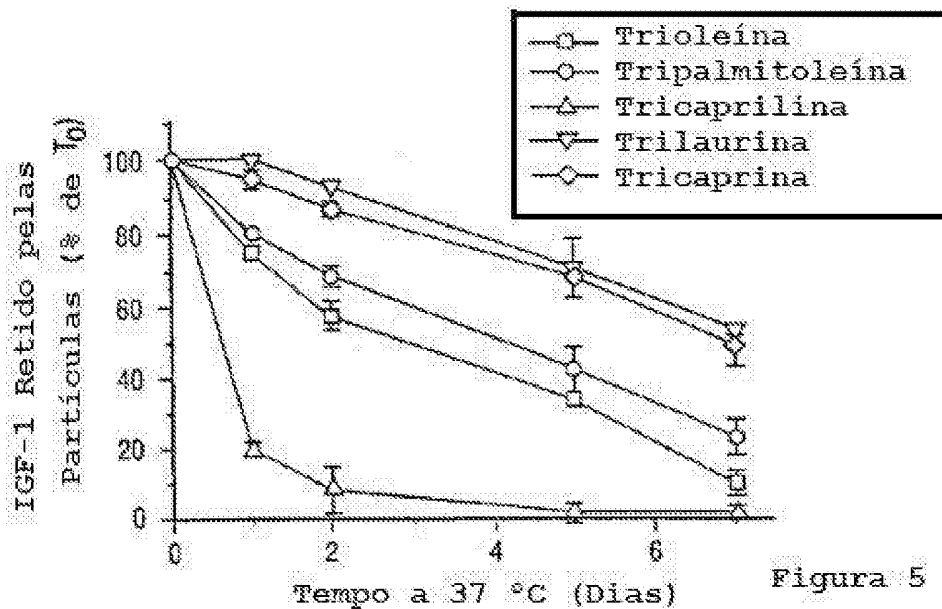
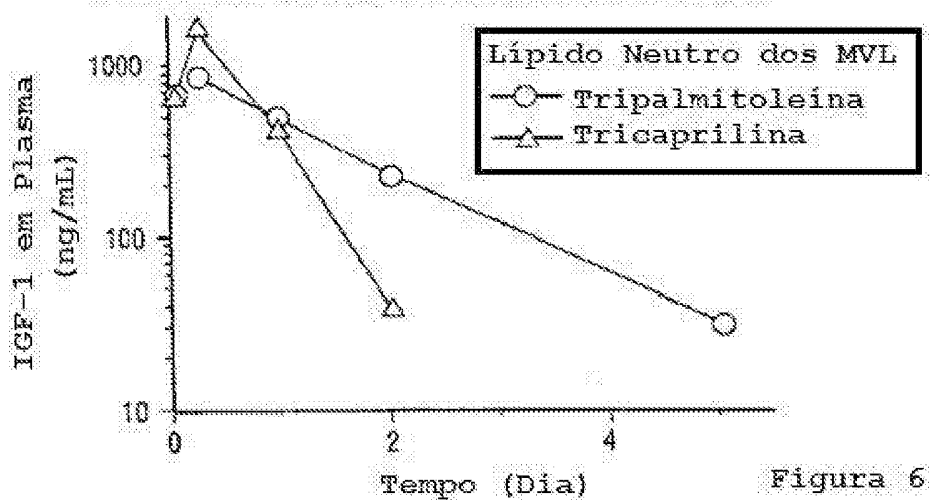


Figura 4

Libertação de IGF-1 rhu em
Plasma Humano de MVL Fabricados
com Diferentes Lípidos Neutros



Formulações com MVL de IGF-1 rhu
num Modelo Farmacocinético de Ratos



Libertação de Insulina rhu (E. coli)
e Sacarose marcada com ^{14}C de MVL
Incubados em Plasma Humano

