



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 920**

51 Int. Cl.:
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 38/11 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05701965 .5**
96 Fecha de presentación : **21.01.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1713446**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.10.2006**

54 Título: **Composiciones lipídicas ternarias no laminares.**

30 Prioridad: **23.01.2004 GB 0401515**
07.04.2004 GB 0407936

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: **CAMURUS AB.**
Ideon, Gamma 1, Solvegatan 41
223 70 Lund, SE
Christopher Robert Goddard

72 Inventor/es: **Johnsson, Markus y**
Tiberg, Fredrik

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 356 920 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

La presente invención se refiere a la protección, estabilización, solubilización y suministro de agentes activos en composiciones farmacéuticas y nutracéuticas. En particular, la invención se refiere a composiciones y formulaciones anfífilas, y a sistemas de suministro de agente activo basadas en éstas.

Las formulaciones basadas en anfífilos presentan un potencial considerable para el suministro de muchas sustancias, en especial para el suministro *in vivo* al organismo humano o animal. Gracias a que el anfífilo tiene tanto grupos polares como grupos apolares, que se agrupan para formar regiones polares y apolares, puede solubilizar eficazmente compuestos tanto polares como apolares. Además, muchas de las estructuras formadas por anfífilos/agentes estructurantes en disolventes polares y/o apolares tienen una superficie muy considerable de límite polar/apolar en el que se pueden adsorber y estabilizar otros compuestos anfífilos.

La formación de regiones no laminares en los diagramas de fase anfífilo/agua, anfífilo/aceite y anfífilo/aceite/agua es un fenómeno bien conocido. Tales fases incluyen fases cristalinas líquidas tales como las fases P cúbica, D cúbica, G cúbica y hexagonal, que son fluidas a nivel molecular, pero muestran un significativo orden de largo alcance, y la fase "esponja" L_3 que comprende una red bicontinua tridimensional múltiplemente interconectada de láminas bicapa que carecen del orden de largo alcance de las fases cristalinas líquidas. Dependiendo de su curvatura, estas fases pueden ser descritas como normales (con curvatura media hacia la región apolar) o invertidas (con curvatura media hacia la región polar). Cuando la curvatura espontánea del sistema lipídico es próxima a cero, las estructuras son típicamente laminares, por ejemplo vesículas/liposomas uni- o multilaminares, y allí donde la curvatura espontánea es más negativa o positiva, dominan típicamente fases micelares, cúbicas y hexagonales.

Las fases cristalinas líquidas no laminares y L_3 son sistemas termodinámicamente estables. Es decir, no son simplemente un estado metaestable que se va a separar y/o reconfigurar en capas, fases laminares o similares, sino que son la forma termodinámicamente estable de la mezcla.

Se han estudiado tanto sistemas laminares como no laminares en cuanto a sus propiedades como vehículos y/o excipientes para agentes dietéticos, cosméticos, nutricionales, de diagnóstico y farmacéuticos, pero se piensa que los sistemas no laminares presentan ventajas considerables en términos de su elevada superficie específica interna entre regiones polares y apolares. Esto ha conducido a una notable investigación sobre las fases no laminares, en particular en formulaciones de liberación controlada y para solubilizar compuestos de solubilidad relativamente baja.

Tal como se ha discutido más arriba, una fase no laminar voluminosa es típicamente un sistema termodinámicamente estable. Además, esta fase voluminosa puede estar dispersada en un disolvente polar o no polar, para formar partículas de una fase no laminar (especialmente cristalina líquida) en un disolvente principal. Esto permite que las ventajas de las fases no laminares voluminosas se apliquen en situaciones en las cuales el uso de una fase no miscible voluminosa originaría problemas, por ejemplo en aplicaciones parenterales. Mediante una dispersión semejante de partículas no laminares también se puede conseguir un control adicional del perfil de liberación de un compuesto.

La fase cristalina líquida o L_3 puede estar en equilibrio termodinámico, o cerca del mismo, con el disolvente en exceso, y puede estar dispersada en forma de dispersiones coloidalmente estables de partículas no laminares. Tales partículas pueden ser completamente (es decir, termodinámicamente) estables, o bien se pueden degradar gradualmente, proporcionando de este modo control sobre el perfil de liberación para agentes activos formulados junto con las mismas. La formación de dispersiones puede ser espontánea o bien como resultado de una fuerza mecánica tal como la cizalladura o los ultrasonidos. Estas partículas no laminares tienen un notable interés en el suministro de agentes activos, y han sido propuestas como vehículos para muchos de tales agentes activos.

En el documento US 5,531,925 se describe un método para formar partículas dispersadas de fase no laminar en disolventes tales como agua. Tales partículas tienen una fase interior cristalina líquida no laminar o L_3 y una fase superficial laminar o L_3 , y pueden contener también ingredientes activos. Los documentos US 6482517, US 6537575 y WO 95/34287 describen diversas composiciones que contienen lípidos.

Se pueden formar partículas conocidas con fase interior cristalina líquida o L_3 mediante métodos tales como añadir a esta fase una disolución de agente formador de fase superficial, agitar para formar una dispersión gruesa y fragmentar la mezcla resultante.

Para evaluar la presencia de una fase cristalina líquida, se puede examinar el potencial material cristalino líquido mediante el uso de difracción de rayos X de pequeño ángulo (siglas inglesas SAX), criomicroscopía electrónica de transmisión (siglas inglesas cryo-TEM) o estudios de espectroscopía de resonancia magnética nuclear (siglas inglesas NMR). Los tamaños y distribuciones de tamaño de las partículas dispersadas pueden ser examinados mediante dispersión luminosa, en particular mediante el empleo de instrumentos de dispersión de luz láser.

Las dispersiones que contienen ingredientes activos y en particular aquellas destinadas a la administración intravenosa al organismo humano o animal son deseablemente coloidales, es decir, deben tener un tamaño de partícula no superior a 10 μm , en especial no superior a 5 μm y en particular no superior a 1 μm . Si hay partículas dentro de la suspensión que superen este tamaño, entonces la dispersión puede no ser coloidalmente estable y existe un riesgo considerable de provocar embolias cuando se administra por vía intravenosa la preparación. Además, es deseable que la distribución de tamaño de partícula sea estrecha para maximizar el control sobre la liberación de cualquier agente activo. Cuando una composición en partículas ha de ser administrada por un método distinto de la vía intravenosa (por ejemplo por vía oral, intramuscular, subcutánea, rectal, o por inhalación), entonces no se requiere que las partículas sean necesariamente coloidales, pero sigue siendo ventajoso proporcionar una distribución de tamaño de partícula bien caracterizada y reproducible con el fin de controlar la velocidad de descomposición de las partículas y/o de liberación de los agentes activos.

El tamaño de partícula de una composición en partículas debería también ser estable frente al almacenamiento durante un período prolongado de tiempo. Si la distribución de tamaño de partícula cambia significativamente, entonces la velocidad de transporte eficaz para la composición (por ejemplo debida a la difusión y la velocidad de liberación de cualquier agente activo) puede verse afectada adversamente. Es aún más preocupante la estabilidad de los tamaños de partícula en una dispersión coloidal para administración intravenosa. Si la distribución de tamaño de partícula de una dispersión semejante no es estable (por ejemplo frente al almacenamiento y la distribución), entonces se pueden formar con el tiempo partículas grandes que pueden resultar peligrosas cuando se administra. Incluso aunque no sea directamente peligrosa, la inestabilidad durante el almacenamiento puede provocar una variabilidad significativa en la farmacocinética, dinámica y/o eficacia.

Además del control sobre el tamaño de partícula, es deseable maximizar la proporción de partículas que se encuentran en la fase no laminar deseada, a fin de maximizar los efectos beneficiosos de ésta en términos de capacidad de carga, encapsulación protectora, liberación controlada, reproducibilidad, etc. Por tanto, debe minimizarse la proporción de partículas laminares tales como vesículas uni- o multi-laminares.

Los métodos conocidos para la formación de partículas dispersadas de fase no laminar son sumamente eficaces, pero típicamente producen una distribución de tamaño de partícula relativamente ancha y una proporción considerable de partículas vesiculares laminares "contaminantes".

Para estrechar la distribución de tamaño de partícula se pueden emplear el aumento de la proporción de agente fragmentante y/o estabilizante (por ejemplo tensioactivo, copolímero y/o proteína) en la formulación, o bien el incremento del aporte de energía del proceso de homogeneización, pero a costa de aumentar la proporción de partículas laminares.

Una limitación de composiciones no laminares actualmente disponibles o sugeridas es que frecuentemente se basan en lípidos que no son bien tolerados *in vivo* a concentraciones elevadas. En particular, los monoacilglicérols habitualmente utilizados (entre ellos el popular monooleato de glicerilo - GMO) pueden ser tóxicos si se administran (en especial por vía parenteral) a elevadas concentraciones, lo que puede ser limitante de la dosis. La posibilidad de efectos secundarios tóxicos del vehículo lipídico puede limitar también el abanico de indicaciones para las cuales se emplee un agente activo a aquellas que sean de naturaleza altamente serosa, en donde se puede tolerar el riesgo de efectos secundarios. Por tanto, constituiría un avance considerable proporcionar composiciones lipídicas que fueran configurables y estables como dispersiones en partículas, mostrasen comportamiento predecible de la fase no laminar, y tuvieran una toxicidad disminuida (deducida, por ejemplo, de índices de hemólisis y/o estudios de toxicidad aguda) en comparación con composiciones de uso generalizado (por ejemplo las que incluyen GMO). Constituiría un avance adicional el que tales formulaciones fueran configurables y estables como partículas de tamaño coloidal (por ejemplo con un diámetro de 0,05 a aproximadamente 2 μm) y tuvieran una distribución de tamaño de partícula estrecha, monomodal.

