



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 905**

51 Int. Cl.:  
**A61K 9/127** (2006.01)  
**A61K 9/72** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03727164 .0**  
96 Fecha de presentación : **01.04.2003**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1490026**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.12.2004**

54 Título: **Liposomas nebulizables y su uso para la administración de principios activos por vía pulmonar.**

30 Prioridad: **04.04.2002 DE 102 14 983**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**14.04.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**14.04.2011**

73 Titular/es:  
**UNITED THERAPEUTICS CORPORATION**  
**1110 Spring Street**  
**Silver Spring, Maryland 20910, US**

72 Inventor/es: **Schmehl, Thomas;**  
**Gessler, Tobias y**  
**Waschkowitz, Esther**

74 Agente: **Roeb Díaz-Álvarez, María**

**ES 2 356 905 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Liposomas nebulizables y su uso para la administración de principios activos por vía pulmonar.

La presente invención se refiere a la preparación de liposomas que son estables frente a la nebulización y adecuados para la administración por vía pulmonar y que muestran una liberación retardada de los principios activos atrapados.

En la tecnología farmacéutica se distinguen diferentes formas farmacéuticas con efecto retardado. Todas ellas tienen el fin de conseguir una prolongación del efecto del fármaco correspondiente. Se distingue entre preparados de larga duración, de depósito y retardados. La liberación modificada del principio activo puede conseguirse mediante modificaciones químicas (por ejemplo, sales, ésteres, complejos), mediante aditivos (por ejemplo, el uso de coadyuvantes), mediante medidas tecnológicas (por ejemplo, la elección de determinados tamaños de partícula, dureza de los comprimidos), así como mediante la elección del punto de administración o del tipo de administración. En función del tipo de liberación se distinguen los tipos de liberación sostenida, repetida/prolongada y retardada.

La administración de principios químicos farmacéuticos al pulmón representa un problema especial, ya que, en este caso, la elección de los coadyuvantes se encuentra muy restringida por razones de tolerabilidad y es difícil conseguir una liberación dirigida y controlada.

Los liposomas se consideran inocuos toxicológicamente, como muestran los productos liposómicos ya autorizados para otras vías de administración, Daunoxome®, Ambisome®, HeparinPur®, entre otros. Las formulaciones liposómicas parecen ser adecuadas también para el pulmón, ya que pueden prepararse, totalmente o en gran parte, a partir de sustancias corporales que se hallan en el pulmón de manera natural.

El experto denomina liposomas a vesículas lipídicas que son muy similares en su estructura a las membranas celulares del cuerpo. Las paredes de las vesículas que, por ejemplo, se componen de fosfolípidos separan un espacio interno acuoso de la fase circundante, igualmente acuosa. Este tipo de vesículas lipídicas pueden formarse espontáneamente según las leyes de la termodinámica, por ejemplo, por dispersión de fosfolípidos en un medio acuoso en exceso. Normalmente, para la preparación de liposomas se emplean fosfolípidos naturales, parcialmente sintéticos o también totalmente sintéticos. Mientras que otros lípidos muestran una estructura molecular cónica que favorece la formación de micelas, los fosfolípidos presentan una geometría cilíndrica, a causa de las dos cadenas de ácido graso, que favorece la formación de estructuras laminares en medio acuoso.

La formación de las láminas individuales de un liposoma es similar a la de la membrana celular: los fosfolípidos forman capas dobles en que las partes hidrófobas de las moléculas se encuentran en el interior de la capa doble, mientras que los grupos de cabeza hidrófilos están orientados hacia fuera o hacia dentro en la fase acuosa.

Los liposomas pueden clasificarse en distintos grupos en función de su estructura y tamaño (tabla 1).

Tabla 1

Clasificación	Diámetro	Estructura
VML (vesículas multilaminares)	100-5.000 nm	varias membranas dobles
VUP (vesículas unilaminares pequeñas)	< 100 nm	vesículas unilaminares pequeñas de relleno hidrófilo
VUG (vesículas unilaminares grandes)	> 100 nm (hasta 2.000 nm)	vesículas unilaminares grandes de relleno hidrófilo

Dado que los liposomas presentan tanto regiones hidrófilas como lipófilas, los principios activos pueden incorporarse de maneras diferentes. Mientras que los principios activos lipófilos se almacenan en la membrana, las sustancias hidrófilas se encuentran en las capas acuosas de las paredes de las vesículas o en el espacio acuoso interior de los liposomas limitado por las paredes vesiculares. Los principios activos anfífilos se disponen de forma análoga a los fosfolípidos. Las diferentes propiedades de las clases de liposomas determinan sus posibles ámbitos de aplicación. De este modo, las VUP tienen un alto contenido relativo de lípidos, relativamente, y, por lo tanto, son adecuadas sobre todo para principios activos lipófilos; lo contrario sucede con las VUL, que presentan un espacio interior relativamente grande para el alojamiento de principios activos hidrófilos. Una liberación retardada puede conseguirse fundamentalmente mediante una estructura VML, con sus numerosas membranas de difusión colocadas sucesivamente.