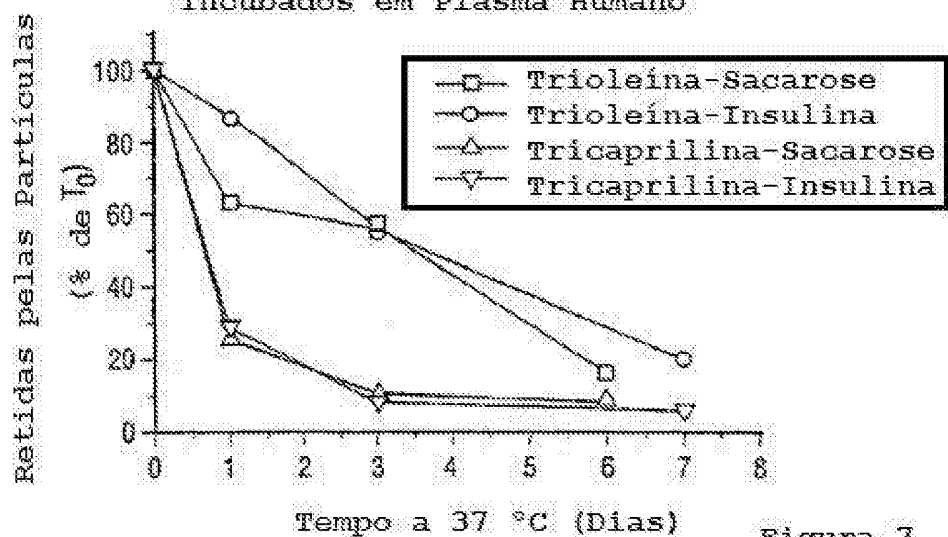


Figura 7

Libertação de Morfina de MVL
Incubados em Plasma Humano

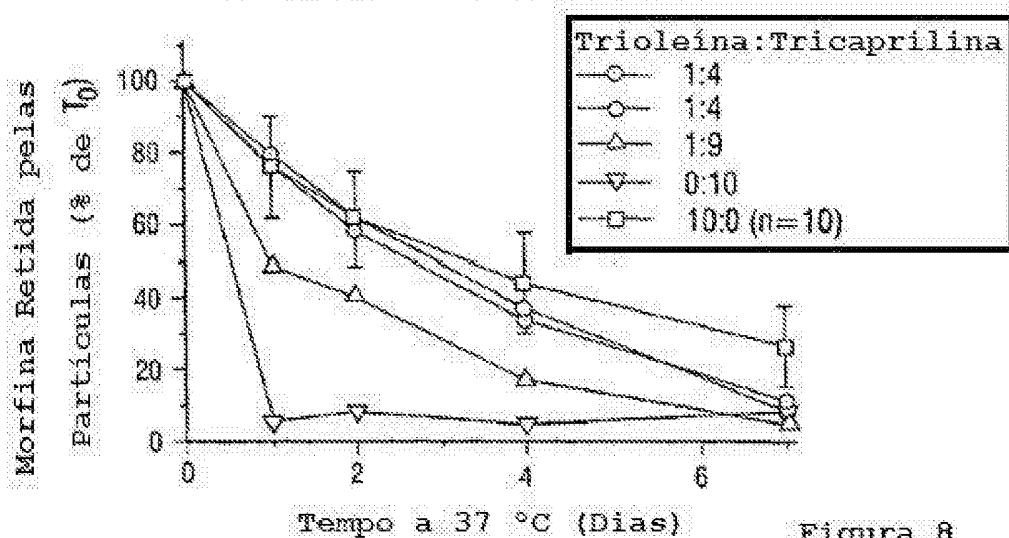
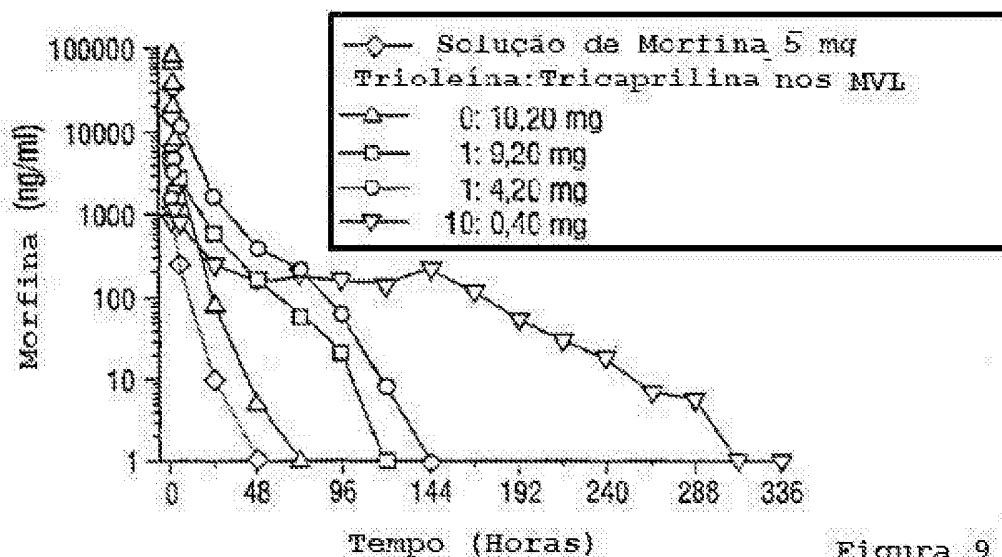
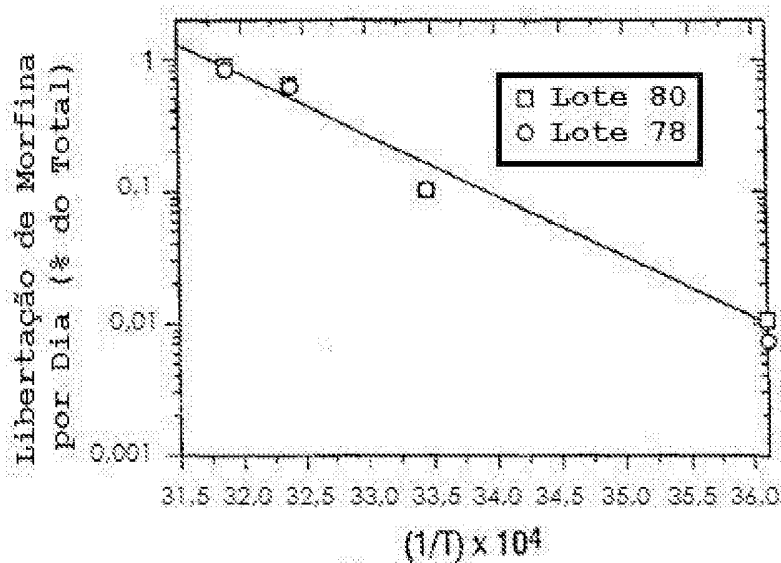