Los autores de la presente invención han determinado, inesperadamente, que una mezcla de al menos 3 componentes anfífilos que comprenda un componente formador de estructura, un componente dilatador y un componente polímero es sumamente eficaz para formar dispersiones no laminares estables y puede presentar una toxicidad sorprendentemente baja *in vivo*.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona, por tanto, una composición en partículas según la reivindicación 1, que comprende:

- a) al menos 50% de al menos un anfífilo formador de estructura,
- b) 2 a 40% de al menos un anfífilo dilatador de estructura, y
- c) 2 a 20% de al menos un anfífilo polímero estabilizante de dispersión,

en donde todas las partes se dan en peso con respecto a la suma de los pesos de a+b+c y en donde la composición comprende partículas no laminares o forma partículas no laminares cuando es puesta en contacto con un fluido acuoso.

Composiciones preferidas de la presente invención contienen adicionalmente al menos un agente activo como se describe en la presente memoria y pueden contener un disolvente (particularmente agua o un disolvente acuoso o mezcla acuosa de disolventes). Las composiciones pueden contener también vehículos, excipientes, cargas, estabilizantes y componentes similares, adecuados.

5 En un aspecto preferido, los componentes anfífilos de las composiciones de la presente invención comprenden al menos 50%, preferiblemente al menos 70% y muy preferiblemente al menos 80%, en peso, de anfífilos que tienen una solubilidad acuosa inferior a 10^{-9} M a 25°C, con respecto al peso total de componentes a+b+c.

10 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una formulación farmacéutica que comprende al menos una composición de la invención y al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente tolerable.

15 Las composiciones anfífilas ternarias de la invención comprenden al menos un anfífilo formador de estructura (componente a), o bien al menos otro anfífilo formador de estructura (componente a) o al menos un agente "dilatador de estructura" (componente b) y al menos un agente anfífilo "polímero" estabilizante de dispersión (componente c). Los componentes b y c facilitarán también la fragmentación de la composición. Al menos 50% en peso del total de componentes anfífilos (a+b+c) debe ser componente a. Preferiblemente, éste constituirá 60 a 95%, más preferiblemente 70 a 90%. En correspondencia, el componente b debe constituir 2 a 40% en peso de a+b+c, preferiblemente 5 a 30% y más preferiblemente 10 a 25%. El componente c debe estar presente en 2 a 20%, preferiblemente 2 a 15% y más preferiblemente 2 a 10% del peso total de a+b+c.

20 En las composiciones anfífilas ternarias, el componente "a" formador de estructura está seleccionado de fosfolípidos (por ejemplo fosfatidiletanolaminas y fosfatidilcolinas), glicolípidos, y diglicéridos. Son particularmente adecuados lípidos que se encuentran en la naturaleza y en particular lípidos de diacilo que se encuentran en la naturaleza, tales como diacilfosfatidiletanolaminas, diacilgliceroles y diacilfosfatidilcolinas. Son particularmente preferidas mezclas de fosfatidilcolina y diacilgliceroles.

25 Se prefiere que el componente formador de estructura a) sea al menos un lípido de diacilo que se encuentre en la naturaleza. En un lípido de diacilo, las dos cadenas de acilo pueden ser iguales o diferentes tanto en términos de longitud de cadena como en número y tipo de eventuales insaturaciones. Los grupos acilo preferidos tienen de 6 a 32 átomos de carbono, preferiblemente de 6 a 24, y de 0 a 3 insaturaciones, en especial enlaces dobles. Los grupos acilo son descritos frecuentemente haciendo referencia al número de átomos de carbono y al número de insaturaciones de la cadena carbonada. Así, CX:Z indica una cadena hidrocarbonada que tiene X átomos de carbono y Z insaturaciones. Los ejemplos particulares incluyen en particular grupos caproílo (C6:0), capriloílo (C8:0), caprilo (C10:0), lauroílo (C12:0), miristoílo (C14:0), palmitoílo (C16:0), fitanoílo (C16:0), palmitoleílo (C16:1), estearoílo (C18:0), oleoílo (C18:1), elaidoílo (C18:1), linoleoílo (C18:2), linolenoílo (C18:3), araquidonoílo (C20:4), behenoílo (C22:0) y lignoceroílo (C24:9). Son grupos acilo más preferibles los grupos C14 a C20 y muy preferiblemente grupos C16 a C18 tales como palmitoílo (C16:0), palmitoleílo (C16:1), estearoílo (C18:0), oleoílo (C18:1), elaidoílo (C18:1), linoleoílo (C18:2), linolenoílo (C18:3).

35 El componente a puede contener también hasta 10% (por ejemplo 1-10% en peso de este componente) de al menos un anfífilo cargado, en particular lípidos aniónicos (tales como acil- o diacilfosfatidilgliceroles) o ácido graso (véase más adelante). En una realización preferida alternativa, el anfífilo cargado puede comprender un anfífilo catiónico tal como lípidos de etilfosfocolina (entre ellos 1,2--diacilglicero-3-etilfosfocolinas); lípidos de 1,2-diacil-3-di- y triaquilamoniopropano (entre ellos 1,2-diacil-3-trimetilamoniopropano); sales de amonio, en particular sales de haluro de amonio ternario (tales como bromuro de N,N-dioctadecil-N,N-dimetilamonio, bromuro de N,N-diestearil-N,N-dimetilamonio, bromuro de N-(1,2-dimiristiloxiprop-3-il)--N-hidroxietyl-N,N-dimetilamonio, cloruro de N,N-dioleoil-N,N-dimetilamonio y cloruro de N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio, cloruro de N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio); derivados catiónicos de espermidina (entre ellos trifluoroacetato de 2,3-dioleiloxi-N-[2-(esperminocarboxamido)etil]-N,N-dimetil-1--propanaminio y diheptadecilamidoglicilespermidina); y derivados catiónicos de colesterol que incluyen 3β-(N-(N',N'-dimetilaminoetano)carbamol)colesterol.

En consecuencia, 90% o más, preferiblemente al menos 95% del componente a debe carecer preferiblemente de carga neta en condiciones neutras y/o fisiológicas.

50 En otra realización, hasta 10% en peso (por ejemplo 1-10%) de componente a (preferiblemente 2-7% en peso) puede ser un esteroil fisiológicamente tolerable. Los ejemplos de tales esteroides incluyen esteroides de origen animal tales como colesterol y esteroides de origen vegetal (fitosteroides) tales como beta-sitosterol, estigmasterol y campesterol). En consecuencia, al menos 90% del componente a tiene generalmente una estructura que no es de esteroil, más preferiblemente al menos 95%.

55 El componente a debe ser tal que, cuando sea formulado solo en un exceso de agua, forme una fase no laminar invertida, preferiblemente una fase hexagonal invertida. Esto se puede determinar fácilmente para cualquier lípido o mezcla de lípidos particular que haya sido propuesto como componente a preparando una mezcla en agua y analizando el comportamiento de fases por cualquiera de las técnicas de examen de fases conocidas y/o descritas en la presente memoria (entre ellas la dispersión de rayos X con pequeño ángulo (SAXS), la microscopía polarizante y/o la criomicroscopía electrónica de transmisión (crio-TEM, por sus siglas en inglés).

Puesto que el componente a es el componente dominante en la composición, es especialmente importante que este componente sea biocompatible. Con anterioridad, para proporcionar la estructura ordenada y la estabilidad deseadas, muchas composiciones no laminares se han basado en componentes formadores de estructura principales que tienen una toxicidad aguda relativamente alta. Utilizando las composiciones de la presente invención, se puede reducir o incluso eliminar el empleo de lípidos con propiedades biológicas que no sean las ideales.

Una medida de la actividad biológica de un lípido es su solubilidad en agua o en disoluciones acuosas. Los componentes con solubilidades acuosas relativamente elevadas mantienen una alta concentración de equilibrio en solución de monómero lipídico disuelto, y ello puede ser al menos parcialmente responsable de los efectos biológicos observados. Por ejemplo, el "monooleato de glicerol" (GMO) comúnmente usado tiene una solubilidad de equilibrio en agua del orden de 10^{-7} M a temperatura ambiente, y mayor a las temperaturas fisiológicas. Por el contrario, los lípidos no cargados preferidos para el uso como "componente a" pueden tener una solubilidad no superior a 10^{-8} o más típicamente 10^{-9} M a temperatura ambiente, preferiblemente 5×10^{-10} M y más preferiblemente 10^{-10} M o inferior. La solubilidad mínima deseable se sitúa generalmente en torno a 10^{-15} M. La Tabla 1 que se encuentra a continuación indica las solubilidades acuosas de equilibrio de algunos anfífilos formadores de estructura.

Una baja solubilidad en agua constituye también una ventaja a la hora de incrementar la estabilidad de las partículas estructuradas no laminares. En particular, a una dilución elevada, la estabilidad del sistema no laminar dependerá de la velocidad con la cual las moléculas de lípido abandonan la superficie del material estructurado y se difunden en la disolución. Así, la estabilidad de una dispersión de partículas no laminares estará relacionada directamente con la solubilidad del monómero en el disolvente.

Tabla 1

Lípido	Solubilidad de equilibrio	
	concentración / M	temp. / °C
monooleato de glicerol	$\sim 10^{-7}$	25
dioleoilfosfatidiletanolamina	$\sim 10^{-10}$	25

Cuando se incluye un lípido catiónico en las composiciones de la presente invención (por ejemplo al 1-10% en peso del componente a, en particular 2-7% en peso) estas composiciones son particularmente adecuadas para el uso en la absorción de ácido nucleico hacia el interior de las células. En particular, las composiciones de la presente invención que comprenden un lípido catiónico son sumamente adecuadas para procurar la transfección de ácidos nucleicos mono o bicatenarios tales como oligómeros de ADN (por ejemplo cADN) o de ARN al interior de células. Los oligómeros de ácidos nucleicos adecuados incluyen ADN y ARNs interfirientes pequeños, ADN y/o ARN antisentido, plásmidos, y ADN o ARN mono o bicatenario que codifica funcionalmente un producto de péptido o proteína (especialmente cuando la secuencia de ácido nucleico comprende un promotor funcional o codón de inicio, según convenga). En este aspecto, el agente activo de la composición comprenderá un ácido nucleico, en particular un oligómero de ácido nucleico.