Tanto por su tolerabilidad biológica, como también por la posibilidad de una farmacocinética modificada (por ejemplo, una liberación retardada), los liposomas representan una estrategia muy prometedora para una liberación controlada y retardada de principios activos en el pulmón.

Una liberación controlada y retardada semejante de principios activos en el pulmón podría tener una importancia terapéutica considerable para numerosas enfermedades. En particular, en el caso de enfermedades del pulmón ofrece la posibilidad de transportar los principios activos directamente al órgano diana y conseguir en estos una alta concentración local del principio activo con una larga duración del efecto. Además, la liberación retardada del principio activo puede llevar a una reducción de los efectos secundarios ya que, por un lado, se evitan las fluctuaciones de concentración intensas, con un pico de concentración alto inmediatamente después de la administración y, por otro lado, mediante el empaquetado en liposomas, pueden usarse principios activos con semividas biológicas menores que se inactivan rápidamente después de su liberación y mediación del efecto. En contraste, los principios activos con semividas biológicas largas, como los que se usan en parte para el tratamiento del asma o de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), pueden pasar a la circulación corporal a través de la barrera aire-sangre y ocasionar allí efectos secundarios. Además de las enfermedades del pulmón y las vías respiratorias ya mencionadas, asma y EPOC, en particular la pulmonía y la hipertensión pulmonar representan enfermedades que pueden tratarse mejor mediante principios activos empaquetados en liposomas. Así por ejemplo, en el tratamiento de la hipertensión pulmonar con sustancias vasoactivas (por ejemplo, prostaciclina o análogos de prostaciclina), debido a su corta semivida biológica, actualmente son necesarias inhalaciones frecuentes, en parte cada hora, de una duración de hasta 15 minutos para una disminución efectiva y constante de la presión en la circulación pulmonar. El empaquetado de las sustancias en liposomas y su liberación retardada podrían reducir drásticamente la frecuencia de las inhalaciones para beneficio del paciente y, simultáneamente, permitirían conseguir una disminución de la presión en la circulación pulmonar, constante y también mantenida durante la fase nocturna, deseada terapéuticamente.

Además de su aplicación en enfermedades del pulmón, la liberación retardada y controlada de principios activos tiene interés también para enfermedades sistémicas como, por ejemplo, la diabetes sacarina. El pulmón es un órgano que cuenta con una gran capacidad de absorción, gracias a la extrema delgadez de la capa entre el aire y la sangre y a la gran superficie total de los alveolos pulmonares. Por lo tanto, los principios activos administrados por vía transpulmonar pueden hacerse disponibles sistémicamente y emplearse de la manera correspondiente para la profilaxis o el tratamiento de enfermedades sistémicas. Por ejemplo, actualmente se está desarrollando la administración de bolos de insulina por vía inhalatoria, como alternativa a la inyección, aunque hasta ahora no se conoce ninguna formulación para la liberación basal continua de insulina en la circulación corporal. Hasta el momento no hay ninguna forma de depósito para la administración por vía pulmonar. La única posibilidad hasta ahora para una larga duración del efecto consiste en el uso de fármacos con una semivida adecuadamente larga.

El procedimiento estándar para el suministro de principios activos al pulmón es la inhalación de aerosoles. Los aerosoles portadores de principios activos se generan por medio de generadores de aerosoles adecuados, en que los aparatos habituales en la práctica son nebulizadores neumáticos o ultrasónicos, así como aerosoles dosificadores o inhaladores de polvo. La deposición de aerosoles en las vías respiratorias depende especialmente de la distribución del tamaño de partículas del aerosol. Las partículas con un diámetro aerodinámico de masa inferior a 6  $\mu\text{m}$  alcanzan el pulmón con las regiones traqueal, bronquial y alveolar en un alto porcentaje; por lo tanto, para fines terapéuticos han de usarse aerosoles con diámetros de partículas inferiores a 6  $\mu\text{m}$ .