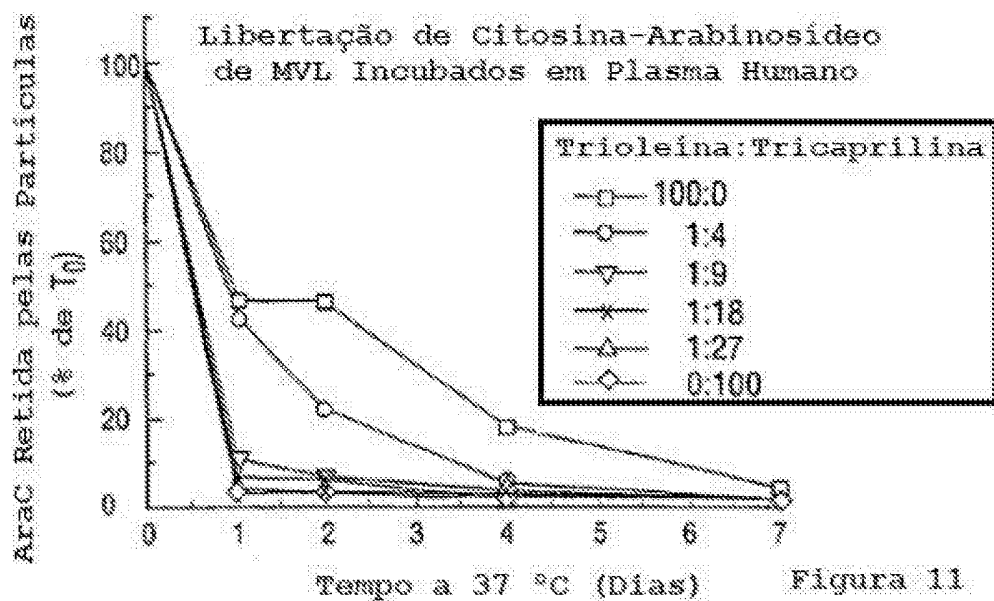
Figura 8

Níveis de Morfina em CSF de Cães Após
Injeção Epidural de Sulfato de Morfina em
Diferentes Formulações com MVL de Lípidos
Neutros

