



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 580**

51 Int. Cl.:
C09K 19/06 (2006.01)
A61K 9/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04794515 .9**
96 Fecha de presentación : **08.10.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1677730**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.07.2006**

54 Título: **Vehículos para la administración de fármacos basados en materiales de fase líquido-cristalina inversa.**

30 Prioridad: **08.10.2003 US 509255 P**
13.07.2004 US 889313

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.04.2011

73 Titular/es: **LYOTROPIC THERAPEUTICS, Inc.**
10487 Lakeridge Parkway 400
Ashland, Virginia 23005, US

72 Inventor/es: **Anderson, David, M. y**
Cameransi, Benjamin, G. Jr.

74 Agente: **Zuazo Araluze, Alexander**

ES 2 357 580 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

Vehículos para la administración de fármacos basados en materiales de fase líquido-cristalina inversa.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la invención

5 La invención se refiere generalmente a partículas no recubiertas de material de fase cúbica inversa o fase hexagonal inversa que contienen un agente activo. En particular, la invención proporciona partículas no recubiertas que tienen una carga iónica que es suficiente para estabilizar las partículas en dispersión en un líquido, por ejemplo un disolvente polar. La invención también contempla formulaciones de fármacos que contienen fases hexagonal inversa y cúbica inversa que pueden aplicarse para aumentar significativamente la duración de acción farmacológica y/o proporcionar la misma duración y eficacia a una dosis significativamente inferior.

Antecedentes de la invención

15 Muchos compuestos activos usados en usos farmacéuticos, nutricionales, nutracéuticos, medioambientales e industriales son o bien insolubles en agua, o bien responden mejor cuando se administran en alguna clase de matriz protectora, direccionable y/o de otro modo funcional. En el caso de los productos farmacéuticos, se reconoce generalmente que las micropartículas pueden proporcionar matrices robustas para fármacos mediante diversas vías de administración, siempre que sean del tamaño apropiado, estables en dispersión y estén compuestas por excipientes que son aceptables para esa vía. Sin embargo, además de solubilizar y/o proteger el compuesto activo para su administración y/o en circulación, sería ventajoso que una micropartícula desempeñase un papel activo en la administración y la absorción del agente activo, un objetivo que ha sido un impedimento para varios vehículos particulados y basados en gotas potencialmente útiles.

20 Para el caso de los agentes activos farmacéuticos que son de baja solubilidad en agua, la solubilización de compuestos de fármacos de este tipo se convierte en un reto por la selección muy limitada de disolventes y líquidos estructurados que están aprobados por organismos reguladores para su uso a los niveles que se requerirían para solubilizar el fármaco. Además, los excipientes líquidos miscibles en agua, más particularmente etanol, son de valor limitado dado que, incluso cuando el fármaco es insoluble en etanol puro, por ejemplo, a menudo precipitará tras el contacto con el agua, tal como con o bien agua para inyección como diluyente o bien en el medio acuoso de líquidos corporales, tales como la sangre.

25 Se han desarrollado fases líquido-cristalinas liotrópicas nanoestructuradas de las fases cúbica inversa y hexagonal inversa concretamente de tipo inverso, como matrices de solubilización excelentes tanto para compuestos escasamente solubles, como para compuestos delicados de este tipo tales como proteínas y otras biomacromoléculas. El documento U.S. 6.482.517 (Anderson, 19 de noviembre de 2002) y el documento U.S. 6.638.621 (Anderson, 28 de octubre de 2003), cuyo contenido se incorpora en su totalidad como referencia, dan a conocer, entre otras cosas, composiciones y métodos eficaces para producir matrices líquido-cristalinas liotrópicas de este tipo. Estas partículas se recubren con materiales sólidos.

30 Un pionero en el comportamiento de fases de tensioactivos, P.A. Winsor, describió partículas de fase cúbica recubiertas con una fase líquida nanoestructurada, que según el conocimiento actual era probablemente una fase L3. Véase *Liquid Crystals & Plastic Crystals*, Vol. 1, ediciones G.W. Gray y P.A. Winsor (1974), Ellis Horwood Ltd., página 224, así como Balinov, Olsson y Soderman (1991) *J. Phys. Chem.* 95:5931. Larsson, en 1989, describió partículas de fase cúbica inversas con recubrimientos de fase líquido-cristalina laminar. Véase Larsson (1989) *J. Phys. Chem.* 93(21) 7304.

35 El documento U.S. 5.531.925 (Landh *et al.*, 2 de julio de 1996) describe asimismo partículas de fase cúbica inversa o fase hexagonal inversa que requieren una fase superficial de o bien fase líquido-cristalina laminar, cristalina laminar, o bien L3, con el fin de dispersar las partículas. El recubrimiento se denomina en esta descripción "fase superficial", o "fase dispersable", enseñando de ese modo, en primer lugar, que es una fase separada, distinta del interior líquido-cristalino inverso, y en segundo lugar, que el propio interior de la fase líquido-cristalina inversa no es una fase dispersable. La fase superficial L3 en esta descripción se describe como que se "anclaje a la bicapa o monocapa de la fase interior" (columna 7, líneas 59-60).

40 La patente estadounidense 6.071.524 describe composiciones en forma de dispersiones que contienen: (a) del 60 al 98% en peso de una fase acuosa y (b) del 2 al 40% en peso de una fase oleosa dispersa en la fase acuosa, dispersándose y estabilizándose la fase oleosa usando partículas de gel cúbicas. Las partículas están formadas esencialmente por del 0,1 al 15% en peso (en relación con el peso total de la composición) de al menos un monoglicérido de ácido graso insaturado que tiene una cadena grasa insaturada C16-C22 en mezcla con fitanetriol, y del 0,05 al 3% en peso en relación con el peso total de la composición de un agente dispersante y estabilizante. El agente es una sustancia activa en superficie, soluble en agua a temperatura ambiente, que contiene una cadena grasa, saturada o insaturada, lineal o ramificada que tiene de 8 a 22 átomos de carbono. La patente también describe métodos de preparación de composiciones de este tipo. Un mínimo de tres fases termodinámicamente distintas están presentes en una mezcla de este tipo, concretamente la fase exterior acuosa, las partículas de gel cúbicas y la fase oleosa que

5 contiene el agente activo. El principio activo (fármaco, compuesto cosmeceútico, etc.) está presente en la fase oleosa dispersa, y de hecho ubicado sustancialmente en la fase oleosa. Sistemas de este tipo, emulsiones en las que monocapas de lípido o tensioactivo, múltiples capas, dominios cristalinos líquido laminares o no laminares o dominios
10 cristalinos laminares estabilizan las gotas de un fluido en otro, presentan escasa idoneidad para el direccionamiento, limitaciones del término de caducidad (flotación, ruptura de las emulsiones, etc.), y otros problemas bien conocidos en la técnica de emulsiones. Y sistemas de emulsiones o gotas en los que cada gota está rodeada por una pluralidad de
15 partículas de otro material o fase, que experimentan toda difusión independiente alrededor de la gota (y, por definición, están separadas unas de otras por capas de fluido intermedias), presentan espacios entre las partículas que comprometen la capacidad del material para controlar la salida del agente activo hacia fuera, o la entrada de factores de
20 confusión al interior de la gota. Además, con un sistema de este tipo en el que la pluralidad de partículas que rodean la gota se deriva de cristales líquidos liotrópicos, tal como en el documento U.S. 6.071.524, en el organismo de un animal estas partículas pueden volverse fácilmente independientes de las gotas, de manera que las gotas, que contienen la amplia mayoría del agente activo, no obtengan los beneficios potenciales (tal como se tratan en el presente documento) de las partículas líquido-cristalinas. Aunque las "partículas de gel cúbicas" del documento 6.071.524 se diseñan para agregarse en la superficie de las gotas de aceite, en una aplicación farmacéutica, los factores de dilución y las fuerzas de cizallamiento, junto con la pluralidad de condiciones y procesos bioquímicos con que se encuentra una gota, podrían separar fácilmente las gotas de su recubrimiento destinado. Otra limitación de la invención descrita en el documento 6.071.524 es que ni los monoglicéridos ni el fitanetriol (ni muchos de los otros tensioactivos usados en las realizaciones notificadas) están aprobados para su uso en productos farmacéuticos inyectables, y en efecto se sabe que los monoglicéridos son extremadamente tóxicos tras su inyección.

25 La solicitud estadounidense 2002/0153509 (Lynch *et al.*, publicada el 24 de octubre de 2002) describe composiciones en las que se usan compuestos cargados como "anclajes" ("enlaces"), que sirven para anclar los compuestos activos o compuestos de direccionamiento a fases cúbicas, algunas veces en material particulado para. Por ejemplo, se afirma en la descripción del documento 2002/0153509 que la inclusión de un anclaje tal como un tensioactivo catiónico podría aumentar la cantidad del fármaco activo en la fase cúbica en proporción a la cantidad de tensioactivo (por ejemplo, párrafo 0099), según la imagen esquemática mostrada en la figura 2 de esta descripción que representa una molécula de ketoprofeno aniónica asociada con el grupo de cabeza de un tensioactivo catiónico (y situado en el lado polar de la interfase polar-apolar). El fin del anclaje es unir una molécula de fármaco, en una base molecular de 1 a 1.

30 En el documento WO 03/000236 A1, se dan a conocer partículas con capacidad de solubilización mejorada. En ese documento, se describen partículas bifásicas, sin embargo, los sistemas bifásicos son más inestables que los sistemas monofásicos con el tiempo.

35 El documento WO 03/106589 A1, un solicitud de patente presentada antes de la presente solicitud pero que se publicó tras la fecha de presentación de la presente invención se refiere a partículas nanoporosas con una diana retenida.

40 Sería deseable tener micropartículas mejoradas para la solubilización y protección de fármacos que son de un tamaño apropiado, estables en dispersión y están compuestas por excipientes que son aceptables para su administración mediante una variedad de vías. Además, sería deseable tener micropartículas mejoradas que también presenten un papel activo en la administración y la absorción del fármaco, de manera que características que incluyen la biodisponibilidad, duración de acción, dosificación requerida, seguridad y otros factores podrían influenciarse de manera favorable mediante la asociación del fármaco con el vehículo.

En particular, se han usado varios métodos en el intento para aumentar la duración de acción de anestésicos locales.

45 Un método usado en la actualidad en la práctica médica es la coadministración de vasoconstrictores tales como epinefrina (adrenalina), fenilefrina o norepinefrina, lo que aumenta el tiempo de permanencia del fármaco en el sitio de administración, debido a la inducción de vasoconstricción con posterior reducción de la captación sistémica del anestésico local. Aunque puede aumentarse la duración aproximadamente dos veces para los anestésicos locales de acción rápida, tales como lidocaína, procaína, cloroprocaina y prilocaína, esto tiende a no ser el caso con los anestésicos locales de acción más prolongada tales como bupivacaína. La documentación del producto de Astra-Zeneca sobre su formulación Marcaine[®] actualmente comercializada declara: "El efecto de prolongación de la duración de la adrenalina no es tan pronunciado con la bupivacaína como con los AL de acción rápida. Puede observarse una prolongación de hasta el 50%, dependiendo del modo de administración." Se han notificado sólo rara vez datos reproducibles que demuestran sistemáticamente bloqueos nerviosos con anestésicos locales que duran más de 10
55 horas a partir de una única inyección del anestésico local a dosis subtóxicas, incluso con la coadministración de agentes vasoconstrictores.

60 La epinefrina, junto con otros agentes vasoactivos, tienen sus propias toxicidades y deben usarse con precaución en determinados pacientes, tales como arritmias cardiacas e hipertensión. Específicamente con bupivacaína, las pruebas en ratas Sprague-Dawley han demostrado que la cardiotoxicidad de la bupivacaína (que se conoce bien que es limitante de la dosis, y ha dado como resultado muertes humanas) se aumenta significativamente por la epinefrina, así como por otros compuestos de vasoconstricción. Véase J.R. Kambam, W.W. Kinney, F. Matsuda,

W. Wright y D.A. Holaday (1990) *Anesth. Analg.* 70(5):543-5. Aunque puede usarse un pretratamiento con propanolol para proteger frente a la cardiotoxicidad de la bupivacaína, este efecto protector se suprime en gran medida por la coadministración de epinefrina. Véase W.W. Kinney, J.R. Kambam y W. Wright (1991) *Can. J. Anaesth.* 38(4 Pt 1): 533-6. Otras contraindicaciones a la adición de epinefrina a los anestésicos locales incluyen angina inestable, tratamiento con inhibidores de la MAO o antidepressivos tricíclicos, insuficiencia uteroplacentaria y bloqueos nerviosos periféricos en zonas que pueden carecer de flujo sanguíneo colateral (oído, nariz, pene, dedos). De manera significativa, se ha demostrado recientemente que la adición de epinefrina a tetracaína aumenta en gran medida su neurotoxicidad, aparentemente debido a la inducción de grandes concentraciones de glutamato, en el líquido cefalorraquídeo para una administración intratecal; esto representa una toxicidad sistemática peligrosa. Véase S. Oka, M. Matsumoto, K. Ohtake, T. Kiyoshima, K. Nakakimura y T. Sakabe (2001) *Anesth. Analg.* 93(4):1050-7.

Adicionalmente, varios estudios han demostrado la ausencia de prolongación por epinefrina en diferentes bloqueos nerviosos. Véase H. Renck y H.G. Hassan (1992) 36(5):387-92, y también A. Weber, R. Fournier, E. Van Gessel, N. Riand y Z. Gamulin (2001) *Anesth. Analg.* 93(5):1327-31.

Se ha usado clonidina para prolongar la acción de determinados anestésicos locales, pero la prolongación es minoritaria, menos de aproximadamente el 50% y casi nada en el caso de los anestésicos locales de acción prolongada, lo que produce duraciones de bloqueo nervioso de menos de 8 horas esencialmente en todos los casos. Por tanto su uso se limita principalmente a casos en los que están contraindicados los agentes vasoconstrictores. De manera bastante amplia, las combinaciones de dos principios activos farmacéuticos (API) están desfavorecidas cuando un único agente puede lograr el mismo fin.

Las preparaciones liposómicas de anestésicos locales han demostrado acción sostenida, pero sólo a dosis que superan ampliamente la dosis tóxica del AL. Un ejemplo representativo se facilita en Grant *et al.*, en el que se logró una duración de aproximadamente 24 horas en ratones, pero a una dosis supertóxica de más de 150 mg/kg, es decir, 50 veces la dosis cardiotoxicidad. Véase G.J. Grant, B. Piskou y M. Bansinath (2003) *Clin. Exp. Harm. Physiol.* 30:966. Un resultado casi idéntico se notificó en la solicitud de patente estadounidense 2003/0185873 concedida a Chasin *et al.*, en la que el ejemplo 12 notifica una dosis de 150 mg/kg. Esta dosis también representa 150 veces la dosis recomendada (1 mg/kg), para su uso en seres humanos. Se han publicado resultados similares de Grant *et al.* usando neostigmina. Resultados previos de Grant *et al.* reivindicaron analgesia prolongada, pero los bloqueos sensoriales en ratones usando bupivacaína duraron sólo un promedio de sólo aproximadamente 2 horas a dosis que fueron superiores a 3 mg/kg. Véase Grant *et al.* (1994) *Regional Anesthesia* 19(4):264. Aunque estos investigadores señalaron que se redujo la toxicidad debido a la encapsulación del fármaco, el aumento de la dosis en dos órdenes de magnitud por encima de la dosis letal sería un impedimento grave, y casi de hecho insuperable, para su aprobación por los organismos reguladores y su aceptación por la comunidad médica. Esto es particularmente cierto en el caso de una preparación liposómica, porque se conoce bien que los liposomas son estructuras metaestables, no estables. En efecto, una dosis de 10 veces, o incluso dos veces, la dosis letal sería gravemente problemática en cualquier vehículo.

Se notificaron niveles en sangre sostenidos de bupivacaína en una formulación de microesferas de policaprolactona administrada o bien por vía subcutánea o bien por vía intraperitoneal, pero de nuevo, las dosis eran bastante superiores a la dosis cardiotoxicidad. Se administraron aproximadamente 9,8 mg/kg (2,46 mg por rata de 250 g) de bupivacaína, claramente una dosis supertóxica, lo que dio como resultado concentraciones plasmáticas máximas de aproximadamente 240 ng/ml. Véase, M.D. Blanco *et al.* (2003) *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 55:229. Se obtuvieron resultados similares usando otras microesferas de polímero, concretamente anhídrido del ácido bis-policarboxifenoxipropano-sebácico (véase D.B. Masters *et al.*, 1993, *Pharm. Res.* 10:1527) y polilactida-glicolida (véase P. leCorre *et al.*, 1994, *Int. J. Pharm.* 107:41).

Se ha notificado que una emulsión lipídica que contiene bupivacaína aumenta la duración del bloqueo nervioso en aproximadamente un 30-40%, aunque curiosamente los bloqueos nerviosos con este sistema tuvieron una duración de sólo aproximadamente 73 minutos (promedio de 3 animales). Véase Lazaro *et al.* (1999) *Anesth. Analg.* 89:121. Se obtuvieron estos tiempos de duración con anestesia general con fenobarbital y a dosis de bupivacaína (de aproximadamente 3,2 - 3,6 mg/kg) que son potencialmente cardiotoxicos para bupivacaína. Además, su formulación contiene oleato de sodio, que en la actualidad no está aprobado para formulaciones inyectables ni pertenece a ninguna clase de compuestos que contenga un miembro que esté aprobado para una formulación inyectable.

Langerman *et al.* han notificado una formulación de anestésicos locales que consiste en una disolución del fármaco en iofendilato. Sin embargo, se redujo la intensidad del bloqueo nervioso, en otras palabras, la eficacia en la formulación, en comparación con la intensidad usando una disolución acuosa sencilla a la misma dosis. Véase Langerman *et al.* (1992) *Anesthesiology* 77: 475-81. Por tanto, parece que obtener un bloqueo igualmente intenso requeriría un aumento de la dosis, en comparación con la disolución acuosa habitual del anestésico local aprobado y comercializado actualmente. También, se notificó aracnoiditis aséptica tras la administración intratecal de iofendilato. En efecto, se han observado frecuentemente aracnoiditis y reacciones de irritación graves, incluyendo muerte, con iofendilato, que se ha declarado más irritante y tóxico que el Lipiodol, un predecesor del iofendilato que se abandonó tras reacciones adversas graves. Véase E. Lindgren y T. Greitz (1995) *Am. J. Euroradiology* 16(2):351-60.

Dybre *et al.* han publicado un estudio de lidocaína en una formulación lipídica polar, en algunos casos junto con dexametasona que es un API que se sabe que prolonga la analgesia. Se registraron bloqueos del nervio ciático de

duración aumentada, pero sólo a dosis de más de 20 mg/kg. Esto es bastante superior a la dosis máxima recomendada de 7 mg/kg. En efecto, dosis de aproximadamente 6 mg/kg produjeron duraciones de acción más cortas que con la misma dosis de clorhidrato de lidocaína en disolución. Los niveles en sangre de lidocaína tras la administración perineural de la formulación fueron muy altos, en algunos puntos de tiempo dos órdenes de magnitud superiores a con la disolución acuosa de lidocaína, que para muchos fármacos se traduciría en un riesgo aumentado de toxicidad. Véase Dyhre *et al.*, *Acta Anesth. Scand.* (2001) 45(5):583. Además, los diglicéridos de lípidos polares de girasol usados en la formulación de ese estudio, y los diglicéridos no son farmacéuticamente aceptables para la inyección intravenosa (ni son monoglicéridos).

SUMARIO DE LA INVENCION

Tal como se trata en más detalle en el presente documento, las partículas de materiales de fase cristalina liotrópica inversa pueden presentar un alto potencial para transportar compuestos activos a través de una variedad de barreras tales como membranas celulares, particularmente en el caso de fases cúbicas bicontinuas inversas, en virtud de sus estructuras nanoporosas únicas y propiedades de curvatura asociadas. Las fases líquido-cristalinas cúbica inversa y hexagonal inversa pueden ser de muy baja solubilidad en agua, lo que significa que mantienen su integridad como vehículos tras la entrada en el organismo evitando así la precipitación del fármaco. Por tanto, con propiedades de solubilización y de secuestro superiores, así como integridad en agua, estos materiales son prometedores en campos tales como la administración de fármacos. Sin embargo, este potencial se ha dejado en gran medida sin explotar debido a la suposición tácita de que las partículas de este tipo deben recubrirse con el fin de ser estables en dispersión.

En la presente invención, el potencial completo de esta actividad de transporte puede explotarse dentro del contexto de dispersiones de partículas estables, en primer lugar mediante la comprensión de que las partículas no recubiertas de fases de este tipo son sumamente deseables por sus propiedades de potenciación del transporte y la absorción, y en segundo lugar mediante la comprensión de que los compuestos asociados a bicapa, cargados de manera iónica, con químicas y concentraciones apropiadas pueden estabilizar tales partículas como partículas no recubiertas creando fuertes potenciales de superficie electrostáticos, potenciales zeta de partícula. En particular, en el presente documento se enseña que el potencial zeta es un parámetro clave para establecer una estabilización de este tipo, y que un potencial zeta superior a o igual a aproximadamente 25 mV, o más preferiblemente superior a aproximadamente 30 mV, de magnitud es un requisito importante para un sistema de este tipo. De igual manera, un potencial zeta inferior a -25 mV o inferior a -30 mV de magnitud es útil para su estabilización.

Por tanto, la invención proporciona partículas no recubiertas, estables formadas por materiales líquido-cristalinos liotrópicos inversos, por ejemplo material líquido-cristalino cúbico inverso o hexagonal inverso. Las partículas están "no recubiertas" porque el material líquido-cristalino a partir del cual se forman las partículas está en contacto directo con el medio en el que las partículas se dispersan, es decir, la periferia externa de una partícula dispersa, individual no está protegida del medio (por ejemplo, una fase líquida acuosa) en el que las partículas se dispersan. Ningún recubrimiento se interpone entre la partícula y el medio, o entre una partícula y otras partículas. Más bien, las partículas se repelen entre sí y se mantienen en dispersión en el medio mediante fuertes potenciales de superficie electrostáticos. Se crean fuertes potenciales de superficie electrostáticos de este tipo mediante la elección apropiada de los "componentes" que se combinan para componer el material líquido-cristalino a partir del cual se forman las partículas, tal como se enseña en el presente documento. En general, la razón en peso de la partícula con respecto a medio de fase líquida está en el intervalo de entre aproximadamente 1:2 y aproximadamente 1:1000. El tamaño de partícula está entre aproximadamente 10 nanómetros (el orden de magnitud de una única celda unidad de material líquido-cristalino inverso) y 100 micras, preferiblemente entre aproximadamente 40 nm y 10 micras, y lo más preferiblemente (al menos para productos inyectables) submicras, lo que significa menos de una micra de diámetro eficaz. Se prefieren especialmente partículas que puedan hacerse pasar a través de un filtro de 0,22 micras, o extruirse de manera similar, dado que esto esteriliza el producto.

En algunas realizaciones de la invención, un compuesto activo, normalmente aunque no siempre un compuesto farmacéutico, se disuelve o se dispersa o se incorpora de otro modo dentro del propio material de fase líquido-cristalina. Preferiblemente, en esta realización, el compuesto activo y el material líquido-cristalino forman una unidad integrada, íntimamente asociada, es decir, el compuesto activo es parte del cristal líquido. Una ventaja de una partícula de este tipo es que el compuesto activo obtiene el beneficio de las capacidades de promoción de la absorción del cristal líquido, de una manera que es superior a las configuraciones de partículas descritas en otra parte, en las que el agente activo está presente principalmente fuera del cristal líquido, o dentro de una partícula de cristal líquido que está recubierta con un recubrimiento de interferencia. En efecto, se prevé que en muchos casos, la mayoría de agentes activos permanecerán asociados con el cristal líquido hasta el punto en el que el cristal líquido se integre con, por ejemplo, una membrana celular seleccionada como diana, eliminando de ese modo la necesidad de disolver el agente activo en un líquido biológico acuoso (por ejemplo, sangre, líquido intestinal) de camino a la captación celular. Si la partícula se capta mediante endocitosis, entonces la misma capacidad para fusionarse con las biomembranas podría desempeñar un papel clave en la superación de una limitación que se aplica a los liposomas, concretamente la del atrapamiento dentro de los compartimentos endosómicos y que da lugar a una escasa administración al/a los sitio(s) intracelular(es). También tiene un gran impacto en el presente documento que todo esto puede llevarse a cabo dentro del contexto, y restricciones extremas, de las formulaciones inyectables incluyendo formulaciones farmacéuticas intravenosas.

5 En otra realización de la invención, el agente o compuesto activo no es parte del material líquido-cristalino que forma la partícula no recubierta, sino que es o bien un líquido que se incluye dentro de la partícula no recubierta, o bien se solubiliza en un líquido que se incluye, se disuelve, se dispersa o se incorpora de otro modo dentro de la partícula no recubierta. Aún en otra realización, el agente activo se dispersa dentro de partícula no recubierta en forma de microcristales del compuesto.

Por tanto, es un objeto de esta invención proporcionar micropartículas cargadas con agente activo que pueden administrarse, que se benefician completamente del potencial de promoción de la absorción y solubilización del fármaco de las micropartículas de fase líquido-cristalina cúbica inversa y hexagonal inversa, no disminuido por los efectos de los recubrimientos.

10 Es un objeto de esta invención proporcionar micropartículas cargadas con agente activo que pueden administrarse, que presentan interacciones no impedidas, directas con biomembranas que pueden promover fuertemente la absorción y/o permitir el direccionamiento.

Es otro objeto de esta invención proporcionar dispersiones estables de micropartículas líquido-cristalinas liotrópicas cargadas con agente activo de este tipo para inyección.

15 En el presente documento, se proporcionan las composiciones y los criterios de diseño que producirán dispersiones de partículas estabilizadas de material de fase líquido-cristalina inversa.

En el presente documento, se proporcionan los criterios y procedimientos experimentales mediante los que se determina si una composición particular producirá dispersiones de partículas estabilizadas de material de fase líquido-cristalina inversa.

20 Es otro objeto de esta invención proporcionar composiciones con propiedades fisicoquímicas necesarias para producir suficiente estabilización de la carga superficial.

En el presente documento, se proporcionan métodos para estabilizar partículas no recubiertas de materiales de fase líquido-cristalina inversa.

25 En el presente documento, se proporcionan formulaciones de nanocristales de fármacos en las que la matriz de estabilización puede servir para las funciones adicionales de potenciación de la absorción de fármacos y solubilización de otros excipientes útiles para su asociación íntima con el fármaco.

Es otro objeto de esta invención proporcionar composiciones que producen partículas de carga estabilizada y dispersiones de las mismas tras la reconstitución con agua.

30 Además, es un objeto importante de esta invención proporcionar nuevas composiciones para la administración de agentes terapéuticos contra el cáncer, agentes anestésicos locales y anestésicos generales, y agentes de reversión de la anestesia. Éstos incluyen en particular propofol, alfaxalona, alfatalona, alfadolona, eltanolona, propanidid, ketamina, pregnanolona, etomidato, y otros anestésicos generales; bupivacaína, lidocaína, procaína, tetracaína, mepivacaína, etidocaína, oxibuprocaína, cocaína, benzocaína, pramixinina, prilocaína, proparacaína, ropivacaínas, cloroprocaina, dibucaína y anestésicos locales relacionados; SN-38 y camptotecinas relacionadas; paclitaxel y taxanos relacionados; doxorubicina, idarubicina, daunorubicina y rubicinas relacionadas; anfotericina B; coenzima Q10; esteroides y agentes antiinflamatorios esteroideos; antiinflamatorios no esteroideos (por ejemplo, salicilatos, derivados de para-aminofenol (por ejemplo, paracetamol), fenomatos, derivados de ácido propiónico (por ejemplo, naproxeno, ibuprofeno, etc.); analgésicos; antipiréticos; sedantes (por ejemplo, benzodiazepinas tales como diazepam); hipnóticos (por ejemplo, anestésicos intravenosos y barbitúricos); opiáceos; cannabinoides; y proteínas (por ejemplo, insulina y eritropoyetina) (ha de entenderse que una amplia variedad de amidas y ésteres pueden tener aplicación en la presente invención). De importancia particular es el agente anestésico general propofol, que se suministra en formulaciones que presentan problemas de ardor en la inyección, contaminación microbiana y altas cargas de lípidos.

45 La invención también contempla formulaciones de fase líquido-cristalina inversa que aumentan la duración de acción de los agentes farmacológicos sin aumento de la dosis, y/o proporcionan la misma duración y eficacia a la dosis recomendada habitual. En el caso de administración de fármacos de acción sostenida que implica fármacos de índice terapéutico relativamente bajo, es crucial observar que el aumento de la dosificación, que se asume tácitamente que es inevitable en la mayoría de los casos, es muy peligroso. Esto se ilustra particularmente bien mediante el caso de los anestésicos locales, tales como bupivacaína. En particular, la dosis cardiotoxicidad es, para la mayoría de anestésicos locales, sólo moderadamente superior a la dosificación recomendada habitual para los bloqueos nerviosos. Específicamente en el caso de la bupivacaína, uno de los anestésicos locales de acción más prolongada y por tanto una de las mejores elecciones de fármaco para una formulación de acción prolongada, la dosificación recomendada para el bloqueo nervioso es de un máximo de 1,5 mg/kg basándose en el peso del animal/ser humano, mientras que dosis superiores a 3 mg/kg pueden ser cardiotoxicas o inducir convulsiones. Este índice terapéutico bastante bajo significa que los métodos habituales para lograr una acción sostenida, basados en el envasado de cantidades más grandes del fármaco en una formulación que lo libera lentamente, de modo que se mantienen los niveles del fármaco en o por encima del nivel umbral para una acción eficaz, requieren inevitablemente dosis próximas a, o superiores a, la dosis tóxica en una única administración. Debido al peligro siempre presente de una inyección involuntaria en una vena o

arteria, una administración de este tipo puede ser potencialmente mortal, incluso en el caso en el que la acción pretendida del vehículo sea liberar el fármaco de manera suficientemente lenta para reducir el riesgo de cardiotoxicidad y convulsiones. Un vehículo que requiere, por ejemplo, más de 3 mg/kg de bupivacaína, con el fin de lograr un aumento significativo en la duración del bloqueo nervioso por encima de las 2-5 horas normales, introducirá un riesgo de letalidad que no justificará su uso rutinario, ni en los pensamientos de los organismos reguladores ni en la comunidad médica, independientemente de lo que se declara en cuanto a la seguridad del vehículo. Cualquier inestabilidad de un vehículo de este tipo, ya sea física, química, inducida por cizallamiento, inducida por la temperatura, inducida por una mala aplicación o asociada con el término de caducidad pueden provocar en principio la liberación prematura del fármaco, y si una parte sustancial alcanza el corazón o el cerebro, esto sería correr el riesgo de un acontecimiento adverso grave, incluyendo la muerte.