Las formulaciones de principios activos presentes en disolución acuosa pueden nebulizarse con generadores de aerosoles neumáticos o ultrasónicos. Para el uso de aerosoles dosificadores o inhaladores de polvo han de llevarse a cabo otras modificaciones adicionales de la formulación del principio activo (por ejemplo, su disolución o suspensión en agentes de expansión, micronización como polvo seco). En el caso de dispersiones liposómicas acuosas, la nebulización neumática o ultrasónica es especialmente apropiada como procedimiento de generación de aerosoles. Los dos procedimientos tienen en común el desprendimiento de gotas de aerosol a partir del líquido continuo por la acción de energía mecánica. En estos procesos actúan fuerzas sobre el líquido que ha de nebulizarse y sobre las vesículas lipídicas suspendidas que pueden conducir a un daño de la integridad de las vesículas lipídicas y, con ello, a una liberación prematura del principio activo atrapado en las vesículas. Por lo tanto, una condición básica para aplicabilidad pulmonar de formulaciones liposómicas de depósito como aerosoles es una estabilidad suficiente de los liposomas frente al proceso de nebulización. La estabilidad de los liposomas frente a la nebulización depende fundamentalmente, además de de las condiciones técnicas de los distintos procedimientos de nebulización (presión, frecuencia ultrasónica), del tipo de liposomas y de su tamaño, así como de la composición química de las membranas liposómicas. Otra posibilidad para suministrar principios activos al pulmón es la instilación intratraqueal. En este procedimiento se introduce un tubo en la tráquea o en los bronquios situados más abajo y la disolución del principio activo se transporta a través de dicho tubo a las vías respiratorias. Aunque este procedimiento plantea considerablemente menores exigencias de estabilidad a las formulaciones liposómicas que la nebulización, conduce a una distribución no homogénea del material suministrado en el pulmón. Además, debido a su invasividad, la instilación intratraqueal solamente es aplicable de manera extremadamente limitada y no es adecuada para un tratamiento domiciliario o continuado. Para ser adecuada como forma de depósito, una formulación liposómica tiene que presentar una estabilidad suficiente frente al proceso de nebulización, poder transformarse en un aerosol respirable por medio de técnicas de nebulización y presentar una liberación retardada del principio activo en el lugar de destino. De manera ideal, la liberación del principio activo comienza directamente después de la deposición de los liposomas en el pulmón y se mantiene durante varias horas. El documento EP 0361894 describe la preparación de liposomas estables con liberación retardada del principio activo. El objetivo de la presente invención es hacer disponible una formulación específica y no tóxica para la administración por vía pulmonar que sea nebulizable y respirable y que presente una liberación retardada de los principios activos y/o colorantes atrapados después de la deposición.

Este objetivo se consigue según la invención mediante la puesta a disposición de formulaciones según la reivindicación 1.

Las formulaciones liposómicas se preparan por el procedimiento de la película, conocido por el experto (véase, por ejemplo, el libro de texto de R. R. C. New (editor), *Liposomes: a practical approach*, Oxford University Press, reimpresión de 1994). Una etapa de trabajo posterior es la extrusión de los liposomas a través de membranas filtrantes, así como la separación del principio activo libre, sin encapsular, por procedimientos de centrifugación, diálisis o cromatografía.

Para determinar la eficiencia de la reacción de inclusión, los liposomas pueden destruirse con metanol y a continuación puede medirse la concentración del principio activo por medio de los procedimientos adecuados. Para caracterizar la estabilidad de los liposomas frente a la nebulización, la dispersión de liposomas se nebuliza mediante generadores de aerosol normales y se recoge el aerosol generado y a continuación se determina la cantidad libre y encapsulada de principio activo.

Sorprendentemente, los liposomas pueden transformarse fácilmente en aerosol con los nebulizadores normales neumáticos o ultrasónicos. Al nebulizar las dispersiones liposómicas se encuentran distribuciones de tamaño de partículas en el aerosol generado similares a las producidas al nebulizar una disolución salina isotónica, de modo que es posible generar aerosoles respirables a partir de las dispersiones de liposomas con nebulizadores adecuados habituales en el comercio. (Algunos ejemplos de nebulizadores habituales en el comercio: nebulizadores neumáticos como Bennett-Raindrop®, Pari LC®, Pari LL®, Ventstream®, nebulizadores ultrasónicos como Multisonic pro®, Pulmosonic®, System LS®).

**Ejemplos de realización:**

La tabla 2 muestra formulaciones liposómicas según la invención que se combinan a partir de los componentes naturales del agente tensioactivo pulmonar, dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), colesterol (Chol), dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) y esfingomielina (SM), y polietilenglicol (PEG), que no está presente en el agente tensioactivo pulmonar.