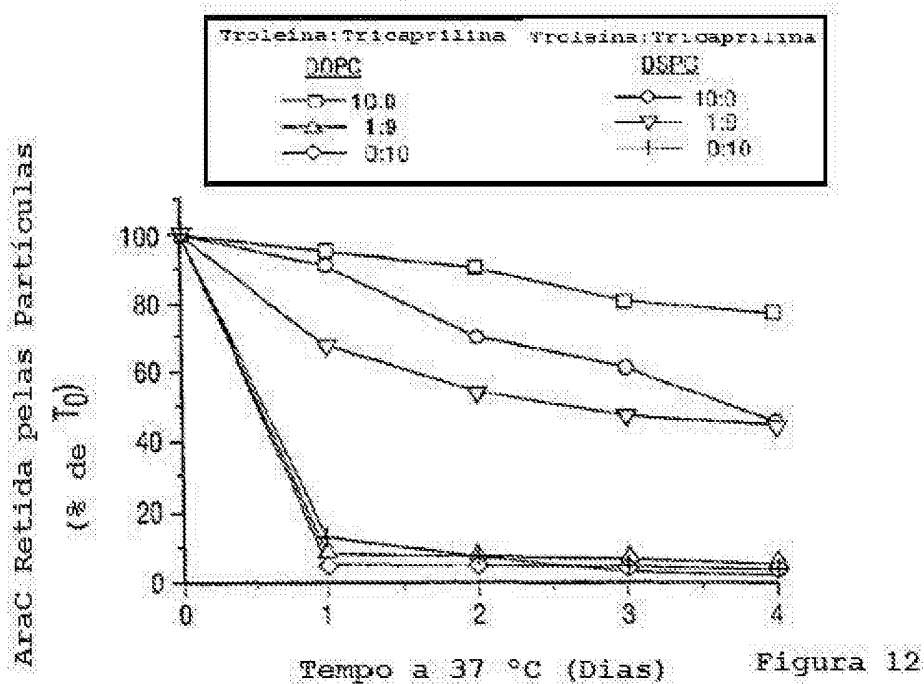


Velocidade de Libertação de Morfina de
Formulações com MVL Armazenadas a
Diferentes Temperaturas em Soluções
Salinas Normais





Influência da Composição do Comprimento da Cadeia Fosfolipídica no Efeito dos Lípidos Neutros na Libertação da Citosina-Arabinosídeo (AraC) de MVL em Plasma Humano