En el transcurso de esta invención, se hizo el descubrimiento sorprendente de que determinadas composiciones farmacéuticamente aceptables basadas en fases líquido-cristalinas hexagonales inversas y, más preferiblemente, cúbicas inversas pueden aumentar la duración de acción de un principio activo farmacéutico (API) mientras se evita el aumento de la dosis que corresponde normalmente a las formulaciones de acción sostenida. Una composición de este tipo puede tener la propiedad de que aumenta la duración de acción normal de este fármaco, preferiblemente en más de aproximadamente un 50%, más preferiblemente en un 100% y lo más preferiblemente en un 200%, y de tal manera que este aumento en la duración de acción se produzca con dosis que no son supertóxicas, y preferiblemente subtóxicas, cuando no se introducen API ni compuestos vasoconstrictores adicionales. La prueba preferida es evaluar la duración del bloqueo nervioso, según un procedimiento descrito en detalle en el presente documento (véase el ejemplo 2), de una formulación de bupivacaína en la composición; la duración, a una dosis de 1 mg/kg, debe representar un aumento, preferiblemente de más de aproximadamente un 50%, de la duración de 4 horas normal, en el caso en el que no esté presente ningún API adicional. Lo más preferiblemente esta dosis en una formulación de este tipo producirá una duración de acción de más de aproximadamente 10 horas. Adicionalmente, la administración de la mitad de la dosis normal (que en el caso de la bupivacaína significa 0,5 mg/kg) debe proporcionar al menos la misma eficacia y duración que 1 mg/kg de la formulación (agente único) habitual (por ejemplo, clorhidrato de bupivacaína en disolución acuosa). El descubrimiento sorprendente en el núcleo de esta invención es que cuando se invocan estas composiciones tal como se reivindican en el presente documento, puede lograrse la duración de acción farmacológica significativamente prolongada sin aumento de la dosis, en efecto, incluso con dosis drásticamente inferiores, lo que es particularmente importante en el caso de fármacos con bajo índice terapéutico tales como muchos anestésicos locales.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra un esquema de una dispersión según la presente invención.

La figura 2 muestra un esquema de la situación electrostática en una partícula representativa de la presente invención, con una carga superficial negativa neta.

La figura 3 muestra la distribución de potencial zeta medida resultante, usando tres ángulos de medición para la dispersión descrita en el ejemplo 1.

La figura 4 muestra la distribución de potencial zeta medida para una dispersión en presencia de agua en exceso descrita en el ejemplo 2.

La figura 5 muestra el comportamiento de fase en presencia de agua en exceso tal como se analiza con un microscopio óptico de polarización para la dispersión descrita en el ejemplo 2.

La figura 6 muestra los datos de potencial zeta para la dispersión descrita en el ejemplo 5.

La figura 7 muestra los datos de potencial zeta para la dispersión descrita en el ejemplo 6.

La figura 8 muestra los datos de potencial zeta para la dispersión descrita en el ejemplo 7.

La figura 9 muestra los datos de potencial zeta para la dispersión descrita en el ejemplo 8.

La figura 10 muestra los datos de potencial zeta para la dispersión descrita en el ejemplo 10.

La figura 11 muestra los datos de potencial zeta para el dantroleno sódico sólo con benzalconio (es decir, no está presente ninguna fase cúbica) tal como se describe en el ejemplo 10.

La figura 12 muestra los datos de potencial zeta para la dispersión descrita en el ejemplo 11.

La figura 13 muestra los datos de potencial zeta para la dispersión descrita en el ejemplo 12.

La figura 14 muestra los datos de potencial zeta para la dispersión descrita en el ejemplo 13.

La figura 15 muestra los datos de tamaño de partícula para la dispersión descrita en el ejemplo 21.

La figura 16 muestra los datos de potencial zeta para la dispersión descrita en el ejemplo 21.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS DE LA INVENCÓN

El inventor ha demostrado la relación entre las propiedades de curvatura de los lípidos, y su tendencia a promover la porosidad en bicapas y a formar fases cúbicas inversas y otras fases inversas. Véase Anderson D.M., Wennerstrom, H. y Olsson, U., J. Phys. Chem. 1989, 93:4532-4542. Para resumir un aspecto crucial de esto, si se supone un modelo matemático en el que el espesor de bicapa es constante, y que el plano medio de la bicapa puede diferenciarse dos veces, puede demostrarse en primer lugar que, con el fin de minimizar las energías de curvatura desfavorables, el plano medio debe tener en todas partes curvatura media de cero. A continuación, en estas condiciones, entonces puede demostrarse que si la curvatura media promedio en la interfase polar-apolar es hacia el agua, como lo es en una fase líquido-cristalina inversa, entonces la curvatura gaussiana integral es significativamente negativa. Entonces, la curvatura gaussiana integral negativa implica porosidad en el sistema de bicapa. Una conclusión del análisis completo extraído por el inventor es que, si una composición que se ensambla en una fase de bicapa porosa, tal como una fase cúbica inversa, comienza a intercambiar material con una membrana, tal como una biomembrana, puede inducir una tendencia local a la curvatura inversa (curvatura hacia el agua en la interfase polar-apolar), e induce de ese modo porosidad en la biomembrana. Esto puede ser de gran importancia en la administración de fármacos a través de barreras de biomembrana para la absorción, lo que constituye una ventaja inherente de una fase cúbica inversa o hexagonal inversa con respecto a un material laminar o liposómico en la práctica de la administración de fármacos, particularmente en la administración de fármacos anticancerígenos y otros fármacos cuando las barreras de absorción son problemas muy significativos en el tratamiento terapéutico.

En vista de esta relación, la tendencia a inducir o formar microestructuras porosas se considera en el presente contexto que es ventajosa con respecto a la administración de fármacos y nutrientes en particular, así como en otras aplicaciones, porque promueve la integración de micropartículas basadas en lípidos (o basadas en tensioactivos) administradas con las biomembranas que forman de otra manera barreras para la absorción. Esto está en marcado contraste con las estructuras lipídicas laminares tales como liposomas que muestran baja curvatura, y poca o ninguna porosidad, y no muestran generalmente tendencias fuertes a integrarse con las biomembranas. Un aspecto muy importante de esto es que también puede permitir que materiales de fase cúbica superen proteínas de flujo de salida tales como glicoproteína P (gp-p). El inventor reconoce que es crucial prever un contacto lo más íntimo posible entre el material de fase líquido-cristalina inversa y cualquier barrera biológica (u otra) inherente en la aplicación de la invención. Los ejemplos de barreras de este tipo que son de interés particular como barreras que pueden superarse mediante la presente invención incluyen: membranas plasmáticas de células que son sitios de acción farmacológica; la barrera hematoencefálica; membranas apicales de células epiteliales intestinales; membranas de macrofases; membranas de células neuronales, membranas intracelulares tales como la membrana mitocondrial o la membrana nuclear; y membranas celulares de la mucosa bucal o nasal.

Sin embargo, aunque se han desarrollado varios métodos para formular micropartículas de fases líquido-cristalinas inversas, la inclusión de una fase de recubrimiento de estabilización ha conducido al desarrollo de partículas con propiedades de promoción de la absorción atenuadas, dado que las interacciones con las biomembranas se ven afectadas entonces por las propiedades del recubrimiento, en vez de la propia fase líquido-cristalina inversa. Por tanto, aunque a menudo los recubrimientos de este tipo sirven como una función útil, en algunos casos el recubrimiento puede ser indeseable.

En esta invención, se dispersan micropartículas cargadas con fármaco de fases líquido-cristalinas cúbica inversa y hexagonal inversa en un líquido tal como agua, sin ningún recubrimiento, permitiendo así interacciones directas entre el cristal líquido y las barreras biológicas. Además, esto puede lograrse usando sólo componentes que son farmacéuticamente aceptables para inyección, incluyendo inyección intravenosa, un requisito necesario para el uso de dispersiones de este tipo en determinadas aplicaciones críticas de administración de fármacos. Esto se logra en la presente invención mediante composiciones que contienen componentes asociados a bicapa, cargados de manera iónica, que producen un potencial electrostático en las partículas lo suficientemente fuerte como para estabilizar las dispersiones de partículas frente a la agregación, floculación y fusión; concretamente que tienen un potencial zeta superior a o igual a aproximadamente 25 mV de magnitud, o más preferiblemente superior a aproximadamente 30 mV de magnitud. Por tanto, la invención representa un punto de partida fundamental a partir de las partículas, y enseñanzas, de la técnica anterior basada en las fases líquido-cristalinas inversas con un recubrimiento, es decir, en la que una fase adicional en el exterior de la partícula estabiliza las dispersiones de partículas de este tipo.

La patente estadounidense 5.531.925 proporciona un ejemplo de la suposición tácita con respecto a las enseñanzas previas de que un recubrimiento a) se requiere para estabilizar partículas líquido-cristalinas, y b) no interfiere con la función de la partícula. Las partículas descritas en el documento U.S. 5.531.925 se recubren con fases superficiales que comprenden fases L3 y fases líquido-cristalinas laminares o fases cristalinas laminares que son obstrucciones inherentes a la función. Estas fases superficiales, en analogía próxima con los liposomas basados en fases líquido-cristalinas laminares y fases cristalinas laminares, presentan varias desventajas y limitaciones, más particularmente interacciones desfavorables con biomembranas que limitan su capacidad para administrar su carga útil a las células. En efecto, no sólo se hace que estas fases superficiales intermedias impidan la entrada del vehículo en la célula diana, sino que además, tras la entrada, que normalmente requiere endocitosis, la partícula queda atrapada en un endosoma que representa todavía otra barrera para la administración. Se conocen muy bien limitaciones de este tipo en el campo de la administración de fármacos basada en liposomas. Son particularmente limitativas en el caso de formulaciones de fármacos inyectables, en las que las barreras para la captación del vehículo por parte de la célula

diana aumentan la probabilidad de que se capte el vehículo mediante mecanismos alternativos desfavorables o incluso que provocan toxicidad, tal como mediante el hígado o el sistema inmunitario.

En el caso de recubrimientos que consisten en fases superficiales L3, la tendencia a que la fase L3 presente sólo interacciones que favorecen la absorción muy limitadas con biomembranas se debe probablemente a su estructura altamente dinámica, y/o su capacidad, y tendencia, a reorganizarse muy rápidamente en una estructura laminar o de tipo laminar, que se correlaciona con su birrefringencia de cizallamiento observada, la presencia de un desdoblamiento en las mediciones de la forma de banda de RMN de pulsos, y su transformación en una fase laminar con el tiempo (véase el documento U.S. 5.531.925 columna 7, líneas 37-48 y columna 15, líneas 5-36). En efecto, el efecto “de lubricación” de las fases L3, que es lo que aparentemente las hacen eficaces como “fases dispersables” en los métodos del documento 5.531.925, pueden describirse como que inducen una tendencia a que las partículas recubiertas con L3 entren en contacto próximo para evitar la fusión, debido en parte a la naturaleza térmicamente enrollada, fluctuante de la fase L3 líquida que produce una fuerza de repulsión efectiva de considerable intensidad. La misma repulsión parece aplicarse a las partículas que entran en contacto próximo con las paredes de un recipiente, que se correlaciona con una falta de adhesión y flujo “deslizante” observado por Landh con sus dispersiones de partículas recubiertas con L3. Por extensión, se deduciría que las partículas recubiertas con L3 deben experimentar por su propia naturaleza una fuerza de repulsión inducida por fluctuación intensa cuando se aproxima a una biomembrana, y por tanto presentar limitaciones que han afectado a la tecnología de los liposomas, particularmente con respecto a la entrada a la célula y la falta de promoción de la absorción. La naturaleza de larga circulación de las partículas recubiertas con L3, notificadas en el ejemplo de somatostatina intravenosa en conejos del documento 5.531.925 soporta la noción de que estas partículas no tienden a interactuar íntimamente con las biomembranas, sino que prefieren permanecer en circulación evitando la integración con las membranas.

Contribuyendo además a esta fuerza inducida por la fluctuación (que en el estudio de fases laminares estrechamente relacionadas se denomina “fuerza de ondulación”, bien estudiada por W. Helfrich) están las fuerzas inducidas por la hidratación que surgen de la fase L3 altamente hidratada. La fase L3 existe de manera bastante general a altos contenidos en agua, casi siempre a contenidos en agua superiores que cualquier fase cúbica que esté próxima en el espacio de la composición; Landh y Larsson observan, de hecho, que cuando una fase L3 y una fase cúbica están en equilibrio, que las dimensiones características de la fase L3 son aproximadamente el doble que las de la fase cúbica, y esto corresponde a un contenido en agua considerablemente superior, una conclusión que se vuelve obvia adicionalmente mediante el propio diagrama de fases en el que el contenido en agua en la fase L3 es superior al de la fase cúbica. Se conoce bien en la técnica que las superficies fuertemente hidratadas experimentan una fuerza de repulsión considerable tras aproximarse a una biomembrana. Se conoce que los tensioactivos de alto HLB, altamente polioxietilados (pegilados), que están presentes en grandes proporciones de fracciones en peso en las fases L3 de las realizaciones notificadas en el documento U.S. 5.531.925 están fuertemente hidratadas a temperaturas ambientales o corporales. En la presente invención, en el caso en el que las partículas se estabilizan mediante un potencial zeta negativo, esto dará lugar a una fuerza de repulsión tras el contacto próximo con una biomembrana típica, pero debido a la baja magnitud del potencial zeta de una biomembrana típica, la fuerza será débil en comparación con las fuerzas inducidas por la hidratación y la fluctuación combinadas en el caso de partículas recubiertas con L3. En casos de la presente invención en los que un potencial zeta positivo estabiliza las partículas, esto dará lugar a una fuerza de atracción. Las fuerzas de hidratación en el caso de partículas de la presente invención pueden mantenerse débiles, tal como se manifiesta mediante bajos contenidos en agua de las fases líquido-cristalinas inversas incluso cuando se incorpora el compuesto asociado a bicapa, cargado, directamente en la fase líquido-cristalina, tal como se muestra en varios de los casos notificados en la sección de ejemplos, más adelante.

La presencia de otra fase que recubre la superficie de las partículas mencionadas anteriormente no sólo puede interponerse e interrumpir las interacciones potencialmente favorables entre el cristal líquido y las barreras de biomembrana para la absorción, sino que también pueden crear numerosos problemas prácticos y experimentales. La interpretación del rendimiento *in vivo* y la elucidación del mecanismo de acción de la formulación están complicadas por supuesto por la presencia de un recubrimiento, que puede tener un impacto considerable en el desarrollo y la aplicación de una formulación farmacéutica inyectable. En el caso de recubrimientos de fase L3, incluso la existencia de la fase L3 es difícil de validar de manera experimental, mucho menos caracterizar, tal como se indica por ejemplo en las líneas 29-33 de la columna 15 del documento U.S. 5.531.925; además, tal como se indica en las líneas 41-45 de la columna 7, la fase L3 a menudo es metaestable, y esto puede dar lugar a cambios farmacéuticamente inaceptables en la estructura con el tiempo, tal como se demuestra en las publicaciones que tratan sobre partículas de Landh y Larsson. Véase Gustafsson, Ljusberg-Wahren, Almgren y Larsson (1996), *Langmuir*, 12(20):4611. Además, en el caso de partículas de la patente estadounidense 5.531.925, las composiciones que producen partículas de este tipo se limitan a las que se encuentran en regiones de 3 fases del diagrama de fases en el que la fase acuosa interior, de recubrimiento, y exterior están en equilibrio termodinámico. Regiones de 3 fases de este tipo a menudo son difíciles de encontrar de manera experimental y normalmente son sensibles a la pureza del material y otras variables intensivas.

Otro aspecto valioso de la presente invención con respecto a partículas recubiertas de este tipo como las del documento 5.531.925 es el hecho de que la fase líquido-cristalina inversa es la única matriz basada en lípidos en la partícula y, por tanto, la única ubicación disponible dentro de la partícula para un compuesto activo, en contraposición con las partículas recubiertas con otra fase basada en lípidos (o basada en tensioactivos), particularmente una fase L3. Cuando también está disponible una segunda fase, la fase de recubrimiento, para el agente activo, se pierde un grado de control y esto puede comprometer o incluso anular el efecto de una o más de las características que hacen la fase

líquido-cristalina inversa la matriz de elección en primer lugar. Por ejemplo, si se usa el tamaño de poro controlado de la fase líquido-cristalina inversa para controlar o bien el flujo de salida de un agente activo de molécula grande fuera del cristal líquido, o bien la penetración de una proteína de adsorción (por ejemplo, albúmina) o de degradación (por ejemplo, proteasa, nucleasa, glicosidasa), entonces esto se ve comprometido si una fracción significativa del agente activo está presente en la fase de recubrimiento; se sabe que el tamaño de poro efectivo del recubrimiento de fase L3 es mayor que el de la fase interior en un factor de dos, normalmente. Es importante observar en un caso de este tipo que en general, los componentes de estas fases líquido-cristalinas que incluyen el agente activo difunden a su alrededor dentro de la partícula, de modo que el agente activo se ubicará en la fase de recubrimiento una determinada fracción del tiempo, y durante estos periodos puede ser susceptible al ataque.

La figura 1 muestra un esquema de una dispersión de partículas no recubiertas según la presente invención. Las letras "D" indican que el fármaco (o más generalmente, el agente activo) está presente en la fase cúbica inversa o la fase hexagonal inversa. En realizaciones alternativas, el fármaco o agente activo D se disuelve o se dispersa o se inserta o se incorpora de otro modo dentro de la partícula. En una variación, el fármaco o el agente activo D puede incorporarse en una fase de aceite que se coloca dentro de la partícula.

La figura 2 muestra un esquema de la configuración electrostática en una partícula no recubierta representativa de la presente invención, con una carga iónica superficial negativa neta. Los signos "+" representan restos catiónicos y los signos "-" representan restos aniónicos, que en este caso incluiría los compuestos asociados a bicapa, cargados, utilizados en la invención. A medida que se aleja de la superficie (cargada de manera aniónica) de la partícula, la preponderancia de las cargas negativas disminuye. La medición del potencial zeta mide el potencial debido al exceso de cargas iónicas (en este caso, aniónicas) en el plano de cizallamiento, que se desplaza desde la superficie de la partícula. Sin embargo, al menos en las condiciones usadas en los ejemplos a continuación y de manera bastante amplia en la práctica de esta invención, el plano de a base de aceite aún se encuentra dentro de la capa de Debye, que está a una distancia (la longitud de Debye) de la superficie de la partícula en la que ya no existe un exceso neto de aniones.

En el presente documento, se proporcionan métodos que son útiles para sostener la acción de los API (principio activo farmacéutico) en un paciente sin aumentar, en muchos casos disminuyendo, la dosis administrada. La aplicación de estos métodos para la administración de anestésicos locales produce resultados que confirman el efecto de las composiciones logrando aumentos en la duración no logrados hasta ahora a una dosis normal, y/o la misma duración a una dosis significativamente inferior, y al mismo tiempo proporciona métodos de administración de anestésicos locales que son de alta utilidad potencial en sí mismos. De importancia particular es la descripción en el presente documento de las formulaciones líquido-cristalinas inversas de bupivacaína que producen bloqueos nerviosos de más de 16 horas de duración, cuando en condiciones idénticas la formulación comercializada actualmente produce una duración de 2-5 horas del bloqueo nervioso. Una formulación líquido-cristalina, estrechamente relacionada, del fármaco anticancerígeno paclitaxel produce excelente absorción oral que conduce a niveles en sangre de paclitaxel de duración ampliada.

La simple encapsulación y otras metodologías de liberación lenta simplistas han enseñado anteriormente que el aumento de la dosis es aceptable siempre que la liberación lenta supere los problemas de toxicidad aguda (sin mencionar que en muchos casos se ha realizado la suposición tácita de que el aumento de la dosis es inevitable). Sin embargo, tal como se señaló anteriormente, ésta es una suposición ingenua, al menos en el caso de los anestésicos locales y otros fármacos de estrecha razón terapéutica, porque un aumento de la dosis requiere dosis a o por encima de las dosis tóxicas umbral, demasiado graves en consecuencia para ser aceptables en la práctica médica, particularmente una práctica de uso rutinario, que no es de urgencia, electiva.

Las realizaciones preferidas de la presente invención, que pueden lograr una acción farmacológica altamente prolongada sin disminuir la eficacia o la introducción de fármacos adicionales, en un método que es farmacéuticamente aceptable incluso para la inyección intravenosa, ofrecen fases líquido-cristalinas nanoestructuradas de las fases líquido-cristalinas cúbica inversa o hexagonal inversa, concretamente de tipo inverso. Éstas pueden ser de muy baja solubilidad en agua o mostrar cinéticas de disolución muy lentas, lo que significa que mantienen su integridad como vehículos, durante al menos algún periodo de tiempo sustancial, tras la entrada en el organismo evitando de ese modo la precipitación o liberación prematura del fármaco, y se muestran prometedoras en campos tales como la administración de fármacos de liberación controlada. En trabajo motivado por la naturaleza anfífila y las nanoestructuras porosas de estos materiales, que pueden conducir a interacciones muy ventajosas con las biomembranas, mucho más íntimas que en el caso de los liposomas y las gotas de emulsión, y por las altas viscosidades de estas fases que puede ser una ayuda importante en el procesamiento, se han desarrollado varias técnicas para dispersar y encapsular materiales de este tipo.

Las siguientes definiciones serán de ayuda.

Partícula no recubierta: tal como se usa en el presente documento, una partícula no recubierta de fase cúbica (o hexagonal) inversa es una partícula en la que el material de la fase más externa de la partícula es una fase cúbica (o hexagonal) inversa, de modo que no existe ninguna otra fase presente exterior a y en contacto con este material más externo excepto por una fase líquida (habitualmente acuosa) individual en la que las partículas se dispersan (fase de dispersión), y en la que el material de esta fase cúbica [hexagonal] inversa es una masa contigua y aislada, individual,

de material definiendo así una partícula individual. En esta definición “aislado” significa sustancialmente no en contacto con otras partículas de este tipo excepto por las colisiones partícula-partícula normales en el transcurso del movimiento browniano.

La partícula no recubierta así definida contrasta con el documento U.S. 6.482.517 en el que hay un recubrimiento cristalino exterior a la fase líquido-cristalina, y también en contraposición con el documento U.S. 5.531.925 y el trabajo de P.A. Winsor citado anteriormente en los que hay una fase L3, fase laminar, o fase laminar cristalina distinta exterior a (es decir, recubrimiento) la fase líquido-cristalina inversa. Tal como se trata en el presente documento, los recubrimientos laminares y L3 en particular son antitéticos para el fin del empleo de las partículas en la potenciación de la permeabilidad para la administración de fármacos mejorada, además pueden introducir otras limitaciones y problemas prácticos.

Debe observarse que esta definición no excluye la posibilidad de que, a una escala que es pequeña en comparación con el espesor de la fases del material más externo (habitualmente el radio de la partícula, a menos que por ejemplo esté presente un núcleo de aceite según la solicitud estadounidense n.º 10/176.112, que se incorpora al presente documento como referencia, o la partícula contiene un cristal incluido), el aspecto a escala nanométrica en la superficie de la fase del material más externo no representa el aspecto típico en la masa de esta fase del material, debido al reordenamiento superficial o efectos relacionados, siempre que no exista ninguna fase extraña presente exterior a la fase líquido-cristalina en el sentido de la regla de las fases de Gibbs. Tal como se conoce bien en la técnica, las energías superficiales pueden inducir reordenamiento en la superficie de un material que puede cambiar el aspecto microscópico, como por ejemplo un remate de extremo hemisférico que cubre lo que sería una abertura de poro en el extremo de un cilindro en la fase hexagonal inversa. Sin embargo, esta dosis no indica la presencia de otra fase, en el sentido termodinámico estricto de una fase. Para ilustrar, a una temperatura y presión dadas, mediante la regla de las fases de Gibbs una mezcla de lípido/agua de dos componentes puede sólo presentar dos fases en equilibrio, y aunque la superficie de una parte o partícula de fase hexagonal inversa podría mostrar una región de espesor a escala nanométrica que es rica en remates de extremo hemisféricos, con grupos polares del lípido en contacto con una fase rica en agua exterior (la segunda fase de las dos presentes), esta región no constituye una tercera fase. (Aunque se ha usado el término “interfase” para describir regiones de este tipo, incluso los usuarios de este término estarán de acuerdo en que no representa una fase termodinámica distinta tal como se determina mediante la regla de las fases; más bien, una interfase, o zona interfacial, describe la superficie de la fase del material más externo). En general, el espesor de esta región reordenada en superficie será aproximadamente igual a o menor que el parámetro de red de la celda unidad, en el caso de los materiales de fase hexagonal inversa y fase cúbica inversa. Por tanto, en particular, el espesor de una región reordenada en superficie de este tipo (o “interfase”) será generalmente menor que aproximadamente 30 nm, y habitualmente menor que aproximadamente 20 nm.

En el caso de las partículas recubiertas con sólido dadas a conocer en el documento U.S. 6.482.517, en el que la fase interior es una fase cúbica inversa o hexagonal inversa, será obvio para cualquier experto en la técnica que el material que constituye el recubrimiento sólido es una fase distinta del interior líquido-cristalino.

Polar, apolar, anfífilo, tensioactivo, interfase polar-apolar, bicontinuo: se toman los términos “polar”, “apolar”, “anfífilo”, “tensioactivo”, “interfase polar-apolar” y “bicontinuo” tal como se usan en el presente documento como que tienen el significado proporcionado en la patente estadounidense 6.638.621, cuyo contenido completo se incorpora al presente documento como referencia.

Asociado a bicapa, asociado a membrana: un compuesto o resto está asociado a bicapa si se reparte preferentemente en una bicapa sobre un compartimiento acuoso. Por tanto, si un material rico en bicapa tal como un material de fase cúbica inversa existe en equilibrio con agua en exceso y se pone en contacto con agua en exceso, y se permite que un compuesto o resto asociado a bicapa se equilibre entre las dos fases, entonces la mayoría predominante del compuesto o resto se ubicará en la fase rica en bicapa. La concentración del compuesto o resto en la fase rica en bicapa será de al menos aproximadamente 100 veces, y preferiblemente al menos aproximadamente 1.000 veces, mayor que en la fase acuosa.

Es importante observar que aunque las fases hexagonales inversas y fases cúbicas discretas o discontinuas inversas no tiene una verdadera bicapa como la unidad estructural fundamental, en la presente descripción se usará, no obstante, la expresión “asociado a bicapa” para describir componentes que se reparten en los microdominios ricos en lípidos (o ricos en tensioactivos) independientemente de si los dominios de este tipo se consideran “monocapas” o “bicapas”. Por tanto, la expresión “asociado a bicapa” se refiere más al reparto del compuesto en cuestión que a la naturaleza precisa de la región de lípidos (o tensioactivos).

Además de los compuestos de direccionamiento y de carga de bicapa, otro componente de la partícula que puede asociarse a bicapa es el propio fármaco (o más generalmente, agente activo). Esto se prefiere para moléculas pequeñas, dado que significa que el fármaco tenderá a permanecer con la partícula incluso cuando se expone la partícula a grandes volúmenes de líquidos biológicos. Sin embargo, los fármacos que se reparten preferentemente en los canales acuosos de material líquido-cristalino inverso, incluyendo muchas si no la mayoría de proteínas y otras biomacromoléculas, pueden incorporarse en las partículas de la presente invención, como pueden los fármacos que se localizan en concentraciones comparables en los compartimentos acuoso e hidrófobo. En efecto, un aspecto importante de la invención que la distingue de las emulsiones típicas, por ejemplo, son las áreas superficiales polar-apolar muy

grandes, que proporcionan un amplio volumen para los fármacos que tienen epítomos o grupos apolares que prefieren un medio hidrófobo así como grupos polares que prefieren el medio hidrófilo de los canales acuosos y regiones ricas en grupos de cabeza.

5 **Gota rica en agentes hidrófobos; fase rica en agentes hidrófobos:** en algunas realizaciones de la presente invención, el material de fase líquido-cristalina inversa contendrá, en su interior, una gota de una fase rica en agentes hidrófobos que es distinta de la fase líquido-cristalina inversa; esto no debe confundirse con los dominios hidrófobos que son elementos estructurales de la propia fase líquido-cristalina inversa. Esta gota rica en agentes hidrófobos será de un tamaño de entre aproximadamente 20 nm y 100 micras, que contendrá como componente mayoritario un agente hidrófobo, por tanto un componente de baja solubilidad en agua (menos de aproximadamente el 3%), y/o de alto coeficiente de reparto octanol-agua (Kow superior a o igual a aproximadamente 10, más preferiblemente superior a 100), en el que se solubilizan el agente activo y alguna fracción (quizás muy pequeña) de cada uno de los componentes del segundo volumen. Por tanto, mientras que la termodinámica dicta que este primer volumen debe contener al menos una traza de lípido y el segundo volumen al menos una traza de líquido hidrófobo, la característica definitiva de la química del primer volumen es que la razón del líquido hidrófobo con respecto al lípido es significativamente mayor que en el segundo volumen. La solubilidad de un agente activo dado en una mezcla de agente hidrófobo y lípido es normalmente una función que aumenta de manera muy marcada de una razón de agente hidrófobo:lípido creciente, porque el agente hidrófobo puede generalmente elegirse específicamente por su capacidad para solubilizar el agente activo particular mientras que la elección del lípido tiene mucho más que ver con su capacidad para formar cristales líquidos (en presencia del agente hidrófobo, en particular). Por ejemplo, mientras que la solubilidad del fármaco paclitaxel en eugenol es de más del 15% en peso, su solubilidad en una mezcla del 42% de fosfatidilcolina de huevo, el 35% de eugenol y el 23% de agua es inferior al 1,5%; por tanto, la adición de fosfolípido y agua a la disolución de paclitaxel en eugenol induce la precipitación del paclitaxel. Por tanto, la presencia del primer volumen puede aumentar drásticamente la solubilidad global del agente activo en la partícula, y puede producir una concentración farmacéuticamente apropiada y sustancial del agente activo en casos en los que la solubilidad del agente activo en una fase líquido-cristalina rica en lípidos (en ausencia del primer volumen) sería prohibitivamente baja, es decir, en casos en los que una cantidad terapéutica del fármaco no podría solubilizarse en una cantidad farmacéuticamente aceptable del cristal líquido. Estos requisitos pueden expresarse en términos de comportamiento de fase tal como sigue. Debe existir una fase líquido-cristalina en equilibrio con una fase líquida que es rica en un líquido hidrófobo que solubiliza el agente activo. Además, preferiblemente debe existir un equilibrio trifásico con estas dos fases en equilibrio con una fase rica en disolvente polar, que es habitualmente una fase rica en agua, a menudo más del 90% de agua.

Esta fase líquida será continua de material hidrófobo, que es la generalización de la expresión de la técnica "continua de aceite" para el caso en el que el agente hidrófobo puede ser bastante diferente químicamente de lo que se denomina de manera común como "aceite". Termodinámicamente, esta fase líquida puede ser una disolución micelar inversa, una disolución de tensioactivo (ya sea diluida o no, teniendo en cuenta que cada tensioactivo tendrá cierta solubilidad distinta de cero incluso si es extremadamente pequeña), una microemulsión rica en aceite, o una fase L3 (del tipo denominado L3*, en publicaciones en las que se distinguen L3 y L3*). Estas fases se conocen bien en la técnica, y se tratan en el documento U.S. 6.482.517.