**Tabla 2**

Formulaciones liposomas de	(DPPC)	(Chol)	(PEG)	(DMPC)	(SM)
Ejemplo de realización 1	7	3	0,15	-	-
	7	3	0,3	-	-
	7	3	0,6	-	-
Ejemplo de realización 2	7	4	-	1	-
	7	4	-	2	-
	7		-	3	-
	7	4	-	4	-
Ejemplo de realización 3	7	3	-	-	2%
	7	3	-	-	4%
	7	3	-	-	6%
	7	3	-	-	8%

Las cifras indican la relación molar de los componentes DPPC, Chol, PEG y DMPC; SM se indica en porcentaje en peso.

**Preparación de liposomas**

Con las formulaciones liposómicas según la invención pueden encapsularse principios activos o colorantes hidrófilos, lipófilos y/o anfífilos con una estabilidad suficiente frente a la nebulización.

En los ejemplos de realización se usa carboxifluoresceína como principio activo modelo, un colorante hidrófilo que puede detectarse fácilmente mediante espectroscopia de fluorescencia. Para la preparación de la disolución de carboxifluoresceína (disolución de CF) se disuelven 100 mg de 5-(6)carboxifluoresceína en 10 ml de

tampón PBS y el pH de la disolución de CF se ajusta a 7,4. Para la preparación de los liposomas según el procedimiento de la película se disuelve una cantidad total de fosfolípidos de 150 mg (véanse las formulaciones de la tabla 2) en 40 ml de una mezcla de cloroformo y metanol (relación de volumen 70:30) en un matraz redondo y el disolvente se elimina al vacío a 60°C en un rotavapor. La película delgada formada en la pared interior del matraz se seca al vacío durante 2 h más. La hidratación de la película tiene lugar por la adición de 10 ml de la disolución de CF, calentada igualmente a 60°C. La dispersión generada se agita durante 2 h con calentamiento y antes de la extrusión se somete a un ciclo de congelación y descongelación. Para ello se introduce el matraz redondo en nitrógeno líquido hasta que el contenido se congela. Durante la descongelación a temperatura ambiente se rompen las membranas, atrapan más CF y de este modo se incrementa la eficiencia de la encapsulación. Este ciclo se repite cinco veces. Después, la dispersión se calienta de nuevo a 60°C en un baño de agua. En cada caso se extruden 0,5 ml de la dispersión 21 veces a través de una membrana filtrante de policarbonato con un diámetro de poro de 1,0 µm o de 0,4 µm. A continuación la dispersión se centrifuga a 4°C (4 x 45 min a 4.500 rpm ó 4 x 60 min a 15.000 rpm). La disolución de CF sobrenadante se retira por pipeteo después de cada ciclo de centrifugación y se sustituye por un volumen igual de tampón PBS.

**Ejemplo de realización 1**

Estas formulaciones liposómicas contienen una relación molar entre dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), colesterol (Chol) y polietilenglicol (PEG) de 7:3:0,15 a 7:3:0,6.

**Ejemplo de realización 2**

Estas formulaciones liposómicas contienen una relación molar entre dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), colesterol (Chol) y dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) de 7:4:1 a 7:4:4.

**Ejemplo de realización 3**

Estas formulaciones liposómicas contienen una relación molar entre dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) y colesterol (Chol) de 7:3 como porcentaje en peso y además cantidades variables de esfingomielina (SM) de más del 2%, con preferencia especial del 2-8% en peso.

Las formulaciones liposómicas con dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) y colesterol (Chol) y las combinaciones de DMPC, SM y/o PEG tienen propiedades igualmente ventajosas.

Los liposomas según la invención tienen un tamaño de 0,2-1,5 µm.

La tabla 3 muestra, a modo de ejemplo, el tamaño de los liposomas de un ciclo de preparación después de la extrusión a través de una membrana de policarbonato con un tamaño de poro de 0,4 µm, la centrifugación y la nebulización con un nebulizador neumático (se representan los valores medios con desviaciones estándar, n = 3).

**Tabla 3**

Formulaciones	Diámetro de los liposomas después de la extrusión [µm]	Diámetro de los liposomas después de la centrifugación [µm]	Diámetro de los liposomas después de la nebulización neumática [µm]
DPPC:Chol:DMPC 7:4:1 7:4:2 7:4:3 7:4:4	0,57 ± 0,01	0,58 ± 0,01	0,51 ± 0,01
DPPC:Chol:PEG 7:3:0,15 7:3:0,3 7:3:0,6	0,60 ± 0,02	0,57 ± 0,01	0,64 ± 0,01
DPPC:Chol:SM 7:3 con SM al 2% 7:3 con SM al 4% 7:3 con SM al 6% 7:3 con SM al 8%	0,65 ± 0,01	0,68 ± 0,02	0,70 ± 0,01