Por consiguiente, en una realización preferida, la presente invención proporciona una composición de la invención (en especial una adecuada para transfectar células con un agente activo de ácido nucleico) en donde la composición comprende un lípido catiónico a un nivel de 1-10% en peso (particularmente 2-7% en peso) de componente a, y al menos un ácido nucleico en calidad de agente activo. La invención proporciona también un método para transfectar células con un ácido nucleico (tal como se describe en la presente memoria) que comprende administrar una de tales composiciones.

Las composiciones de la presente invención que comprenden un agente activo de ácido nucleico (especialmente en combinación con un componente catiónico) son sumamente adecuadas para el uso en métodos de inmunización genética, terapia génica, terapia antisentido y terapia de interferencia con ácidos nucleicos. Se cree que el componente de lípido catiónico, cuando está presente, modula las propiedades de la formulación de forma que proporciona un nivel particularmente elevado de transfección del ácido nucleico. La naturaleza la composición global también proporciona un entorno protegido y encapsulante dentro del cual el agente activo puede repartirse eficazmente dentro del vehículo, y favorece el suministro del agente activo al lugar de acción deseado, tal como ocurre en otras realizaciones descritas en la presente memoria.

El alto nivel de absorción proporcionado por las composiciones en ausencia de componente catiónico puede ser debido a las propiedades de las composiciones que incluyen este alto nivel de protección del componente activo, suministro controlado tanto en el tiempo como en el espacio, y absorción incrementada a través de la membrana biológica en el lugar de acción. El incremento adicional observado con la inclusión de un componente catiónico resulta particularmente ventajoso, y se piensa que es debido a una retención, adhesión y/o fusión más intensificadas en el lugar de acción de la composición.

El componente dilatador "b" es generalmente un componente que hincha el retículo de la estructura anfífila, permitiéndola adoptar más rápidamente una forma en partículas dispersas. Este componente puede facilitar también la transición estructural, por ejemplo, desde la estructura hexagonal invertida a estructuras de fase cúbica. La identificación de un agente dilatador adecuado se puede llevar a cabo examinando el comportamiento de fase y de fragmentación de mezclas con lípidos formadores de estructuras por medio de técnicas conocidas (entre ellas las descritas en la presente memoria). Los agentes dilatadores tienen generalmente un peso molecular relativamente bajo (por ejemplo inferior a 2500, en especial inferior a 2000 y preferiblemente de 200 a 1950) y pueden consistir, por ejemplo, en tensioactivos basados en oligo(óxido de etileno). Son ejemplos preferidos de tensioactivos basados en oligo(óxido de etileno) los que tienen entre 5 y 40 unidades de óxido de etileno unidas a un grupo "de cola" no polar (por ejemplo un éster de un ácido graso, tal como cualquiera de los que se describen más adelante en la presente memoria, o un éter de un alcohol graso correspondiente). El componente b) está seleccionado de polioxietilén-ésteres de ácido graso, polioxietilén-éteres de alquilo, ésteres de ácido graso con polioxietilén-sorbitán (polisorbatos), derivados de polioxietilén-aceite de ricino y derivados lipídicos de polioxietileno. Son ejemplos muy preferidos TGMO-15 (Nikko), Solutol HS15 (BASF) y el polisorbato 80.

El componente polímero "c" es, en general, un componente que mejora la estabilidad de la dispersión, en particular en forma de partículas coloidales. Los componentes polímeros tienen generalmente un peso molecular relativamente elevado (por ejemplo superior a 2000, preferiblemente superior a 2200, más preferiblemente de 2500 a 50000, por ejemplo de 2500 a 10000) y tendrán al menos una porción polímera (por ejemplo copolímera) en su estructura molecular. Los componentes polímeros incluyen copolímeros de poli(óxido de etileno), lípidos derivatizados con poli(óxido de etileno), polisacáridos modificados hidrofólicamente y proteínas anfílicas. El componente c) está seleccionado de poloxámeros tales como los descritos en la presente memoria, PEG-ésteres de ácido graso y PEG-fosfolípidos que incluyen PEG-dioleato de glicerol, PEG-dioleoilfosfatidiletanolamina (en particular DOPE-PEG2000 y DOPE PEG-5000) ó PEG-dioleoilfosfatidilserina.

Son ejemplos preferidos de copolímeros de poli(óxido de etileno) los poloxámeros, que contienen al menos un bloque de poli(óxido de etileno) y al menos un bloque de polioxipropileno. Los más preferidos de estos agentes son poloxámero 407 (por ejemplo Pluronic® F127, BASF), poloxámero 188 (por ejemplo Pluronic® F68, BASF), poloxámero 124 (Pluronic® L44, BASF).

Los componentes b y c actúan como agentes de fragmentación y ayudan tanto al control como a la estabilidad del comportamiento de fase de las partículas, y para favorecer y estabilizar la fragmentación de la fase no laminar para dar partículas. Los componentes b y c estarán presentes en un nivel combinado suficiente para producir la fragmentación del agente estructurante y/o para estabilizar las partículas de fase no laminar fragmentadas. Tal fragmentación puede ser espontánea o bien puede requerir fragmentación física, por ejemplo mediante cizalladura y/o por aplicación de ultrasonidos. El especialista en la técnica no tendrá ninguna dificultad en decidir si cualquier composición contiene suficientes agentes de fragmentación a la vista de los Ejemplos de la presente memoria.

Las composiciones de la presente invención comprenden partículas no laminares o composiciones que forman tales partículas en contacto con un fluido acuoso. Dicho fluido puede ser un fluido para suministro a un paciente (por ejemplo agua o solución salina estéril) o bien puede ser un fluido corporal, en particular fluido gástrico, fluido intestinal, fluido de superficies mucosas, o sangre.

Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "no laminar" se utiliza para indicar una estructura de fase cúbica, hexagonal o L_3 , o cualquiera de sus combinaciones, por oposición a las estructuras laminares tales como las que se encuentran en la fase laminar o en liposomas. Cuando se describe una partícula como poseedora de una fase o estructura no laminar, ello indica que al menos el interior de la partícula tiene esta estructura. Las partículas tendrán generalmente dos regiones distintas, una región interna y una región superficial circundante. La región superficial, incluso en una partícula "no laminar", puede ser laminar o cristalina, y puede consistir en cualquier fase desde una fase cristalina o de cristal líquido altamente ordenada hasta una capa fluida virtualmente carente de orden.

La expresión "partículas laminares" se utiliza en la presente memoria para indicar partículas vesiculares (por ejemplo liposomas) caracterizadas porque comprenden una o más bicapas laminares de anfífilo externas, rodeando un compartimiento de disolvente interior.

En un aspecto de la presente invención, las composiciones comprenden partículas no laminares. Esto indica que, de las partículas (preferiblemente coloidales) presentes, al menos 50%, preferiblemente al menos 75% y muy preferiblemente al menos 85% (medido en volumen) son no laminares (determinado, por ejemplo, mediante difracción láser combinada con crío-TEM o SAXS). En un aspecto alternativo de la presente invención, las composiciones forman partículas no laminares en contacto con un fluido acuoso. Esto indica que, en contacto con un fluido acuoso (tal como se describe en la presente memoria), al menos 50%, preferiblemente al menos 75% y muy preferiblemente al menos 85% de las partículas (medido en volumen) se hacen partículas no laminares.

En una realización preferida de la presente invención, las partículas que componen la composición o son formadas por ésta comprenden fase L_3 , fase hexagonal invertida y/o sus mezclas. Es muy preferida la fase L_3 .

Cuando se formula un agente activo en una composición de la invención, el agente activo tendrá

frecuentemente un efecto sobre el comportamiento de fase del agente o agentes estructurantes. Por ejemplo, algunos agentes activos (tales como la ciclosporina A) introducen mayor curvatura negativa que algunos agentes estructurantes, y a altas concentraciones pueden provocar la formación de fases muy curvadas negativamente, tales como la fase L₂ micelar invertida en lugar de una fase cristalina líquida cúbica o hexagonal. De todos modos, un agente activo semejante podría ser formulado en, por ejemplo, una fase hexagonal invertida por formulación con una mezcla de componentes a, b y c que tenga una curvatura espontánea menos negativa. Por este método, la mezcla global proporciona la curvatura negativa apropiada para permitir su empleo en las composiciones de la invención.

El especialista en la técnica será capaz de emplear métodos habituales para evaluar el grado de curvatura espontánea de cualquier agente estructurante (o mezcla del mismo con otros componentes), o bien el efecto sobre ello de la introducción de un agente activo. Ello se podría hacer, por ejemplo, a través de estudios del comportamiento de fase voluminosa de cada uno de los agentes estructurantes en agua, y estudios posteriores con concentraciones variables de agente activo incluido. Las fases se pueden examinar mediante cualquiera de los métodos que se indican en la presente memoria (por ejemplo luz polarizada, SAXS, crío-TEM, etc.) y una mezcla adecuada de componentes elegida para cada caso. En algunas circunstancias, cuando el efecto del agente activo sobre el comportamiento de fase es significativo, puede que el o los agentes estructurantes elegidos no proporcionen por sí mismos la fase no laminar deseada (por ejemplo pueden tener una curvatura espontánea demasiado pequeña o demasiado grande) pero generarán esta fase sólo cuando estén formulados también con el agente activo. Así, por ejemplo, con la adición del agente activo la fase de equilibrio puede cambiar de cúbica a fase cristalina líquida hexagonal.