Libertação de Sacarose marcada com ^{14}C
de MVL Incubados em Plasma Humano

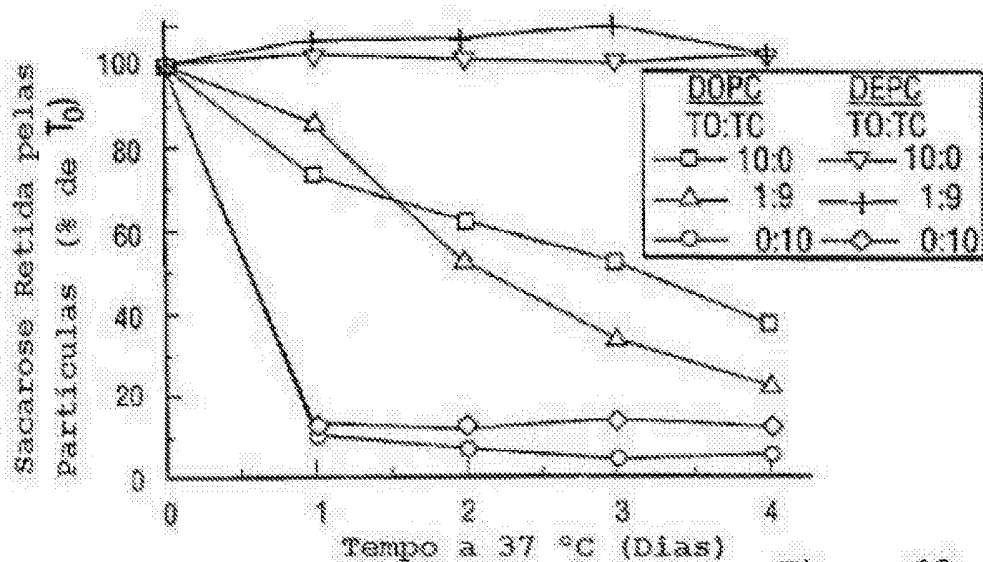


Figura 13

Libertação de Sacarose marcada com ^{14}C
por MVL Incubados em Plasma Humano

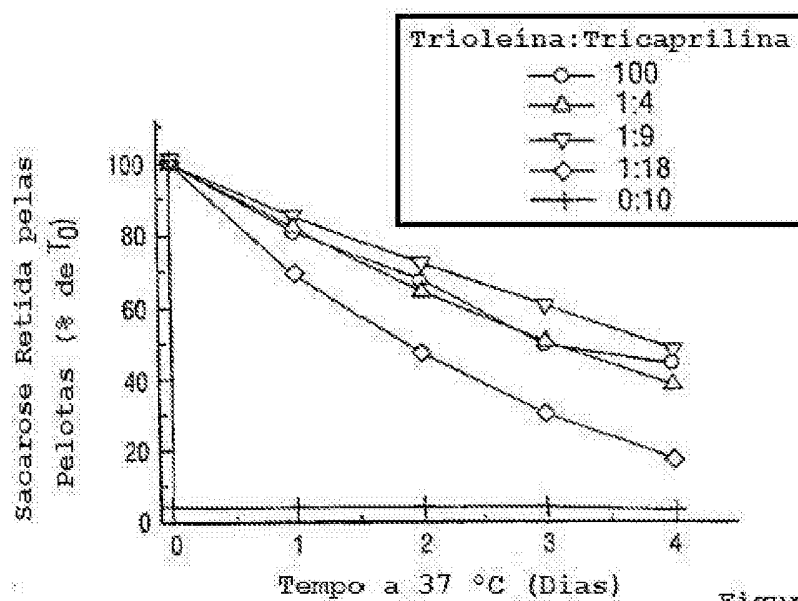
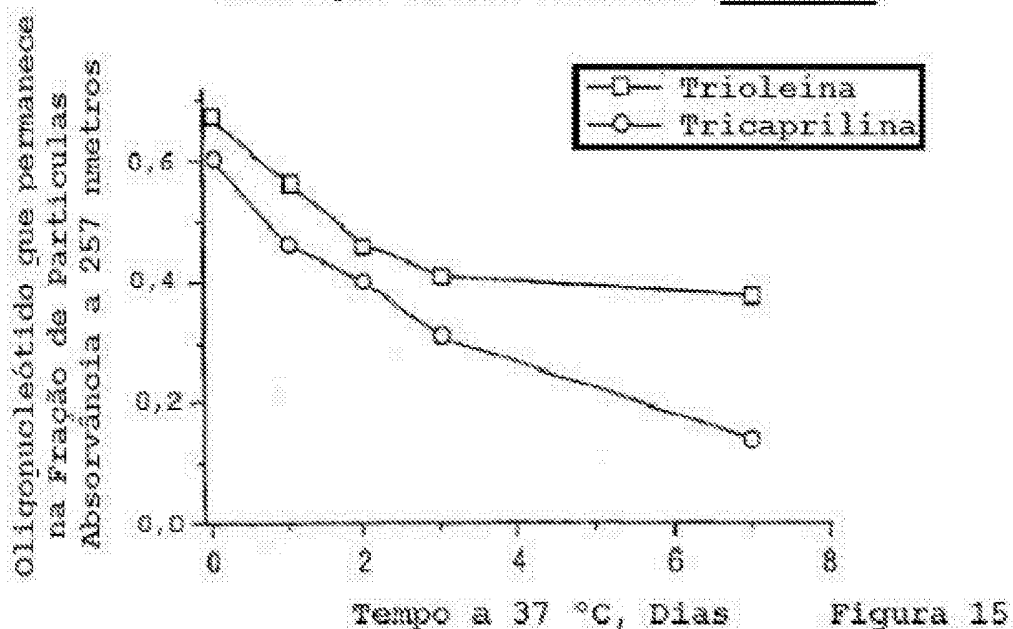
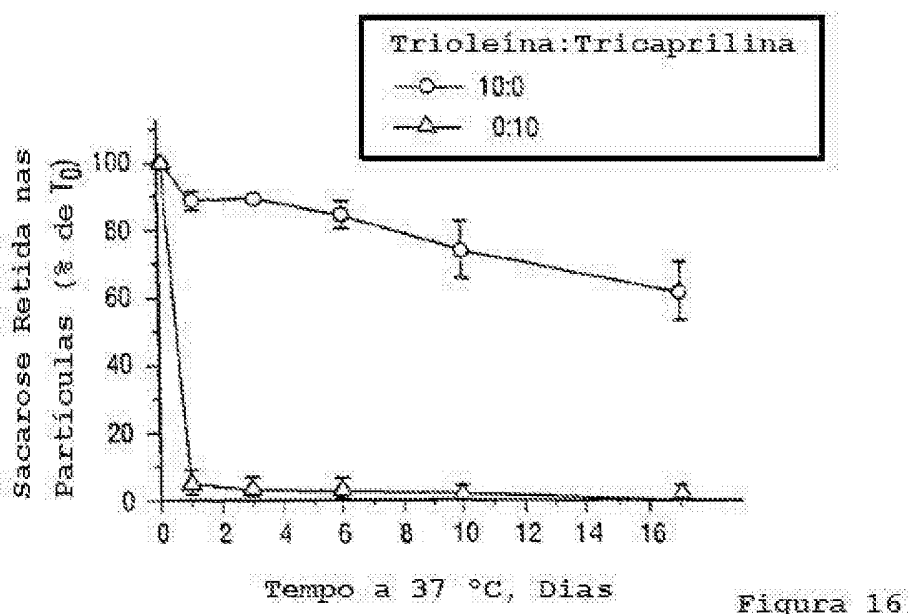


Figura 14

Libertação de um Oligonucleótido 15-mer de
MVL Preparados com Tricaprilina ou
Trioleína como Lípido Neutro Durante a
Incubação em CSF de Ratos in Vitro



Libertação de Sacarose marcada com ^{14}C
de MVL Contendo Plasmídeos Incubados
em Plasma Humano