**Estabilidad de los liposomas frente a la nebulización**

5 Para investigar la estabilidad frente a la nebulización, las formulaciones liposómicas extrudidas a través de una membrana filtrante de policarbonato de 0,44 µm se diluyen con PBS en la relación 1:10 y 2,5 ml de cada una de las dispersiones obtenidas se nebulizan neumáticamente (a una presión de 100 kPa) o ultrasónicamente (con 10 l/minuto de aire adicional) a temperatura ambiente durante 3 minutos. El aerosol generado se conduce a través de un tubo de silicona (15 cm de largo, 3 cm de diámetro interior) a una placa deflectora de vidrio y se recoge en un recipiente de ensayo de 40 ml. Las cantidades libre y total de carboxifluoresceína en las dispersiones recogidas se analizan por espectrometría de fluorescencia.

10 Para determinar la cantidad libre de CF (C<sub>libre</sub>) se centrifugan 100 µl de la dispersión liposómica según la invención en un tubo Eppendorf, 50 µl del sobrenadante obtenido se diluyen con tampón PBS en una relación 1:100 y la concentración de CF en el sobrenadante se cuantifica por espectrometría de fluorescencia. Para determinar la cantidad total de CF (C<sub>total</sub>) se mezclan 50 µl de la dispersión liposómica según la invención con 450 µl de metanol, la mezcla se incuba durante 10 minutos y a continuación se centrifuga. En ello, la adición de metanol tiene el efecto de destruir los liposomas y liberar completamente el colorante. Después de la centrifugación se diluyen 50 µl del sobrenadante con PBS en la relación 1:1.000 y la concentración de CF se cuantifica por espectrometría de fluorescencia. La cantidad del colorante encapsulado en los liposomas (C<sub>encapsulado</sub>) puede determinarse fácilmente mediante la fórmula siguiente:

$$C_{encapsulado} = (C_{total} - C_{libre}) \times 100 / C_{total} \text{ [%]}$$

20 Las investigaciones sobre la estabilidad de los liposomas frente a la nebulización muestran que el 50%-80% de los liposomas superan el proceso de nebulización con nebulizadores neumáticos o ultrasónicos como liposomas intactos.

La tabla 4 muestra a modo de ejemplo la estabilidad de los liposomas frente a la nebulización neumática para ejemplos de realización seleccionados (valores medios ± desviaciones estándar, n = 4).

**Tabla 4**

Formulaciones	Principio activo empaquetado en liposomas después de la nebulización [%]
DPPC:Chol:DMPC 7:4:1 7:4:2 7:4:3 7:4:4	69,3 ± 1,3
DPPC:Chol:PEG 7:3:0,15 7:3:0,3 7:3:0,6	55,7 ± 1,8
DPPC:Chol:SM 7:3 con SM al 2% 7:3 con SM al 4% 7:3 con SM al 6% 7:3 con SM al 8%	76,9 ± 0,7

25 **Cinética de liberación de los principios activos y colorantes empaquetados en liposomas en un modelo de pulmón**

Las dispersiones liposómicas según la invención se investigan en un modelo de pulmón de conejo aislado, perfundido y ventilado (Seeger y col., J. Appl. Physiol. 1986, 61: 1781-1789; Seeger y col., en: Oxygen Radicals in Biological Systems, editado por L. Packer, Nueva York: Academic Press, 1994, vol. 233: 549-584). Para ello, se

administra heparina como anticoagulante a conejos con un peso entre 2,5 y 3 kg y se les anestesia con una mezcla de xilocaína, ketamina y xilacina. Se lleva a cabo una traqueostomía con ventilación con aire ambiental. Después de realizar una esternotomía media se integra un catéter en la arteria pulmonar, se liga la aorta y se abren los dos ventrículos por la punta del corazón.

5 La perfusión del pulmón tiene lugar ahora mediante una bomba de rodillo y como medio de perfusión se usa la disolución de electrolitos de Krebs-Henseleit que contiene además hidroxietilalmidón y bicarbonato de sodio. Paralelamente a la perfusión artificial se ventila el pulmón con una mezcla de oxígeno al 21%, dióxido de carbono al 5,3% y nitrógeno al 73,7%. El bloque corazón-pulmón se disecciona cuidadosamente de la cavidad torácica y a continuación se fija un segundo catéter en el ventrículo izquierdo por medio de una sutura en bolsa de tabaco. Después de colgar el pulmón en una báscula, el lado venoso del sistema de perfusión se une con el catéter integrado en el corazón, de modo que se genera un circuito de perfusión cerrado y con recirculación. Para mantener una temperatura fisiológica, el perfundido se calienta a 38°C y el pulmón que cuelga libremente se coloca en una cámara calentada.