En una realización preferida, las composiciones de la presente invención comprenden al menos un agente activo. Los agentes activos adecuados incluyen fármacos y vacunas humanos y veterinarios, agentes de diagnóstico, agentes activos "alternativos" tales como aceites esenciales, extractos o aromas de plantas, agentes cosméticos, nutrientes, suplementos dietéticos, etc. Los ejemplos de fármacos adecuados incluyen agentes antibacterianos tales como antibióticos β -lactámicos o peptídicos macrocíclicos, agentes antifúngicos tales como macrólidos de polieno (por ejemplo anfotericina B) o antifúngicos de azol, fármacos anticancerosos y/o antivíricos tales como análogos de nucleósidos, paclitaxel, y sus derivados, antiinflamatorios, tales como fármacos antiinflamatorios no esteroides, fármacos cardiovasculares que incluyen agentes reductores del colesterol y antihipertensivos, analgésicos, anestésicos, antidepresivos que incluyen inhibidores de la absorción de serotonina, vacunas y moduladores óseos. Los agentes de diagnóstico incluyen compuestos marcados con radionúclidos y agentes de contraste que incluyen agentes intensificadores del contraste para rayos X, ultrasonidos y MRI. Los nutrientes incluyen vitaminas, coenzimas, suplementos dietéticos, etc. En general, los agentes activos para uso en la presente invención no serán ninguno de los componentes a, b, ó c tal como se describen en la presente memoria.

Los agentes activos preferidos incluyen fármacos humanos y veterinarios seleccionados del grupo consistente en péptidos tales como hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y sus fragmentos, angiotensina y sus péptidos relacionados, anticuerpos y sus fragmentos, antígenos y sus fragmentos, péptidos natriuréticos atriales, péptidos bioadhesivos, bradisininas y sus péptidos relacionados, péptido T y sus péptidos relacionados, calcitoninas y sus péptidos relacionados, fragmentos de proteína de receptores de superficie celular, péptidos quimiotácticos, ciclosporinas, citocinas, dinorfinas y sus péptidos relacionados, endorfinas y fragmentos de P-lidotropina, encefalina y sus proteínas relacionadas, inhibidores de enzimas, fragmentos de fibronectina y sus péptidos relacionados, péptidos gastrointestinales, péptidos liberadores de hormonas del crecimiento, péptidos inmunoestimulantes, insulinas y factores de crecimiento similares a insulinas, interleucinas, hormonas liberadoras de hormona luteinizante (LHRH) y sus péptidos relacionados, hormonas estimulantes de melanocitos y sus péptidos relacionados, péptidos relacionados con señales de localización nuclear, neurotensinas y sus péptidos relacionados, péptidos neurotransmisores, péptidos opioides, oxitocinas, vasopresinas y sus péptidos relacionados, hormona paratiroide y sus fragmentos, proteína-quinasas y sus péptidos relacionados, somatostatinas y sus péptidos relacionados, sustancia P y sus péptidos relacionados, factores de crecimiento transformante (TGF) y sus péptidos relacionados, fragmentos de factor de necrosis tumoral, toxinas y toxoides y péptidos funcionales tales como péptidos anticancerosos que incluyen angiostatinas, péptidos antihipertensivos, péptidos anticoagulantes, y péptidos antimicrobianos; seleccionados del grupo consistente en proteínas tales como inmunoglobulinas, angiogeninas, proteínas morfogénicas óseas, quimiocinas, factores estimulantes de colonias (CSF), citocinas, factores de crecimiento, interferones, interleucinas, leptinas, factores inhibidores de leucemia, factores de células madre, factores de crecimiento transformante y factores de necrosis tumoral; seleccionados del grupo consistente en antivíricos, fármacos antiinflamatorios esteroideos (AIE), fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), antibióticos, antifúngicos, antivíricos, vitaminas, hormonas, ácido retinoico, prostaglandinas, prostaciclina, fármacos anticancerosos, fármacos antimetabólicos, mióticos, colinérgicos, antagonistas adrenérgicos, anticonvulsivos, ansiolíticos, tranquilizantes, antidepresivos, anestésicos, analgésicos, esteroides anabólicos, estrógenos, progesteronas, glicosaminoglicanos, polinucleótidos, inmunosupresores e inmunoestimulantes, fármacos cardiovasculares que incluyen agentes hipolipidémicos y agentes antihipertensivos, moduladores óseos; vacunas, adyuvantes de vacunas, inmunoglobulinas y antisueros; agentes de diagnóstico; agentes cosméticos, protectores solares y agentes autobronceadores; nutrientes; suplementos dietéticos; herbicidas, pesticidas, y repelentes. Se pueden encontrar otros ejemplos de agentes activos en, por ejemplo, Martindale, The Extra Pharmacopoeia. Las cargas adecuadas de agentes activos serán establecidas por referencia a sus dosis conocidas, teniendo en cuenta la vía de administración y el hecho de que las composiciones de la invención pueden proporcionar una absorción biológica de agente activo mayor que la de formulaciones conocidas.

En composiciones coloidales, el tamaño medio de partícula estará típicamente en el intervalo de 0,1 a 0,6 μm , determinado por ejemplo mediante métodos de dispersión luminosa (por ejemplo difracción láser). Preferiblemente, no más de 0,1% de partículas estarán fuera del intervalo de 0,05 a 0,5 μm , más preferiblemente no más de 0,1% estarán fuera de este intervalo, y muy preferiblemente una proporción no detectable (mediante difracción láser) de partículas estará fuera de este intervalo. En formulaciones no coloidales el tamaño medio de partícula estará típicamente en el intervalo de 10 a 200 μm .

Además, típicamente las formulaciones coloidales de la presente invención son físicamente estables frente al almacenamiento durante períodos prolongados a temperatura ambiente. Tales formulaciones deberían ser esencialmente estables tanto en términos de comportamiento de fase como de tamaño de partícula durante períodos de al menos 10 días a temperatura ambiente, más típicamente al menos 3 meses, preferiblemente al menos 6 meses y más preferiblemente 12 meses o más. Por el contrario, las dispersiones conocidas de tamaño de partícula similar pueden tener tamaños de partícula estables durante menos de 10 días a temperatura ambiente. Ello es una ventaja particular de composiciones de la presente invención que comprenden componentes a+b+c, ya que composiciones de componentes a+b en ausencia de componente c son típicamente menos estables frente al almacenamiento.

Se puede considerar que una distribución de tamaño de partícula es esencialmente estable frente al almacenamiento si el tamaño modal de partícula no aumenta a más del doble durante el período de almacenamiento. Preferiblemente, el tamaño medio no debería aumentar más de 50% durante el período de almacenamiento, y más preferiblemente no más de 20%. De manera similar, preferiblemente la anchura de la distribución a la mitad de la altura no debería aumentar en más de 50% durante el período de almacenamiento, más preferiblemente no más de 20%, y muy preferiblemente no más de 10%. Cuando una distribución es monomodal, preferiblemente debería seguir siendo monomodal durante el período de almacenamiento. En una realización muy preferida, la distribución de tamaño de partícula de las composiciones de la invención varía en tamaño medio de partícula y anchura de la distribución de tamaño de partícula a mitad de la altura en no más de 10%, y sigue siendo monomodal durante los períodos antes indicados.

En el caso de dispersiones coloidales para uso en administración intravenosa o intraarterial es particularmente importante que la distribución de tamaño de partícula sea estable durante el almacenamiento y el uso. Al ser administrada directamente al torrente sanguíneo, una composición que contenga incluso un componente relativamente pequeño de partículas no coloidales puede provocar embolias, o al menos velocidades de liberación impredecibles. De manera similar, en una composición destinada a ser administrada por cualquier otra vía, la liberación controlada de un agente activo puede depender de una distribución de tamaño de partícula fiable. También se desea que los productos farmacéuticos, de diagnóstico y veterinarios sean estables frente al almacenamiento durante varios meses, ya que en caso contrario el coste y disponibilidad del producto se ven afectados de manera significativa.

Además de ser sumamente estables frente al almacenamiento, tanto en términos de comportamiento de fase como de tamaño de partícula, las composiciones de la presente invención son no tóxicas de manera sorprendente y ventajosa. Esta baja toxicidad se puede demostrar, por ejemplo, por la falta de efecto hemolítico. Así, en otra realización preferida, la presente invención proporciona composiciones y formulaciones tales como se describen en la presente memoria que son no hemolíticas hasta una concentración de 0,2% en peso de anfífilo total. Preferiblemente, las composiciones serán no hemolíticas hasta una concentración de anfífilo total de 0,5% en peso, y más preferiblemente hasta una concentración de 1% en peso.

Otra demostración de baja toxicidad es la ausencia de pirogenicidad y, en una realización adicional, la presente invención proporciona además composiciones y formulaciones tales como se describen en la presente memoria que son no pirogénicas en conejos hasta en dosis de al menos 1 ml/kg de disolución con 5% en peso de anfífilo total, preferiblemente al menos 2 ml/kg de disolución con 5% en peso, y muy preferiblemente al menos 5 ml/kg de 5% en peso.

Otra demostración más de baja toxicidad es la carencia de toxicidad aguda, y así, en una realización adicional, la presente invención proporciona además composiciones y formulaciones tales como se describen en la presente memoria que no manifiestan toxicidad aguda en ratas hasta en dosis de al menos 2 ml/kg de disolución con 10% en peso de anfífilo total, preferiblemente al menos 5 ml/kg de disolución con 10% en peso, y muy preferiblemente al menos 10 ml/kg de 10% en peso.