40 **Farmacéuticamente aceptable:** en el contexto de esta invención, "farmacéuticamente aceptable" generalmente designa compuestos o composiciones en los que cada excipiente está aprobado por la Administración de Alimentos y Fármacos (*Food and Drug Administration*), o un organismo similar en otro país, para su uso en una formulación farmacéutica, o pertenece a una clase concisa de compuestos para la cual se ha presentado un Drug Master File (Archivo Maestro del Fármaco) en una agencia reguladora gubernamental, habitualmente la FDA. Esto también incluye compuestos que son componentes mayoritarios de excipientes aprobados, que se sabe que son de baja toxicidad tomados internamente. Se publicó una lista de excipientes aprobados, cada uno con las diversas vías de administración para las que están aprobados, por la División de Recursos de Información sobre Fármacos de la FDA en enero de 1996 y titulada "Guía de Principios Inactivos". La existencia de un Drug Master File en la FDA es prueba adicional de que un excipiente dado es aceptable para su uso farmacéutico, al menos para determinadas vías de administración. Para productos inyectables, se publicó una lista de excipientes aprobados en 1997. Véase Nema, Washkuhn y Brendel (1997) PDA J. of Pharm. Sci. & Technol. 51(4):166. Debe añadirse que existen determinados compuestos, tales como vitaminas y aminoácidos, que están en productos inyectables (normalmente para nutrición parenteral) como "agentes activos", y por tanto se sabe que son seguros con la inyección, y compuestos de este tipo se consideran en el presente documento como farmacéuticamente aceptables como excipientes también, para inyección. Un ejemplo particularmente importante de una clase concisa de compuestos sobre los que se ha presentado un Drug Master File (DMF) es la clase de tensioactivos Pluronic (poloxámero), para los que BASF tiene un DMF presentado. En este caso, aunque sólo unos pocos miembros de esta clase se han usado explícitamente en formulaciones inyectables, para los fines de esta invención, la homogeneidad de la clase, la presencia de un DMF y la existencia de formulaciones para inyección aprobadas usando varios miembros de la clase es suficiente para incluir cada uno de los miembros de la clase Pluronic como farmacéuticamente aceptables para productos inyectables.

60 En el contexto específico de los anestésicos locales, a veces se comete el error de que sólo es necesario que una formulación de anestésico local sea farmacéuticamente aceptable para inyección subcutánea, u otra instilación local. Sin embargo, tal como se señaló en otra parte en el presente documento, el peligro constante de una inyección intravenosa o intraarterial involuntaria de una formulación de este tipo conduce directamente al requisito de que la

formulación sea farmacéuticamente aceptable para inyección intravenosa. Para un vehículo particulado, esto también conlleva el requisito importante de que el tamaño de partícula sea aceptable para inyección i.v., lo que significa habitualmente submicrométrico, o preferiblemente de menos de aproximadamente 0,5 micras.

Partícula estabilizada. Para los fines de esta descripción, por brevedad la expresión “partícula estabilizada” significará una partícula que puede, en pluralidad, formar una dispersión estable en un líquido, preferiblemente un líquido que comprende un disolvente polar, y lo más preferiblemente que comprende agua o glicerol. Una dispersión estable significa que la dispersión de partículas no muestra efectos perjudiciales de floculación o fusión con escalas temporales de al menos varios días, preferiblemente varias semanas y lo más preferiblemente de más de varios meses.

Diana, célula diana: en algunos casos estas expresiones tendrán significados ligeramente diferentes en esta descripción tal como se usan a menudo en la técnica. Por “diana”, se entiende la célula, u otro resto, al que el agente activo debe suministrarse mediante la partícula con el fin de que se absorba o se vuelva disponible de otro modo, ya corresponda o no al sitio de acción final del agente activo. Por ejemplo, si se administra un fármaco por vía oral dentro de las partículas de la invención, la diana normalmente sería una célula epitelial intestinal de absorción, sin importar cuál es el sitio de acción del fármaco tras su absorción sistémica. Si la partícula lleva a cabo la tarea de conseguir que se absorba el agente activo en el sitio diana, entonces ha tenido éxito en su tarea farmacéutica.

Resto de direccionamiento, compuesto de direccionamiento: en esta descripción, esta frase tendrá un significado que es bastante distinto del de “diana” o “célula diana” tal como se definió anteriormente. Un resto de direccionamiento es un grupo químico que es parte de la partícula de la presente invención, situado o bien dentro del cristal líquido o bien unido a la superficie de la partícula, y sirve como una diana molecular para algún compuesto fuera de la partícula en la aplicación, normalmente aunque no siempre una biomolécula en el cuerpo de un mamífero. Entonces, un compuesto de direccionamiento es un compuesto que contiene un resto de direccionamiento. Es importante señalar que se incorpora el resto de direccionamiento en la presente invención sin la introducción de otra fase en la superficie de la partícula. En otras palabras, tal como se trató en otra parte en el presente documento, no se aumenta el número de fases termodinámicas. Un ejemplo de un resto de direccionamiento sería un anticuerpo que se une a la partícula, por ejemplo mediante enlaces covalentes a un espaciador flexible que está anclado a lípido en la partícula, de manera que el anticuerpo contiene un resto de direccionamiento que se unirá a una molécula biológica (el antígeno) en el cuerpo y por tanto ubica la partícula en el sitio de acción deseado. En este caso, el resto de direccionamiento puede entenderse como o bien un motivo de unión en el anticuerpo, o bien el propio anticuerpo completo.

Disolución: mediante el término “disolución” se entiende que está disolviéndose un compuesto en consideración, o está “experimentando disolución”.

Solubilizar: este término se entiende que es esencialmente sinónimo al término “disolver” o “disolución”, aunque con una diferente connotación. Se solubiliza un compuesto en consideración en un material líquido o líquido-cristalino si y sólo si las moléculas del compuesto pueden difundir dentro del material líquido o líquido-cristalino como moléculas individuales, y que el material de este tipo con el compuesto en el mismo forman una única fase termodinámica. Debe tenerse en cuenta que se asocian connotaciones ligeramente diferentes con los términos “disolver” y “solubilizar”. Normalmente, el término “disolver” se usa para describir el simple acto de poner un compuesto cristalino en un material líquido o líquido-cristalino y permitir o estimular que el compuesto se descomponga y se disuelva en el material, mientras que los términos “solubilizar” y “solubilización” generalmente se refieren a un esfuerzo concertado para encontrar un material líquido o líquido-cristalino apropiado que pueda disolver tal compuesto. **Criterios químicos:** se han presentado en forma de tabla varios criterios y Robert Laughlin los ha tratado en detalle para determinar si un grupo polar dado es funcional como un grupo de cabeza de tensioactivo, en el que la definición del tensioactivo incluye la formación en agua de fases nanoestructuradas incluso a concentraciones bastante bajas. R. Laughlin, *Advances in Liquid Crystals*, págs. 3-41, 1978. Una discusión adicional y una lista de temas que incluyen: grupos polares que no funcionan como grupos de cabeza de tensioactivo; grupos polares que funcionan como grupos de cabeza de tensioactivo; grupo apolar; y copolímeros de bloque de un único componente; véase la patente estadounidense 6.638.621, cuyo contenido completo se incorpora al presente documento como referencia.

Agente farmacológico: un material se considerará un agente farmacológico siempre que la industria farmacéutica y los organismos reguladores (concretamente, la FDA en los Estados Unidos) lo consideren un principio activo farmacéutico (API), a diferencia de un principio inactivo (también conocido como excipiente). El término “fármaco” se usará de manera intercambiable con “agente farmacológico”, por brevedad.

Eficacia: La eficacia es la habilidad o capacidad específica del producto farmacéutico para efectuar el resultado para el cual se ofrece cuando se usa en las condiciones recomendadas por el fabricante. (Esta definición se toma literal del Título 9 del Código de Reglamentos Federales de los Estados Unidos). En el caso de formulaciones orales de fármacos activos de manera sistémica, la eficacia del fármaco naturalmente se ve afectada fuertemente por el grado de absorción sistémica, que se mide mediante la AUC (“área bajo la curva”), una integración de los niveles en sangre con el tiempo de duración de estos niveles en sangre.

Dosis terapéutica habitual; dosis recomendada: estas expresiones, usada de manera intercambiable en el presente documento, se refieren a la dosis que, en el momento de aplicación del agente farmacológico, se recomienda

para su uso en un entorno dado por fuentes autorizadas en la comunidad farmacéutica, incluyendo el Vademécum de Especialidades Farmacéuticas (*Physician's Desk Reference*), prospectos del medicamento, y la Administración de Alimentos y Fármacos. La intención en el presente documento es que esto haga referencia a la dosis cuando se administra en su vehículo habitual, tal como la disolución acuosa de la forma de clorhidrato en el caso de la mayoría de anestésicos locales, en vez de en las formulaciones que se enseñan en esta invención, para lo que se usa la formulación habitual en el vehículo habitual como punto de referencia.

Dosis subtóxica: Una dosis administrada se considerará "subtóxica" en esta descripción si y sólo si satisface dos criterios: 1) la cantidad de fármaco administrado es menor que o aproximadamente igual a la mayor dosis recomendada generalmente aceptada para la práctica médica; y 2) la dosis administrada en la composición indicada no introduce toxicidad sistémica significativa superior a la de la dosis recomendada en su vehículo habitual. Con respecto al criterio 1, en el caso de la bupivacaína, este criterio requeriría una dosis menor que aproximadamente 2 mg/kg; en el Vademécum de Especialidades Farmacéuticas se proporcionan dosificaciones máximas recomendadas, (véase, por ejemplo, 55ª edición, página 601), y para un paciente de 70 kg estas dosis se traducen en un máximo de aproximadamente 2 mg/kg.

Dosis supertóxica: Una dosis administrada se considerará "supertóxica" en esta descripción si y sólo si satisface cualquiera de los dos criterios: 1) la cantidad de fármaco administrado es superior a o aproximadamente igual a la dosis que se acepta generalmente que provoca toxicidades sistémicas peligrosas; o 2) la dosis administrada en la composición indicada introduce toxicidades sistémicas peligrosas. (Se observará que "supertóxico" no es sinónimo de "no supertóxico"; sino que hay un punto intermedio que no es ni lo suficientemente seguro como para satisfacer la definición de "subtóxico", ni lo suficientemente peligroso como para cumplir con la definición de "supertóxico"). Con respecto al criterio 1, en el caso de la bupivacaína, este criterio para supertóxico se traduce en una dosis superior a 3 mg/kg.

Duración de referencia: La duración de referencia de un agente activo farmacéutico significa el promedio o la duración típica de la acción eficaz para la dosificación de base de este fármaco, que en la mayoría de contextos en el presente documento se entenderá que significa la dosis recomendada publicada. En el caso de un anestésico local, esto significa la duración promedio de la acción analgésica o anestésica, definida en el presente documento como que es bloqueo nervioso sensorial a menos que se indique de otro modo, de este fármaco cuando se administra en su formulación de disolución acuosa de clorhidrato habitual según el procedimiento que es la práctica médica habitual (véase el procedimiento descrito a continuación). Para la bupivacaína, por ejemplo, esta duración de referencia para una dosis terapéutica normal de 1 mg/kg es de aproximadamente 4 horas.

Administración única: Se considerará que una formulación del fármaco se administra mediante una administración única si y sólo si se deposita la formulación del fármaco completa en o sobre el organismo durante una escala temporal que es al menos un orden de magnitud menor que la duración de referencia de esta cantidad de fármaco cuando se administran en su vehículo habitual, que en el caso de un anestésico local es una disolución acuosa.

Aumento en la duración: el aumento en duración de un fármaco dado en una formulación particular es la razón (expresada como porcentaje) del incremento en el aumento de la duración de tiempo de la acción eficaz (en particular, para el caso de un anestésico local, ésta es la duración del bloqueo nervioso, medida mediante procedimientos descritos en el presente documento) del fármaco en esta formulación con respecto a la duración de referencia de esta misma dosis del mismo fármaco.

Duración relativa: esto es el aumento en duración, más el 100%. Es decir, es la razón (expresada como porcentaje) de la duración de tiempo de la acción eficaz del fármaco en esta formulación con respecto a la duración de referencia de esta misma dosis del mismo fármaco. Una formulación con un aumento en la duración de desde, digamos, 4 horas hasta 6 horas tendría un aumento en la duración del 50%, y una duración relativa del 150%.

Dosis relativa: esto se define simplemente que es la razón (expresada como porcentaje) de la dosis dada en una formulación particular con respecto a la dosis terapéutica normal (en particular, la dosis a la que se hace referencia en la definición de duración de referencia). Para el caso de la bupivacaína, cuando se toma en el presente documento que la dosis terapéutica habitual es de 1 mg/kg, la dosis relativa de una formulación de interés es simplemente la dosis dividida entre 1 mg/kg, expresada como porcentaje (es decir, multiplicado por el 100%).

Factor de amplificación: esto se define que es la duración relativa dividida entre la dosis relativa. Como ejemplo, en el caso de la formulación de bupivacaína liposómica de Grant *et al.* revisada anteriormente, la dosis relativa era de $[150 \text{ mg/kg}]/[1 \text{ mg/kg}] \times 100\% = 15.000\%$ y la duración relativa era de $[24 \text{ h}]/[4 \text{ h}] \times 100\% = 600\%$, y de ese modo el factor de amplificación era de $600\%/15.000\% = 0,04$.

Bajo índice terapéutico; estrecha razón terapéutica: Se usarán estas expresiones de manera intercambiable. La estrecha razón terapéutica se define en los reglamentos en 21 CFR 320.33(c). Esta subsección se ocupa de los criterios y la evidencia para evaluar problemas de bioequivalencia reales o potenciales. En la Sección 320.33(c) del Código de Registro Federal 21, la FDA de los Estados Unidos define un medicamento que tiene una estrecha razón terapéutica tal como sigue: existe una diferencia de menos de 2 veces en la mediana de la dosis letal y la mediana de los valores de dosis eficaz, o existe una diferencia de menos de 2 veces en las concentraciones tóxicas mínimas y concentraciones eficaces mínimas en la sangre. Para los fines de esta descripción, la expresión se

interpretará más ampliamente, para indicar fármacos para los que la ventana terapéutica es lo suficientemente estrecha como para que las mejoras en el índice terapéutico obtenidas mediante la reformulación del fármaco se consideren un avance significativo en el campo.

5 **Excipiente:** compuesto y mezclas de compuestos que se usan en formulaciones farmacéuticas que no son los propios principios activos farmacéuticos. El término “excipiente” es sinónimo de “principio inactivo”.

Fases líquido-cristalinas inversas, incluyendo fase hexagonal inversa y fase cúbica inversa (incluyendo esta última tanto fase cúbica bicontinua inversa y fase cúbica discreta inversa) se entienden que son tal como se describen en detalle en otra parte (por ejemplo, en la patente estadounidense 6.638.621, cuyo contenido completo se incorpora al presente documento como referencia). Estas fases se conocen en la técnica de autoasociación de tensioactivos.

10 En resumen, las fases líquido-cristalinas nanoestructuradas se caracterizan por estructuras de dominios, compuestas de dominios de al menos un primer tipo y un segundo tipo (y en algunos casos tres o incluso más tipos de dominios) que tienen las siguientes propiedades:

15 a) los restos químicos en los dominios del primer tipo son incompatibles con aquellos en los dominios del segundo tipo (y en general, cada par de tipos de dominios diferentes son incompatibles entre sí) de manera que no se mezclan en las condiciones dadas sino que permanecen como dominios separados; (normalmente, los dominios del primer tipo podrían estar compuestos sustancialmente por restos polares tales como agua y grupos de cabeza lipídicos, mientras que los dominios del segundo tipo podría estar compuestos sustancialmente por restos apolares tales como cadenas hidrocarbonadas, sistemas de anillos condensados, cadenas de poli(óxido de propileno), cadenas de polisiloxanos, etc.);

20 b) el ordenamiento atómico dentro de cada dominio es de tipo líquido más que de tipo sólido, carece de ordenamiento reticular de los átomos; (esto se manifestaría por la ausencia de reflexiones de picos de Bragg marcadas en la difracción de rayos X de ángulo ancho);

25 c) la dimensión más pequeña (por ejemplo, el espesor en el caso de capas, el diámetro en el caso de cilindros o esferas) de sustancialmente todos los dominios es del orden de los nanómetros (a saber, desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 100 nm); y

30 d) la organización de los dominios se ajusta a una red cristalina, que puede ser uni, bi o tridimensional, y que tiene un parámetro de red (o tamaño de celda unidad) del orden de los nanómetros (a saber, desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 200 nm); por tanto, la organización de los dominios se ajusta a uno de los 230 grupos espaciales presentados en forma de tabla en las Tablas Internacionales de Cristalografía, y se manifestaría en una medición de difusión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS) bien diseñada por la presencia de reflexiones de Bragg agudas estando los espaciados d de las reflexiones de menor orden en el intervalo de 3-200 nm.

Fase hexagonal inversa: La fase hexagonal inversa, un tipo de fase líquido-cristalina liotrópica, se caracteriza por:

35 1. Los rayos X de ángulo pequeño muestran picos que se indexan como $1:\sqrt{3}:2:\sqrt{7}:3\dots$ en general, $\sqrt{(h^2 + hk - k^2)}$, en la que h y k son números enteros, los índices de Miller del grupo de simetría hexagonal bidimensional,

2. A simple vista, la fase generalmente transparente cuando está completamente equilibrada, y por tanto, por ejemplo, a menudo considerablemente más clara que cualquier fase laminar cercana.

40 3. En el microscopio óptico de polarización, la fase es birrefringente, y Rosevear y Winsor han descrito bien las texturas bien conocidas (por ejemplo, Winsor (1968) Chem. Rev., pág. 1).

4. La viscosidad es generalmente bastante alta; la viscosidad limitante de cizallamiento cero es del orden de millones e incluso miles de millones de centipoises.

45 5. El coeficiente de autodifusión del agua es lento en comparación con el de la fase laminar, al menos inferior en un factor de dos; el del tensioactivo es comparable al de las fases laminar y cúbica inversa.

6. La forma de banda del ^2H -RMN usando tensioactivo deuterado muestra un desdoblamiento, que es la mitad del desdoblamiento observado para la fase laminar.

50 7. En cuanto al comportamiento de fase, la fase hexagonal inversa se produce generalmente a altas concentraciones de tensioactivo en sistemas de agua/tensioactivo de dos colas, que a menudo se extienden a, o cerca de, el 100% de tensioactivo. Habitualmente, la región de fase hexagonal inversa es adyacente a la región de fase laminar, lo que se produce a una concentración de tensioactivo inferior, aunque a menudo se producen fases cúbicas inversas bicontinuas entremedias.

Fase cúbica inversa: La fase cúbica inversa se caracteriza por:

1. Los rayos X de ángulo pequeño muestran picos que se indexan a un grupo espacial tridimensional con un aspecto cúbico. Los grupos espaciales más comúnmente encontrados, junto con sus indexaciones son: Ia3d (n.º 230), con indexación $\sqrt{6}:\sqrt{8}:\sqrt{14}:4\dots$ Pn3m (n.º 224), con indexación $\sqrt{2}:\sqrt{3}:2:\sqrt{6}:\sqrt{8}\dots$ e Im3m (n.º 229), con indexación $\sqrt{2}:\sqrt{4}:\sqrt{6}:\sqrt{8}:\sqrt{10}\dots$. También se han observados los grupos espaciales cúbicos n.º 212 (derivados del grupo espacial n.º 230 mediante una ruptura de simetría) y n.º 223 (correspondiente a micelas cerradas dispuestas en una red cristalina cúbica).

2. A simple vista, la fase es generalmente transparente cuando está completamente equilibrada, por tanto a menudo considerablemente más clara que cualquier fase laminar cercana.

3. En el microscopio óptico de polarización, la fase no es birrefringente, y por tanto no existe ninguna textura óptica.

4. La viscosidad es muy alta, mucho más viscosa que la fase laminar. La mayoría de las fases cúbicas inversas tienen viscosidades de cizallamiento cero del orden de miles de millones de centipoises.

5. No se observa ningún desdoblamiento en la forma de banda de RMN, sólo un pico individual, correspondiente al movimiento isotrópico.

6. En cuanto al comportamiento de fase, se encuentra la fase cúbica bicontinua inversa o bien entre la fase laminar y la fase hexagonal inversa, o bien para un contenido en agua inferior a la fase hexagonal inversa. Una buena regla es que si la fase cúbica se encuentra a concentraciones de agua superiores a las de la fase laminar, entonces es normal, mientras que si se encuentra a concentraciones de tensoactivo superiores a las de la laminar entonces es inversa (siendo una excepción notable el caso de la fase cúbica inversa en monoglicéridos insaturados de cadena larga).

Variantes deshidratadas. Una variante deshidratada de un cristal líquido inverso es una composición que produce una fase líquido-cristalina inversa tras el contacto con el agua (o más rara vez, otro disolvente polar), ya sea o no esta misma composición deshidratada una fase líquido-cristalina inversa.

MATERIALES Y MÉTODOS

En esta invención, el procedimiento normalmente comienza con la selección de una composición de cristal líquido que preferiblemente solubiliza, o de otro modo atrapa (por ejemplo, incorpora) el agente activo, y tiene las características fisicoquímicas apropiadas para las interacciones deseadas tal como se describen en el presente documento. Un agente activo puede describirse como "atrapado" por la composición de cristal líquido si, por ejemplo, el agente activo se solubiliza en una gota de aceite que se ubica en última instancia dentro de la partícula, o si el agente activo está en forma cristalina, y los cristales se dispersan en última instancia por toda la partícula. Las composiciones para fases líquido-cristalinas inversas se tratan extensamente en el documento U.S. 6.452.517 cuyo contenido se incorpora al presente documento como referencia, y en las solicitudes de patente estadounidense números 09/994.937 y 10/460.659, que se incorporan al presente documento como referencia. Tal como se tratará en mayor detalle a continuación, en la forma más preferida, el agente activo forma un componente de la fase cúbica inversa o hexagonal inversa.

Una consideración importante en la selección de una composición de cristal líquido, que puede no ser obvia para los expertos en la técnica tradicional, es que la composición elegida para el cristal líquido debe ser lo suficientemente robusta, en particular, debe tener un punto de fusión lo suficientemente alto (la mejor medida individual de esta característica) que pueda albergar la incorporación de un componente asociado a bicapa, cargado, tal como un tensoactivo iónico. Tales componentes a menudo (aunque no de manera universal) tienen el efecto de fundir materiales tales como fases cúbicas inversas. Cuando una fase cúbica inversa se funde, por ejemplo, mediante la adición de un componente asociado a bicapa cargado, habitualmente se fundirá para dar o bien una fase L2, o bien una fase L3, presentando ambas interacciones limitadas con las barreras biológica, tal como se describe en el presente documento.

Las excepciones a la regla general de que altas cargas (superiores a aproximadamente el 8%, o especialmente superiores al 15%) de un tensoactivo cargado funden habitualmente las fases líquido-cristalinas inversas, se producen más menudo cuando el tensoactivo tiene dos (o más) cadenas hidrófobas largas (mayores que o iguales a 12 carbonos cada una) y un grupo de cabeza polar de PM relativamente bajo, en particular PM<300, particularmente si las cadenas hidrófobas son cadenas de alcano saturadas. Por tanto, un tensoactivo de doble cadena tal como bromuro de didodecildimetilamonio normalmente no provocará la fusión de un material de fase líquido-cristalina inversa, ni de una molécula de fosfolípido cargada si está saturada. Estos fosfolípidos de doble cadena que están cargados de manera suficientemente fuerte para esta aplicación incluyen fosfatidilglicerol, fosfatidilserina, fosfatidilinositol y ácido fosfatídico, pero no fosfatidilcolina ni fosfatidiletanolamina.

Tras, o simultáneamente con, la selección de la composición de cristal líquido, se selecciona(n) uno o más componentes asociados a bicapa, cargados de manera iónica, basándose en propiedades tales como coeficiente de reparto (generalmente alto es lo mejor, preferiblemente superior a aproximadamente 1.000), baja toxicidad, estado

regulador favorable (dependiente de la vía de administración), y solubilidad y compatibilidad con los otros componentes de la formulación. En el presente documento, se proporciona una selección de componentes de este tipo.

En el transcurso de este trabajo, se estableció que una vez que el potencial zeta de un conjunto de estas partículas de fase líquido-cristalina inversa es igual o superior a aproximadamente 25 milivoltios de magnitud (es decir, más positivo que 25 mV o más negativo que -25 mV), o preferiblemente superior a aproximadamente 30 mV de magnitud (o más negativo que -30 mV), entonces no se requiere ningún otro mecanismo para la estabilización de la dispersión frente a la floculación. En algunos casos, otras fuerzas de atracción excepcionales, tales como entremezclado de cadenas poliméricas asociadas a superficie, condiciones iónicas inusuales, redistribuciones dependientes del tiempo dentro de las partículas, pueden impedir la formación de partículas estabilizadas mediante este método solo.

Generalmente se está de acuerdo en la técnica en que las diferencias en los potenciales zeta no son significativas a menos que difieran en aproximadamente 5 mV o más. Expresado de otro modo, con poca pérdida de información, los potenciales zeta pueden notificarse como múltiplos de 5 mV. Por tanto, la regla de que 30 mV (positivo o negativo) o superior es suficiente para la estabilización de la carga se expresará, para los fines de esta descripción, como el criterio de que un potencial zeta superior a aproximadamente 25 mV de magnitud es lo que la invención requiere como carga superficial, prefiriéndose especialmente un valor superior a aproximadamente 30 mV.

Es importante optimizar la razón de tensioactivo cargado con respecto a cristal líquido, cuando se estabiliza la carga de partículas líquido-cristalinas para inyección. La eliminación o minimización de las poblaciones de partículas que se encuentran por debajo del potencial zeta crítico para su estabilización es importante para su estabilidad y establece un valor mínimo para la razón, y esto se ilustra en los ejemplos a continuación con mediciones cuantitativas, según el método preferido. Se prefiere que la fracción de intensidad ponderada de las partículas con potencial zeta menor que 25 mV de magnitud sea menor que aproximadamente el 10%, y más preferiblemente menor que aproximadamente el 3%. Obsérvese que esto hace referencia a la distribución de intensidad ponderada determinada mediante un método de dispersión de la luz, y en casos en los que, por ejemplo, el 10% de la distribución notificada se encuentre por debajo de 25 mV de magnitud, debe recordarse que el ensanchamiento por difusión exagera este valor notificado, y por tanto la población de intensidad ponderada real a valores inferiores a 30 mV de hecho será considerablemente menor que esto.

Estos requisitos del potencial zeta deben reunirse sin utilizar concentraciones excesivas de tensioactivo cargado. Una razón para esto es que la introducción de mayores cargas de tensioactivo cargado puede conducir a un aumento en la toxicidad de la formulación. Aunque los tensioactivos iónicos tales como SDS, docusato y cloruro de benzalconio (un conservante bien conocido) están presentes en la actualidad en formulaciones inyectables aprobadas por la FDA, esto no quiere decir que estén desprovistos de efectos tóxicos incluso a dosis mayores, particularmente en el caso de los compuestos catiónicos. Las normas de la FDA recomiendan generalmente el uso de la menor cantidad de excipiente requerido para el trabajo, en este caso para la estabilización.

El uso de tensioactivos con grupos polares hidrófilos poliméricos, particularmente polietilenglicol (PEG), tales como Pluronic (poloxámeros) o ésteres de glicerol o sorbitol pegilados, con valores de HLB superiores a aproximadamente 8 o un peso molecular de PEG total superior a aproximadamente 2.000 debe minimizarse en la práctica de esta invención dado que, al igual que las razones excesivas de tensioactivo cargado con respecto a fase cúbica, tienen una fuerte tendencia a inducir recubrimientos de fase laminar o L3. También se sabe que los tensioactivos de este tipo presentan un "efecto de apilamiento" sobre las superficie; mediciones de dispersión de la luz casi elásticas en las partículas dispersas con Pluronic de alto HLB, por ejemplo, muestran un aumento en el diámetro de partícula a medida que aumenta la concentración de Pluronic de alto HLB, lo que indica el apilamiento de las moléculas de tensioactivo en la superficie de la partícula, lo que claramente interferirá con las interacciones partícula-célula tal como se trata en el presente documento.

Incorporación del agente activo. Existen tres formas generales en las que puede incorporarse el agente activo en la partícula no recubierta de la presente invención. Éstas se describen a continuación.

Primera forma: en esta forma, la forma preferida, se disuelve el agente activo en el material de fase líquido-cristalina inversa. Expresado más precisamente, el agente activo es uno de los componentes, que, junto con los otros componentes, forman el cristal líquido en las condiciones usadas (temperatura, presión, etc.), como una fase de equilibrio termodinámico. Obsérvese que esto no es necesariamente lo mismo que decir que el agente activo se "añade a" a la fase líquido-cristalina inversa, porque la fase a la que se añade el agente activo podría ser totalmente diferente antes de la adición del agente activo; la adición del agente activo puede promover la formación de la fase líquido-cristalina inversa. Por ejemplo, en los ejemplos proporcionados en el presente documento que implican propofol se solubiliza el agente activo propofol en el cristal líquido como una "primera forma" es decir, se solubiliza el propofol en el material de fase líquido-cristalina inversa, y es uno de los componentes que forman el material líquido-cristalino.

Segunda forma: en esta forma, el agente activo se dispersa en el material de fase líquido-cristalina inversa, en forma de o bien cristal, que están preferiblemente del orden de las submicras, o bien una forma sólida amorfa. En este caso, por definición, la parte del agente activo que se dispersa, y no se disuelve, no afecta al comportamiento de fase del material líquido-cristalino. Este tipo de realización puede realizarse de al menos tres maneras. En el método

preferido, se mezcla físicamente el agente activo con el material de fase líquido-cristalina inversa, y entonces se dispersa el material resultante en agua tal como se da a conocer en otra parte en el presente documento. Antes del mezclado, el agente activo puede someterse a micronización, o incluso hacerse submicrométrico. Si esto requiere el uso de tensioactivo u otro agente estabilizante, entonces debe controlarse que este agente estabilizante no altere la fase líquido-cristalina inversa, a los niveles usados. Se han descrito métodos para producir cristales submicrométricos de material de fármaco de una manera farmacéuticamente aceptable, por ejemplo en la patente estadounidense 5.510.118 citada anteriormente. En un segundo método de esta forma, se dispersan las partículas activas sólidas junto con la fase líquido-cristalina inversa, con la intención de que el cristal líquido cubrirá el agente activo sólido debido a la menor tensión interfacial, una suma más favorable de interacciones entre el agente activo sólido y el cristal líquido, y el cristal líquido y la fase continua líquida polar. En el tercer método, en primer lugar se solubiliza el agente activo, o bien en el líquido, preferiblemente un disolvente polar, o bien, preferiblemente, en el cristal líquido o un precursor del mismo, a, por ejemplo, temperatura elevada o un pH favorable, y entonces se cambian las condiciones para precipitar o cristalizar el agente activo, preferiblemente en el interior de la matriz líquido-cristalina.