Libertação de Sacarose marcada com
 ^{14}C de MVL Incubados em Plasma
 Humano

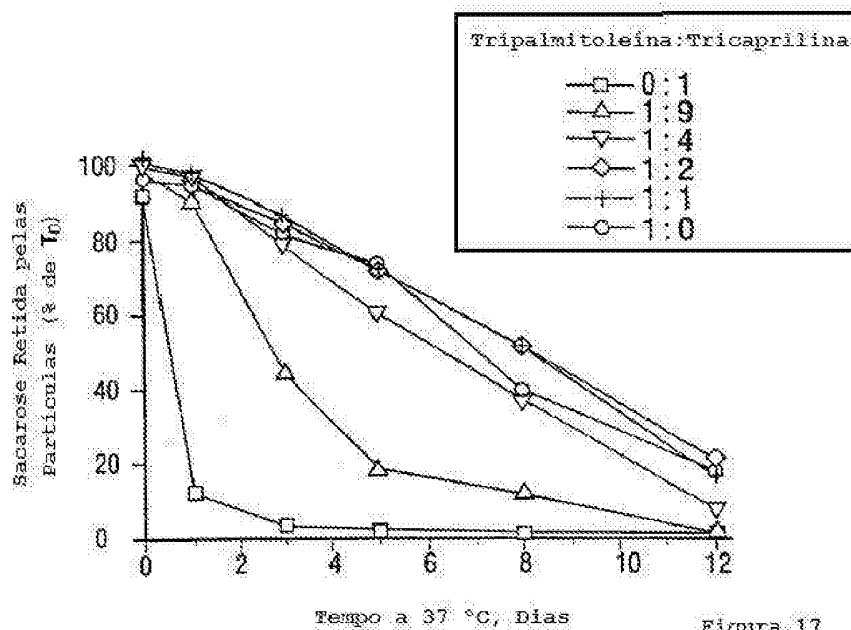


Figura 17

Libertação de Tetracaina de MVL