Las composiciones de la presente invención se pueden formar preparando una dispersión de componentes a, b, y c en un disolvente (por ejemplo un disolvente acuoso) y después opcionalmente tratando la dispersión con uno o más ciclos de calentamiento y enfriamiento. Se forman dispersiones de partículas que comprenden componentes a, b, y c como preformulaciones antes de los ciclos de tratamiento térmico opcionales. Estas preformulaciones se pueden preparar por métodos establecidos, tales como los que se indican en los presentes Ejemplos y en los documentos US 5,531,925, WO 02/02716, WO 02/068561, WO 02/066014 y WO 02/068562, y pueden ser en sí mismas una composición de la invención.

Tales métodos incluyen:

i) añadir una fase de cristal líquido anfífilo/agua (por ejemplo componente a en agua) a una disolución acuosa de

agente de fragmentación (por ejemplo componente b y/o c) y, o bien permitir la fragmentación natural de la mezcla, o bien acelerar el proceso mediante, por ejemplo, agitación mecánica, formación de vórtices, mezclado por roto-estator, homogenización a alta presión, microfluidización y/o ultrasonidos; o bien

- 5 ii) añadir una mezcla de a+b+c (que opcionalmente contiene al menos un agente bioactivo) a un disolvente (por ejemplo una disolución acuosa) y agitar directamente.

10 Un método adicional mediante el cual se pueden preparar dispersiones que contienen agentes activos, en particular a partir de fases cristalinas líquidas, consiste en la disolución en dióxido de carbono supercrítico (sc-CO₂) o en un disolvente de proceso alternativo, tal como un alcohol ligero (por ejemplo metanol o etanol), adecuado para disolver y reducir la viscosidad de la composición. En particular, la fase cristalina líquida, por ejemplo una fase voluminosa cúbica o hexagonal, es a menudo muy viscosa, y puede resultar difícil de manipular y mezclar. En consecuencia, si se debe preparar la fase cristalina líquida como un líquido principal, y posteriormente hay que cargarla con agente activo, la mezclado requerida para proporcionar una distribución homogénea del agente activo es difícil de conseguir. En la región supercrítica del diagrama de presión/temperatura (típicamente a temperatura ambiente o superior, y a 150 bares o más), el dióxido de carbono constituye un disolvente muy eficaz y puede ser empleado para reducir la viscosidad de la fase cristalina líquida y favorecer una eficaz mezclado y carga con agentes activos. Después se puede eliminar el sc-CO₂ (por ejemplo disminuyendo la presión, y dispersar en disolvente la fase principal cargada, tal como se ha discutido antes. Por tanto, el empleo de sc-CO₂ en la formación de fases cristalinas líquidas dispersas cargadas con agente activo (especialmente las de la presente invención) constituye un aspecto adicional de la invención.

20 El comportamiento de fase y la distribución de tamaño de partícula de formulaciones en partículas, de la presente invención, pueden controlarse mediante uno o más (preferiblemente uno) ciclos de calentamiento y enfriamiento. Tales ciclos se pueden emplear para convertir partículas laminares a una forma no laminar, y/o para reducir la dispersión de tamaños de partícula. También se puede mejorar mediante este método la estabilidad de las partículas.

25 Un ciclo térmico lleva a la composición, con o sin agente activo presente, hasta una temperatura suficiente para procurar la conversión de al menos una porción de las partículas a fase no laminar al enfriar a la temperatura ambiente. Típicamente, esto implicará calentar hasta aproximadamente 90-150°C durante 1-30 minutos y seguidamente enfriar hasta la temperatura ambiente. Más típicamente, un ciclo térmico implicará calentar hasta 100-120°C durante 2-20 minutos antes de enfriar. Las condiciones más adecuadas variarán en sus detalles entre una composición y otra, pero serán fácilmente determinadas por un especialista en la técnica.

En el proceso de ciclos térmicos, el tamaño medio de partícula típicamente crece ligeramente, pero la distribución de tamaño de partícula se estrecha.

35 La presencia de partículas en forma no laminar será evaluada preferiblemente a partir de un conjunto de imágenes de partículas obtenidas por criomicroscopía electrónica de transmisión, que preferiblemente expongan una muestra de más de 20 partículas, preferiblemente más de 50 partículas. La presencia de partículas no laminares puede ser determinada también mediante experimentos de dispersión de rayos X.

40 Puesto que el método de tratamiento térmico se puede emplear para convertir partículas laminares a la forma no laminar, no resulta esencial que las partículas de la preformulación sean no laminares. Por tanto, para crear preformulaciones para uso en métodos de tratamiento térmico de la presente invención se puede emplear cualquiera de los métodos bien conocidos para formular lípidos en vesículas. Los métodos adecuados incluyen, por ejemplo, la sonicación o la extrusión (por ejemplo a través de una membrana de policarbonato). Tales métodos serán bien conocidos para los especialistas en la técnica apropiada.

45 Preferiblemente, las preformulaciones deben estar formuladas de manera tal que el estado termodinámicamente estable a temperatura ambiente sea no laminar. Como alternativa, la forma no laminar puede ser un estado termodinámicamente metaestable. Si debe estar presente, el agente activo puede ser incorporado a las partículas antes y/o después del tratamiento por ciclos térmicos. Cuando se emplea más de un ciclo térmico, el agente activo puede ser incorporado entre ciclos. Cuando el agente activo es sensible al calor (por ejemplo un péptido o proteína), el agente activo se incorpora preferiblemente después de terminado el tratamiento por ciclos térmicos.

50 Se puede proporcionar un control adicional sobre la distribución de tamaño de partícula de una composición si se forman y/o suspenden las partículas en un medio acuoso de fuerza iónica controlada. En particular, se forman más fácilmente por tratamiento térmico partículas pequeñas (por ejemplo coloidales, especialmente partículas coloidales pequeñas (<0,3 µm)) a bajas fuerzas iónicas, por ejemplo inferiores o en torno a NaCl 1 mM en agua. La proporción de partículas no laminares (es decir, que tienen un núcleo no laminar tal como se describe en la presente memoria) aumenta por emplear el método de tratamiento por ciclos térmicos descrito en la presente memoria. La distribución de tamaño de partícula se puede controlar por medio del tratamiento térmico en un medio (generalmente una disolución acuosa) de fuerza iónica controlada. Generalmente, el tamaño medio de partícula aumenta por emplear medios con fuerza iónica superior. Típicamente, se pueden formar dispersiones de partículas no laminares estables si se lleva a cabo el paso de tratamiento térmico con fuerzas iónicas en el intervalo de NaCl 0,1 mM a 100 mM

(o una fuerza iónica equivalente) dependiendo de la composición empleada. La distribución de tamaño exacta dependerá de la composición, y por referencia a los métodos descritos en la presente memoria se pueden establecer rápidamente condiciones adecuadas, pero típicamente se forman partículas submicrónicas con una fuerza iónica baja, y partículas coloidales y no coloidales mayores a medida que aumenta la fuerza iónica.

5 Cuando se requieren partículas pequeñas en disoluciones con contenido salino relativamente elevado (por ejemplo en NaCl al 0,9% para inyección), es posible formar las partículas por tratamiento térmico a baja fuerza iónica, y añadir sal o sales adicionales después del enfriamiento, para proporcionar la osmolalidad deseada.

10 Además, cuando en los componentes anfílicos de una composición se incluye (por ejemplo hasta 10% de componente a) una porción de lípido cargado es deseable llevar a cabo el paso de tratamiento térmico con una fuerza iónica en torno a NaCl 0,1-20 mM, o un nivel equivalente de otra u otras sales apropiadas. Así, la proporción de partículas convertidas a forma no laminar aumenta, al tiempo que el tamaño de partícula se mantiene en un intervalo de tamaño deseable.

15 Las partículas (que pueden haber sido tratadas térmicamente o bien pueden ser tratadas térmicamente con posterioridad) se pueden concentrar (por ejemplo mediante ultrafiltración o diálisis) y/o secar, por ejemplo mediante secado por nebulización, secado en lecho fluidizado o liofilización. En el caso de partículas secadas, el proceso de secado puede ir seguido de aumento de tamaño de partícula por medio de un único paso o de pasos repetidos de aglomeración y granulación. Las formulaciones concentradas, secadas y/o aglomeradas así formadas pueden ser utilizadas como tales, o bien hidratadas y/o dispersadas, para proporcionar dispersiones de partículas no laminares adecuadas para el uso en el suministro de sustancias activas, en especial *in vivo*. Tales formulaciones de partículas concentradas, secadas y/o aglomeradas y las suspensiones resultantes de su resuspensión/hidratación forman un aspecto adicional de la presente invención.

Las formulaciones de la presente invención comprenden al menos una composición de la invención y al menos un vehículo o excipiente. Cuando la formulación sea una formulación farmacéutica, los vehículos o excipientes serán farmacéuticamente tolerables.

25 Las composiciones pueden ser formuladas con vehículos, diluyentes y/o excipientes farmacéuticos convencionales tales como vehículos acuosos (por ejemplo agua para inyectables), aglutinantes, cargas, estabilizantes, agentes para ajuste de la osmolalidad, agentes efervescentes, tampones y modificadores del pH, modificadores de la viscosidad, edulcorantes, lubricantes, emulsionantes, aromas, agentes de revestimiento (por ejemplo revestimientos resistentes al jugo gástrico), etc. Las formulaciones que comprenden una composición de la invención y al menos un vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable pueden ser formuladas en cualquier forma farmacéutica conocida, entre ellas suspensiones, polvos, comprimidos, cápsulas, cápsulas revestidas, comprimidos revestidos, aerosoles, supositorios, cremas, parches transdérmicos, nebulizaciones, etc. Cuando la composición de la invención ha sido secada, puede ser formulada en una forma (tal como un polvo) adecuada para ser resuspendida en un medio apropiado (por ejemplo agua purificada o una disolución de osmolalidad fisiológica) antes de su administración. Las formulaciones pueden ser administradas mediante cualquier método adecuado, entre ellos la vía oral, parenteral (por ejemplo por inyección o infusión intramuscular, subcutánea o intravenosa), tópica, rectal, etc.