Tercera forma: el agente activo está en forma líquida, o bien como un agente activo líquido (por ejemplo, en el caso de un fármaco líquido) o bien como una disolución del fármaco en una fase líquida que es (necesariamente) distinta de e interior al material de fase líquido-cristalina. Se incluye este líquido en el material líquido-cristalino, rodeado por una matriz contigua y continua del material líquido-cristalino.

Son posibles las combinaciones de estas tres formas. Por ejemplo, podría solubilizarse una parte del agente activo en el cristal líquido, mientras que el resto podría estar en forma cristalina dispersa en el cristal líquido.

Tal como se acaba de describir en la primera forma, cuando se disuelve el agente activo en la fase líquido-cristalina cúbica inversa o hexagonal inversa, es sumamente deseable que en la dispersión final, se ubique la mayoría del agente activo en la fase líquido-cristalina, es decir en las partículas, en lugar de en el exterior acuoso. De esta manera, el uso de la invención puede beneficiarse completamente de las características de la fase líquido-cristalina inversa tal como se describe en el presente documento: el secuestro y la protección del fármaco tanto en almacenamiento como frente al ataque de los componentes biológicos del organismo; las interacciones íntimas entre las partículas y las membranas biológicas; cualquier capacidad de direccionamiento incorporada en las partículas tales como anticuerpos o lectinas; cualquier antioxidante (por ejemplo, tocoferol) o componentes protectores de otro modo en las partículas; conformación favorable y más fisiológica y presentación de compuestos bioactivos especialmente proteínas; naturaleza biomimética del vehículo en relación con las biomembranas, etc. Además, tal como se trata en el presente documento, se cree que varios fármacos presentan un efecto dañino (por ejemplo, ardor en la inyección) cuando están presentes, incluso en cantidades minúsculas, en la fase exterior acuosa de una microgota o un sistema microparticulado, aún cuando no se ubica dentro de una partícula o gota hidrófoba. De hecho, generalmente se prefiere en estas realizaciones que más de aproximadamente el 90% del fármaco se ubique preferentemente en las partículas, y, tal como se observa en el ejemplo 18 y la discusión a su alrededor, se prefiere especialmente que más de aproximadamente el 99% del fármaco se ubique preferentemente en las partículas (véase el ejemplo 18), particularmente en el caso en el que el fármaco es propofol.

En la tercera forma, cuando el agente activo es un líquido incluido en el material líquido-cristalino, rodeado por una matriz contigua y continua del material líquido-cristalino, puede esperarse de manera razonable que el fármaco permanecerá con el material líquido-cristalino en el organismo y de ese modo obtener las ventajas de la asociación. Esto debe contrastarse con el documento U.S. 6.071.524 en el que las partículas de gel cúbicas se sitúan en la interfase entre las microgotas de aceite y la fase exterior acuosa. Con el gran área superficial de las interfaces de aceite-agua en el organismo, y esta relación espacial débil topológicamente entre las partículas de gel y las gotas de aceite, existe una buena razón para creer (y no se proporciona ninguna prueba de lo contrario en el documento 6.071.524) que las partículas de gel se separarán de las gotas de aceite en su curso a través del organismo, en una aplicación farmacéutica del documento 6.071.524. Tampoco existe una razón convincente para creer que se transportarán las gotas de aceite a través de una barrera de biomembrana incluso si son las mismas partículas de gel cúbicas.

Incorporación de un componente asociado a bicapa, cargado. Un aspecto clave de la invención es la incorporación de un compuesto asociado a bicapa, cargado de manera iónica, que induce una carga en toda la bicapa, y crea una carga superficial sobre las partículas del material líquido-cristalino. Existen dos métodos generales para incorporar este compuesto cargado, aunque el resultado neto normalmente no se ve afectado por la elección del método. En un método, se mezcla el compuesto cargado junto con el material líquido-cristalino, o en algunos casos, la fase líquido-cristalina inversa requiere la presencia del compuesto cargado. En otro método, el compuesto cargado está presente en la fase líquida, preferiblemente solubilizado en la misma, y se dispersa el cristal líquido en esta mezcla. Al final, los componentes tenderán hacia la equilibración, que tenderá a minimizar las diferencias entre estos enfoques, de manera que se repartirá el componente cargado entre las partículas líquido-cristalinas y la fase polar según una distribución que eventualmente llegará a una distribución en equilibrio, o casi en equilibrio.

El compuesto asociado a bicapa, cargado a menudo, aunque no siempre, será un tensioactivo cargado, o bien un tensioactivo aniónico o bien, más rara vez, un tensioactivo catiónico. A continuación se proporcionan ejemplos de tensioactivos de este tipo, farmacéuticamente aceptable para diversas vías de administración. Sin embargo, en muchas realizaciones de la invención, el compuesto cargado no satisfará la definición (proporcionada anteriormente) de un tensioactivo, pero no obstante se adecuará perfectamente bien como un compuesto asociado a bicapa, cargado que

puede producir partículas de la presente invención. El compuesto asociado a bicapa, cargado puede ser el agente activo.

Compuestos asociados a bicapa, aniónicos. Para las formulaciones destinadas para su administración por inyección u otras vías no orales, los restos aniónicos especialmente preferidos para establecer la carga en las micropartículas de esta invención son: docusato, dodecilsulfato, ácido desoxicólico (y colatos relacionados, tales como glicocolato), succinato de tocoferol, ácido esteárico y otros ácidos grasos de 18 carbonos incluyendo ácidos oleico, linoleico y linolénico, ácido gentísico, aminoácidos hidrófobos incluyendo triptófano, tirosina, leucina, isoleucina, ácido aspártico, cistina, y sus derivados N-metilados, particularmente N-acetilriptófano, cloruro de miristil-gamma-picolinio, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol (particularmente dimiristoil-fosfatidilglicerol), y otros fosfolípidos aniónicos y ácidos. El experto en la técnica reconocerá el docusato como el resto aniónico del tensioactivo docusato de sodio (también conocido como Aerosol OT), y dodecilsulfato como el resto aniónico del tensioactivo dodecilsulfato de sodio, o SDS. También pueden usarse polipéptidos y proteínas tensioactivas, tales como caseína y albúmina, aunque debe prestarse mucha atención al pH que tendrán un efecto sobre la carga de la molécula.

Para las formulaciones destinadas para su administración oral, pueden usarse los compuestos aniónicos anteriores, pero además existen varios otros compuestos que pueden proporcionar el anión. Éstos incluyen palmitato de ascorbilo, lactilato de estearoilo, glicirrizina, citrato de monoglicérido, citrato de estearilo, estearilfumarato sodio, ramnolípido JBR-99 (y otros biotensioactivos de Jeneil Biosurfactant), ácido glicocólico, ácido taurocólico y ácido tauroquenodesoxicólico.

Los tensioactivos aniónicos especialmente preferidos son: oleato de sodio, dodecilsulfato de sodio, dietilhexil-sulfosuccinato de sodio, dimetilhexil-sulfosuccinato de sodio, di-2-etilacetato de sodio, 2-etilhexil-sulfato de sodio, undecano-3-sulfato de sodio, etilfenilundecanoato de sodio, jabones de carboxilato de la forma IC_n , en los que la longitud de la cadena n está entre 8 y 20 e l es un contraión monovalente tal como sodio, potasio, amonio, etc.

Compuestos asociados a bicapa, catiónicos. Tal como se trató en el presente documento, en la actualidad la selección de los tensioactivos catiónicos farmacéuticamente aceptables para inyección se limita principalmente a cloruro de miristil-gamma-picolinio y cloruro de benzalconio. Sin embargo, varios otros lípidos y tensioactivos catiónicos están en la actualidad en investigación como excipientes farmacéuticos para productos inyectables, que incluyen: clorhidrato de dimetilaminoacetato de tocoferilo, Cytofectin gs, 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-trimetilamonio-propano, colesterol unido a lisinamida u ornitinamida, bromuro dimetildioctadecilamonio, 1,2-dioleoil-sn-3-etilfosfocolina y otros lípidos de doble cadena con una carga catiónica llevada por un átomo de fósforo o arsénico, yoduro de trimetilaminoetanocarboxilato-colesterol, cloruro de O,O'-ditetradecanoil-N-(alfa-trimetil-amonioacetil)dietanolamina (DC-6-14), cloruro de N-[(1-(2,3-dioleiloxi)propil)]-N-N-N-trimetilamonio, cloruro de N-metil-4-(dioleil)metilpiridinio ("saint-2"), glicósidos lipídicos con grupos colgantes aminoalquilo, bromuro de 1,2-dimiristiloxipropil-3-dimetilhidroxietil-amonio, bromuro de bis[2-(11-fenoxiundecanoato)etil]-dimetilamonio, bromuro de N-hexadecil-N-10-[O-(4-acetoxi)-fenilundecanoato]etil-dimetilamonio, 3-beta-[N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoilo].

Otros compuestos asociados a bicapa útiles. Otros compuestos asociados a bicapa, cargados, adecuados para su uso en la presente invención, que pueden captar una carga en al menos algunas condiciones, incluye: ácidos grasos, compuestos fenólicos tales como eugenol, isoeugenol, quinolinas, hidroxiquinolinas y benzoquinolinas, compuestos tricíclicos tales como carbazol, fenotiazina, etc., pigmentos, clorofila, determinados extractos de aceites naturales particularmente aquellos que son fenólicos (tales como aceite de clavo, aceite de jengibre, aceite de albahaca), biotensioactivos (tales como "JBR-99" de Jeneil), una amplia gama de colorantes. Pueden usarse proteínas y polipéptidos anfífilos, incluyendo gramicidina, caseína, albúmina, glicoproteínas, proteínas ancladas a lípidos, proteínas receptoras y otras proteínas de membrana tales como proteinasa A, amiloglucosidasa, encefalinasa, dipeptidilpeptidasa IV, gamma-glutamilttransferasa, galactosidasa, neuraminidasa, alfa-manosidasa, colinesterasa, arilamidasa, surfactina, ferroquelatasa, espiralina, proteínas de unión a penicilina, glicotransferasas microsomales, cinasas, proteínas de membrana externa bacteriana, y antígenos de histocompatibilidad. Tal como se conoce bien, cada proteína tiene una carga neta, excepto en su punto isoeléctrico (pI), y por tanto una proteína asociada a membrana farmacéuticamente aceptable es adecuada para su uso en la presente invención siempre que el pH esté alejado de su punto isoeléctrico. En la actualidad se aceptan unas pocas proteínas de este tipo como componentes inactivos para preparaciones farmacéuticas, al menos con algunas condiciones, y éstas incluyen gluten, caseína y albúmina.

Tensioactivos y lípidos. Los lípidos y tensioactivos, de baja toxicidad, de manera especial farmacéuticamente aceptables, forman la base de las fases líquido-cristalinas liotrópicas que son un bloque estructural fundamental de la presente invención. Los tensioactivos preferidos que están aprobados por la FDA como productos inyectables y otros tensioactivos y lípidos de baja toxicidad, que tienen solubilidad al menos relativamente baja en agua, que se prefieren para la presente invención para productos destinados para varias vías de administración, incluyen aquellos indicados en la patente estadounidense 6.638.621, cuyo contenido completo se incorpora al presente documento como referencia. El inventor ha encontrado que los siguientes tensioactivos farmacéuticamente aceptables son particularmente útiles en la formación de fases cúbicas y hexagonales inversas insolubles: fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, Arlatone G, Tween 85, monooleato de glicerol y otros monoglicéridos insaturados de cadena larga (sólo aplicaciones orales, tópicas y bucales), monooleato de sorbitano, docusato de zinc y calcio, y Pluronic con menos de aproximadamente el 30% de grupos PEO en peso, especialmente Pluronic L122 y en un menor grado L101; Pluronic P123 (y de igual manera Pluronic 103) también forma fases cúbicas y hexagonales inversas pero tiene una solubilidad en agua significativa que

puede limitar su utilidad en algunas aplicaciones. Los tensioactivos etoxilados de bajo PM OE-2 y OE-5 (éter de alcohol oleílico unido a o bien 5 o bien 2 grupos PEG) son útiles en este respecto pero su aprobación en formulaciones de fármacos es limitada, dependiendo de la vía de administración.

Disolvente polar. Los disolventes polares se requieren en la presente invención para la creación del material de fase líquido-cristalina liotrópica, y se prefieren como una fase continua para dispersar dicho material. Habitualmente, al menos en el caso de una fase cúbica bicontinua, que es la realización preferida, la composición de disolvente polar en el cristal líquido y en la fase continua (exterior) será en última instancia igual, o casi igual, porque los dos están esencialmente en continuidad hidráulica. También debe observarse que la elección de un disolvente polar no volátil como el glicerol puede ser importante en procesos tales como secado por pulverización. El disolvente polar puede ser: agua; glicerol; formamida, N-metilformamida, o dimetilformamida; etilenglicol u otro alcohol polihidroxilado; nitrato de etilamonio; otros disolventes polares no acuosos tales como N-metilsidnona, N-metilacetamida, dimetilacetamida, cloruro de piridinio, etc.; o una mezcla de dos o más de los anteriores, siendo agua-glicerol la más importante de las mezclas.

Para el caso de la administración de fármacos, los disolventes polares preferidos son agua, glicerol, N,N-dimetilacetamida, y N-metilacetamida, así como mezclas de los mismos. Las mezclas de agua-glicerol son de toxicidad extremadamente baja y son muy compatibles con muchos tensioactivos incluyendo fosfolípidos. Las mezclas de dimetilacetamida-glicerol son excelentes para disolver compuestos farmacéuticos solubles con dificultad.

Puede ser ventajoso en determinadas circunstancias usar, como una forma alternativa de esta invención, una composición que produzca una dispersión de carga estabilizada de partículas de fase líquido-cristalina inversa al contacto con el agua (o con menor frecuencia, otro disolvente o líquido polar), sea o no esta misma composición deshidratada una fase líquido-cristalina inversa (es decir, un material que puede reconstituirse que forma partículas no recubiertas cuando se combinan con medio (agua o algún otro fluido) en el que las partículas así formadas tengan una carga iónica que las estabiliza como una disolución o dispersión en un líquido (por ejemplo, agua)). En particular, este contacto con el agua o una mezcla que contienen agua puede ser o bien durante una etapa de reconstitución, o bien durante la aplicación de la partícula, cuando la partícula entra en contacto con una disolución acuosa tal como sangre, líquido extracelular, líquido intracelular, mucosa, líquido intestinal, etc. Esto puede estar en forma de partículas, o un líquido precursor, tal como se observa en el ejemplo 17, o una matriz sólida o semisólida. Existen varias razones por las que esto puede ser ventajoso, incluyendo las siguientes sin limitación: proteger agentes activos o excipientes hidrolíticamente inestables; limitar la liberación prematura de agentes activos solubles en agua; y como un resultado natural de un proceso de producción tal como secado por pulverización o liofilización que pueden inducir la deshidratación. Eliminar la mayoría, o la totalidad, del agua de una fase líquido-cristalina inversa a menudo producirá otra fase líquido-cristalina o líquida nanoestructurada, pero a veces puede producir una disolución sin estructura, precipitado, o una mezcla de estos con una o más fases líquido-cristalinas o líquidas nanoestructuradas. En cualquier caso, para muchas aplicaciones, es la forma hidratada la que es importante en la aplicación de las partículas, y por tanto si esta forma hidratada es una fase líquido-cristalina inversa, entonces la composición de la materia cae dentro del alcance de la presente invención.

Métodos preferidos de preparación. El método preferido para poner en práctica la presente invención es tal como sigue, centrándose en el caso de un agente activo farmacéutico. Puede elegirse emplear o bien el material líquido-cristalino de fase cúbica bicontinua inversa, o bien menos preferiblemente, un material de fase hexagonal inversa (menos preferible debido tanto a menos interacciones favorables con biomembranas como a riesgo aumentado de efectos tóxicos y/o antigénicos). Se prepara un cristal líquido que contiene el agente activo mezclando el agente activo, un tensioactivo o lípido, agua, y si es necesario un excipiente de solubilización, y mezclando exhaustivamente de manera que el material resultante sea ópticamente isotrópico y de alta viscosidad. Los métodos para ubicar y mezclar la composición apropiada para lograr esto se proporcionan en detalle en las patentes estadounidenses 6.482.517 y 6.638.621 junto con las solicitudes estadounidenses 09/994.937 y 10/460.659 cuyo contenido se incorpora al presente documento como referencia. Para resumir, estos métodos implican el desarrollo de diagramas de fases con la ayuda de microscopía óptica de polarización y dispersión de rayos X de ángulo pequeño, la aplicación de los componentes de ayuda a la solubilización que no son parafínicos y normalmente contienen uno o más grupos polares que no funcionan son como tensioactivos (en combinación con tensioactivos verdaderos que son, por supuesto, necesarios para el comportamiento líquido-cristalino), y el uso acertado de técnicas útiles para acelerar la disolución tal como calentamiento, sonicación, agitación/amasado vigoroso, etc. La concentración del agente activo debe ser lo suficientemente alta para que una cantidad terapéutica eficaz (una "dosis", para generalizar un término de productos farmacéuticos) no requiera más de aproximadamente 10 gramos de cristal líquido, y más preferiblemente no más de aproximadamente 2 gramos. Si el tensioactivo o lípido no está fuertemente cargado, y esto será normalmente el caso en aplicaciones farmacéuticas, especialmente formulaciones inyectables, porque la mayoría de los tensioactivos y lípidos aprobados por la FDA aprobados para su uso en concentración relativamente alta (tal como se necesita en el cristal líquido) no están altamente cargados, entonces debe incorporarse una cantidad relativamente pequeña del compuesto asociado a bicapa, cargado, y esto es preferiblemente un tensioactivo cargado. Para los casos en los que se necesita este aditivo (es decir, en el que la propia fase cúbica no tiene un tensioactivo cargado como su componente tensioactivo principal), la razón en peso del compuesto asociado a bicapa, cargado, con respecto al cristal líquido debe ser de entre aproximadamente 0,01:1 y 0,15:1, o más preferiblemente entre aproximadamente 0,02:1 y 0,08:1. Razones en peso mayores que 0,08:1, y especialmente razones mayores que 0,15:1, tendrán una tendencia a inducir una fase L3 o fase laminar que puede convertirse en un recubrimiento de interferencia. Razones inferiores a 0,01:1 no producirán suficiente

potencial superficial para estabilizar las partículas en dispersión. Aunque el método preferido de incorporación de un aditivo tensioactivo cargado, siempre que sea soluble en agua, es disolviéndolo en el agua que se usa para dispersar la fase cúbica, en primer lugar debe controlarse que la fase cúbica no se funda mediante la adición de pequeñas cantidades del tensioactivo.

5 Entonces se dispersa la fase cúbica en la disolución de tensioactivo, o en el otro caso se dispersa la fase cúbica cargada en agua o alguna clase de tampón/disolución acuosa, usando homogeneización u otros medios mecánicos, preferiblemente seguido de microfluidización. En la producción de partículas de esta invención y su reducción de tamaño, pueden usarse varios métodos de emulsificación como entradas de energía. Éstos incluyen sonicación, microfluidización, homogeneización en válvulas, agitación con paletas, etc. Cuando se requieren partículas del orden de las submicras (por ejemplo, en aplicaciones intravenosas), la microfluidización es el método preferido dado que las velocidades de cizallamiento y los picos de temperatura pueden controlarse mejor en este método. La filtración o extrusión, en combinación con estos métodos, pueden ser de gran ayuda en la reducción del tamaño de partícula, y pueden servir a un fin de esterilización al mismo tiempo. La homogeneización del tamaño de partícula hasta unas pocas micras seguido de filtración a 0,45 ó 0,2 micras es otro medio preferido de producción de partículas finas de esta invención. En casos en los que la rigidez del cristal líquido inverso interfiere con la filtración, puede ayudar elevar la temperatura de modo que se lleve a cabo la filtración a una temperatura en la que el cristal líquido se funde para dar una fase líquida (normalmente fase L2, L3 o de microemulsión), haciendo más fácil el dimensionamiento mediante filtración, y entonces reducir la temperatura de vuelta a la ambiente para devolver las partículas a la forma líquido-cristalina.

20 La esterilización del producto terminado puede ser o bien mediante filtración, preferiblemente a 0,2 micras, o bien mediante otros métodos conocidos en la técnica, tales como luz UV o UV de pulsos, irradiación gamma, esterilización con haz de electrones, esterilización con vapor, o cuando sea posible mediante esterilización por calor terminal. Dado que muchos de los componentes usados en la práctica de esta invención serán líquidos a o cerca de la temperatura ambiente (por ejemplo, muchos de los de Pluronic, tocoferol, aceites esenciales, disoluciones acuosas, y fases L2 que resultan de mezclar composiciones de fase cúbica menos agua u otro componente líquido), también existe la posibilidad de empezar con componentes líquidos esterilizados (por ejemplo, mediante filtración estéril) y procesar en condiciones estériles.

25 Los fluidos supercríticos también pueden proporcionar otros medios mediante los cuales preparar la invención, siendo el dióxido de carbono supercrítico el disolvente preferido. Pueden usarse métodos que aplican sonicación y otra energía de alta frecuencia a las composiciones disueltas en dióxido de carbono supercrítico, desprendiéndose el dióxido de carbono como un gas que deja micropartículas.

30 **Validación y cuantificación de la estabilización de la carga.** En el contexto de la presente invención, la medición de la carga superficial, preferiblemente en forma de potencial zeta de partículas, es crucial para validar que las partículas de la invención están en efecto presentes, predecir las características de estabilidad a largo plazo, y para cuantificar la repulsión electrostática. En particular, tal como se trató anteriormente, en el transcurso de este trabajo se estableció que una vez que el potencial zeta de un conjunto de estas partículas de fase líquido-cristalina inversa es igual o superior a aproximadamente 25 mV, o más preferiblemente 30 milivoltios, de magnitud (o es inferior a -25 mV o -30 mV de magnitud), entonces no se requiere ningún otro mecanismo para la estabilización de la dispersión frente a la floculación, siempre que no exista ninguna fuerza de atracción excepcional, tales como el entremezclado de cadenas poliméricas asociadas a superficie, condiciones iónicas inusuales, redistribuciones dependientes del tiempo dentro de las partículas, etc.

35 En la presente técnica, se han reemplazado en gran medida estimaciones basadas en microscopía histórica de la movilidad electroforética por métodos de dispersión de la luz más cuantitativos. Esto no quiere decir que los métodos basados en microscopía sean inútiles, pero en el presente contexto, centrándose en micropartículas del orden de las submicras e incluso a escala nanométrica, se adecuan mucho mejor los métodos de dispersión de la luz. No obstante se da el hecho de que para sistemas que contienen partículas más grandes, tales como formulaciones subcutáneas, determinaciones basadas en microscopía usando celdas de observación electroforética pueden ser muy útiles y producir información intuitiva, más directa, y métodos de este tipo pueden incluso extenderse a partículas del orden de las submicras particularmente con ópticas especializados tales como por contraste de interferencia diferencial (DIC, también conocido como óptica de Nomarski). En cualquier caso, las mediciones de DELSA 440SX notificadas en el presente documento han sido cruciales para optimizar las composiciones usadas en la presente invención, particularmente la razón de tensioactivo cargado con respecto a cristal líquido, y especialmente en la tarea de eliminación o reducción al mínimo de poblaciones de partículas que se encuentran por debajo del potencial zeta crítico requerido para su estabilización sin utilizar concentraciones excesivas de tensioactivo cargado.

40 En los ejemplos proporcionados en el presente documento, las condiciones/parámetros aplicados fueron representativos del procedimiento preferido para determinar el potencial zeta. Se cargaron las muestras en una celda de muestra recubierta de plata, no diluida o sólo diluida levemente, lo que es importante porque la dilución puede afectar a los potenciales zeta por varios efectos. Las conductividades fueron normalmente del orden de 0,1 mS/cm, y la corriente en miliamperios se estableció a un valor algo mayor que la mitad del valor de la conductividad en mS/cm; por ejemplo, en un ejemplo, la conductividad era de 0,311 mS/cm y la corriente se estableció a 0,2 mA. El cambio de frecuencia se estableció en primer lugar a 500 Hz, y si la medición indicaba que un parámetro de 250 Hz sería aceptable entonces se

tomaba una segunda medición a 250 Hz. En el último cambio de frecuencia, el ensanchamiento experimental se redujo a menudo considerablemente en comparación con la lectura a 500 Hz; sin embargo, particularmente a ángulos de medición superiores, la forma del pico podía parecer que tenía una cola en el extremo de magnitud zeta superior, debido al denominado efecto "homodino".

5 Este instrumento mide el potencial zeta a hasta cuatro ángulos simultáneamente: 8,9, 17,6, 26,3 y 35,2 grados. Tal como se conoce en la técnica de la dispersión de luz, ángulos más pequeños resaltan partículas más grandes, y viceversa. Esto significa que a los ángulos más grandes, dado que las partículas más pequeñas se resaltan más, el ensanchamiento difusional es más pronunciado.

10 La presencia de un pico marcado a un potencial zeta indicado de cero, al menos en el presente contexto, es casi siempre debido al material que o bien se adhiere a las paredes de la celda, o bien se depositan al fondo. En los ejemplos de la presente descripción, esto tiene mucho más que ver con el tamaño de las partículas que con cualquier otro parámetro, excepto por el hecho de que las partículas catiónicas tienen una tendencia ligeramente más grande a adherirse al cuarzo (el material de la celda de muestra DELSA) debido a una interacción con la carga aniónica débil del cuarzo a los valores de pH investigados en el presente documento.

15 La medición simultánea a diferentes ángulos también es importante en la validación de la medición. En resumen, dado que esta medición (como con casi cualquier medición científica o por ingeniería) tiene ruido asociado, la cuestión de que un pico o característica dada sea real o un artefacto puede resultar más fácil y más substancial controlando si el pico o la característica está presente o no sólo en una curva, o en varias curvas (y preferiblemente todas) correspondientes a los diferentes ángulos de medición.

20 **Sistemas que puede reconstituirse o secos.** Materiales secos, parcialmente secos, que pueden reconstituirse y otros materiales que forman o se vuelven partículas del tipo dado a conocer en el presente documento están dentro del espíritu y el alcance de la presente invención. Pueden prepararse sistemas de este tipo mediante varios métodos. Por un lado, pueden obtenerse liofilizando partículas líquido-cristalinas, o secando partículas de este tipo mediante otros medios que implican vacío y/o entrada de calor. También pueden aplicarse secado por pulverización, secadores de lecho fluidizado y técnicas similares a o bien dispersiones acuosas de partículas, o bien disoluciones precursoras de los componentes no acuosos de las partículas disueltos en un disolvente orgánico volátil. Las tres formas de la invención tratadas anteriormente pueden deshidratarse mediante al menos algunos de estos medios para producir sistemas que puede reconstituirse.

30 Este enfoque es especialmente útil cuando se puede aprovechar el hecho de que muchos cristales líquidos liotrópicos inversos se vuelven sólidos tras la eliminación de su agua. Ejemplos de tensioactivos y lípidos que forman fases líquido-cristalinas inversas tras la hidratación pero son sólidas (de manera eficaz) en forma seca son monoelaidina, docusato de sodio (y otras sales de docusato), determinados fosfolípidos dependiendo de la insaturación de la cadena de acilo, y mezclas de bromuro de didodecildimetilamonio con tetradecanol.

35 Alternativamente, el secado de una dispersión puede producir un sistema que puede reconstituirse de varias clases. Si existen cantidades relativamente pequeñas de componentes no volátiles en la fase exterior de la dispersión, entonces el secado dejará o bien una masa fundida, esencialmente el cristal líquido contiguo original, o bien un conjunto de partículas distintas que puede, al menos en principio, dispersarse con una introducción de energía relativamente baja. Puede promoverse el último escenario mediante la selección de un tensioactivo u otro componente de superior punto de fusión.

40 Al incorporar un aditivo no volátil en la fase exterior, preferiblemente disuelto pero alternativamente disperso, el secado puede dar como resultado partículas que se mantienen a partir del cristal líquido, fusión de cristal líquido por la presencia de un sólido de intervención. La selección de un aditivo que está cargado de manera opuesta a las partículas líquido-cristalinas puede ayudar en el establecimiento de la ubicación adecuada del sólido resultante. Dado que el sólido es o bien soluble, o bien puede dispersarse fácilmente, en el líquido original (habitualmente agua), entonces la adición de este líquido generalmente dará como resultado la reconstitución rápida de una dispersión. El tamaño de partícula de la dispersión reconstituida puede ser el mismo que el de la dispersión original, pero en caso de ser más grande, entonces pueden usarse métodos sencillos tal como se describe en el presente documento para reducir el tamaño de partícula; en particular, en muchos casos una etapa de filtración o extrusión inducirá el tamaño de partícula deseado al tiempo que también la esterilización, y una etapa filtración en jeringa es un procedimiento bien aceptado incluso en el caso de una reconstitución en la cabecera de la cama.

55 **Inducción de la fase líquido-cristalina inversa.** En algunos casos, el agente activo de interés es tal que induce una fase líquido-cristalina inversa en un sistema lípido-agua o tensioactivo-agua que forma láminas seleccionadas. Como caso particularmente importante y preferido de esto, el sistema lípido-agua es un sistema fosfolípido-agua, especialmente un sistema fosfatidilcolina-agua en el que el fosfolípido está lo suficientemente insaturado como para formar un sistema líquido-cristalino laminar a o cerca de la temperatura ambiente. Se sabe bien que la fosfatidilcolina purificada de la mayoría de fuentes vegetales, así como varias PC sintéticas con cadenas insaturadas, forma fases líquido-cristalinas laminares a temperatura ambiente. Sin embargo, se conoce mucho menos que la adición de determinados compuestos hidrófobos o anfífilos puede inducir que la fase laminar se convierta en una fase cúbica inversa, o menos comúnmente hexagonal inversa. Muchos aceites de solubilización, tales como varios

aceites esenciales (en efecto, la mayoría de estos), inducen fases cúbicas inversas, normalmente a niveles de entre aproximadamente el 10 y el 35% de la composición final. Determinados agentes activos, incluyendo agentes activos farmacéuticos tales como propofol, también inducen fases cúbicas en sistemas de fosfatidilcolina-agua, tal como ha encontrado el inventor actual. Estos casos sorprendentes, en los que se encuentra que el fármaco, o una combinación fármaco/diluyente, tal como una mezcla de propofol y tocoferol, induce una fase líquido-cristalina inversa en una mezcla de tensoactivo-agua que forma láminas de otro modo, se adecuan especialmente bien para esta invención. Esto se ilustra mediante las grandes cargas (29% en peso) que pueden lograrse en la fase cúbica PC-propofol-agua en los ejemplos mostrados a continuación, que dieron como resultado que se suministraran bajos niveles de excipientes en el transcurso del tratamiento de un mamífero con la formulación.

Preparación de formulaciones de acción prolongada basada en materiales de fase líquido-cristalina inversa. Tal como se declaró anteriormente, también se consideran en esta invención preparaciones basadas en materiales de fase líquido-cristalina inversa, de varios tipos que incluyen, y se representan bien mediante, pero no se limitan a partículas no recubiertas de carga estabilizada, que pueden aumentar significativamente y en algunos casos drásticamente la duración de acción de fármacos sin requerir aumento de la dosis; o puede mantenerse la duración de acción a una dosis sustancialmente disminuida.