Los parámetros estándar de la ventilación y perfusión del pulmón son:

- 15 - la perfusión del pulmón mediante la bomba de rodillo es de 100 ml/min;
- la ventilación del pulmón tiene lugar con un volumen de respiración de 30 ml y una frecuencia de respiración de 30 min<sup>-1</sup>;
- la presión positiva al final de la espiración (PPFE) es de 0,13 kPa (1 mm Hg);
- la presión ventricular izquierda se ajusta a 0,26 kPa (2 mm Hg);
- 20 - el volumen de perfundido es de 150 ml.

La administración por vía inhalatoria de los aerosoles se realiza mediante un sistema denominado de bolsa en caja (fig. 1). Este sistema consta de un nebulizador neumático (1), una bolsa de almacenamiento (2), válvulas (3) y un globo flexible (4, bolsa) que está colocado en un recipiente de vidrio hermético al aire (5, caja). La bomba respiratoria (6) está conectada al recipiente de vidrio hermético al aire (5) y transmite una presión positiva o negativa, dependiendo de la dirección del flujo de gas, al globo flexible (4) que se encuentra en el recipiente de vidrio hermético al aire (5). El aerosol generado por el nebulizador neumático (1) se dirige en primer lugar a la bolsa de almacenamiento (2). Durante la fase de espiración de la bomba (6), el globo flexible (4) se expande debido a la presión negativa en el recipiente de vidrio (5) y se llena con el aerosol de la bolsa de almacenamiento a través de un sistema de válvulas (3). En la fase de inspiración siguiente, el aerosol se transporta, con las válvulas en la posición adecuada, desde el globo (4) a las vías respiratorias de pulmón (7).

Para la nebulización se usa un nebulizador neumático (Bennett-Raindrop®) que funciona con la mezcla de gas de respiración (CO<sub>2</sub> al 5,3%, O<sub>2</sub> al 21%, N<sub>2</sub> al 73,7%) a una presión de 100 kPa.

Para determinar la cinética de liberación del principio activo o del colorante encapsulado en los liposomas, en una primera serie de ensayos se realizan dos intervenciones sucesivas en cada pulmón. En primer lugar se lleva a cabo la administración por vía inhalatoria de una cantidad definida de una disolución de CF aerosolizada durante un periodo de 30 minutos, seguido de un tiempo de observación de 90 minutos. En una segunda etapa, después de cambiar el perfundido con 1 l de disolución de electrolitos nueva, se administra la dispersión liposómica correspondiente igualmente aerosolizada durante 30 minutos, a lo que sigue un tiempo de observación de hasta 270 minutos. Durante las dos administraciones de aerosol por vía inhalatoria se deposita la misma cantidad de CF en el pulmón de conejo. Como es sabido, el CF libre pasa rápida y completamente del espacio alveolar al sistema vascular del pulmón. El paso de colorante puede cuantificarse mediante la toma de muestras de perfundido (0,5 ml), que tienen lugar cada 10 minutos, comenzando en el momento inmediatamente anterior a la administración del aerosol. Así puede evaluarse la cinética de liberación del CF encapsulado en liposomas por comparación con la disolución de CF sin encapsular.

45 La cinética de liberación del principio activo modelo, CF, para las formulaciones según la invención se muestra en las figuras 2-4 (fig. 2: cinética de liberación de liposomas de DPPC/Chol/DMPC; fig. 3: cinética de liberación de liposomas de DPPC/Chol/PEG; fig. 4: cinética de liberación de liposomas de DPPC/Chol/SM).

#### Figura 1 Representación del sistema de bolsa en caja para la ventilación del pulmón aislado.

50 La bomba respiratoria (6) mueve un globo flexible (4) que suministra al pulmón (7) el aerosol/mezcla de gas de respiración a partir de una bolsa de almacenamiento (2). El llenado de la bolsa de almacenamiento (2) se realiza con aerosol generado por medio de un nebulizador neumático (1) que funciona con gas de respiración a 100 kPa.

#### Figura 2 Cinética de liberación de liposomas de DPPC/Chol/DMPC.

Se administran liposomas de la composición DPPC/Chol/DMPC = 7:4:1 con carboxifluoresceína

como principio activo modelo atrapado, en forma de aerosol y durante un período de 30 minutos a un pulmón de conejo aislado, ventilado y perfundido. La carboxifluoresceína liberada a partir de los liposomas y detectada en el medio de perfusión se indica en porcentaje de la carboxifluoresceína total atrapada inicialmente en los liposomas. Se representan los valores medios con la desviación estándar de n = 3 ensayos.