40 Las composiciones de la presente invención tienen efectos tóxicos nulos o limitados, proporcionan propiedades ventajosas para el suministro de agentes activos *in vivo* y pueden ser cargadas fácilmente con tales agentes. Por tanto, las composiciones son muy adecuadas para establecer un sistema de suministro adecuado o mejorado para agentes activos nuevos o conocidos.

45 Aún en otro aspecto, la presente invención proporciona un conjunto o *kit* adecuado para establecer una formulación biológicamente tolerable de un agente activo que comprenda al menos una composición de la presente invención. El kit proporciona preferiblemente una pluralidad de composiciones de la presente invención, por ejemplo dos, tres, cuatro o más. Más preferiblemente, dicho kit contendrá al menos 10 composiciones de la presente invención diferentes, que pueden ser presentadas en un formato de matriz, por ejemplo en los pocillos de al menos una placa de múltiples pocillos. Dicho kit puede incluir también instrucciones para cargar las composiciones con un agente activo y/o para su formulación con vistas a la administración.

50 A continuación se ilustrará adicionalmente la invención por referencia a los siguientes Ejemplos y las Figuras adjuntas, en las cuales:

la Figura 1 muestra la distribución de tamaño de partícula de una composición de DOPE/TGMO-15/DOPE-PEG(5000), antes y después del tratamiento térmico opcional;

la Figura 2 muestra la distribución de tamaño de partícula de una composición de DOPE/TGMO-15/DOPE-PEG(5000) preparada en disolución de NaCl, antes y después del tratamiento térmico opcional;

55 la Figura 3 muestra la distribución de tamaño de partícula de una composición de DOPE/polisorbato 80/Pluronic® F127, antes y después del tratamiento térmico opcional;

la Figura 4 muestra la distribución de tamaño de partícula de una composición de DOPE/DOPG/TGMO-

15/DOPE-PEG(5000), antes y después del tratamiento térmico opcional;

la Figura 5 muestra la distribución de tamaño de partícula de una composición de DOPE/DOPG/polisorbato 80/DOPE-PEG(5000), antes y después del tratamiento térmico opcional;

5 la Figura 6 muestra una imagen de crío-TEM de partículas no laminares obtenidas tras haber tratado térmicamente un homogenizado de DOPE/TGMO-15/DOPE-PEG(5000) (76/20/4).

Ejemplo 1 - Partículas anfífilas

1.1. - Preparación de una dispersión no laminar

10 Se formó una dispersión grosera de partículas cúbicas y laminares mezclando DOPE (Avanti Polar Lipids, EE.UU., 0,75 g), TGMO-15 (Nikko, Japón, 0,2 g) y DOPE-PEG(5000) (Avanti Polar Lipids, EE.UU., 0,05 g) en agua desionizada (49,0 g). Se congeló y descongeló 3 veces la mezcla, incluyendo la congelación a -85°C y la descongelación con agitación enérgica y por sacudidas a temperatura ambiente. La dispersión grosera resultante fue homogenizada después en un microfluidizador a alta presión (350 bares) durante 10 minutos (8 pasadas) a temperatura ambiente.

El tamaño de partícula se midió mediante difracción láser (Coulter LS230) después de la homogenización.

15 La muestra homogenizada era una dispersión coloidal de turbia a azulada, con tamaños de partícula entre 0,05 y 1 µm, consistente en partículas de fase cúbica y vesículas.

1.2. - Tratamiento térmico

Se llevó a cabo un ciclo opcional de tratamiento térmico sobre la dispersión preparada en el Ejemplo 1.1.

20 Se trató en autoclave (120°C, 20 minutos) una muestra (25 ml) de la dispersión generada en el Ejemplo 1.1 y se enfrió hasta la temperatura ambiente. Cuando se examinó mediante crío-TEM, una proporción aún mayor de las partículas en dispersión presentaban carácter no laminar. La distribución de tamaño de partícula se había estrechado algo en comparación con la dispersión antes del tratamiento térmico, y mostraba mejor estabilidad frente al almacenamiento.

Componentes:

- 25 a DOPE
- b TGMO-15 (monooleato de glicerilo-PEG(15), Nikko, Japón)
- c DOPE-PEG(5000)

Formulación	a:b:c	abc % en peso	medio acuoso	aq. % en peso	Fase antes	Temp. °C	Tiempo minutos	Fase después
i	75:20:5	2	agua	98	lam/cúbica*	120	20	cúbica**

*lam/cúbica = partículas cúbicas y laminares mezcladas

30 **cúbica = predominantemente partículas cúbicas

En la Figura 1 se muestra la distribución de tamaño de partícula de la composición antes y después del tratamiento térmico.

Ejemplo 2 - Composición adicional

35 Se ha estudiado el efecto de la fuerza iónica durante el tratamiento térmico preparando una segunda composición mediante los métodos de los Ejemplos 1.1 y 1.2. Se emplearon los mismos componentes a, b y c pero con una relación en peso distinta, y para el paso de tratamiento térmico se empleó NaCl 3 mM en lugar de agua.

Formulación	a:b:c	abc % en peso	medio acuoso	aq % en peso	Fase antes	Temp. °C	Tiempo minutos	Fase después
ii	77,2:20,3:2,5	2	NaCl 3 mM	98	lam/cúbica*	120	20	cúbica*

En la Figura 2 se indica la distribución de tamaño de partícula antes y después del tratamiento térmico. En este caso, se ve que el efecto de la elevada fuerza iónica consiste en provocar que el tamaño de partícula modal aumente aproximadamente al cuádruple, al tiempo que se mantiene una distribución de tamaño de partícula estrecha. Además, las partículas fueron convertidas a partículas esencialmente 100% de fase cúbica.

5 Ejemplo 3 - Composición adicional

Se preparó una dispersión de DOPE (0,80 g), polisorbato 80 (0,134 g) y Pluronic® F127 (0,10 g) en agua desionizada (49,0 g) mediante los métodos de los Ejemplos 1.1 y 1.2. En la Figura 3 se indica la distribución de tamaño de partícula medida antes y después del tratamiento térmico. Se observa que el tratamiento térmico transforma las partículas originales que presentan una distribución de tamaño multimodal ancha a partículas con una distribución monomodal estrecha. La proporción de partículas de fase cúbica en la dispersión se incrementó a casi el 100% después del tratamiento térmico.

Componentes:

- a DOPE
- b Polisorbato 80
- 15 c Pluronic® F127

Formulación	a:b:c	abc % en peso	medio acuoso	aq % en peso	Fase antes	Temp. °C	Tiempo minutos	Fase después
iii	77,4:13,0:9,6	2	agua	98	lam/cúbica*	120	20	cúbica*

Ejemplo 4 - Composición adicional: incluye fosfolípido aniónico

Se preparó una dispersión de DOPE (0,90 g), DOPG (0,036 g), TGMO-15 (0,207 g) y DOPE-PEG(5000) (0,06 g) en agua desionizada (58,8 g) mediante los métodos de los Ejemplos 1.1 y 1.2. El tratamiento térmico se llevó a cabo en NaCl 5 mM dando como resultado una distribución de tamaño estrecha monomodal. En la Figura 4 se indica la distribución de tamaño de partícula medida antes y después del tratamiento térmico. El tratamiento térmico fue acompañado también de un aumento en la turbidez de la muestra, que indicaba que una proporción mayor de las partículas de la dispersión tenían carácter no laminar.

Componentes:

- 25 a1 DOPE
- a2 DOPG
- b TGMO-15
- c DOPE-PEG(5000)

Formulación	a1:a2:b:c	abc % en peso	medio acuoso	aq % en peso	Fase antes	Temp. °C	Tiempo minutos	Fase después
iv	75:3:17:5	2	NaCl 5 mM	98	lam/cúbica*	120	20	cúbica**

30 Ejemplo 5 - Composición adicional: incluye fosfolípido aniónico

Se preparó una dispersión de DOPE (0,90 g), DOPG (0,036 g), polisorbato 80 (0,212 g) y DOPE-PEG(5000) (0,06 g) en agua desionizada (58,8 g) mediante los métodos de los Ejemplos 1.1 y 1.2. El tratamiento térmico se llevó a cabo en NaCl 5 mM dando como resultado una distribución de tamaño estrecha monomodal. En la Figura 5 se indica la distribución de tamaño de partícula medida antes y después del tratamiento térmico. Una proporción mayor de las partículas de la dispersión mostró carácter no laminar después del tratamiento térmico.

Componentes:

- a1 DOPE
- a2 DOPG

- b Polisorbato 80
- c DOPE-PEG(5000)

Formulación	a1:a2:b:c	abc % en peso	medio acuoso	aq % en peso	Fase antes	Temp. °C	Tiempo minutos	Fase después
v	75:3:17:5	2	NaCl 5 mM	98	lam/cúbica*	120	20	cúbica**

5 **Ejemplo 6 - Composición adicional**

10 Se preparó una mezcla de Soy PC (Lipoid GmbH, Alemania, 0,44 g) y GDO (Danisco, Dinamarca, 0,44 g) mezclando en etanol y eliminando después por evaporación el disolvente. A esta mezcla se añadió polisorbato 80 (0,05 g) y la mezcla de anfífilos se mezcló mediante mezclado por vórtices para proporcionar un líquido homogéneo. Se añadió la mezcla SPC/GDO/P80 (0,93 g) a 49 g de agua desionizada que contenía DOPE-PEG(5000) disuelto (0,07 g). Se agitó por sacudidas la mezcla durante 12 horas (350 r.p.m.) y después se homogenizó y se trató térmicamente de acuerdo con los métodos de los Ejemplos 1.1 y 1.2.