En la práctica de este aspecto de la invención, la composición debe preferiblemente ser de tal manera que lleve a cabo la solubilización del fármaco a concentraciones lo suficientemente altas que se mantengan de manera razonable volúmenes de vehículo, desde el punto de vista tanto de un volumen de administración como de una toxicidad. (Es decir, a medida que disminuye la concentración del fármaco en el vehículo, aumenta la cantidad de cada excipiente requerido para administrar una dosis dada, alcanzando eventualmente niveles en los que se compromete baja toxicidad). En el caso de anestésicos locales con grupos amino, se prefiere que el anestésico local se solubilice sustancialmente en su forma no protonada (o "base libre"). Esto aumenta el coeficiente de reparto del fármaco en los dominios hidrófobos del vehículo. La metodología y composiciones para solubilizar anestésicos locales así como una amplia gama de otros fármacos en materiales líquido-cristalinos se tratan en su extensión en la solicitud de patente estadounidense con n.º de serie , titulada Treatment Methods with Low-Dose, Longer-Acting Formulations of Local Anesthetics and Other Agents, presentada el 8 de octubre de 2004, así como en los documentos U.S. 6.482.517 y 6.638.621 ambos de Anderson, cuyo contenido se incorpora al presente documento como referencia. Debe observarse que la solubilización no es necesaria para la invención, dado que de hecho existen razones para creer que la administración de un fármaco en asociación con un material de fase líquido-cristalina inversa puede lograr aumento de la duración de la acción farmacológica, o la misma duración a una dosis inferior.

La forma física de estas fases líquido-cristalinas inversas puede adoptar varias formas útiles. Puede aplicarse el cristal líquido en masa de varias maneras, que incluyen: por vía tópica, como una crema o ungüento; por vía bucal o por vía sublingual; mediante inyección tal como subcutánea o intramuscular; y por vía oral, como por ejemplo dentro de una cápsula de gel. Se prefieren las formulaciones de micropartículas, suspensiones o dispersiones de partículas, particularmente dado que pueden, si se preparan apropiadamente como se muestra a modo de ejemplo en los ejemplos en el presente documento, inyectarse por vía intravenosa (lo que puede ser de enorme importancia en el caso de anestésicos locales y otros agentes activos inyectables que pueden ser tóxicos tras la administración intravenosa o intraarterial involuntaria); las formulaciones de micropartículas son especialmente versátiles porque pueden administrarse por vía subcutánea, intramuscular, intratecal, intraperitoneal, intrapleural, intralinfática, intralesional, intradérmica, subdérmica, intraocular, epidural, etc., o administrarse por vía oral, intranasal, mediante inhalación, o por vía rectal, además de por vía intravenosa en las condiciones tratadas en el presente documento.

Las formulaciones de micropartículas de materiales de fase líquido-cristalina inversa pueden ser del tipo de carga estabilizada, no recubierto, descrito en detalle en el presente documento, o del tipo recubierto descrito en detalle en las patentes estadounidenses 6.482.517 y 6.638.621, cuyo contenido se incorpora al presente documento como referencia.

APLICACIÓN DE LA INVENCION

Las partículas de la presente invención tienen aplicación en una variedad de campos. Las partículas pueden adaptarse para absorber uno o más materiales a partir de un entorno seleccionado, adsorber uno o más materiales a partir de un entorno seleccionado o, lo más preferiblemente, para liberar uno o más materiales, tales como agentes activos, en un entorno seleccionado.

Con respecto a la absorción, las partículas pueden usarse, por ejemplo, para recoger productos o eliminar residuos en procesos de reacción biológicos o químicos; o para eliminar toxinas, antígenos o productos de desecho en aplicaciones médicas.

Con respecto a la adsorción, por ejemplo, las partículas pueden usarse como medios cromatográficos y como agentes adsorbentes. En aplicaciones en las que el agente activo es una molécula diana que puede capturar un analito, tal como una molécula biológica o químicamente importante u otro compuesto del medio circundante las partículas no recubiertas de esta invención tienen una ventaja sobre las partículas recubiertas de cualquier clase porque el cristal líquido se presenta directamente al medio con la menor cantidad de interferencia.

Con respecto a la liberación, las partículas pueden usarse para la liberación controlada de agentes farmacéuticos tales como agentes anticancerígenos o agentes de terapia fotodinámicos, agentes anestésicos locales y generales, agentes de reversión anestésica, o materiales cosméticos, nutricionales, nutricéuticos o cosmicéuticos. Un agente activo puede ubicarse dentro de las partículas para su liberación tras la activación de la liberación.

5 Un aspecto muy valioso de la invención se aplica en particular a agentes activos altamente insolubles, fármacos insolubles en particular. Un enfoque principal en el desarrollo de fármacos es la solubilidad en agua de candidatos a fármacos, y se gastan considerables recursos midiendo, optimizando y evaluando esta solubilidad, incluso en casos en los que es muy baja. La noción frecuente es, de hecho, que éste es un parámetro crucial porque, en algún punto en la ruta de absorción, el fármaco tendrá que disolverse en agua en camino a la membrana celular diana. Sin embargo, se reconoce en esta invención que las partículas no recubiertas tal como se dan a conocer en el presente documento, que interaccionan de manera íntima con membranas diana, puede reducir en gran medida o incluso superar la necesidad de difusión de fármaco “desnudo” (fármaco que ya no está en el núcleo de la partícula) a través de rutas acuosas para alcanzar la membrana diana, las rutas acuosas que por sí mismas representan barreras, de manera eficaz. En efecto, se considera que desde el momento en el que una molécula de fármaco se disuelve en una partícula de la presente invención, hasta el punto en el que se ubica en la membrana celular diana, nunca necesita cruzar una ruta acuosa; la partícula puede incorporar el agente activo como componente hasta la células diana, punto en el que la fase líquido-cristalina inversa puede fusionarse e integrarse con la membrana celular diana, depositando el fármaco directamente en la membrana celular.

20 Las proteínas, polipéptidos, ácidos nucleicos, polisacáridos, lectinas, anticuerpos, receptores y otras biomacromoléculas son agentes activos que pueden adecuarse particularmente bien para la presente invención. La fase líquido-cristalina inversa puede proporcionar las propiedades de potenciación de la absorción tratadas en el presente documento, que pueden ser especialmente importantes en el caso de las macromoléculas, mientras que al mismo tiempo proporcionan protección frente a las proteínas de degradación (proteasas, nucleasas, glicosidasas, anticuerpos, etc.) y células que de otro modo inactivarían o secuestrarían el agente activo; de hecho, puede proporcionarse protección de este tipo mediante el efecto del tamaño de poro controlado de las fases líquido-cristalinas inversas, o en virtud de la carencia de poros accesibles en la fase cúbica discreta (no bicontinua), aunque esta fase es menos eficaz que la fase cúbica bicontinua para potenciar el transporte. El tamaño de poro uniforme en la fase cúbica bicontinua inversa y la fase hexagonal inversa probablemente puede utilizarse para liberar una molécula grande en respuesta a un estado fisiológico u otro (por ejemplo, temperatura o hidratación, en una aplicación de detergente de lavado de ropa) que induce una microestructura con tamaño de poro lo suficientemente grande para liberar la macromolécula. Como con las moléculas pequeñas, la liberación del agente activo también puede activarse mediante cambios en condiciones iónicas, tales como un cambio en el pH, salinidad, concentración de iones divalentes, especies de unión a hidrógeno, o incluso escisión de enlaces entre el agente activo y un componente del cristal líquido mediante acción o bien química o bien bioquímica (por ejemplo, enzimática). En algunos casos, no será necesario liberar el agente activo, si es un compuesto reactivo o catalítico, particularmente una proteína, siempre que el sustrato u otro(s) reactivo(s) pueda(n) pasar a través de los poros del material de fase líquido-cristalina inversa. En el caso de ácidos nucleicos en particular, pero también en otros casos, las partículas de la presente invención pueden ser de gran utilidad en la administración de agentes activos a sitios intracelulares, tales como el núcleo o la membrana nuclear, el aparato de Golgi, el retículo endoplasmático, la mitocondria, etc., y en un caso de este tipo las propiedades de potenciación del transporte de los materiales de fase líquido-cristalina inversa, particularmente las fase cúbicas bicontinuas inversas, pueden ser de alta utilidad en el contexto de una partícula no recubierta.

45 En casos de aplicación farmacéutica de la invención, en los que el fármaco se dispone en la partícula en forma cristalina (a diferencia de solubilizada), dentro de una micropartícula líquido-cristalina inversa, y por tanto rodeada por una matriz contigua y continua del material líquido-cristalino, y particularmente cuando las partículas también son del orden de las submicras en tamaño, entonces la parte del material líquido-cristalino inverso de la partícula puede servir a varias funciones simultáneamente, incluyendo pero, sin limitarse a: estabilizar las partículas en dispersión; potenciar la absorción mejorando las interacciones con biomembranas y otras barreras; servir como una matriz para la solubilización de otros excipientes o cofactores; servir como una matriz para la solubilización de inhibidores de proteínas circulantes en particular, proporcionando un medio mediante el cual modular, e incluso invertir, la carga eficaz en el fármaco; proporcionar la compatibilidad mejorada con determinados enfoques de formulación de fármacos; proporcionar la modulación de las características de deposición de los fármacos mediante la presencia de un bioadhesivo y/o matriz de alta viscosidad; proporcionar una protección selectiva del tamaño de poro frente a, o el acceso de, biomacromoléculas (por ejemplo, albúmina, proteasas, nucleasas, esterases) al fármaco sólido; en el caso de un profármaco, proporcionar una administración de liberación controlada o direccionamiento de fármaco mediante el acceso por permeación selectiva y/o disolución controlada de la matriz; y proporcionar la estabilización mejorada de la dispersión del fármaco en líquidos biológicos mediante el uso de cristales líquidos que tienen solubilidades mucho más bajas que la mayoría de los tensioactivos previamente usados en la estabilización de nanocristales.

60 Una aplicación potencial particularmente importante de la invención es para alojar moléculas, tales como anticuerpos, receptores, ligandos, ácidos nucleicos, oligosacáridos, u otros compuestos que pueden unirse a una molécula analito en una situación de diagnóstico. En una realización preferida de una aplicación de este tipo, se reparte un compuesto diana que puede unirse a un producto químico de interés en una partícula de la presente invención. En un ensayo competitivo o una aplicación de segregación sencilla de la invención, el producto químico de interés difundirán en la partícula líquido-cristalina inversa porosa y se unirá a la diana. En ensayos competitivos, un producto

químico que puede desplazarse tal como un grupo enzimático o similares se desplazará mediante el producto químico de interés y difundirá fuera de la una partícula líquido-cristalina inversa porosa y reaccionará con un compuesto marcador para indicar que se ha producido la unión dentro de la partícula; véase en particular la solicitud estadounidense 10/170.214. Por tanto, la partícula líquido-cristalina nanoestructurada mantiene la enzima u otros grupos que pueden desplazarse separados del compuesto marcador hasta que se liberan de la diana, permitiendo de ese modo la detección precisa sin procedimientos complejos de lavado, aspiración y otros usados en muchos analizadores de inmunoensayos automatizados con mucho equipo. Esto permite que los médicos lleven a cabo pruebas de manera rápida y precisa, sin formación o instrumentación sofisticada. En una aplicación de ensayo de tipo sándwich de la invención, se une un ligando a la diana dentro de la partícula líquido-cristalina inversa porosa, o puede llegar a unirse a la diana mediante difusión a través del material líquido-cristalino poroso. Además, se añade una segunda diana que puede difundir a través del material líquido-cristalino inverso que se une a otro epítipo del ligando. Una vez que se une la segunda diana, se proporciona una indicación que demuestra la unión. En aplicaciones de este tipo en las que la diana debe unirse a una moléculas de un medio de interés, de nuevo la presencia de un recubrimiento es intrusiva, incluso una fase L3 porosa debido a su tendencia (descrita anteriormente) para formar dominios de fase laminar, que pueden ser de muy baja permeabilidad para una amplia gama de compuestos. En efecto, esta es la razón porqué la naturaleza usa bicapas para compartimentalizar las células.

Usos alternativos de la invención son en el aislamiento químico y la limpieza, o en la administración de enzimas, u otro agente bioactivo, por ejemplo, agentes radioactivos y toxinas químicas. En la aplicación del aislamiento químico, las partículas de la presente invención se ponen en contacto con un medio en el que se desea la segregación y el aislamiento de un producto químico de interés. Durante un periodo de tiempo, y con o sin operaciones tales como remover, agitar, etc., el producto químico se difunde dentro de la partícula líquido-cristalina inversa porosa y se une mediante la diana. Este procedimiento puede usarse en la limpieza del agua contaminada, o en la limpieza *ex vivo* de la sangre, por ejemplo. En el modo de administración, la partícula líquido-cristalina porosa incorporará un producto químico que va a administrarse (por ejemplo, un agonista, antagonista, medicamento, toxina, etc.). Este producto químico se protegerá del entorno, por ejemplo, el organismo en una aplicación *in vivo*, mediante la partícula líquido-cristalina porosa, hasta que esté en posición para administrar el producto químico. Una vez que está en posición, un compuesto del entorno se difundirá a través de la partícula líquido-cristalina porosa, interaccionará de manera competitiva con la diana y desplazará el producto químico que va a administrarse, y, después de eso, el producto químico que va a administrarse se difundirá fuera de la partícula líquido-cristalina inversa porosa y en el entorno en el que debe actuar.

Se conocen otras diversas aplicaciones de micropartículas en general, incluyendo las indicadas en la patente estadounidense 6.638.621, cuyo contenido completo se incorpora al presente documento como referencia.

En vista de los requisitos exigentes para la administración de agentes farmacéuticos, las ventajas y la flexibilidad de la presente invención la hacen particularmente atractiva en la administración y liberación de muchos compuestos farmacéuticos, particularmente para la administración y liberación de cantidades terapéuticas de sustancias de este tipo. Los compuestos farmacéuticos que se adecuan particularmente bien para su incorporación como agentes activos en la presente invención, y presentan problemas o limitaciones en las formulaciones actualmente comercializadas, incluyen propofol, alfaxalona, alfadolona, eltanolona, propanidid, ketamina, pregnanolona, etomidato, y otros anestésicos generales; bupivacaína, lidocaína, procaína, tetracaína, mepivacaína, etidocaína, oxibuprocaína, cocaína, benzocaína, pramixinina, prilocaína, proparacaína, ropivacaínas, cloroprocaína, dibucaína, y anestésicos locales relacionados; SN-38 y camptotecinas relacionadas; paclitaxel y taxanos relacionados; doxorubicina, idarubicina, daunorubicina y rubicinas relacionadas; anfotericina B; coenzima Q10; esteroides y agentes antiinflamatorios esteroideos; antiinflamatorios no esteroideos (por ejemplo, salicilatos, derivados de paraminofenol (por ejemplo, acetaminofén), fenomatos, derivados de ácido propiónico (por ejemplo, naproxeno, ibuprofeno, etc.); analgésicos; antipiréticos; sedantes (por ejemplo, benzodiazepinas tales como diazepam); agentes hipnóticos (por ejemplo, anestésicos intravenosos y barbituratos); opiáceos; cannabinoides y proteínas (por ejemplo, insulina y eritropoyetina) (entendiéndose que una amplia variedad de amidas y ésteres pueden tener aplicación en la presente invención). Además, diversos agentes antineoplásicos y otros compuestos farmacéuticos indicados en la patente estadounidenses 6.638.537 y 6.638.621, cuyo contenido completo se incorpora al presente documento como referencia.

Obsérvese que la presente invención también se adecua muy bien para la incorporación de excipientes funcionales, tales como aceites esenciales que mejoran la absorción de fármacos poco absorbidos, en algunos caso inhibiendo las en proteínas circulantes de fármaco. Tal como se trata en más detalle en otra parte en el presente documento, existen varios sitios dentro, y en la superficie de las partículas, en los que pueden ubicarse los agentes activos, excipientes y excipientes funcionales dentro del contexto de esta invención.

En el área de los productos farmacéuticos y nutricéuticos, las partículas de la presente invención pueden administrarse a un mamífero (incluyendo un ser humano), u otro animal, mediante cualquiera de una variedad de vías de administración que están bien establecidas y los expertos en la técnica conocen bien. Éstas incluyen, pero no se limitan a, vías orales (por ejemplo, mediante píldoras, comprimidos, pastillas, cápsulas, trociscos, jarabes y suspensiones, y similares) y no orales (por ejemplo parenteral, intravenosa, intraperitoneal, intratecal, intramuscular, subcutánea, intraarterial, rectal, intravaginal, sublingual, intraocular, transdérmica, intranasal, mediante inhalación, en un dispositivo, y similares). Las composiciones de la presente invención son particularmente adecuadas para su administración interna (es decir, no tópica) pero en algunas aplicaciones pueden proporcionarse por vía tópica. La presente invención es especialmente útil en aplicaciones en las que un agente activo farmacéutico soluble con dificultad

va administrarse por vía interna (es decir, no tópica), incluyendo por vía oral y parenteral, en el que dicha formulación se ha de mezcla con un medio continuo acuoso tal como suero, orina, sangre, mucosa, saliva, líquido extracelular, etc. En particular, un aspecto útil importante de muchos de los líquidos estructurados de atención en el presente documento es que pueden prestarse para la formulación como vehículos continuos acuosos, normalmente de baja viscosidad.

5 Debe observarse que, en el caso de formulaciones inyectables, las composiciones de esta clase notificadas en los documentos U.S. 5.756.108 y 6.071.524, en particular, no son aplicables, porque se centran en el uso de monoglicéridos insaturados, que son altamente tóxicos en inyección y no están aprobados para su uso en formulaciones inyectables. De manera similar, la solicitud estadounidense 2002/0153509 enseña alejándose de partículas inyectables con su atención casi exclusiva en la monooleína.

10 **Incorporación de grupos de direccionamiento y compuestos bioactivos.** En la presente invención, puede ser muy eficaz incorporar productos químicos o grupos químicos, a menudo proteínas u otras biomacromoléculas, que pueden emplearse para dirigir partículas de manera temporal y espacial, por ejemplo, para dirigir partículas a sitios específicos en el organismo. De manera similar, otros compuestos bioactivos incorporados sobre o en las partículas
15 podría servir a funciones importantes, tales como: pueden estar presentes potenciadores de la absorción tales como mentol de modo que aumente la permeabilidad de las barreras de absorción (bicapas lipídicas, unión de huecos) antes de o de manera concomitante con la liberación del fármaco; pueden incorporarse proteínas u otros materiales moduladores de la adsorción que inhibirán la unión desfavorable de proteínas endógenas tales como albúmina; pueden incorporarse adyuvantes que potenciarán el efecto de componentes vacuna u otros materiales de modulación inmunitaria. Anticuerpos, esteroides, hormonas, oligo o polisacáridos, ácidos nucleicos, vitaminas, inmunógenos, e
20 incluso nanosondas son todos ejemplos de una amplia gama de materiales que pueden unirse a partículas de la presente invención, o bien mediante solubilización o compartimentalización en el material líquido-cristalino, o bien mediante unión covalente, unión iónica, unión coordinada, puentes de hidrógeno, adsorción, interacciones bioquímicas específicas (tales como unión avidina-biotina), u otras interacciones químicas con componentes en la partícula.

25 Aunque no siempre es crucial para una aplicación dada conocer la ubicación exacta (o más precisamente, la distribución de probabilidad espacial) de un resto de direccionamiento dentro de o en asociación con una partícula, esto puede ser una consideración importante en el diseño de una combinación de partícula-resto de direccionamiento, y la presente invención se presta a mucha flexibilidad y potencia en este respecto. Normalmente, los restos de direccionamiento pueden ubicarse sustancialmente en uno o más de los siguientes sitios con referencia a la micropartícula:

30 1) en la partícula, es decir, disuelta o dispersa en el interior la fase líquido-cristalina inversa; esta ubicación puede ofrecer la ventaja distintiva de proporcionar un medio "biomimético" para el resto de direccionamiento, un medio que puede comprender una bicapa lipídica así como dominios hidrófobos cada uno de los cuales puede ajustarse para optimizar el entorno; además, ésta es la ubicación preferida en el caso en el que la micropartícula se usa en la metodología de diagnóstico descrita en la solicitud de patente estadounidense
35 10/170.214;

2) en la superficie de la partícula; y/o

3) unido a, pero a una distancia de, la superficie mediante unión a través de un espaciador flexible, por ejemplo, un polímero que se une (por ejemplo mediante unión covalente) en un extremo a un componente de la
40 partícula y en el otro extremo al resto de direccionamiento. La experiencia con otros tipos de micropartículas en la técnica ha mostrado que esto es generalmente un enfoque excelente para lograr buen direccionamiento porque conserva grados de libertad conformacionales y difusionales importantes que algunas veces se requieren para el buen anclaje de un resto de direccionamiento con un receptor o diana.

También es posible en la presente invención crear un resto de direccionamiento sensible ajustando las
45 condiciones de la formulación de manera que el resto de direccionamiento se ubique preferentemente en el interior protector de la partícula hasta el momento en que sea necesario para su tarea de direccionamiento, punto en el que las condiciones locales tales como pH o concentraciones de ligando puedan inducir que el resto deje el interior de la partícula y se presente en, o fuera de (mediante un espaciador) la superficie de la partícula. Por ejemplo, si un resto de direccionamiento tenía una carga neta, por ejemplo catiónica, a los valores de pH encontrados durante el
50 almacenamiento del producto e incluso en tránsito al sitio de acción, secuestrando de ese modo el resto diana en el interior de la partícula en la que hay compuesto(s) aniónico(s) presente(s); durante la aplicación, tras alcanzar el sitio de acción, un cambio en el pH, la fuerza iónica, la concentración iónica específica, capacidad como tensioactivo, concentración del ligando u otro parámetro puede liberar el resto de direccionamiento interrumpiendo la unión iónica o liberando de otro modo el resto (posiblemente mediante la acción de masa), de manera que el resto puede venir a la
55 superficie de la partícula y volverse disponible para su unión a la diana. El secuestro del resto puede potenciar en gran medida la estabilidad del resto particularmente en vista de los tamaños de poro pequeños de las fases líquido-cristalinas inversas, que son lo suficientemente pequeños como para ocluir el paso de determinadas moléculas tales como proteasas, nucleasas, etc.

Pueden usarse potencialmente varios compuestos como restos de direccionamiento en una aplicación farmacéutica de partículas de la presente invención. Para comenzar, determinados lípidos, tales como lípido A, tienen

interacciones muy específicas con componentes del sistema inmunitario, por ejemplo, y pueden incorporarse en las partículas. De manera similar, pueden utilizarse copolímeros de bloque en los que uno de los bloques puede tener potencial de direccionamiento, tal como glicógeno y heparina. Moléculas pequeñas que pueden estar presentes en la partícula para lograr un grado de direccionamiento incluyen esteroides, ácidos grasos, gramicidina, fragmentos o agentes que simulan epítopos de proteínas apropiados, y aminoácidos incluyendo ácido aspártico, cisteína, triptófano, leucina y otros.

La capacidad de las fases líquido-cristalinas inversas de la presente invención para permitir la solubilización y estabilización de biomoléculas, tales como los restos de direccionamiento de interés en este caso, se ha descrito anteriormente, en la que se proporcionan varios ejemplos de proteínas de membrana (proteínas receptoras, proteínas tales como proteinasa A, amiloglucosidasa, encefalinas, dipeptidil-peptidasa IV, gamma-glutamyltransferasa, galactosidasa, neuraminidasa, alfa-manosidasa, colinesterasa, arilamidasa, surfactina, ferroquelatasa, espiralina, proteínas de unión a penicilina, glicotransferasas microsómicas, cinasas, proteínas de membrana externa bacteriana y antígenos de histocompatibilidad), muchos de los cuales podrían servir a un papel de direccionamiento si se incorporan en las partículas de la presente invención.

Aún en otra realización de la invención, puede lograrse el "direccionamiento dirigido de manera externa" de las partículas. Esto puede llevarse a cabo dirigiendo partículas que contienen determinados materiales magnéticamente sensibles (por ejemplo, óxido férrico), dispersos en la partícula o enlazados a ésta, mediante la aplicación de campos magnéticos.

Los anticuerpos son ampliamente útiles para el direccionamiento a sitios o moléculas específicas en el organismo u otros entornos, y pueden incorporarse en diversos sitios en una partícula tal como se trató anteriormente. En particular, los anticuerpos intactos con sus fragmentos Fc más hidrófobos son propensos a repartirse en las matrices del tipo usado en esta invención, y además se conoce bien que los anticuerpos pueden adsorberse o unirse (incluyendo de manera covalente) a superficies con retención de unión y especificidad de unión. Las fuentes comerciales suministran una gran abundancia de tipos de anticuerpos, por ejemplo, los indicados en la patente estadounidense 6.638.621, cuyo contenido completo se incorpora al presente documento como referencia, y otros que están constantemente en desarrollo.

Alternativamente, muchas sustancias (por ejemplo folato, Gp-p, citocromo P450, y EGF) pueden en y por sí mismas ser útiles como sustancias de direccionamiento y pueden incorporarse en las partículas de la presente invención.

Es importante señalar que además de los compuestos de direccionamiento *per se*, pueden incorporarse compuesto activos, excipientes funcionales tales como potenciadores de la absorción, y otros materiales bioactivos que se extraen de las listas de materiales proporcionadas en el presente documento en cualquiera de estos sitios de ubicación.

Además del direccionamiento de las partículas a sitios específicos para la liberación del fármaco, tal como se mencionó anteriormente podrían usarse por sí mismas partículas que incorporan determinados materiales radiopacos u ópticamente densos para la obtención de imágenes, y cuando se acoplan a compuestos de direccionamiento tal como describe en el presente documento podrían seleccionar como diana sitios específicos en el organismo y permitir su visualización. Como un ejemplo, se sabe que los receptores de somatostatina se ubican en determinados sitios tumorales, de modo que la unión de una diana a las partículas según la presente invención que se unirá de manera electiva a receptores de somatostatina puede seleccionar como diana un tumor y permitir su visualización mediante, por ejemplo, rayos X, obtención de imágenes de RM, u obtención de radioimágenes. Para extender esta idea, una partícula dirigida de manera similar puede llevar entonces un material radioactivo que emitirá radiación destinada a inducir la necrosis del tumor.

Cristales líquidos polimerizados como fases. La patente estadounidense 5.244.799 (cuyo contenido se incorpora al presente documento como referencia en su totalidad) notifica la polimerización de cristales líquidos de fase cúbica y hexagonal nanoestructurados, con retención de su nanoestructura. La retención de la estructura se demostró mediante dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS) y microscopía electrónica de transmisión (MET).

La posibilidad de la polimerización de la fase cúbica de una partícula de la presente invención abre varias posibilidades, particularmente en relación con el aumento de la estabilidad de la fase líquido-cristalina inversa y la modulación de su interacción con el organismo, y membranas celulares en particular. Para un ejemplo de lo último, mientras que puede esperarse que una fase cúbica no polimerizada se disperse de manera molecular cuando entra en contacto con una biomembrana, la polimerización puede crear una partícula que conservará su integridad durante toda su interacción con la misma biomembrana, y esto puede tener consecuencias drásticas con respecto al destino de la partícula y a un fármaco dentro de la partícula. Además, la retención de un fármaco unido a bicapa (molécula hidrófoba pequeña, proteína de membrana, etc.) puede aumentarse enormemente mediante polimerización, lo que produce una partícula de liberación lenta. Y la presencia de una estructura porosa definida de manera precisa, más permanente, con un tamaño de poro que puede ajustarse con precisión, puede hacer posible una liberación controlada mejorada de un fármaco, y/o el secuestro del fármaco de enzimas degradadoras u otras enzimas mediante exclusión de tamaño de los poros de la matriz polimerizada.

Control de reparto. En el contexto de esta invención, a veces es posible ajustar el reparto de uno o más compuestos, el agente activo en particular, dentro o fuera de las partículas, de modo que, por ejemplo, se reducen significativamente los niveles de fármaco libre en la fase acuosa exterior. Ejemplos de compuesto farmacéuticos en los que esto es importante incluyen diazepam, y propofol, en los que se cree que la presencia de propofol en la fase exterior es responsable del ardor que muchos experimentan tras la inyección. Esto es a pesar del hecho de que, en el caso de propofol, la cantidad de fármaco que está en la fase acuosa es inferior al 1% de la cantidad de propofol que está en las partículas, es decir, en la fase cúbica, en todos los casos (véase el ejemplo 18, en particular), o, expresado de otro modo, que más del 99% del propofol está en las partículas. Otros casos incluirán en los que el compuesto activo es sensible a hidrólisis, oxidación, electrólisis, cavitación, o de manera amplia cualquier forma de ataque químico de especies (iones, nucleófilos, electrófilos, radicales, etc.) que son más polares y se ubican preferentemente en la fase acuosa. El enfoque general es diluir el fármaco en las partículas con un compuesto, preferiblemente un líquido o al menos un compuesto de bajo punto de fusión, que tiene un alto coeficiente de reparto, preferiblemente superior a aproximadamente 10, más preferiblemente superior a aproximadamente 100, y lo más preferiblemente superior a aproximadamente 1.000. Esto aumenta el volumen del material hidrófobo en las partículas y en la dispersión en relación con la masa del fármaco, independientemente de si el compuesto diluyente tiene una afinidad o potencial de solubilización particular para el fármaco (siempre que el fármaco sea soluble en, o miscible con, el diluyente). Lo que hace que este enfoque trabaje eficaz y eficientemente en el contexto de esta invención es el hecho de que el diluyente de alto K_{ow} puede elegirse de manera que imite la razón molecular de grupo polar con respecto a grupo apolar del fármaco, de manera que la fase cúbica inversa o hexagonal inversa pueda encontrarse con la combinación diluyente-fármaco a la misma fracción en volumen, o similar, que la del sistema sin diluyente. Por ejemplo, en el ejemplo 19 a continuación, se encuentra una fase cúbica inversa en el sistema Pluronic L-122/propofol/agua con el fármaco propofol a aproximadamente el 19% en volumen, o alternativamente, en el sistema con diluyente, a una fracción en volumen total de propofol (10%) más tocoferol (9%) también de aproximadamente el 19%. De manera similar, en el ejemplo 20, se encuentra una fase cúbica inversa en el sistema fosfatidilcolina/propofol/agua con el fármaco propofol a aproximadamente el 29% en volumen, o alternativamente, en el sistema con diluyente, a una fracción en volumen total de propofol (10%) más tocoferol (19%) también de aproximadamente el 29%. Esto es particularmente importante en casos en los que el grado de la región de fase líquido-cristalina deseada en el espacio de la composición (es decir, el diagrama de fases) sea relativamente pequeño. En la preparación de esta dilución, es sumamente preferible cuando el diluyente se elige de modo que se imite la molécula del fármaco en cuanto a la razón de grupos polares con respecto a grupos apolares. Por ejemplo, el tocoferol, con su grupo benzopiranol (2 oxígenos) como parte de un compuesto de PM 430 es similar en cuanto a la razón polar/apolar con respecto a propofol, con su grupo fenólico individual (1 oxígeno) como parte de una molécula de PM 178. Se cree que los grupos polares tales como hidroxilo se unen fuertemente a la interfase polar-apolar de sistemas tensioactivo-agua, y dado que esto tiene implicaciones importantes para el comportamiento de fase [véase, por ejemplo, P. Strom y D. M. Anderson, *Langmuir* (1992) 8:691-702], el diluyente debe tener preferiblemente un contenido similar de grupos polares similares, en la medida de lo posible.