5

DPPC = dipalmitoilfosfatidilcolina, Chol = colesterol, DMPC = dimiristoilfosfatidilcolina

**Figura 3 Cinética de liberación de liposomas de DPPC/Chol/PEG.**

Se administran liposomas de la composición DPPC/Chol/PEG = 7:3:0,3 con carboxifluoresceína como principio activo modelo atrapado, en forma de aerosol y durante un período de 30 minutos a un pulmón de conejo aislado, ventilado y perfundido.

10

La carboxifluoresceína liberada a partir de los liposomas y detectada en el medio de perfusión se indica en porcentaje de la carboxifluoresceína total atrapada inicialmente en los liposomas. Se representan los valores medios con la desviación estándar de n = 3 ensayos.

DPPC = dipalmitoilfosfatidilcolina, Chol = colesterol, PEG = polietilenglicol

**Figura 4 Cinética de liberación de liposomas de DPPC/Chol/SM.**

Se administran liposomas de la composición DPPC/Chol = 7:3 + esfingomielina al 6% con carboxifluoresceína como principio activo modelo atrapado, en forma de aerosol y durante un período de 30 minutos a un pulmón de conejo aislado, ventilado y perfundido. La carboxifluoresceína liberada a partir de los liposomas y detectada en el medio de perfusión se indica en porcentaje de la carboxifluoresceína total atrapada inicialmente en los liposomas. Se representan los valores medios con la desviación estándar de n = 3 ensayos.

20

DPPC = dipalmitoilfosfatidilcolina, Chol = colesterol, SM = esfingomielina

**Lista de números de referencia**

- (1): nebulizador neumático
- (2): bolsa de almacenamiento
- (3): válvula
- (4): globo flexible
- (5): recipiente de vidrio
- (6): bomba respiratoria
- (7): pulmón

25

30



## REIVINDICACIONES

1. Uso de una formulación liposómica para la administración por medio de un nebulizador, en el que la formulación liposómica comprende: A) liposomas seleccionados entre una de las formulaciones siguientes: a) liposomas que comprenden i) fosfolípidos de DPPC, ii) colesterol y iii) fosfolípidos de DMPC en una relación molar de 7:4:1 a 7:4:4; b) liposomas que comprenden i) fosfolípidos de DPPC, ii) colesterol y iii) polietilenglicol en una relación molar de 7:3:0,15 a 7:3:0,6; y c) liposomas que comprenden i) fosfolípidos de DPPC y ii) colesterol en una relación molar de 7:3, así como iii) fosfolípidos de esfingomielina que forman del 2% al 8% de la masa de los liposomas; y B) un principio activo o colorante encapsulado en los liposomas.
2. Uso según la reivindicación 1, **caracterizado porque** los liposomas comprenden fosfolípidos de DPPC, colesterol y fosfolípidos de DMPC en una relación molar de 7:4:1 a 7:4:4
3. Uso según la reivindicación 1, **caracterizado porque** los liposomas comprenden fosfolípidos de DPPC, colesterol y polietilenglicol en una relación molar de 7:3:0,15 a 7:3:0,6
4. Uso según la reivindicación 1, **caracterizado porque** los liposomas comprenden fosfolípidos de DPPC y colesterol en una relación molar de 7:3, así como fosfolípidos de esfingomielina que forman del 2% al 8% de la masa de los liposomas.
5. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado porque** el nebulizador es un nebulizador neumático.
6. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado porque** el nebulizador es un nebulizador ultrasónico.
7. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado porque** durante la administración del 50 al 80% de los liposomas quedan intactos.
8. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado porque** el principio activo está encapsulado en los liposomas.