Componentes:

- a1 Soy PC
- a2 GDO
- 15 b Polisorbato 80
- c DOPE-PEG(5000)

Formulación	a1:a2:b:c	abc % en peso	medio acuoso	aq % en peso	Fase antes	Temp. °C	Tiempo minutos	Fase después
vi	44:44:5:7	2	agua	98	lam/cúbica*	120	20	cúbica**

Ejemplo 7 - Carga de ingrediente activo

20 Se pueden preparar dispersiones no laminares de diversos componentes en agua y en soluciones salinas por el método del Ejemplo 1.1 y tratarse opcionalmente con el método de tratamiento térmico del Ejemplo 1.2.

Se añade a las dispersiones el péptido catiónico desmopresina a una concentración de 1 mg/ml. Se deja que la dispersión se equilibre durante 60 minutos a temperatura ambiente y se reanaliza en cuanto a tamaño de partícula y comportamiento de fase opcional. El tamaño de partícula no se ve afectado, tal como se establece por medio de difracción láser.

25 **Ejemplo 8 - Ensayos de toxicidad**

8.1 Hemólisis

Se preparó una dispersión en fase cúbica mediante los métodos de los Ejemplos 1.1 y 1.2 utilizando los siguientes componentes:

- a) DOPE
- 30 b) TGMO-15
- c) DOPE-PEG5000

en una proporción en peso a:b:c de 76:20:4, dispersados en agua hasta una concentración total de anfífilos de 5% en peso. Se diluyó con agua esta disolución hasta diversas concentraciones finales. En la Figura 6 se muestra una imagen por crío-TEM de la dispersión.

35 Se midió el efecto hemolítico de la dispersión en fase cúbica a diversas concentraciones. Se halló que la dispersión no era hemolítica a concentraciones de hasta 1% en peso de anfífilo total.

Se prepararon dispersiones en fase cúbica de monooleína de glicerol (GMO) mediante un método análogo, y se ensayaron en cuanto a efecto hemolítico en las mismas condiciones. La dispersión basada en GMO mostró efecto hemolítico significativo a concentraciones tan bajas como 0,1% en peso de anfífilo total.

8.2 Pirogenicidad

- 5 Se preparó una formulación basada en DOPE como en el Ejemplo 8.1, y se ensayó en cuanto a pirogenicidad en un modelo de conejo. Se halló que la dispersión era apirógena hasta a dosis de al menos 5 ml/kg (5% en peso de anfífilo total).

8.3 Toxicidad aguda

- 10 Se prepararon composiciones basadas en DOPE y GMO como en el Ejemplo 8.1, y se ensayaron en cuanto a toxicidad aguda en un modelo de rata.

En un estudio dependiente de la dosis, la dispersión de fase cúbica basada en DOPE no mostró toxicidad aguda con dosis de hasta 10 ml/kg (10% en peso de anfífilo).

Por el contrario, las dispersiones en fase cúbica basadas en monooleína de glicerol resultaron ser tóxicas a dosis de lipído correspondientes.

REIVINDICACIONES

1. Una composición en partículas que comprende:

a) al menos 50% de al menos un anfífilo formador de estructura seleccionado de fosfolípidos, glicolípidos, y diglicéridos,

5 b) 2 a 40% de al menos un anfífilo dilatador de estructura seleccionado de polioxietilen-éteres de alquilo, ésteres de ácido graso con polioxietilen-sorbitán, polioxietilen-ésteres de ácido graso, derivados de polioxietilen-aceite de ricino o derivados lipídicos de polioxietileno, y

c) 2 a 20% de al menos un anfífilo polímero estabilizante de dispersión seleccionado de poloxámeros, PEG-dioleato de glicerol, PEG-ésteres de ácido graso o PEG-fosfolípidos,

10 en donde todas las partes se dan en peso con respecto a la suma de los pesos de a+b+c y en donde la composición comprende partículas no laminares o forma partículas no laminares cuando es puesta en contacto con un fluido acuoso.

15 2. Una composición según la reivindicación 1 en donde los componentes anfífilicos comprenden al menos 50% en peso de anfífilos que tienen una solubilidad acuosa inferior a 10^{-9} M a 25°C, con respecto al peso total de componentes a+b+c.

3. Una composición según la reivindicación 1 en donde los componentes anfífilicos comprenden al menos 70% en peso de anfífilos que tienen una solubilidad acuosa inferior a 10^{-9} M a 25°C, con respecto al peso total de componentes a+b+c.

20 4. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde dichas partículas no laminares comprenden fase L_3 y/o fase hexagonal invertida.

5. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que comprende adicionalmente al menos un agente activo.

25 6. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en donde el componente a) comprende un lípido catiónico a un nivel de 1-10% en peso y la composición comprende adicionalmente al menos un agente activo de ácido nucleico.

7. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en donde dichas partículas no laminares tienen un tamaño de partícula de 10 a 200 μm .

8. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en donde dichas partículas no laminares son coloidales.

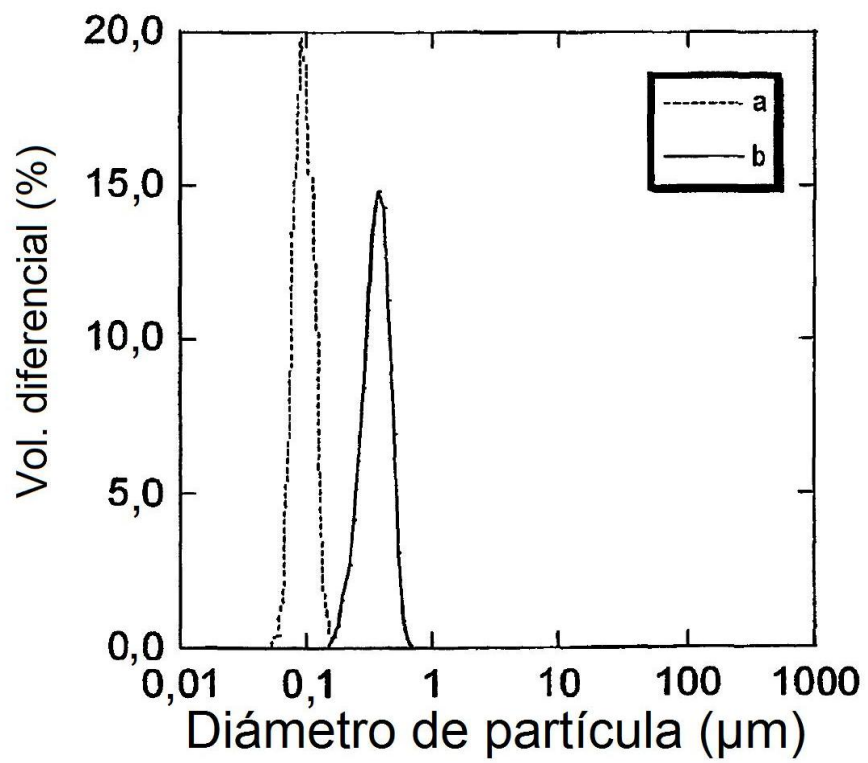
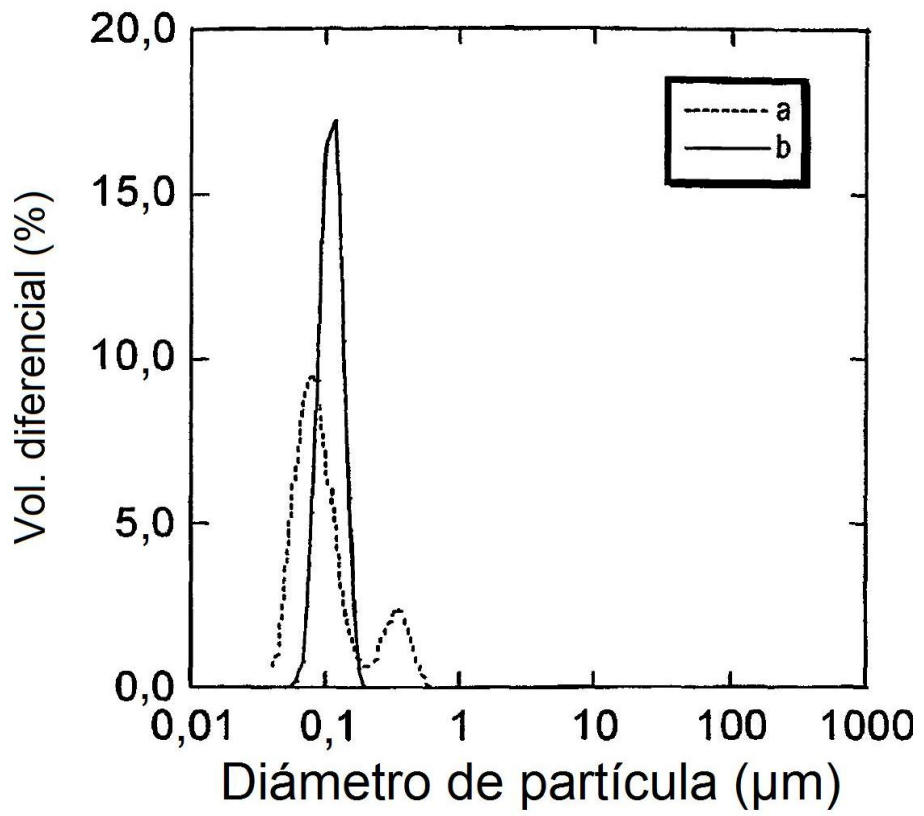
30 9. Una composición según la reivindicación 8 en donde dichas partículas no laminares son estables, tanto en términos de comportamiento de fase como de tamaño de partícula, frente al almacenamiento a temperatura ambiente durante al menos 10 días.