 Incubados em Plasma Humano

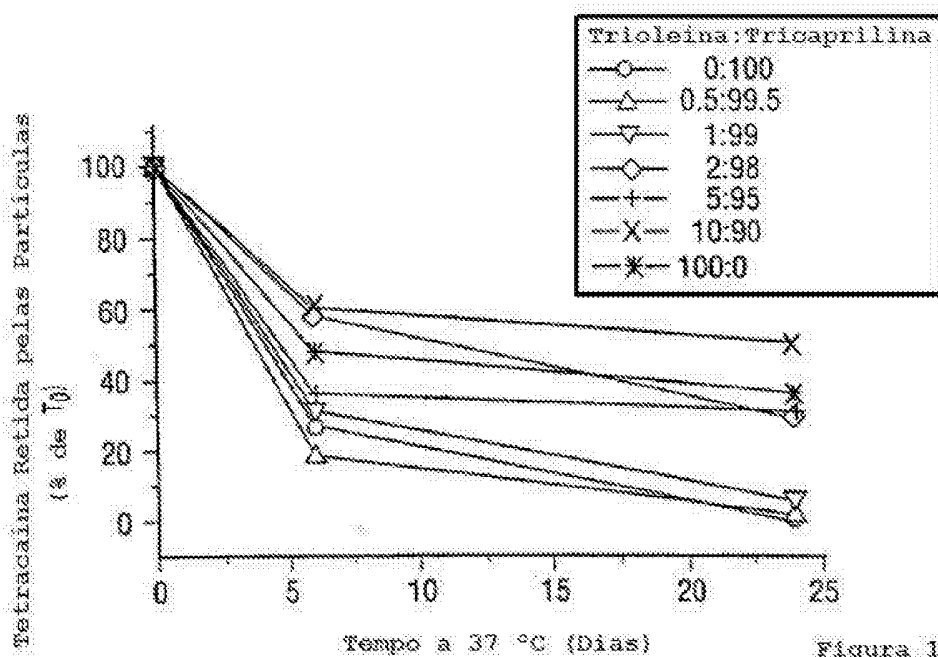
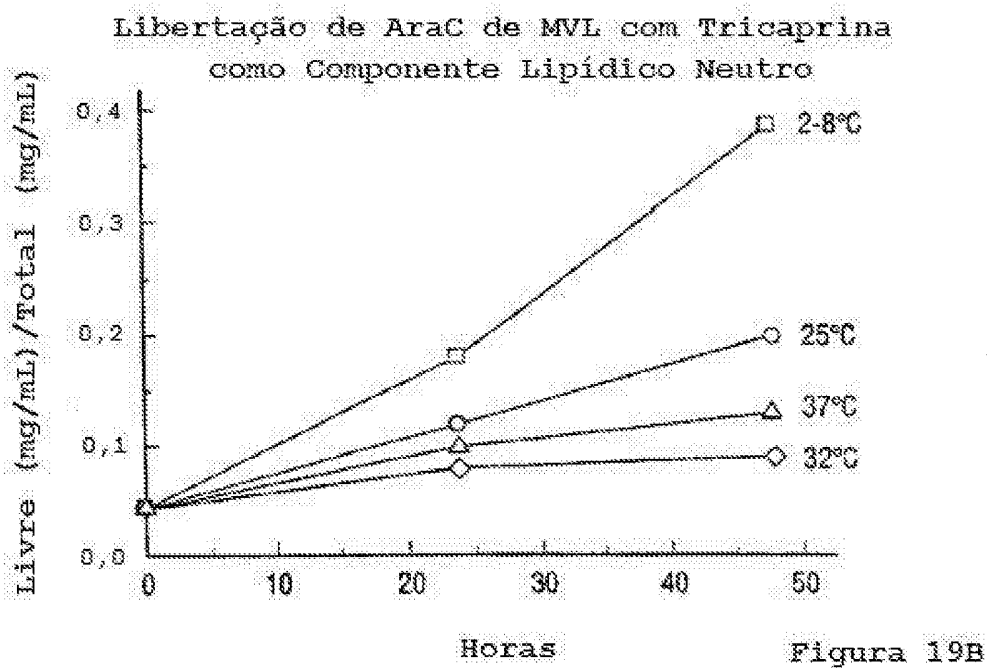
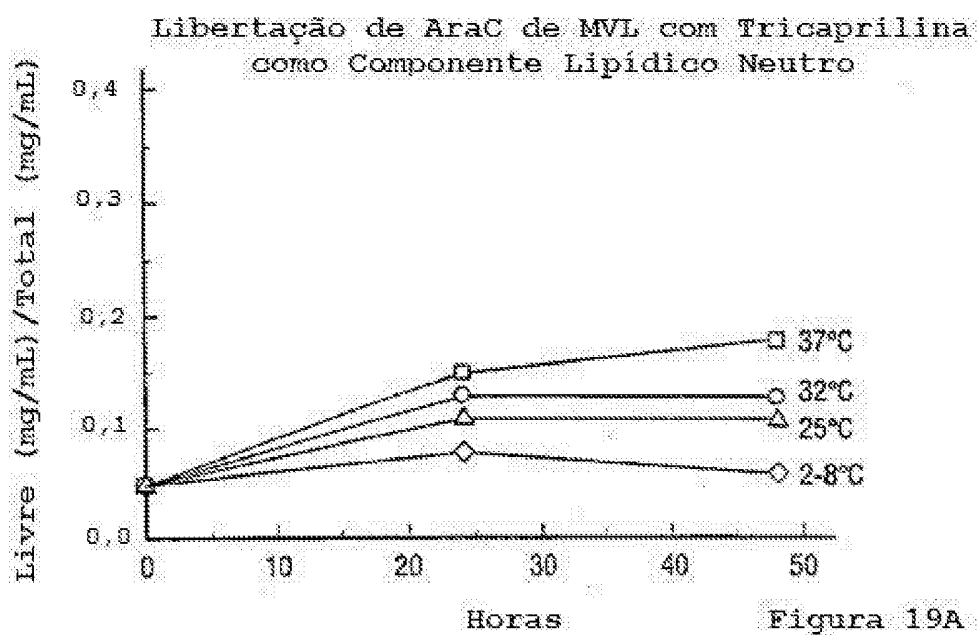