Figura 1

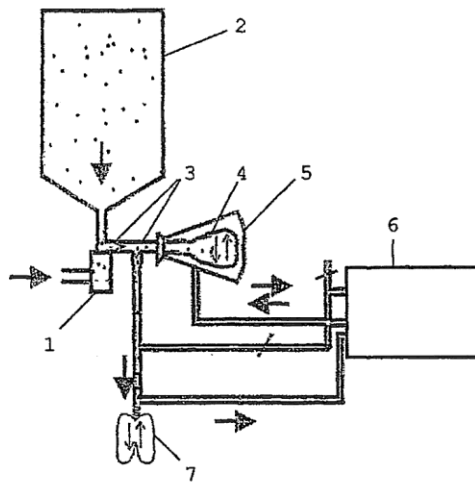


Figura 2

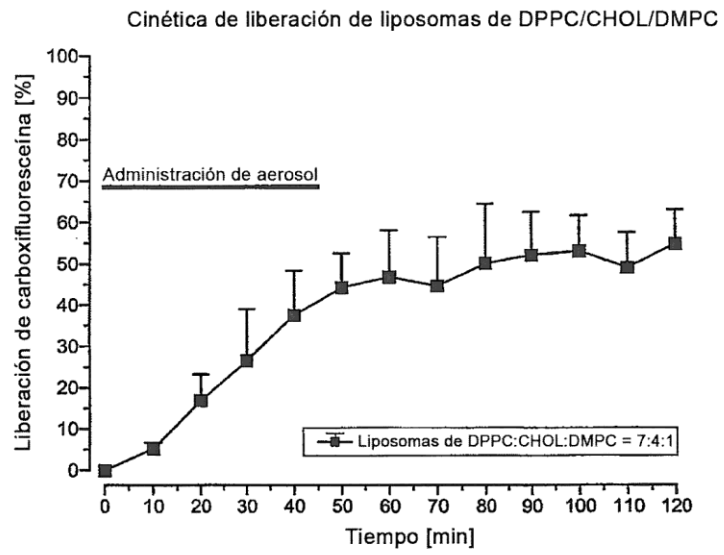


Figura 3

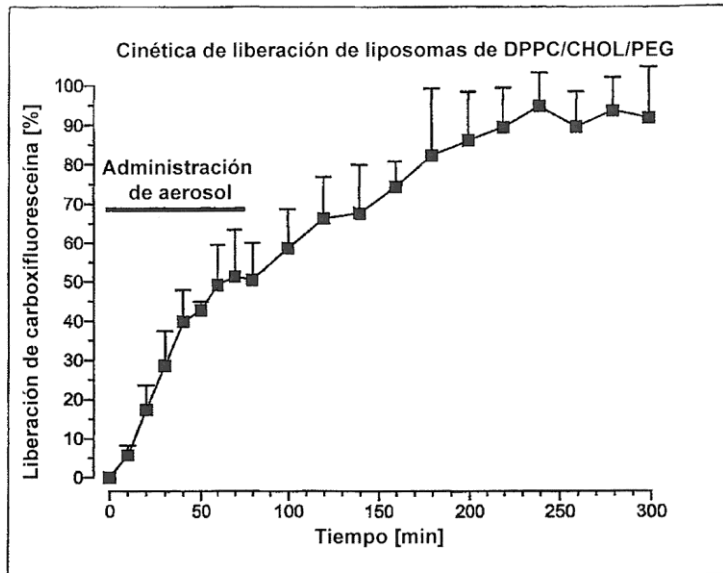
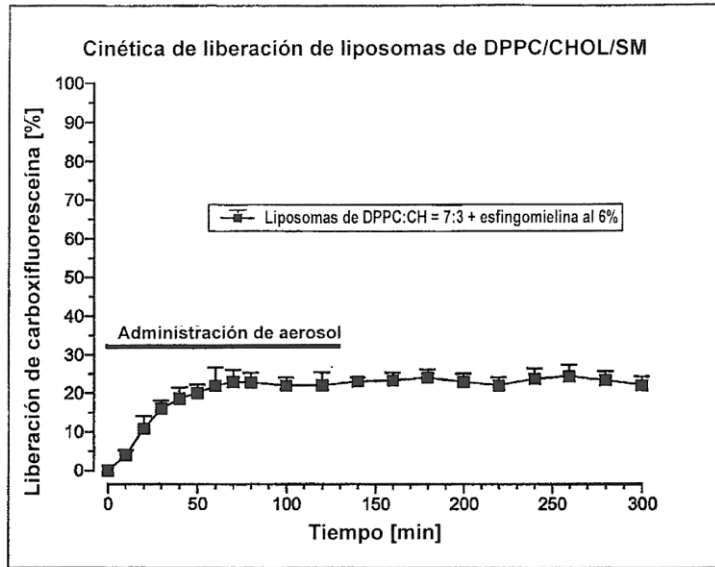


Figura 4



**DOCUMENTOS CITADOS EN LA DESCRIPCIÓN**

Esta lista de documentos citados por el solicitante se ha incluido solamente para información del lector y no forma parte del documento de patente europea. A pesar de que dicha lista se ha elaborado con el mayor cuidado, no es posible excluir errores u omisiones eventuales, por los que la OEP no asume ninguna responsabilidad.

**Bibliografía citada en la descripción que no corresponde a patentes**

- Liposomas: a practical approach. Oxford University Press, 1994.
- Seeger y col., J. Appl. Physiol., 1986, vol 61, 1781-1789.
- Seeger y col., Oxygen Radicals in Biological Systems. Academic Press, 1994, vol. 233, 549-584.