En casos en los que el agente activo es propofol, y con otros fármacos y nutrientes que se proporcionan a pacientes para quienes debe controlarse la entrada de lípidos, una ventaja importante de muchas de las formulaciones notificadas en el presente documento es que puede hacerse que las cargas de lípido sean muy bajas. Particularmente en las formulaciones de fase cúbica a base de Pluronic, notificadas en los ejemplos 1-4 y 13-17, la carga de lípido es significativamente menor que en las formulaciones actualmente comercializadas, y además esto puede reducirse incorporando hasta el 19% de propofol en la fase cúbica sin ningún alfa-tocoferol. Particularmente en aplicaciones de propofol, en las que se usa repetida o continuamente a lo largo del tiempo como un sedante, las cargas de lípido de la formulación pueden interferir significativamente con el régimen nutricional del paciente o incluso provocar complicaciones graves.

El alfa-tocoferol, u otras formas de vitamina E tales como acetato de tocoferol y succinato de tocoferol, es una elección sumamente preferida como un diluyente de alto coeficiente de reparto para productos inyectables debido a su larga historia de uso seguro en productos inyectables, así como el grupo OH unido a la interfase citado anteriormente. Otros diluyentes preferidos incluyen aceites esenciales de origen vegetal, así como varios otros líquidos que se indican en la lista de la FDA titulada *Inactive Ingredients for Currently Marketed Drugs Products* (Componentes inactivos para medicamentos comercializados en la actualidad) y/o las secciones apropiadas de la *Food Additives Status List* (Lista de la situación de aditivos alimentarios). Entre estos están: benzoato de bencilo, aceite de casia, aceite de ricino, ciclometicona, polipropilenglicol (de bajo PM), polisiloxano (de bajo PM), aceite de coñac (oenantato de etilo), toronjil, bálsamo de Perú, oleorresina de cardamomo, estragol, geraniol, acetato de geraniol, acetato de mentilo, eugenol, isoeugenol, aceite de pepitas, aceite de pino, aceite de ruda, trifurano, extracto de achiote, oleorresina de cúrcuma, y oleorresina de pimentón. Aceites esenciales de fuentes vegetales (incluyendo sus extractos y componentes, y mezclas de los mismos) comprenden un grupo bastante grande y químicamente diverso de líquidos que incluyen muchos agentes hidrófobos de baja toxicidad con grupos polares. La expresión "aceites esenciales" pretende incluir aceites esenciales de las siguientes fuentes: baya de pimienta de Jamaica, esencia de ámbar, semilla de anís, árnica, bálsamo de Perú, albahaca, laurel, hojas de laurel, bergamota, bois de rose (palisandro), cajeput, caléndula (margarita), alcanfor blanco, semilla de alcaravea, cardamomo, semilla de zanahoria, madera de cedro, apio, manzanilla alemana o húngara, manzanilla romana o inglesa, canela, citronela, salvia, brote de clavo, cilantro, comino, ciprés, eucalipto, hinojo, aguja de pino siberiano, franquincienso (aceite de olíbano), ajo, geranio rosa, jengibre, pomelo, hisopo, jazmín, jojoba, bayas de enebro, lavanda, limón, limoncillo, lima, mejorana, artemisa, flor de verbasco, goma de mirra, bigarade neroli, nuez moscada, naranja amarga, naranja dulce, orégano, palmarosa, pachulí, poleo, pimienta negra, menta, petitegrain, aguja

de pino, raíz de carmín, absoluto de rosa, semillas de rosa mosqueta, romero, salvia, salvia dálmata, aceite de sándalo, sasafrás (libre de safrol), menta verde, nardo, píceo (cicuta), tangerina, árbol de té, thuja (hoja de cedro), tomillo, extracto de vainilla, vetiver, gaulteria, extracto de olmo escocés (hamamelia), o ilang ilang (cananga). También se prefieren los siguientes componentes de aceites esenciales: 2,6-dimetil-2,4,6-octatrieno; 4-propenilanol; ácido bencil-3-fenilpropenoico; 1,7,7-trimetilbicyclo[2.2.1]heptan-2-ol; 2,2-dimetil-3-metilenbicyclo[2.2.1]heptano; 1,7,7-trimetilbicyclo[2.2.1]heptano; trans-8-metil-n-vanilil-6-nonenamida; 2,2,5-trimetilbicyclo[4.1.0]hept-5-eno; 5-isopropil-2-metilfenol; p-menta-6,8-dien-2-ol; p-menta-6,8-dien-2-ona; beta-cariofileno; 3-fenilpropenaldehído; 3,7-dimetil-6-octenal; 3,7-dimetil-6-octen-1-ol; 4-alilanol; ácido etil-3-fenilpropenoico; 3-etoxi-4-hidroxibenzaldehído; 1,8-cineol; 4-alil-2-metoxifenol; 3,7,11-trimetil-2,6,10-dodecatrien-1-ol; 1,3,3-trimetilbicyclo[2.2.1]heptan-2-ol; 1,3,3-trimetilbicyclo[2.2.1]heptan-2-ona; trans-3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol; acetato de trans-3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ilo; 3-metil-2-(2-pentenil)-2-cilopent-1-ona; p-menta-1,8-dieno; 3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol; acetato de 3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ilo; p-mentan-3-ol; p-mentan-3-ona; 2-aminobenzoato de metilo; acetato de metil-3-oxo-2-(2-pentenil)-ciclopentano; 2-hidroxibenzoato de metilo; 7-metil-3-metilen-1,6-octadieno; cis-3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol; 2,6,6-trimetilbicyclo[3.1.1]hept-2-eno; 6,6-dimetil-2-metilenbicyclo[3.1.1]heptano; p-ment-4(8)-en-3-ona; p-ment-1-en-4-ol; p-menta-1,3-dieno; p-ment-1-en-8-ol; metilfenilglicidato de etilo; y 2-isopropil-5-metilfenol.

Diluyentes especialmente preferidos, debido a una combinación favorable de buenas propiedades de solubilización del fármaco, baja toxicidad, baja solubilidad de agua, intervalo de temperatura útil como líquido, historia de uso, y compatibilidad con (o inducción de) fases cúbicas y hexagonales, son: tocoferoles, benzoato de bencilo, estragol, eugenol, isoeugenol, linalool, aldehído de fresas, terpineol, y los siguientes aceites esenciales: bálsamo de Perú, albahaca, laurel, bois de rose (palisandro), semilla de zanahoria, brote de clavo, eucalipto, jengibre, pomelo, hisopo, limón, artemisa, goma de mirra, naranja amarga, orégano, palmarosa, pachulí, menta, petitgrain, romero, aceite de sándalo, menta verde, thuja (hoja de cedro), tomillo, vainilla, y ilang ilang (cananga). De estos, el presente inventor ha encontrado que tocoferoles, linalool, y aldehído de fresa (metilfenilglicidato de etilo) son los más preferido en el caso de productos inyectables.

El ejemplo 18 muestra un resultado experimental que indica que la concentración de fase exterior del fármaco anestésico general propofol en varias fases cúbicas equilibradas con agua se reduce fuertemente sustituyendo aproximadamente la mitad del propofol con alfa-tocoferol. En los ejemplos 19 y 20, se inyectaron por vía intravenosa en perros las formulaciones de propofol de la presente invención en las que se usó la misma mezcla de tocoferol-propofol en las partículas de fase cúbica, y no se observó ninguna molestia con la inyección en ninguno de los animales. Tal como se observó anteriormente, el consenso en la técnica es que el picor en la inyección de muchas formulaciones propofol se debe al propofol presente en la fase acuosa. Esto pone en relieve la importancia del control del reparto aceite-agua que es posible en la presente invención, mediante un medio sencillo. El mismo método también puede aplicarse a otros sistemas que contienen tensioactivos o lípidos, tales como liposomas, dispersiones, microemulsiones, y emulsiones de partículas de cristal líquido recubiertas. No es necesario que el diluyente tenga alguna afinidad particular para el fármaco, tal como se ilustra mediante los ejemplos en el presente documento en los que el tocoferol es el diluyente, dado que este compuesto no tiene ninguna afinidad especial por el propofol (no obstante, tal como se trató anteriormente, el propofol y tocoferol comparten una similitud estructural que es importante en el contexto de esta invención). Más bien el efecto es el resultado matemático de la razón aumentada del volumen hidrófobo con respecto a la masa del fármaco. Tal como se observa mediante los datos en el ejemplo 18, el aumento de la razón del volumen hidrófobo (fracción en volumen de dominios hidrófobos) con respecto al contenido del fármaco (fracción en volumen del fármaco) en el 50%, o más preferiblemente en el 100%, puede tener un fuerte efecto sobre la concentración del fármaco en la fase exterior. Los tocoferoles son particularmente útiles como diluyentes en una amplia gama de sistemas posibles debido a sus cadenas hidrófobas largas, bajos puntos de fusión, y naturaleza no alergénica, segura. Aunque el uso de diluyentes oleosos se conoce en la técnica de las emulsiones, su uso en el contexto de liposomas y dispersiones basadas en cristal líquido ha sido prácticamente desconocido, particularmente en el campo de los productos farmacéuticos, con la excepción de determinadas descripciones de patentes del presente inventor (solicitudes estadounidenses 10/176.112 y 60/387.909).

Otro hallazgo sorprendente en el transcurso de la preparación de las muestras notificadas en el presente documento fue que la oxidación del propofol a lo largo del tiempo se redujo fuertemente mediante el uso del método con diluyente tocoferol descrito anteriormente. Esto puede deberse a una combinación, quizás una sinérgica, de varios factores. El mismo tocoferol puede actuar como antioxidante, y en particular puede proteger al propofol cuando está en los dominios hidrófobos de la dispersión. Además, la reducción del propofol acuoso por el método con diluyente puede reducir la velocidad de oxidación debido a la cinética de oxidación más lenta en los dominios hidrófobos en comparación con la fase acuosa, debido a la viscosidad superior y/o concentración inferior de oxígeno. El segundo factor se aplicará incluso en casos en los que el diluyente no sea específicamente un antioxidante.

Ajuste de la tonicidad. En el transcurso de esta invención, el inventor ha encontrado que aminoácidos solubles, por ejemplo glicina, prolina y valina, en particular, son excelentes agentes de ajuste de la tonicidad para formulaciones que incorporan tensioactivos que contienen grupos polares de poli(óxido de etileno) (o PEG), tales como poloxámeros (Pluronic), particularmente en el caso de la formulación de propofol. Las razones por las que los aminoácidos solubles, y especialmente hidrófilos neutros son particularmente útiles en estos casos son: 1) no presentan la tendencia a precipitar partículas que incorporan tensioactivo pegilado, como lo hacen las sales iónicas; 2) no aumentan de manera apreciable, y de hecho pueden disminuir, la concentración de propofol en la fase acuosa exterior, lo que tal como se trata en el presente documento es importante en la reducción del ardor en la inyección; y 3) parecen

tener el efecto de mejorar la compatibilidad de las fases cúbicas y hexagonales inversas con la fase acuosa. El ejemplo 18 demuestra la reducción de propofol acuoso con la adición de glicina para hacer la dispersión isotónica (aproximadamente 300 mOsm/l). Por el contrario, se encontró que los sacáridos que se usan comúnmente para ajustar la tonicidad, tales como dextrosa, aumentaron los niveles acuosos de propofol. Incluso el cloruro de sodio al 0,8% tuvo el efecto de precipitación de las partículas de Pluronic L-122/desoxicolato de la presente invención durante un periodo de aproximadamente una semana. También se descubrió que la glicina produce una fase cúbica más transparente, lo que indica un orden de largo alcance más perfecto, en estos experimentos. Se encontró que la glicina y la valina y la prolina no tenían efectos adversos sobre las partículas de fase cúbica basadas en L-122, que contenían propofol, de la presente invención. La glutamina y asparagina alteraron la misma formulación. Se usa glicina en grandes cantidades (superiores a 100 mg/kg) en inyecciones del producto farmacéutico Humate-P, y una dosis individual del producto nutricional inyectable Nephramine contiene más de 2 gramos de valina, haciendo que ambas sean especialmente preferidas para productos parenterales. Los aminoácidos preferidos para este fin, en orden decreciente de preferencia, son: glicina, alanina, prolina, serina, glutamina, valina, asparagina; los aminoácidos ácidos, básicos e hidrófobos son mucho menos preferidos (y algunos de estos no son solubles en agua hasta niveles de ajuste de la tonicidad), como son los aminoácidos que contienen azufre debido a problemas de hipersensibilidad. Los aminoácidos indicados como preferidos también tienen un efecto de estabilización del pH y pueden actuar como antioxidantes hasta algún grado. Se prefiere el uso de glicina a niveles de entre aproximadamente el 1 y el 3%, y más preferiblemente entre aproximadamente el 1,3 y el 2,2%, para ajustar la tonicidad, a menos que estén presentes otros componentes que aumenten la osmolalidad en cuyo caso pueden ser útiles niveles inferiores. La sinergia entre las diversas funcionalidades de estos aminoácidos, concretamente su compatibilidad con grupos de cabeza de PEG, su efecto positivo sobre el reparto del fármaco (al menos en el caso de fármacos fenólicos tales como propofol), y su tonicidad, capacidad de tamponamiento, y actividad antioxidante es particularmente importante en el caso de productos farmacéuticos, en los que hay un alto ímpetu para mantener el número de componentes en la formulación a un mínimo. La tonicidad también puede lograrse con el uso de zwitteriones, incluyendo fosfatidilcolina.

Un método especialmente útil de producción de partículas de la presente invención implica fases relacionadas de viscosidad inferior. En particular, y tal como se ilustra en el ejemplo 17 a continuación, a menudo se da el caso de que cuando se elimina el agua de una fase cúbica o hexagonal inversa, se forma una fase L2 líquida, de viscosidad muy inferior o en casos más raros una fase L3 líquida. Es decir, en algunos casos, simplemente una reflexión del hecho de que grupos de cabeza de tensioactivo requieren hidratación con el fin de que la segregación en los dominios hidrófobos e hidrófilos sea lo suficientemente pronunciada, en cuanto a la energía, para que se desarrolle el comportamiento de fase líquido-cristalina completo. Dado que la fase L2 líquida es de baja viscosidad se dispersa mucho más fácilmente en agua, y después de que las gotas resultantes se hidraten con agua, experimentan el cambio de fase para dar la fase líquido-cristalina inversa buscada. Esta hidratación es generalmente un proceso rápido porque los tiempos de difusión se reducen en gran medida, asumiendo que se logra un tamaño de gota de fase L2 razonablemente fino, preferiblemente inferior a aproximadamente 100 micras y más preferiblemente inferior a aproximadamente 20 micras. El mismo resto cargado que induce la estabilización de la carga en la dispersión de partícula líquido-cristalina final puede de igual manera proporcionar la estabilización de la carga de las gotas de líquido en dispersión. Pueden usarse otros métodos para convertir las gotas de líquido precursor (habitualmente L2, o en otros casos la fase L3) en partículas de fase líquido-cristalina. Éstos incluyen, por ejemplo, incorporar un compuesto de bajo coeficiente de reparto en el cristal líquido lo que provoca que se licue, en el que K_{ow} bajo implica que el compuesto dejará preferentemente las gotas de líquido tras la dispersión, lo que induce que el líquido vuelva a un cristal líquido como una partícula. Un compuesto de este tipo puede encontrarse fácilmente añadiendo simplemente la cantidad suficiente de un compuesto de bajo K_{ow} a un cristal líquido hasta que el cristal líquido se licúe, lo que no es una tarea difícil en vista del intervalo de la composición normalmente pequeño de las fases líquido-cristalinas inversas.

Los estudios de estabilidad notificados en el ejemplo 22 demuestran que las partículas de la presente invención son estables a largo plazo en dispersión, con muy poca agregación o crecimiento del tamaño de partícula a lo largo del tiempo, tal como se muestra mediante la medición de dispersión de la luz dinámica, que se conoce bien que es muy sensible a la agregación de partículas. Debe observarse que esto contradice las partículas de gel cúbicas del documento U.S. 6.071.524, que de hecho se diseñan para agregarse en la superficie de las gotas de aceite en esa invención. En el documento 6.071.524 no se proporcionaron estudios de estabilidad con resultados de dimensionamiento de partículas a lo largo del tiempo.

Aplicación de formulaciones que contienen cristal líquido inverso para lograr duración de acción aumentada y/o dosis disminuida. En el transcurso de este trabajo se hizo el descubrimiento inesperado de que las formulaciones que contienen cristal líquido inverso de determinados fármacos presentaron, en algunos casos, duración en gran medida aumentada de la acción eficaz sin aumento de la dosis, y/o duración y eficacia equivalente a una dosis significativamente inferior, en comparación con las formulaciones habituales (tales como disoluciones acuosas sencillas) del mismo fármaco. Esto puede aplicarse a una amplia gama de fármacos y productos nutricéuticos tal como se describe a continuación. El caso específico de los anestésicos locales es representativo de muchas realizaciones de este tipo y a continuación se describen con cierto detalle.

La introducción (o colocación) de anestésicos locales en o en proximidad al tejido neural da como resultado anestesia o analgesia y denomina ampliamente como anestesia regional. Se han desarrollado técnicas específicas para establecer la anestesia quirúrgica, analgesia posoperatoria, así como diversas terapias de tratamiento del dolor agudo y crónico. Estas técnicas continúan desarrollándose a medida que se realizan avances en agentes farmacéuticos,

dispositivos médicos, y el entendimiento de la fisiología y función celular. Algunas de estas técnicas específicas se denominan ocasionalmente “bloqueo nervioso”, “bloqueo de raíz nerviosa”, “bloqueo neural”, “bloqueo neuraxial”, “bloqueo intratecal”, “bloqueo subaracnoideo” “bloqueo epidural”, “bloqueo de ganglio”, “bloqueo del plexo”, “bloqueo de campo”, “bloqueo incisional”, “bloqueo por infiltración” entre otros. La presente invención tiene importancia potencial en todos estos bloqueos.

La expresión “bloqueo diferencial” se usa para describir los diversos efectos observados cuando se usan diversos anestésicos locales para establecer anestesia regional con los diferentes tipos de fibras nerviosas. El uso de cada agente anestésico local producirá resultados característicos variados basados en gran parte en las propiedades hidrófilas o hidrófobas inherentes del agente. De igual importancia que el fármaco seleccionado para su uso es el tipo de fibra nerviosa cuya actividad va bloquearse. Algunos otros factores pueden afectar a la calidad o la característica de un tipo específico de bloqueo nervioso. Históricamente, la rapidez del comienzo y la duración del bloqueo de conducción pueden manipularse aumentando la dosis total del anestésico local así como el volumen de administración. La adición de epinefrina, norepinefrina, y fenilefrina puede aumentar la duración del bloqueo debido en gran parte a sus efectos vasoconstrictores que reducen la absorción del anestésico local lejos de la fibra nerviosa. La proximidad de la fibra nerviosa y otras estructuras anatómicas ubicadas cerca del sitio de la inyección pueden afectar al comienzo y la duración del bloqueo. Cualquier número de factores independientes incluyendo, pero sin limitarse a, pH, bicarbonatación, carbonatación, temperatura, baricidad, la hormona progesterona, pueden efectuar el comienzo característico, la calidad y latencia de diversas técnicas de conducción nerviosa.

En el ser humano, puede realizarse el bloqueo del nervio ciático para producir anestesia distal en la extremidad inferior distal para la rodilla y el pie. Existen varias técnicas de anestesia regional prescritas que dan como resultado el bloqueo de la conducción satisfactorio, principalmente usando o bien el enfoque periférico o bien el clásico. Cada serie de técnicas puede realizarse o bien con o bien sin la ayuda de un simulador de nervio periférico, provocando parestesias combinadas con el conocimiento de marcas anatómicas y de superficie.

El uso de un simulador de nervio facilita la administración precisa de un agente anestésico local en proximidad directa a o incluso dentro del nervio o la vaina nerviosa. Esto se lleva a cabo aplicando una cantidad pequeña y ajustable de corriente eléctrica a una aguja de búsqueda de bloqueo por aislamiento para provocar la despolarización del nervio una vez que la punta de la aguja no aislada avanza a una ubicación cerca de o contra el nervio. Esta técnica ayuda al médico entrenado en la identificación y el aislamiento del/de los nervio(s) destinado(s) a bloquearse.

En el ejemplo de un bloqueo del nervio ciático que va a realizarse en la posición de Sim lateral, se flexionará la pierna destinada a bloquearse en la rodilla y la extremidad más superior, descansando sobre la extremidad inferior dependiente. Mediante palpación, se identificará el trocánter mayor y la tuberosidad isquiática con el fin de identificar la escotadura anatómica entre las dos marcas claves. El nervio ciático se encuentra casi en el punto medio dentro de esta escotadura. Se anestesiará la superficie correspondiente de la piel por encima de este punto inyectando una pequeña cantidad de un anestésico local elevando un habón de piel. Entonces se une el cable negativo del estimulador de nervio cerca del centro de la aguja, y entonces se avanza la punta de la aguja de bloqueo en la escotadura ciática. A medida que la aguja avanza, se observará tanto la dorsiflexión como la flexión plantar del pie una vez que se ha establecido la proximidad de la punta de la aguja al nervio. La confirmación de la colocación de la aguja puede realizarse o bien disminuyendo la estimulación eléctrica hasta menos de 0,2 miliamperios o bien inyectando de 1 a 2 mililitros de anestésico local, que abolirá suficiente estímulo eléctrico y provocará una disminución y pérdida eventual del movimiento motor. Entonces puede completarse el bloqueo ciático administrando una cantidad apropiada de la disolución de anestésico local al adulto sedado o al niño anestesiado.

Lo siguiente son ejemplos de bloqueos nerviosos que pueden ofrecer un nivel mejorado de comodidad con un anestésico local de mayor duración tal como se proporciona mediante esta invención.

CABEZA Y CUELLO

| | | |
|---|---|-------|
| Amígdalas y adenoides | Bloqueo de fosa palatina | * * * |
| Biopsia de ganglio linfático, cuello | Bloqueo del plexo cervical superficial | * * |
| Enderterectomía carotídea | Bloqueo del plexo cervical profundo/superficial | * * |
| Control del dolor posoperatorio general | Inyección incisional superficial y profunda | * |
| RSD/Causalgia/Raynaud | Bloqueo de ganglio estrellado | * * * |

EXTREMIDAD SUPERIOR

| | | |
|---|---|-------|
| Artroscopía de hombro, diagnóstico | Plexo braquial, enfoque interescalénico | * |
| Reparación con manguito de rotación, abierto o de alcance | p.b., enfoque interescalénico | * * * |

| | | |
|---|--|------------|
| Artroplastía | p.b., enfoque interescalénico | * * * |
| Fx humeral con RAFI | p.b., enfoque interescalénico | * |
| Fx de olécranon con RAFI de brazo (codo) | Plexo braquial, enfoque axilar | * * |
| Bursa de olécranon | Plexo braquial, axilar/intraclavicular | * * |
| Radio con RAFI de antebrazo | Plexo de cúbito braquial, axilar/intraclavicular | * * * |
| Inserción de derivación con diálisis | “ “ “ | * |
| Muñeca, mano, dedos | Bloqueo(s) de sitio(s) selectivo(s) | De * a ** |
| TÓRAX Y PARED ABDOMINAL | | |
| Pecho, toracotomía (pecho abierto) | Bloqueo paravertebral (T1 - T6 o T8) | * * * (#) |
| Control del dolor, fx de costilla(s) | paravertebral/intercostales | * * * (#) |
| Herpes (dermatoma) | Bloqueo(s) de nervio(s) intercostal(es) | * |
| Mastectomía/ganglio linfático axilar | paravertebral (T1 - T6) | * * * |
| Reconstrucción de mama sin parte abdominal | Colgajo TRAM “ | * * * (#) |
| Reconstrucción de mama con parte abdominal | Colgajo TRAM “ | ninguno |
| Parche y conexión de hernia inguinal, abierto | Con malla | * |
| PELVIS, PERINEO UROGENITAL | | |
| Diversos bloqueos específicos de sitio | | * |
| EXTREMIDAD INFERIOR | | |
| Artroscopía de rodilla, diagnóstico | Plexo lumbar, bloqueo n femoral | * |
| Alcance de rodilla con reparación de ligamentos | “ “ | * * |
| Artroplastía de rodilla total | “ “ | * * * (#) |
| Rótula con RAFI | “ “ | * * |
| Artroplastía de cadera total | “ “ | * |
| Amputación, por encima/por debajo de la rodilla | Bloqueo de nervio ciático | * * |
| RAFI de pierna distal, tibia | “ “ * | * |
| Pies, tobillo, tendones | Nervio ciático poplíteo, bloqueo de tobillo | De * a *** |

Leyenda

* alguna mejora ofrecida durante de 4 a 6 h de bloqueo con marcaine™

* * buena mejora probable en comparación con el bloqueo con marcaine™

* * * mejora significativa ofrecida durante bloqueo con marcaine™ de inyección individual

Catéter permanente epidural a nivel torácico o lumbar ofrece ventajas significativas sobre Marcaine™ de inyección individual o la presente invención, aunque presentan determinados problemas.

Aplicación de formulaciones que contienen cristal líquido inverso de baja dosis, de larga duración con respecto a otros agentes activos. Los compuestos farmacéuticos que bien adecuados para su incorporación como agentes activos en formulaciones de larga duración y/o dosis reducida que contienen los materiales líquido-cristalinos de fase cúbica inversa de las realizaciones preferidas, y que pueden obtener potencialmente beneficio de los métodos de la presente invención, incluyen propofol, alfaxolona, alfadolona, eltanolona, propanidid, ketamina, pregnanolona, etomidato, y otros anestésicos generales; dexametasona, clonidina, loperamida, antagonistas de serotonina como

ondansatrón, especialmente en conjunto con determinados anestésicos locales; anfotericina B; coenzima Q10; esteroides y agentes antiinflamatorios esteroideos; epoyetina; mitoxantrona; dacarbazina; antiinflamatorios no esteroideos (por ejemplo, salicilatos, derivados de paraminofenol (por ejemplo, acetaminofén); calcitonina; sucralfato; danazol y otros esteroides; megace; L-dopa; ketamina; aciclovir y otros antivirales; anakinra; flavanoides (productos nutricéuticos); fenomatos; pentafusida; derivados de ácido propiónico (por ejemplo, naproxeno, ibuprofeno, etc.); analgésicos; antipiréticos; agentes de bloqueo neuromuscular tales como rocuronio, vecuronio, y pancuronio; antihipertensores, tales como sulfinalol, oxiprenolol, hidroclorotiazida, captopril, felodipino, guanazodina, cadralazina, tolonidina, bromuro de pentametonio, bunazosina, ambusida, metildopa, etc.; antitusivos, tales como mutamirato, etc.; sedantes (por ejemplo, benzodiazepinas tales como diazepam); hipnóticos (por ejemplo, anestésicos intravenosos y barbituratos); opiáceos; cannabinoides y proteínas (por ejemplo, insulina y eritropoyetina). Por supuesto los anestésicos locales se prefieren especialmente dentro del contexto de esta invención, e incluyen bupivacaína, lidocaína (que tiene un bajo índice terapéutico, a pesar de su uso contra arritmias ventriculares) procaína, tetracaína, mepivacaína, etidocaína, oxibuprocaína, cocaína, benzocaína, pramixinina, prilocaína, proparacaína, ropivacaína, levobupivacaína, amilocaína, dibucaína, diperodón, hexilcaína, leucinocaína, meprilcaína, cloroprocaína, dibucaína, oxibutacaína, propanocaína, propipocaína, pseudococaína, butacaína, QX-314, y anestésicos locales relacionados; anestésicos dentales tales como clorobutanol, eugenol, y aceite de clavo; y una mezcla eutéctica 1:1 en peso de lidocaína y prilocaína. Los fármacos antineoplásicos tienen generalmente estrechas razones terapéuticas y pueden beneficiarse especialmente de esta invención; éstos incluyen SN-38 y camptotecinas relacionadas tales como irinotecán; paclitaxel y taxanos relacionados; gencitabina; colchicina; doxorubicina, idarubicina, daunorubicina y rubicinas relacionadas; iludinas y el ptaquilosin relacionado; filgrastima; vincristina y vinblastina; perindopril; epotilonas; Photofrin y otros agentes PDT; ciclofosfamida; ácido 13-cis-retinoico; clotrimazol (para candidiasis oral); cisplatino, carboplatino, y otros fármacos basados en platino. Además, otros compuestos farmacéuticos indicados en las patentes estadounidenses 6.638.537 y 6.638.621, cuyo contenido completo se incorpora al presente documento como referencia, son adecuados para su incorporación en la invención descrita en el presente documento, y preferiblemente en las fases líquido-cristalinas inversas de las realizaciones preferidas; uno de los ejemplos a continuación expone en detalle una aplicación de la invención para un agente antineoplásico, concretamente un taxano, paclitaxel. Además, otros fármacos y productos nutricéuticos que son de bajo índice terapéutico y se prefieren especialmente para la presente invención incluyen warfarina y otros anticoagulantes, ciclosporina y otros inmunosupresores incluyendo basiliximab, agentes antifúngicos, dioxina, fenitoína, teofilina, aminofilina, litio, antibióticos aminoglicósidos, insulina, dimercaprol, mercaptopurina, fluoroquinolonas, fármacos antiepilépticos, anticonceptivos orales, fenilpropanolamina, compuestos tripanocidas, vitaminas A y D, quinidina, miltefosina, terfenadina, hormonas, cisaprida, inhibidores de 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa, analgésicos narcóticos potentes tales como fentanilo y buprenorfina, muchos fármacos psicotrópicos tales como butaclamol, muchos inhibidores de la MAO, y depresores tricíclicos, y en cierto grado los barbituratos. De manera geeral, cualquier fármaco para el que se han llevado a cabo separaciones quirales con el fin de eliminar el enantiómero de bajo índice terapéutico es probable que sea un candidato preferido para esta invención. En general, los fármacos con un bajo índice terapéutico (agentes anticancerígenos en particular) son buenos candidatos para aprovechar el aspecto de dosis reducida de formulaciones que contienen cristal líquido inverso, aunque existen casos (tales como quizás antihipertensores o antidepresivos) en los que la dosis se mantendrá lo más probablemente igual y se aprovechará el aspecto de duración aumentada.

También debe señalarse que la presente invención puede desempeñar un papel en la facilitación del uso de determinados agentes farmacéuticos activos que han caído en desuso o presentan una falta de desarrollo debido a problemas de abuso de fármacos, problemas de toxicidad o duración de la acción inaceptable, tales como la cocaína. Al cambiar la forma física y la farmacocinética del fármaco mediante el uso de esta invención, puede conservarse la eficacia farmacéutica, o mejorarse, mientras que se disuade o impide la posibilidad de su abuso.