Figura 18



Libertação de Morfina de MVL com Tricaprilina
como Componente Lipídico Neutro

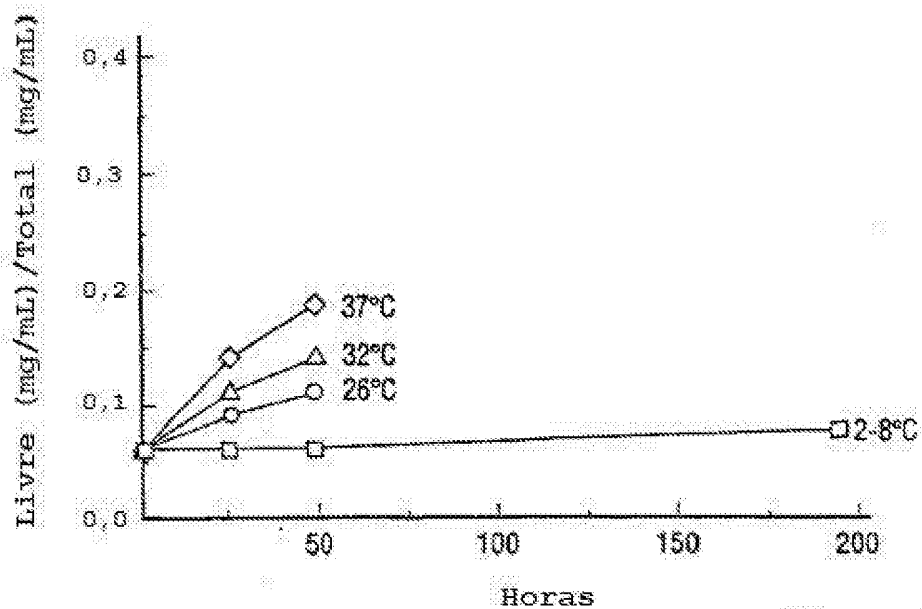


Figura 19C

Libertação de Morfina de MVL com Tricaprilina
como Componente Lipídico Neutro

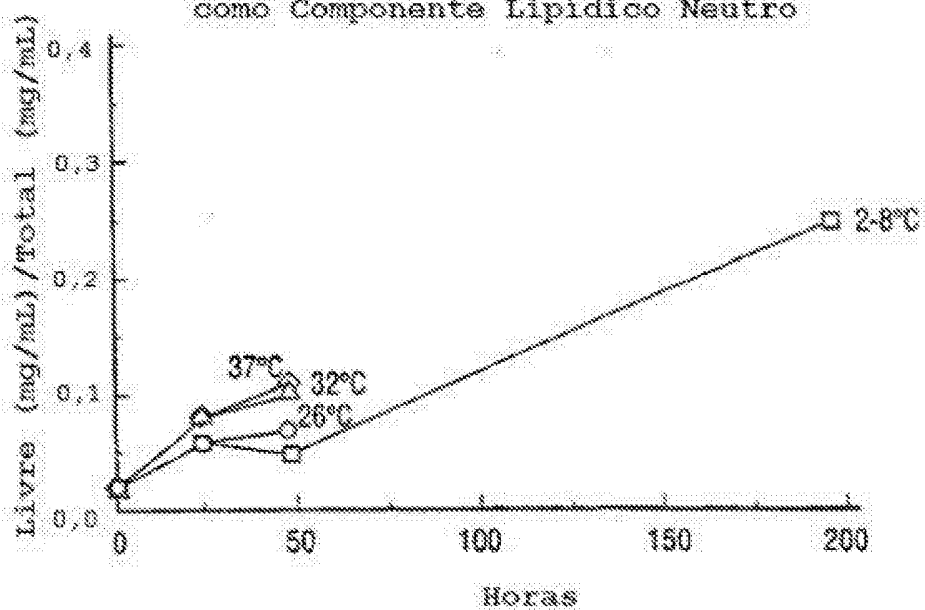


Figura 19D

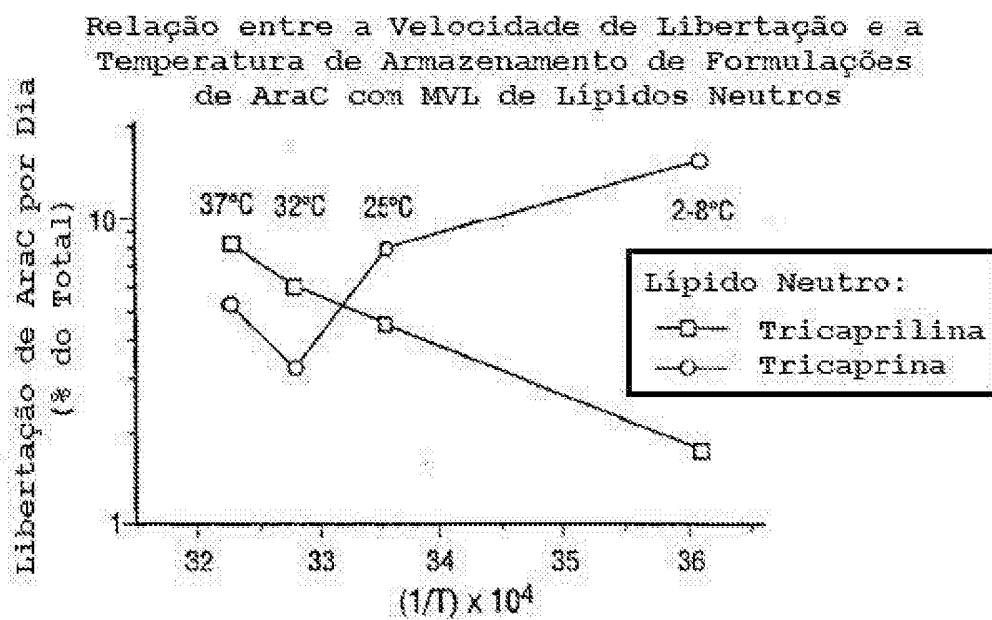


Figura 20