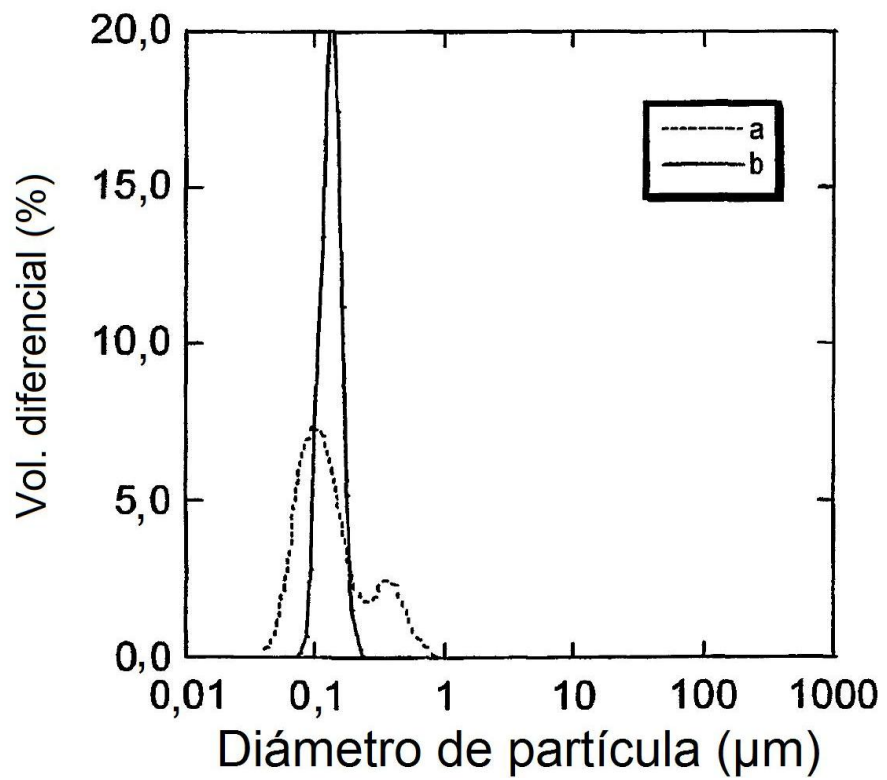
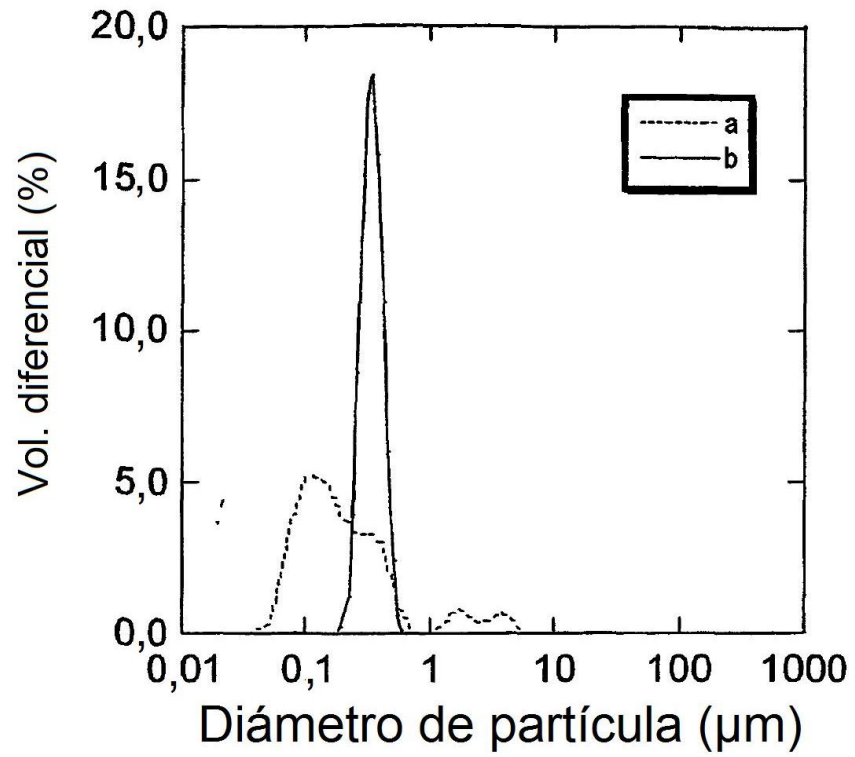
10. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 que es no hemolítica hasta una concentración de 0,2% de anfífilo total.

35 11. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 que es no hemolítica hasta una concentración de 1% de anfífilo total.

12. Una formulación farmacéutica que comprende al menos una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y al menos un vehículo o excipiente biológicamente tolerable.

40 13. Un kit apropiado para establecer una formulación biológicamente tolerable de un agente activo, en donde dicho kit comprende al menos una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.





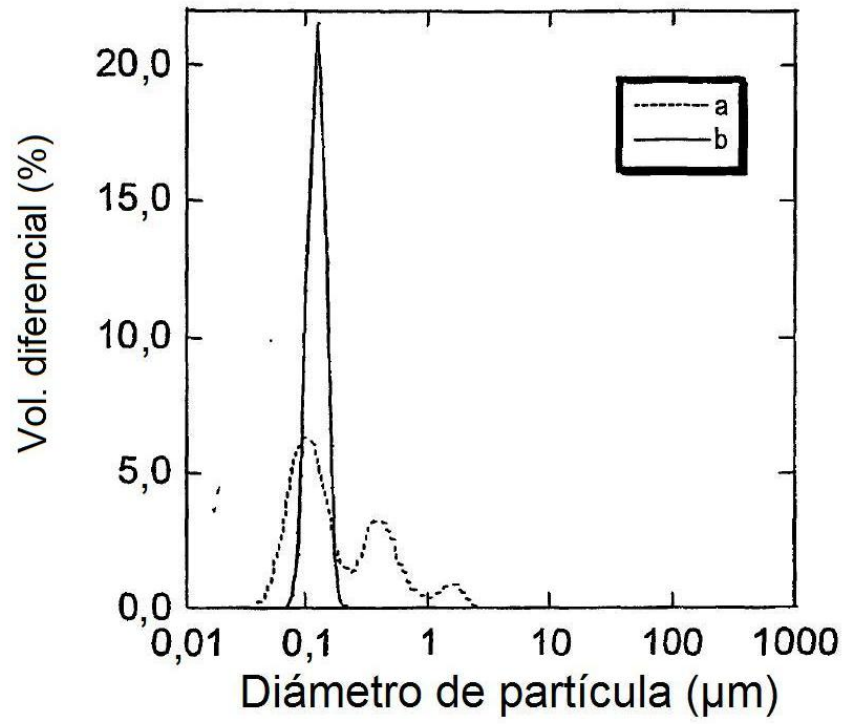


Fig. 5

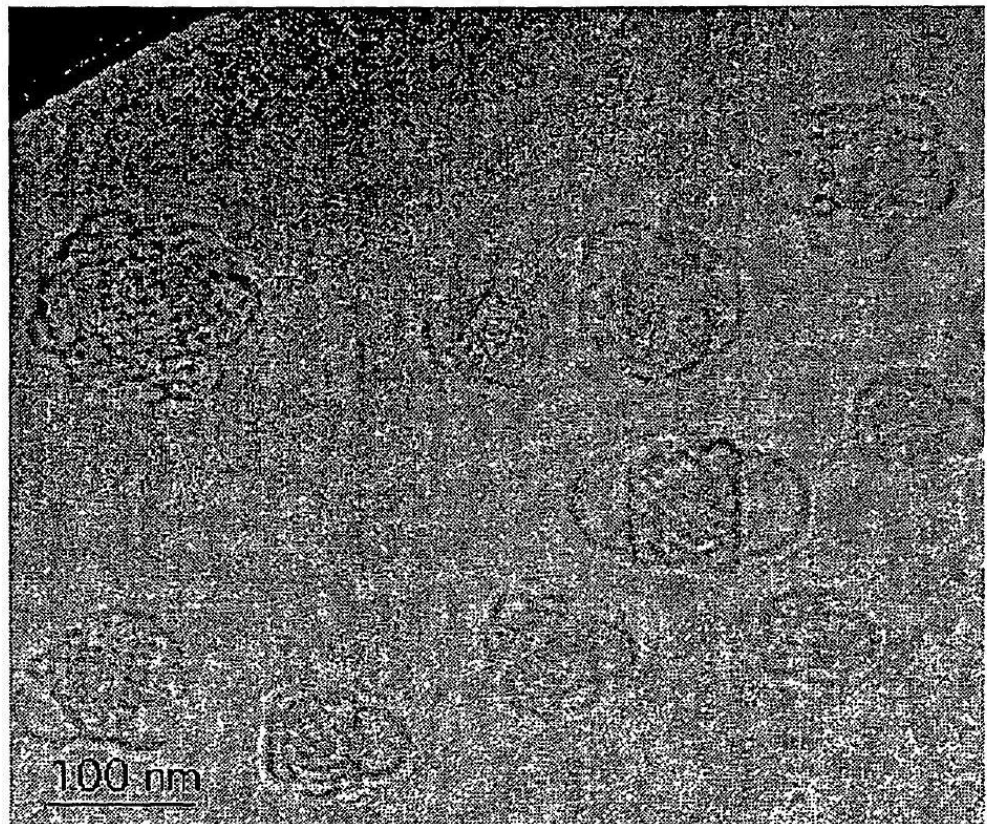


Fig. 6