Los siguientes ejemplos ilustran la presente invención pero no deben interpretarse como limitativos de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Se preparó en primer lugar una fase cúbica inversa que contenía el anestésico propofol mezclando 0,952 gramos (g) de propofol (obtenido de Albemarle Corporation), 1,308 g de agua destilada (todas las referencias al agua en esta sección significan agua destilada) y 2,756 g del tensioactivo Pluronic L122 (obtenido de Ethox Corporation). Después de mezclar meticulosamente esta composición, se comprobó que el material fuera ópticamente isotrópico y de alta viscosidad. Entonces, se disolvieron 0,319 g del tensioactivo aniónico docusato de sodio (también conocido como Aerosol OT, o simplemente AOT) en 100 ml de agua. Después, se añadieron 1,088 g de la fase cúbica a un vaso de precipitados de 100 ml que contenía 20 ml de la disolución de tensioactivo, y se homogeneizó la mezcla usando un homogeneizador Brinkmann PT 10/35, después de lo cual se microfluidizó la dispersión homogeneizada en un microfluidizador de alta presión modelo 110L de Microfluidics, usando tres ejecuciones de 30 segundos cada una a aproximadamente 10.000 psi. La observación en un microscopio de contraste de fase Olympus BHC demostró que se había logrado un tamaño de partícula del orden de 300 nanómetros (nm). Entonces se analizó la dispersión usando un aparato DELSA 440SX de Beckman-Coulter para análisis de dispersión de luz por electroforesis Doppler, fijado en modo de medición de potencial zeta.

La figura 3 muestra la distribución de potencial zeta medida resultante, usando tres ángulos de medición. En los tres ángulos, la distribución está centrada alrededor de -67 mV, que es un potencial zeta lo suficientemente intenso

como para aportar una dispersión estable. Debe observarse que aunque hay una propagación con respecto a la distribución, contribuciones importantes a esta propagación notificada provienen del ensanchamiento instrumental y ensanchamiento por difusión. Por tanto, la distribución es de hecho significativamente más estrecha que la indicada. Particularmente teniendo esto en cuenta, la fracción de partículas con un potencial zeta inferior a 30 mV de magnitud es bastante pequeña.

La razón de tensioactivo (docusato) con respecto a fase cúbica en este ejemplo era de 0,06:1, y resultó una dispersión estable, con un potencial zeta promedio de -67 mV. Cuando esta razón se disminuyó a 0,02:1, manteniendo todo lo demás constante, el potencial zeta promedio se desplazó a aproximadamente -20 mV, y esa dispersión no era estable.

Ejemplo 2. El agente hipnótico y anestésico general propofol, en la cantidad 0,57 gramos, se combinó con 0,78 g de agua estéril y 1,65 g de Pluronic L122 (en el que la fracción en peso de cadenas de polioxietileno es del 20%), trabajando en una campana de flujo laminar. Después de mezclar esto para formar una fase cúbica inversa, se disolvieron 0,105 g de desoxicolato de sodio en 40 ml de agua estéril. Se dispersó entonces una cantidad de 2,1 g de la fase cúbica en los 40 ml de disolución, usando en primer lugar el homogeneizador Brinkmann, usando entonces el microfluidizador de Microfluidics durante un total de 15 minutos de microfluidización a alta presión. La dispersión, denominada posteriormente en lo sucesivo "Lyotropic/PF1", se filtró con un filtro de jeringa de 0,8 micras antes de su uso en las pruebas con animales descritas en el ejemplo 4 a continuación.

La figura 4 muestra la distribución de potencial zeta medida para esta dispersión. El potencial zeta promedio, concretamente de aproximadamente -48 mV, es de mayor magnitud que 30 mV y por tanto consecuente con la estabilización debida principalmente al potencial de superficie.

Se preparó también una mezcla con sólo 1 ml de agua pero la misma cantidad de desoxicolato de sodio. Por tanto, todas las razones fueron las mismas que en párrafo anterior, excepto la cantidad de agua. El propósito de esto es comprobar el comportamiento de la fase en presencia de agua en exceso (esto es suficiente para proporcionar un exceso), pero sin el efecto de dispersión/dilución que viene con la razón agua:fase cúbica 20:1 normal. Esto significa que si cualquier fase laminar o L3 estuviera presente, aunque podría ser difícil de detectar en la dispersión diluida, sería bastante más fácil de detectar en esta forma concentrada. Esto se analizó en un microscopio óptico de polarización Olympus BHC, y el resultado se muestra en la figura 5. A la izquierda, hay una línea gruesa de birrefringencia, que es un sólo cabello, puesto deliberadamente en el campo de visión para mostrar a qué se parecería un material birrefringente en estas condiciones óptica/fotográficas. El contraste muestra claramente que el material de esta invención no es birrefringente. Tampoco había birrefringencia cuando la muestra se cortó entre vidrio y cubreobjetos, mostrando que no hay L3 presente. Además, cuando se centrifugó la muestra, no parecía tener algún signo de un L3 por separado en la muestra centrifugada, más bien pareció ser simplemente una mezcla de fase cúbica más disolución acuosa en exceso.

Ejemplo 3. Se combinó propofol, en la cantidad de 0,57 gramos, con 0,78 g de agua estéril y 1,65 g de Pluronic P123 (en el que la fracción en peso de cadenas de polioxietileno es del 30%), trabajando en una campana de flujo laminar. Después de mezclar esto para formar una fase cúbica inversa, se disolvieron 0,105 g de desoxicolato de sodio en 40 ml de agua estéril. Entonces se dispersó una cantidad de 2,1 g de la fase cúbica en los 40 ml de disolución, usando en primer lugar el homogeneizador Brinkmann, usando entonces el microfluidizador de Microfluidics durante un total de 15 minutos de microfluidización a alta presión. La dispersión, denominada posteriormente en lo sucesivo "Lyotropic/PF4" se filtró con un filtro de jeringa de 0,8 micras antes de usar las pruebas con animales descritas en el ejemplo 4 a continuación. Análisis DELSA mostró una distribución de potencial zeta unimodal centrada en aproximadamente -36 mV.

Ejemplo 4. En este ejemplo, se dosificaron a ratas las formulaciones notificadas anteriormente en el ejemplos 2 y 3, y se encontró que estas formulaciones funcionaban mejor que una formulación de propofol a base de emulsión, comercializada actualmente, produciendo una vuelta más rápida a la consciencia normal después de la anestesia, en contraposición con la vuelta más lenta observada para la marca comercializada. A un total de 18 ratas Sprague Dawley se les administró Lyotropic/PF1, Lyotropic/PF4 o Propofol® (la formulación de propofol disponible comercialmente) mediante la vena lateral de la cola una vez a niveles de dosis que oscilaban desde 0,5 hasta 12 mg/kg en un modo de arriba a abajo. Se alojaron las ratas en jaulas de acero inoxidable con suelos de tela metálica suspendidos sobre bandejas alineadas e identificadas por un número único marcado en su cola con tinta indeleble además de una tarjeta de jaula inscrita con el número del animal, número de estudio, número de grupo y nivel de dosis codificado por colores. Se mantuvieron los animales en un sala de animales de temperatura aislada (16-23°C) y humedad (53%-71%) controlada con un suministro de aire filtrado (10-15 cambios de aire/hora) e iluminación en ciclos (12 horas diarias). Dieta para roedores certificada (5002) de PMI y agua del grifo sometida a prueba estuvieron disponibles a voluntad. Se ocultó la comida durante la noche antes de la dosificación. Se aclimataron las ratas usadas en este estudio a las condiciones de laboratorio durante al menos 5 días antes de la iniciación de la fase con animales. Se seleccionaron las ratas basándose en el peso corporal y el aspecto general antes de la prueba y se asignaron al azar a los siguientes grupos:

| Número de grupo | Artículo de prueba | Dosis mg/kg | Conc. de dosis mg/ml | N.º de ratas/nivel de dosis |
|-----------------|--------------------|-----------------|----------------------|-----------------------------|
| CBF1 | Lytropic/PF1 | 0,5, 1, 2, 4, 8 | 1 ó 10* | 2 |
| CBF3 | Propoflo® | 4, 8 | 10 | 2 |
| CBF4 | Lytropic/PF4 | 2, 4, 8 | 10 | 2 |

*Para las ratas a las que se les dosificó 0,5, 1 y 2 mg/ml, se diluyó el artículo de prueba con agua estéril para inyección para una concentración de dosis final de 1 mg/ml. La concentración de dosis final para las ratas a las que se les dosificó 4 y 8 mg/ml era de 10 mg/ml.

5 Se obtuvieron los pesos corporales justo antes de la administración de la dosis y se usaron como la base para la dosificación. Se observaron los animales inmediatamente después de la dosis y de manera continua durante 30 minutos, y de nuevo aproximadamente a las 1, 2 y 24 horas tras la dosis para determinar la salud general, el aspecto físico y para detectar señales de efecto clínico, incluyendo cambios de conducta. Los parámetros para la evaluación incluyeron observaciones tras la dosis y observaciones macroscópicas en la necropsia.

10 No se produjo mortalidad durante el periodo de observación tras la dosis de 24 horas. Los signos relevantes de efecto incluyeron ataxia, estado comatoso, actividad disminuida, y entrecerrado de párpado(s), que estuvieron todos resueltos en 24 horas tras la dosificación. En la mayoría de los casos, el tiempo del estado comatoso fue rápido tras la inyección intravenosa y generalmente aumentó de una manera dependiente de la dosis. Las observaciones macroscópicas de la necropsia no revelaron hallazgos notables. En particular, no se encontraron signos de émbolos pulmonar en ninguno de los animales de prueba, incluyendo aquellos tratados con las formulaciones de dispersión de fase cúbica.

15 De manera significativa, a los animales a los que se les dosificó Lyotropic/PF1 parecieron, para un observador entrenado en anestesiología, salir del coma con mayor claridad y "lucidez" que los animales a los que se les dosificó Propoflo®. Sin desear limitarse por la teoría, se cree que esto se debió a la integración del vehículo de fase cúbica inversa no recubierta con estructuras de biomembrana en el cuerpo, dando como resultado la eliminación del vehículo como un "depósito", o reservorio, para el fármaco. En comparación, se cree que la formulación de emulsión comercializada experimenta efectos debidos a un efecto de reservorio prolongado de las gotas de aceite.

20 Los registros de peso corporal y dosificación (tabla 1), signos clínicos tras la dosis individual (tabla 2) y tiempo de estado comatoso (tabla 3) se facilitan a continuación.

Tabla 1: Registros de peso corporal y dosificación

| Lytropic/PF1 | | | | |
|-------------------------|-------------------|---------------|--------------------------------|--------------------------|
| Prefijo n.º animal: CBF | Peso corporal (g) | Dosis (mg/kg) | Concentración de dosis (mg/ml) | Volumen de dosis (ml/kg) |
| 1M1 | 259,2 | 0,5 | 1 | 0,5 |
| 1F17 | 222,5 | 0,5 | 1 | 0,5 |
| 1M5 | 265,5 | 1 | 1 | 1 |
| 1F21 | 221,1 | 1 | 1 | 1 |
| 1M9 | 265,4 | 2 | 1 | 2 |
| 1F25 | 231,9 | 2 | 1 | 2 |
| 1M13 | 273,1 | 4 | 10 | 0,4 |
| 1F29 | 235,8 | 4 | 10 | 0,4 |
| 1M33 | 299,1 | 8 | 10 | 0,8 |
| 1F34 | 203,2 | 8 | 10 | 0,8 |
| Propoflo® | | | | |

| Prefijo n.º animal: CBF | Peso corporal (g) | Dosis (mg/kg) | Concentración de dosis (mg/ml) | Volumen de dosis (ml/kg) |
|-------------------------|-------------------|---------------|--------------------------------|--------------------------|
| 3M3 | 237,7 | 4 | 10 | 0,4 |
| 3F19 | 220,1 | 4 | 10 | 0,4 |
| 3M7 | 253,8 | 8 | 10 | 0,8 |
| 3F23 | 222,5 | 8 | 10 | 0,8 |
| Lyotropic/PF4 | | | | |
| Prefijo n.º animal: CBF | Peso corporal (g) | Dosis (mg/kg) | Concentración de dosis (mg/ml) | Volumen de dosis (ml/kg) |
| 4M12 | 275,3 | 2 | 10 | 0,2 |
| 4F28 | 229,2 | 2 | 10 | 0,2 |
| 4M16 | 271,8 | 4 | 10 | 0,4 |
| 4F32 | 242,0 | 4 | 10 | 0,4 |
| 4M35 | 283,3 | 8 | 10 | 0,8 |
| 4F36 | 215,3 | 8 | 10 | 0,8 |

Tabla 2: Signos clínicos tras la dosis individual

| Prefijo n.º animal: CBF | Artículo de prueba | Dosis (mg/kg) | 0-30 tras la dosificación | 1 hora tras la dosificación | 2 horas tras la dosificación | 24 horas tras la dosificación |
|-------------------------|--------------------|---------------|---------------------------|-----------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| 1M1 | Lyotropic/PF1 | 0,5 | AD, EP | NN | NN | NN |
| 1F17 | Lyotropic/PF1 | 0,5 | AD, EP | NN | NN | NN |
| 1M5 | Lyotropic/PF1 | 1 | AD | NN | NN | NN |
| 1F21 | Lyotropic/PF1 | 1 | AD | NN | NN | NN |
| 1M9 | Lyotropic/PF1 | 2 | AD | NN | NN | NN |
| 1F25 | Lyotropic/PF1 | 2 | AD | NN | NN | NN |
| 1M13 | Lyotropic/PF1 | 4 | CT, AD | NN | NN | NN |
| 1F29 | Lyotropic/PF1 | 4 | CT, AD | NN | NN | NN |
| 1M33 | Lyotropic/PF1 | 8 | AT, CT | NN | NN | NN |
| 1F34 | Lyotropic/PF1 | 8 | AT, CT | NN | NN | NN |
| 3M3 | Propoflo® | 4 | AT | NN | NN | NN |
| 3F19 | Propoflo® | 4 | AT, CT | NN | NN | NN |
| 3M7 | Propoflo® | 8 | AT, CT | NN | NN | NN |
| 3F23 | Propoflo® | 8 | AT, CT | NN | NN | NN |
| 4M12 | Lyotropic/PF4 | 2 | AD | NN | NN | NN |
| 4F28 | Lyotropic/PF4 | 2 | AD | NN | NN | NN |
| 4M16 | Lyotropic/PF4 | 4 | AT, AD | AD | NN | NN |

| | | | | | | |
|------|---------------|---|------------|----|----|----|
| 4F32 | Lyotropic/PF4 | 4 | AT, CT | NN | NN | NN |
| 4M35 | Lyotropic/PF4 | 8 | AT, CT, AD | NN | NN | NN |
| 4F36 | Lyotropic/PF4 | 8 | AT, CT | NN | NN | NN |

Explicación de las observaciones: AT = ataxia

CT = estado comatoso

AD = actividad disminuida

EP = entrecerrado de párpado(s)

NA = no aplicable

NN = no notable

*Justo antes de la necropsia

Tabla 3: Duración del estado comatoso

| Prefijo n.º animal: CBF | Artículo de prueba | Dosis (mg/kg) | Tiempo de estado comatoso (min) |
|----------------------------|--------------------|---------------|------------------------------------|
| 1M13 | Lyotropic/PF1 | 4 | 3 |
| 1F29 | Lyotropic/PF1 | 4 | 4 |
| 1M33 | Lyotropic/PF1 | 8 | 4,5 |
| 1F34 | Lyotropic/PF1 | 8 | 5,5 |
| | | | |
| 3F19 | Propoflo® | 4 | 1 |
| 3M7 | Propoflo® | 8 | 5 |
| 3F23 | Propoflo® | 8 | 5,5 |
| | | | |
| 4M35 | Lyotropic/PF4 | 8 | 4 |
| 4F36 | Lyotropic/PF4 | 8 | 8 |
| 4F32 | Lyotropic/PF4 | 4 | 2 |

5 **Ejemplo 5.** Se preparó una fase líquido-cristalina cúbica inversa mezclando meticulosamente 0,962 g de propofol, 0,706 g de agua y 1,329 g de fosfatidilcolina de soja (de lípidos polares Avanti). Se puso una cantidad de 1,002 g de esta fase cúbica en un vaso de precipitados de 100 ml que contenía 20 ml de docusato de sodio acuoso (Aerosol OT), en el que la razón de docusato con respecto a fase cúbica era de 0,06:1. Se homogeneizó la mezcla a alta velocidad durante 45 segundos, entonces se microfluidizó durante 6 minutos, produciendo una dispersión fina, con una población submicrométrica sustancial. Esto se analizó con el instrumento DELSA y se encontró que tenía un potencial zeta promedio de aproximadamente -67 mV, tal como se muestra en la figura 6. Debe observarse que en las condiciones (en particular, de pH) usadas, la fase cúbica de fosfatidilcolina/propofol/agua estaría, como en los ejemplos anteriores, sustancialmente sin carga, de manera que se requiere el docusato para lograr una dispersión de partículas de fase cúbica de carga estabilizada. En efecto, es imposible dispersar esta fase cúbica sin el uso de un compuesto cargado, desasociado a bicapa incluso a las mayores velocidades de cizallamiento posibles con esta instrumentación. Rápidamente después de cualquier intento, sin importar cómo de enérgico, para dispersar esta fase cúbica, el material de fase cúbica se aglomera de vuelta en agrupaciones macroscópicas. Todos los componentes (excepto el fármaco) en esta formulación están en la lista de la FDA de excipientes aprobados para productos inyectables.

15 **Ejemplo 6.** Se dispersaron otros 1,002 g de la fase cúbica del ejemplo 5 en 20 ml de una disolución de cloruro de benzalconio usando la misma metodología que en el ejemplo 5. Se midió entonces el potencial zeta promedio y se encontró que era de aproximadamente +74 mV, tal como se muestra en la figura 7.

Ejemplo 7. El anestésico local bupivacaína, en su forma de base libre, y en la cantidad de 0,176 g, se combinó con 0,700 g de linalool, 0,333 g de aceite de sándalo, 1,150 g de agua y 2,65 g del tensioactivo Pluronic L122. La fase cúbica resultante se compone por tanto de excipientes de toxicidad muy baja; incluso el aceite de sándalo ha mostrado ser de baja toxicidad por vías inyectables (aunque no está aprobado en sentido estricto para su uso en productos inyectables). Usando la metodología de los ejemplos anteriores, se dispersó esta fase cúbica usando docusato de sodio (a una razón de 0,06:1), y se tomó la medición del potencial zeta. La figura 8 muestra el resultado, que indica una distribución centrada alrededor de -64 mV, y casi todas las partículas más negativas que -30 mV.

Ejemplo 8. Se dispersó la fase cúbica del ejemplo 7, usando métodos físicos similares, usando el tensioactivo catiónico cloruro de benzalconio. La distribución de potencial zeta resultante, mostrada en la figura 9, estaba centrada alrededor de +55 mV, para la dispersión de partículas de carga estabilizada.

Ejemplo 9. Se preparó una fase cúbica que contenía el agente activo vitamina E mezclando 1,12 g de vitamina E (alfa-tocoferol), 1,593 g de fosfatidilcolina de soja y 0,788 g de agua. Esto se dispersó usando cloruro de benzalconio, y se registró un promedio de potencial zeta de aproximadamente +70 mV.

Ejemplo 10. Se agitó vigorosamente la misma fase cúbica que en el ejemplo 9 junto con una décima parte de su peso en dantroleno sódico, un relajante de músculo esquelético. Esto se dispersó entonces en cloruro de benzalconio acuoso, con una razón 20:1 de agua con respecto a fase cúbica, y una razón 0,06:1 de tensioactivo con respecto a fase cúbica. Esto se homogeneizó a alta velocidad durante 3 minutos.

Potencial zeta es particularmente significativo en este caso, puesto que el fármaco es aniónico, mientras que la fase cúbica dispersa (como en el ejemplo 9) es catiónica. Por tanto, si está presentedantroleno "libre" entonces aparecerá un pico con un potencial zeta negativo, junto con el pico de las partículas estabilizadas de manera catiónica, indicando que no se han producido partículas de esta invención.

De hecho, se analizó la dispersión de color intenso (por el dantroleno sódico) con el DELSA, y no se encontró ningún pico a potencial zeta negativo. La figura 10 muestra el análisis, con un único pico (en los cuatro ángulos) centrado en +72 mV. Por tanto, se produjeron en efecto partículas de la presente invención, con cristales de tamaño nanométrico del relajante de músculo esquelético escasamente soluble estabilizados al estar incluidos en una partícula de fase cúbica estabilizada de manera catiónica de la presente invención.

Se hizo un intento de dispersar dantroleno sódico con sólo el cloruro de benzalconio, sin usar la fase cúbica o cualquier otro cristal líquido, con el fin de evaluar la importancia de la fase cúbica en este ejemplo. Por tanto, se disolvió dantroleno sódico en la fase acuosa a la misma concentración, lo que dio como resultado una razón 0,06:1 de tensioactivo con respecto a dantroleno sódico, y se aplicó el mismo protocolo de homogeneización. La medición DELSA, mostrada en la figura 11, muestra claramente un potencial zeta mucho menor que en el caso en el que se usó la fase cúbica. Esta carga enormemente aumentada en el caso de la partícula de fase cúbica está probablemente relacionada con la carga de benzalconio mucho mayor posible con la fase cúbica (tal como se expresa en la superficie de partícula) en comparación con la superficie de dantroleno sódico.

El dantroleno sódico se usa actualmente en el tratamiento de hipertermia maligna, una situación de crisis, potencialmente mortal. La formulación comercializada actualmente debe reconstituir un vial cada vez, requiriéndose hasta 36 viales para un único tratamiento. Se han notificado muertes de pacientes causadas por el médico que no pudo reconstituir e inyectar estos muchos viales durante la crisis MH creciente. La presente invención puede proporcionar medios mediante los cuales podría inyectarse una dispersión concentrada, estable del fármaco en lugar de la formulación actual. Aunque están disponibles otros métodos de estabilización de nanocristales de compuestos tales como dantroleno, la presente invención puede tener ventajas sobre éstos en casos en los que las propiedades de potenciación de la absorción de la presente invención son deseables. Todos los componentes de esta formulación son farmacéuticamente aceptables para inyección intravenosa.

Ejemplo 11. Se dispersó una cantidad de 0,999 gramos de la fase cúbica L122/propofol/agua usada en el ejemplo 1 en una disolución de dodecilsulfato de sodio (SDS), a una razón de SDS:fase cúbica de 0,06:1. Esto produjo una dispersión estable de micropartículas con un potencial zeta centrado a aproximadamente -63 mV, tal como se muestra en la figura 12. SDS no es sólo un tensioactivo de muy baja toxicidad, que está aprobado para su uso en productos inyectables, sino que también es uno de los tensioactivos disponibles más estudiado y caracterizado, sino el que más.

Ejemplo 12. El fármaco antineoplásico paclitaxel, en la cantidad de 40 mg, se combinó con 0,372 g de aceite de sándalo y 0,725 g de aldehído de fresa, entonces se calentó para disolver el paclitaxel. Esto se combinó entonces con 1,855 g de Pluronic L122 (HLB=4) y 0,905 g de agua, y se mezcló para formar una fase cúbica inversa. Esto se dispersó entonces en una disolución acuosa de docusato de sodio en una razón de docusato:fase cúbica de 0,06:1, homogeneizando a alta velocidad durante 30 segundos, entonces se microfluidizó durante 1,5 minutos, y finalmente se centrifugó durante 5 minutos en una centrífuga de mesa a aproximadamente 5.000 rpm. El análisis DELSA (usando una corriente de 0,18 mA, y un desplazamiento de frecuencia de 500 Hz) indicó entonces una distribución de potencial zeta centrado alrededor de -53 mV, tal como se muestra en la figura 13. Esta formulación de paclitaxel libre de Cremophor

podría ser bastante adecuada para varias vías de administración, incluyendo instilación vesical, intraperitoneal, oral, o posiblemente mediante inyección.

5 **Ejemplo 13.** Se preparó en primer lugar una fase cúbica inversa que contenía anestésico propofol mezclando 0,9501 gramos de propofol (obtenido de Albemarle Corporation), 1,2970 g de agua destilada y 2,7575 g del tensioactivo Pluronic P-123 (un tensioactivo de poloxámero obtenido de BASF Corporation). Después de un mezclado meticuloso, se comprobó la composición para asegurarse de que tenía alta viscosidad y era ópticamente isotrópica. Se cargó entonces en una jeringa desechable de 10 ml para facilitar la pesada de una muestra de 1 g . En otro vaso de precipitados, se disolvieron 0,3192 g de Aerosol OT (AOT, también denominado docusato de sodio) en 100 ml de agua destilada. Se puso una varilla de agitación en el vaso de precipitados y se agitó la disolución durante 1 hora usando un aparato Fischer Thermix modelo 210T. Se añadió entonces una cantidad de 1,0199 g de la fase cúbica a la disolución de AOT y agua en una cantidad equivalente a 0,0638 g de AOT y 20,0 g de agua destilada. Esto dio como resultado una razón de tensioactivo con respecto a fase cúbica de 0,06:1 y una razón de agua destilada con respecto a fase cúbica de 20:1. Se homogeneizó la mezcla usando un homogeneizador Brinkman PT 10/35 en modo alto durante 20 segundos. La dispersión homogeneizada se microfluidizó entonces con un aparato M110L de Microfluidics durante 3 ejecuciones, cada una de las cuales duró 30 segundos. Después, se recogió la dispersión en un tubo de ensayo y se centrifugó durante 2 minutos usando una centrífuga de mesa. La dispersión se visualizó bajo un microscopio Olympus BHC para comprobar el tamaño y el aspecto de partícula.

20 Se analizó entonces la dispersión usando el aparato DELSA 440SX de Beckmann-Coulter para análisis de dispersión de luz por electroforesis Doppler, con las movilidades electroforéticas convertidas en potenciales zeta mediante las ecuaciones convencionales, tal como se observa en la figura 14. Se notificaron cuatro ángulos de medición de dispersión, con la distribución en cada caso centrada alrededor de menos 39 mV. Este análisis de movilidad electroforética se ejecutó a un desplazamiento de frecuencia, de acuerdo con la metodología DELSA de Beckmann-Coulter, de 500 Hz, con un tiempo de ejecución de 180 segundos. El docusato aparece en la Guía de Principios Inactivos de la FDA de 1996 como aprobable para su uso en productos inyectables.

25 **Ejemplo 14.** Usando métodos similares a los empleados en la preparación del ejemplo 13, se añadió una cantidad de 1,0135 gramos de la fase cúbica idéntica a la del ejemplo 13 a un equivalente de 0,0638 g de dodecilsulfato de sodio (SDS) (obtenido de EM Science Corporation) y 20,0 g de agua destilada tal como se describió en el ejemplo 13.

30 De nuevo, usando métodos similares al ejemplo 13, la dispersión se homogeneizó, se microfluidizó y se analizó bajo el microscopio. Se encontró que el potencial zeta era de menos 41 mV, tal como se midió desde cuatro ángulos a 500 Hz durante 180 segundos. Debe observarse que se ha usado SDS en el producto farmacéutico inyectable Proleukin.

35 **Ejemplo 15.** De nuevo, usando métodos similares a los empleados en el ejemplo 13, se añadió una cantidad de 1,0001 gramos de la fase cúbica idéntica a la del ejemplo 13 a un equivalente de 0,0638 g de cloruro de benzalconio (obtenido de Sigma Corporation) y 20,0 g de agua destilada tal como se describió en el ejemplo 13. Se ha usado cloruro de benzalconio en el producto inyectable Celestrone Soluspan.

Siguiendo los métodos descritos en el ejemplo 13, la dispersión se homogeneizó, se microfluidizó y se analizó bajo el microscopio. Se encontró que el potencial zeta para esta dispersión era de 36 mV y por tanto indicaba estabilidad de carga. Se ejecutó a 500 Hz durante 180 segundos desde cuatro ángulos de dispersión diferentes.

40 **Ejemplo 16.** En este caso se usaron los mismos métodos que se usaron para el ejemplo anterior para preparar una fase cúbica similar excepto que se usaron 0,9520 gramos de Pluronic L-122 en lugar de los 0,9501 g de Pluronic 123. Se añadió entonces una cantidad de 0,9989 g de la fase cúbica a 0,0638 g de cloruro de benzalconio (obtenido de Sigma Corporation) y 20,0 g de agua destilada.

45 Se usaron métodos similares a los utilizados en el ejemplo 13 para microfluidizar, homogeneizar y analizar la dispersión bajo el microscopio. El potencial zeta de la dispersión, tomado en cuatro ángulos diferentes y ejecutado a 500 Hz durante 180 segundos, promedió +47 mV, lo que indicó estabilidad de carga de acuerdo con la presente invención.

50 **Ejemplo 17.** Este ejemplo ilustra el método de producción tratado anteriormente, en el que se preparó y dispersó una fase líquida de baja viscosidad precursora de la fase líquido-cristalina inversa, y las partículas se convirtieron en la fase líquido-cristalina tras el contacto con agua. Se preparó en primer lugar una fase L2 mezclando 2,2009 gramos de propofol, 1,9883 gramos de alfa-tocoferol y 12,0964 gramos del tensioactivo de poloxámero Ethox L-122 en un tubo de ensayo de 50 ml y agitando con vórtex hasta que estuvo todo en una fase. La fase L2 líquida que se formó era transparente pero amarilla y de baja viscosidad. En un vaso de precipitados de 150 ml, se pusieron 0,9032 gramos de ácido desoxicólico de sodio, 2,0017 gramos de glicina, 70 ml de agua destilada y 13,345 gramos de la fase L2. Esto se homogeneizó hasta que el material se dispersó. Bajo observación en contraste de interferencia diferencial (DIC) en un microscopio Polyvar de Reichert-Jung, fue evidente que la fase L2 se había convertido en una fase cúbica viscosa y rígida, con partículas angulares de forma irregular en contraposición con gotas líquidas que son generalmente bastante redondas. Esto se homogeneizó entonces adicionalmente durante 60 minutos más, y el tamaño de partícula entonces fue lo suficientemente pequeño como para que el material pudiera filtrarse fácilmente a través de un filtro de

0,22 micras. La distribución de potencial zeta medida tal como se describió anteriormente fue unimodal y centrada en aproximadamente -34 mV.

5 **Ejemplo 18.** Se prepararon cuatro fases cúbicas inversas con propofol (Albemarle Corporation), alfa-tocoferol (vitamina E, de Aldrich Chemical Company), agua destilada y Pluronic L122 (Ethox Corporation). Se combinaron el propofol y la vitamina E en diversas razones en peso hasta un 19% total, el agua se mantuvo constante al 26% y el Pluronic L-122 al 55%. Se combinaron los componentes en tubos de ensayo de 8 ml y se mezclaron meticulosamente hasta ser ópticamente isotrópicos y de alta viscosidad. Se preparó un total de tres gramos de cada una de las siguientes composiciones (todos los pesos figuran en la lista en gramos):

| | 10% de propofol | 13% de propofol | 16% de propofol | 19% de propofol |
|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Propofol | 0,302 | 0,388 | 0,478 | 0,570 |
| Vitamina E | 0,273 | 0,189 | 0,105 | 0 |
| Agua destilada | 0,777 | 0,792 | 0,786 | 0,784 |
| Pluronic L122 | 1,657 | 1,649 | 1,658 | 1,647 |

10 Se extendió una capa delgada de cada fase cúbica inversa sobre la pared interior de cuatro tubos de ensayo, y se añadió una cantidad apropiada de solvente (o bien agua destilada o bien disolución al 2,2% de glicina, esta última preparada añadiendo 48,9 ml de agua destilada a 1,1 g de glicina, Spectrum Chemical Company) a cada tubo para obtener una concentración de propofol global del 1% o del 2%. Por tanto, resultaron las dieciséis combinaciones siguientes:

| | Concentración de propofol global del 1% | | | | |
|-----------------|---|-------------------|--|------|------|
| | Q | Disol. de glicina | | Q | agua |
| 10% de propofol | 0,51 | 4,50 | | 0,51 | 4,50 |
| 13% de propofol | 0,41 | 4,65 | | 0,41 | 4,65 |
| 16% de propofol | 0,32 | 4,69 | | 0,31 | 4,71 |
| 19% de propofol | 0,29 | 4,72 | | 0,28 | 4,73 |
| | Concentración de propofol global del 2% | | | | |
| | Q | Disol. de glicina | | Q | agua |
| 10% de propofol | 1,01 | 4,08 | | 1,01 | 4,06 |
| 13% de propofol | 0,77 | 4,32 | | 0,78 | 4,28 |
| 16% de propofol | 0,62 | 4,38 | | 0,60 | 4,42 |
| 19% de propofol | 0,53 | 4,48 | | 0,55 | 4,48 |

15 Se permitió que se asentara cada tubo durante la noche a temperatura ambiente (aproximadamente 23 grados centígrados), tiempo durante el cual las fases cúbicas inversas rodeadas por agua se volvieron blancas opacas, mientras que las fases cúbicas inversas rodeadas por glicina permanecieron claras y transparentes. Se invirtió entonces cada tubo dos veces, y el contenido líquido se transfirió a matraces volumétricos de 50 ml separados y se enrasaron con fase móvil (50% de acetonitrilo, 40% de agua, 10% de metanol, 0,5% de ácido fosfórico, todos disolventes de calidad para HPLC). Se mezclaron meticulosamente las muestras y se transfirió una porción de cada una a viales de HPLC separados. Se preparó una disolución patrón disolviendo 59,4 mg de reactivo propofol en 100 ml de fase móvil, mezclando bien, y transfiriendo a viales. Se preparó una disolución de comprobación para el patrón de la misma manera, usando 52,1 mg de propofol.

25 Se analizaron los patrones y las muestras en un sistema HPLC SCL-10A VP de Shimadzu con las siguientes condiciones cromatográficas: columna C18 Phenomenex Luna de 25 cm x 4,6 mm, velocidad de flujo isocrática de 2,0

ml/minuto, volumen de inyección de 20 ul, duración de ejecución de 14 minutos (elución de propofol a los 12 minutos), y detección UV a 270 nm.

El sistema demostró ser adecuado para la cuantificación con una desviación patrón relativa inferior al 0,5% de cinco inyecciones reproducidas de la disolución patrón y todas las inyecciones de patrón posteriores. Además, el patrón de comprobación se sometió a ensayo al 100% de la disolución patrón.

Se calculó la concentración de propofol en la fase acuosa con la siguiente ecuación:

$$\left(\frac{\text{área de pico de la muestra}}{\text{área de pico del patrón promedio}} \right) \times \left(\frac{\text{conc. de disol. patrón} \left(\frac{59,4 \text{ mg}}{100 \text{ ml}} \right)}{\frac{\text{volumen de disolución acuosa}}{\text{matraz volumétrico de 50 ml}}} \right) \times 100 = \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \text{ propofol}$$

Se representaron gráficamente estos datos como microgramos/ml de propofol en la fase acuosa frente al porcentaje de propofol en la fase cúbica. El valor para el 13% de propofol en la fase cúbica al 1% con glicina es claramente un valor atípico.

| % propofol en Q | 1% (glicina) | 2% (glicina) | 1% (agua) | 2% (agua) |
|-----------------|--------------|--------------|-----------|-----------|
| 10 | 18,6 | 19,3 | 25,1 | 19,5 |
| 13 | (34,9) | 25 | 29,6 | 28,8 |
| 16 | 30,1 | 29,3 | 39,1 | 34,2 |
| 19 | 35,5 | 35,9 | 46,9 | 45,6 |

Este ejemplo muestra por tanto que el nivel de propofol acuoso puede reducirse sustancialmente mediante el uso de diluyente de alto coeficiente de partición (Kow alto) tal como se describió anteriormente, así como muestra el resultado sorprendente de que el uso de glicina no sólo puede reducir el nivel de fármaco acuoso, sino que también mejora la compatibilidad de la fase cúbica inversa con la fase acuosa, tal como se manifiesta por la transparencia de las muestras de glicina en contraposición con las muestras sin glicina que mostraron una turbidez importante en la fase cúbica.

Ejemplo 19. En este ejemplo, se les dosificó a perros la formulación notificada en el ejemplo 1 anteriormente, y se encontró que esta formulación funcionaba tan bien como, y de manera similar a, una formulación de propofol basada en emulsión, comercializada actualmente, Propoflo®. La formulación de fase cúbica, sin embargo, ofrece las ventajas de estar esencialmente libre de componentes que fomentan el crecimiento microbiano.

En 3 días consecutivos, se dosificó a seis perros Beagle (de aproximadamente 1,5-3,5 años de edad) Propoflo® (una formulación de propofol disponible comercialmente) y Lyotropic PF1 en un diseño cruzado de 3 vías. Los perros estuvieron en un programa de alimentación controlada, recibiendo aproximadamente 500 gramos de dieta canina certificada (5507) durante aproximadamente 7 días antes de la iniciación de la dosificación. Se ocultó la comida durante la noche antes de cada sesión de dosificación. Se pensó que los niveles de contaminantes que se sabía que estaban presentes en el pienso y el agua no podrían interferir en este estudio. Se aclimataron los adultos jóvenes usados en este estudio a las condiciones de laboratorio durante al menos 14 días antes de la iniciación de la fase con animales. Se seleccionaron seis perros basándose en el aspecto general y se designaron a los siguientes grupos:

| Número de grupo | Artículo de prueba | Dosis mg/kg | Concentración de dosis mg/ml | N.º de animales |
|-----------------|--------------------|-------------|------------------------------|-----------------|
| CBG1 | Lyotropic PF1 | 6,0 | 10 | 2 |
| CBG3 | Propoflo | 6,0 | 10 | 2 |

Se almacenaron los artículos de prueba de dispersión de fase cúbica (Lyocell ®) de la presente invención a aproximadamente 2-8C y protegidos de la luz. Se obtuvo Propoflo® de Abbott Laboratories y se almacenó a temperatura ambiente. Se obtuvieron los pesos corporales justo antes de la administración de la dosis y se usaron como base para la dosificación. Se realizaron observaciones clínicas para determinar la mortalidad y el aspecto general al menos dos veces al día tras la administración de la dosis. Los parámetros para la evaluación incluyeron observaciones tras la dosificación. Todos los animales estuvieron constantemente atendidos desde la inducción de anestesia hasta el

despertar (es decir, erguirse sobre las cuatro patas). Se registraron para cada perro la duración de tiempo desde la inyección (de inicio a fin; aproximadamente 30 segundos) hasta la inducción, tiempo hasta el despertar y tiempo para erguirse sobre las cuatro patas). Se monitorizaron los animales de manera continua para evaluar el nivel de anestesia usando el tono mandibular, reflejos palpebral y flexor.

5 No se produjo mortalidad durante los periodos de dosificación o tras la dosificación. Las alteraciones o características de respiración relevantes incluyeron la aparición de respiración irregular, apnea, disnea y regurgitación leve (sólo en 2 perros). Sin embargo, ninguna de estas alteraciones podría considerarse que sea específica del artículo de prueba puesto que todos estos se produjeron a una frecuencia igual con los tres artículos de prueba. Después del inicio de la inyección, la inducción de anestesia se produjo en el plazo de 1 minuto después del inicio de la inyección y podría describirse como una inducción sin complicaciones independientemente del artículo de prueba. En la mayoría de casos, los perros a los que se les inyectaron las preparaciones de fase cúbica se comportaron de manera similar (es decir, características de respiración, acontecimientos reflejos y observaciones tras la dosificación) a aquellos a los que se les inyectó la preparación Propofol® disponible comercialmente.

Registros de peso corporal individual y dosificación

| Día 1 | | | | | | |
|-------------------------|-------------|--------------------|--------------------|---------------|--------------------------------|-----------------------|
| Prefijo n.º animal: CBG | Número USDA | Artículo de prueba | Peso corporal (kg) | Dosis (mg/kg) | Concentración de dosis (mg/ml) | Volumen de dosis (ml) |
| 1M1 | 3643590 | PF1 | 19,80 | 6 | 10 | 11,9 |
| 1F2 | 4220196 | PF1 | 7,60 | 6 | 10 | 4,6 |
| 3M5 | 3645771 | Propofol | 12,60 | 6 | 10 | 7,6 |
| 3F6 | 4119177 | Propofol | 10,05 | 6 | 10 | 6,1 |
| Día 2 | | | | | | |
| Prefijo n.º animal: CBG | Número USDA | Artículo de prueba | Peso corporal (kg) | Dosis (mg/kg) | Concentración de dosis (mg/ml) | Volumen de dosis (ml) |
| 2M3 | 3771687 | Propofol | 15,25 | 6 | 10 | 9,2 |
| 2F4 | 4121538 | Propofol | 9,10 | 6 | 10 | 5,5 |
| 3M5 | 3645771 | PF1 | 12,25 | 6 | 10 | 7,4 |
| 3F6 | 4119177 | PF1 | 10,15 | 6 | 10 | 6,1 |
| Día 3 | | | | | | |
| Prefijo n.º animal: CBG | Número USDA | Artículo de prueba | Peso corporal (kg) | Dosis (mg/kg) | Concentración de dosis (mg/ml) | Volumen de dosis (ml) |
| 1M1 | 3643590 | Propofol | 19,85 | 6 | 10 | 12,0 |
| 1F2 | 4220196 | Propofol | 7,55 | 6 | 10 | 4,6 |
| 2M3 | 3771687 | PF1 | 15,25 | 6 | 10 | 9,2 |
| 2F4 | 4121538 | PF1 | 9,00 | 6 | 10 | 5,4 |

Frecuencia cardiaca individual tras la dosis

| Día 1 | | | |
|-------------------------|-------------|--------------------|---------------------------|
| Prefijo n.º animal: CBG | Número USDA | Artículo de prueba | Frecuencia cardiaca (LPM) |
| 1F1 | 3643590 | PF1 | 90 |
| 1F2 | 4220196 | PF1 | 120 |
| 3M5 | 3645771 | Propofol | 126 |

| | | | |
|-----|---------|----------|----|
| 3F6 | 4119177 | Propoflo | 90 |
|-----|---------|----------|----|

| Día 2 | | | |
|-------------------------|-------------|--------------------|---------------------------|
| Prefijo n.º animal: CBG | Número USDA | Artículo de prueba | Frecuencia cardíaca (LPM) |
| 1M1 | 3643590 | PF1 | 90 |
| 1F2 | 4220196 | PF1 | 120 |
| 3M5 | 3645771 | Propoflo | 120 |
| 3F6 | 4119177 | Propoflo | 90 |

| Día 3 | | | |
|-------------------------|-------------|--------------------|---------------------------|
| Prefijo n.º animal: CBG | Número USDA | Artículo de prueba | Frecuencia cardíaca (LPM) |
| 1M1 | 3643590 | Propoflo | 102 |
| 1F2 | 4220196 | Propoflo | 60 |
| 2M3 | 3771687 | PF1 | 76 |
| 2F4 | 4121538 | PF1 | 102 |

Características de respiración individual tras la dosis

| Día 1 | | | |
|-------------------------|-------------|--------------------|---|
| Prefijo n.º animal: CBG | Número USDA | Artículo de prueba | Características de respiración |
| 1M1 | 3643590 | PF1 | Respiración irregular, inicialmente rápida; luego regular |
| 1F2* | 4220196 | PF1 | Periodo de dipnea, respiración irregular, apnea |
| 3M5 | 3645771 | Propoflo | Respiración regular en todo el episodio |
| 3F6 | 4119177 | Propoflo | Respiración regular con apnea esporádica |

*Se observó regurgitación aproximadamente a los 2 minutos tras la inyección.

| Día 2 | | | |
|-------------------------|-------------|--------------------|---|
| Prefijo n.º animal: CBG | Número USDA | Artículo de prueba | Características de respiración |
| 2M3 | 3771687 | Propoflo | Respiración regular en todo el episodio |
| 2F4 | 4121538 | Propoflo | Periodo inicial de apnea |
| 3M5* | 3645771 | PF1 | Respiración irregular seguida por apnea. Respiración regular durante el resto del episodio. |
| 3F6 | 4119177 | PF1 | Respiración regular en todo el episodio. |

*Episodio leve de regurgitación

| Día 3 | | | |
|-------------------------|-------------|--------------------|--|
| Prefijo n.º animal: CBG | Número USDA | Artículo de prueba | Características de respiración |
| 1M1 | 3643590 | Propoflo | Respiración regular en todo el episodio |
| 1F2 | 4220196 | Propoflo | Respiración regular en todo el episodio |
| 2M3 | 3771687 | PF1 | Inicialmente, periodo marcado de apnea seguido por respiración regular |
| 2F4 | 4121538 | PF1 | Respiración regular en todo el episodio |

Registro de anestesia

| Día 1 | | | | | | |
|--|-------------|--------------------|-----------|------------|--------------|------------------|
| Prefijo n.º animal: CBG | Número USDA | Artículo de prueba | INY a IND | IND a DESP | DESP a ESTER | ESTER a ERGUIRSE |
| 1M1 | 3643590 | PF1 | 0:00:34 | 0:18:49 | 0:00:00 | 0:06:42 |
| 1F2 | 4220196 | PF1 | 0:00:41 | 0:10:27 | 0:00:00 | 0:04:26 |
| 3M5* | 3645771 | Propoflo | 0:00:40 | 0:07:33 | 0:00:16 | 0:03:31 |
| 3F6 | 4119177 | Propoflo | 0:00:29 | 0:10:29 | 0:00:10 | 0:01:23 |
| Prefijo n.º animal: CBG | Número USDA | Artículo de prueba | INY a IND | IND a DESP | DESP a ESTER | ESTER a ERGUIRSE |
| 1M1 | 3643590 | PF1 | 0:00:34 | 0:19:23 | 0:19:23 | 0:26:05 |
| 1F2 | 4220196 | PF1 | 0:00:41 | 0:11:08 | 0:11:08 | 0:15:34 |
| 3M5 | 3645771 | Propoflo | 0:00:40 | 0:08:13 | 0:08:29 | 0:12:00 |
| 3F6 | 4119177 | Propoflo | 0:00:29 | 0:10:53 | 0:11:08 | 0:12:31 |
| INY = tiempo de inyección (inicio) IND = tiempo de inducción DESP= tiempo hasta el despertar ESTER = tiempo de postura esternal ERGUIRSE = tiempo para erguirse (cuatro patas) Formato = HH:MM:SS | | | | | | |

Se inyectó cada artículo de prueba durante aproximadamente 30 segundos.

Registro de anestesia individual

| Día 1 | | | | | |
|-----------------|-------------|--------------------|----------------|-----------------|----------|
| TONO MANDIBULAR | | | | | |
| Prefijo n.º | Número USDA | Artículo de prueba | INY a AUSENCIA | INY a PRESENCIA | Duración |

| | | | | | |
|---|-------------|--------------------|----------------|-----------------|----------|
| animal: CBG | | | | | |
| 1M1 | 3643590 | PF1 | 0:00:48 | 0:19:23 | 0:18:35 |
| 1F2 | 4220196 | PF1 | 0:01:48 | 0:04:53 | 0:03:05 |
| 3M5 | 3645771 | Propoflo | 0:00:55 | 0:05:57 | 0:05:02 |
| 3F6 | 4119177 | Propoflo | 0:00:52 | 0:07:14 | 0:06:22 |
| PALPEBRAL | | | | | |
| Prefijo n.º animal: CBG | Número USDA | Artículo de prueba | INY a AUSENCIA | INY a PRESENCIA | Duración |
| 1M1 | 3643590 | PF1 | 0:01:08 | 0:05:54 | 0:04:46 |
| 1F2 | 4220196 | PF1 | 0:01:29 | 0:04:34 | 0:03:05 |
| 3M5 | 3645771 | Propoflo | 0:01:55 | 0:03:50 | 0:01:55 |
| 3F6 | 4119177 | Propoflo | 0:01:10 | 0:05:28 | 0:04:18 |
| FLEXOR | | | | | |
| Prefijo n.º animal: CBG | Número USDA | Artículo de prueba | INY a AUSENCIA | INY a PRESENCIA | Duración |
| 1M1 | 3643590 | PF1 | 0:00:57 | 0:18:59 | 0:18:02 |
| 1F2 | 4220196 | PF1 | 0:02:39 | 0:04:46 | 0:02:07 |
| 3M5 | 3645771 | Propoflo | 0:01:15 | 0:05:30 | 0:04:15 |
| 3F6 | 4119177 | Propoflo | 0:00:56 | 0:06:54 | 0:05:58 |
| INY = tiempo de inyección (inicio) AUSENCIA = pérdida de reflejo PRESENCIA = recuperación del reflejo tras la pérdida Formato = HH:MM:SS | | | | | |

Se inyectó cada artículo de prueba durante aproximadamente 30 segundos.

Registro de anestesia individual

| Día 2 | | | | | | |
|-------------------------------|----------------|-----------------------|--------------|---------------|-----------------|---------------------|
| Prefijo n.º animal: CBG | Número USDA | Artículo de prueba | INY a IND | IND a DESP | DESP a ESTER | ESTER a ERGUIRSE |
| 2M3 | 3771687 | Propoflo | 0:00:15 | 0:09:35 | 0:02:52 | 0:2:40 |
| 2F4 | 4121538 | Propoflo | 0:00:30 | 0:05:05 | 0:00:30 | 0:01:45 |
| 3M5 | 3645771 | PF1 | 0:00:25 | 0:16:31 | 0:07:04 | 0:03:54 |
| 3F6 | 4119177 | PF1 | 0:00:20 | 0:19:47 | 0:02:47 | 0:02:20 |
| | | | | | | |
| Prefijo n.º animal: CBG | Número USDA | Artículo de prueba | INY a IND | INY a EMER | INY a ESTER | INY a ERGUIRSE |

ES 2 357 580 T3

| | | | | | | |
|-----|---------|----------|---------|---------|---------|---------|
| 2M3 | 3771687 | Propoflo | 0:00:15 | 0:09:50 | 0:12:42 | 0:15:22 |
| 2F4 | 4121538 | Propoflo | 0:00:30 | 0:05:35 | 0:06:05 | 0:07:50 |
| 3M5 | 3645771 | PF1 | 0:00:25 | 0:16:56 | 0:24:00 | 0:27:54 |
| 3F6 | 4119177 | PF1 | 0:00:20 | 0:20:07 | 0:22:54 | 0:25:14 |

INY = tiempo de inyección (inicio)
 IND = tiempo de inducción
 DESP= tiempo hasta el despertar
 ESTER = tiempo de postura esternal
 ERGUIRSE = tiempo para erguirse (cuatro patas)
 Formato = HH:MM:SS

Se inyectó cada artículo de prueba durante aproximadamente 30 segundos.

Registro de anestesia individual

| Día 2 | | | | | |
|-------------------------|-------------|--------------------|----------------|-----------------|----------|
| TONO MANDIBULAR | | | | | |
| Prefijo n.º animal: CBG | Número USDA | Artículo de prueba | INY a AUSENCIA | INY a PRESENCIA | Duración |
| 1M1 | 3643590 | PF1 | 0:00:57 | 0:18:59 | 0:18:02 |
| 1F2 | 4220196 | PF1 | 0:02:39 | 0:04:46 | 0:02:07 |
| 3M5 | 3645771 | Propoflo | 0:01:15 | 0:05:30 | 0:04:15 |
| 3F6 | 4119177 | Propoflo | 0:00:56 | 0:06:54 | 0:05:58 |
| PALPEBRAL | | | | | |
| Prefijo n.º animal: CBG | Número USDA | Artículo de prueba | INY a AUSENCIA | INY a PRESENCIA | Duración |
| 2M3 | 3771687 | Propoflo | 0:00:43 | 0:06:24 | 0:05:41 |
| 2F4 | 4121538 | Propoflo | 0:01:35 | 0:05:05 | 0:03:30 |
| 3M5 | 3645771 | PF1 | 0:01:57 | 0:09:30 | 0:07:33 |
| 3F6 | 4119177 | PF1 | 0:01:37 | 0:15:37 | 0:14:00 |
| FLEXOR | | | | | |
| Prefijo n.º animal: CBG | Número USDA | Artículo de prueba | INY a AUSENCIA | INY a PRESENCIA | Duración |
| 2M3 | 3771687 | Propoflo | 0:00:58 | 0:06:24 | 0:05:26 |
| 2F4 | 4121538 | Propoflo | 0:00:45 | 0:05:05 | 0:04:20 |
| 3M5 | 3645771 | PF1 | 0:00:50 | 0:09:20 | 0:08:30 |
| 3F6 | 4119177 | PF1 | 0:00:40 | 0:16:00 | 0:15:20 |

INY = tiempo de inyección (inicio)
 AUSENCIA = pérdida de reflejo

PRESENCIA = recuperación del reflejo tras la pérdida

Formato = HH:MM:SS

Se inyectó cada artículo de prueba durante aproximadamente 30 segundos.

Registro de anestesia individual

| Día 3 | | | | | | |
|-------------------------|-------------|--------------------|-----------|------------|--------------|------------------|
| Prefijo n.º animal: CBG | Número USDA | Artículo de prueba | INY a IND | IND a DESP | DESP a ESTER | ESTER a ERGUIRSE |
| 1M1 | 3643590 | Propoflo | 0:00:24 | 0:13:42 | 0:00:13 | 0:00:24 |
| 1F2 | 4220196 | Propoflo | 0:00:29 | 0:08:41 | 0:01:00 | 0:00:19 |
| 2M3 | 3771687 | PF1 | 0:00:22 | 0:16:01 | 0:06:45 | 0:00:31 |
| 2F4 | 4121538 | PF1 | 0:00:42 | 0:13:00 | 0:05:56 | 0:00:22 |
| Prefijo n.º animal: CBG | Número USDA | Artículo de prueba | INY a IND | IND a DESP | DESP a ESTER | ESTER a ERGUIRSE |
| 1M1 | 3643590 | Propoflo | 0:00:24 | 0:14:06 | 0:14:19 | 0:14:43 |
| 1F2 | 4220196 | Propoflo | 0:00:29 | 0:09:10 | 0:10:10 | 0:10:29 |
| 2M3 | 3771687 | PF1 | 0:00:22 | 0:16:23 | 0:23:08 | 0:23:39 |
| 2F4 | 4121538 | PF1 | 0:00:42 | 0:13:42 | 0:19:38 | 0:20:00 |

INY = tiempo de inyección (inicio)
 IND = tiempo de inducción
 DESP = tiempo hasta el despertar
 ESTER = tiempo de postura esternal
 ERGUIRSE = tiempo para erguirse (cuatro patas)
 Formato = HH:MM:SS

Se inyectó cada artículo de prueba durante aproximadamente 30 segundos.

Registro de anestesia individual

| Día 3 | | | | | |
|-------------------------|-------------|--------------------|----------------|-----------------|----------|
| TONO MANDIBULAR | | | | | |
| Prefijo n.º animal: CBG | Número USDA | Artículo de prueba | INY a AUSENCIA | INY a PRESENCIA | Duración |
| 1M1 | 3643590 | Propoflo | 0:01:06 | 0:12:45 | 0:11:39 |
| 1F2 | 4220196 | Propoflo | 0:01:30 | 0:07:07 | 0:05:37 |
| 2M3 | 3771687 | PF1 | 0:00:44 | 0:14:15 | 0:13:31 |
| 2F4 | 4121538 | PF1 | 0:02:26 | 0:13:02 | 0:10:36 |
| PALPEBRAL | | | | | |

| Prefijo n.º animal: CBG | Número USDA | Artículo de prueba | INY a AUSENCIA | INY a PRESENCIA | Duración |
|---|-------------|--------------------|----------------|-----------------|----------|
| 1M1 | 3643590 | Propoflo | 0:00:45 | 0:16:25 | 0:15:40 |
| 1F2 | 4220196 | Propoflo | 0:01:15 | 0:07:07 | 0:05:52 |
| 2M3 | 3771687 | PF1 | 0:00:44 | 0:13:00 | 0:12:16 |
| 2F4 | 4121538 | PF1 | 0:01:20 | 0:09:05 | 0:07:45 |
| FLEXOR | | | | | |
| Prefijo n.º animal: CBG | Número USDA | Artículo de prueba | INY a AUSENCIA | INY a PRESENCIA | Duración |
| 1M1 | 3643590 | Propoflo | 0:00:53 | 0:09:54 | 0:09:01 |
| 1F2* | 4220196 | Propoflo | * | * | * |
| 2M3 | 3771687 | PF1 | 0:00:44 | 0:13:15 | 0:12:31 |
| 2F4 | 4121538 | PF1 | 0:01:18 | 0:09:50 | 0:08:32 |
| <p>*El reflejo flexor siguió siendo positivo en todo el episodio</p> <p>INY = tiempo de inyección (inicio)</p> <p>IND = tiempo de inducción</p> <p>DESP = tiempo hasta el despertar</p> <p>ESTER = tiempo de postura esternal</p> <p>ERGUIRSE = tiempo para erguirse (cuatro patas)</p> <p>Formato = HH:MM:SS</p> | | | | | |

5 **Ejemplo 20.** Se preparó en primer lugar una fase cúbica inversa que contenía el anestésico propofol mezclando 1,496 gramos de propofol (Albemarle Corporation, Baton Rouge, LA) 1,346 g de vitamina E (Aldrich Chemical Company, Milwaukee, WI), 3,902 g de agua estéril (Abbott Laboratories, Chicago, IL) y 8,255 g de Pluronic L122 (Ethox Chemicals, Greenville, SC). Después de mezclar meticulosamente esta composición, se comprobó que el material fuera ópticamente isotrópico y de alta viscosidad. A continuación, se disolvieron 0,504 g del tensioactivo aniónico de sal de sodio del ácido desoxicólico (Aldrich Chemical Company, Milwaukee, WI) y 1,500 g de glicina (Spectrum Chemical Company, Gardena, CA) en 88 ml de agua. Después, se añadieron 10,101 g de la fase cúbica a un vaso de precipitados de 250 ml que contenía la disolución de tensioactivo y se dispersó usando un homogeneizador (Brinkmann Polytron PT 3000) a 29k rpm durante 20 minutos. Se ajustó el pH de la mezcla a 7,40 mediante la adición de 5 gotas de pipeta de ácido clorhídrico 1 M (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO). Se inyectó la dispersión en viales estériles usando una aguja de calibre 27 unida a un filtro de jeringa de PVDF de 0,22 µm (Millipore, Irlanda). Se burbujeó cada vial con nitrógeno durante 5 minutos para eliminar el oxígeno de la dispersión. La observación en un microscopio Polyvar de Reichert-Jung funcionando en modo de contraste de interferencia diferencial (DIC) demostró que se había logrado un tamaño de partícula del orden de 200 nanómetros. Se analizó entonces la dispersión usando un aparato DELSA 440SX de Beckman Coulter para análisis de dispersión de luz por electroforesis Doppler, fijado en el modo de medición de potencial zeta. Se diluyó 4:1 la dispersión con agua para dispersión con el fin de conseguir que los niveles del detector estén en la escala. La distribución de potencial zeta medida resultante, usando cuatro ángulos de medición, muestra la distribución centrada alrededor de -34 mV, que es un potencial zeta lo suficientemente intenso como para producir una dispersión estable. La concentración de propofol en esta dispersión, denominado a continuación Lyotropic PF1(1%), era del 1% o 10 mg/ml.

25 Se preparó en primer lugar una fase cúbica inversa que contenía el anestésico propofol mezclando 2,206 gramos de propofol (Albemarle Corporation, Baton Rouge, LA) 1,982 g de vitamina E (Aldrich Chemical Company, Milwaukee, WI), 5,739 g de agua estéril (Abbott Laboratories, Chicago, IL) y 12,100 g de Pluronic L122 (Ethox Chemicals, Greenville, SC). Después de mezclar meticulosamente esta composición, se comprobó que el material fuera ópticamente isotrópico y de alta viscosidad. Después, se disolvieron 1,003 g del tensioactivo aniónico de sal de sodio del ácido desoxicólico (Aldrich Chemical Company, Milwaukee, WI) y 1,502 g de glicina (Spectrum Chemical Company, Gardena, CA) en 77,5 ml de agua. Entonces, se añadieron 19,989 g de la fase cúbica al vaso de precipitados de 250 ml que contenía la disolución de tensioactivo y se dispersó usando un homogeneizador (Brinkmann Polytron PT 3000) a

29k rpm durante 30 minutos. Se ajustó el pH de la mezcla a 7,40 mediante la adición de 6 gotas de pipeta de ácido clorhídrico 1 M (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO). Se inyectó la dispersión en viales estériles usando una aguja de calibre 27 unida a un filtro de jeringa de PVDF de 0,22 μm (Millipore, Ireland). Se burbujeó cada vial con nitrógeno durante 5 minutos para eliminar el oxígeno de la dispersión. La observación en un microscopio Polyvar de Reichert-Jung funcionando en modo de contraste de interferencia diferencial (DIC) demostró que se había logrado un tamaño de partícula del orden de 200 nanómetros. Se analizó entonces la dispersión usando un aparato DELSA 440SX de Beckman Coulter para análisis de dispersión de luz por electroforesis Doppler, fijado en el modo de medición de potencial zeta. Se diluyó 4:1 la dispersión con agua para dispersión con el fin de conseguir que los niveles del detector estén en la escala. La distribución de potencial zeta medida resultante, usando cuatro ángulos de medición, muestra la distribución centrada alrededor de -32 mV, que es un potencial zeta lo suficientemente intenso como para producir una dispersión estable. La concentración de propofol en esta dispersión, denominado a continuación Lyotropic PF1(2%), era del 2% ó 20 mg/ml.

Se les dosificaron a perros las dos formulaciones anteriores, y se encontró que cada una funcionaba tan bien como o mejor que, y manera similar a, una formulación de propofol basada en emulsión, comercializada actualmente, Propoflo® (Abbot Labs).

En 3 días consecutivos, se dosificó a seis perros Beagle (de aproximadamente 1,5-3,5 años de edad) Propoflo® (una formulación de propofol disponible comercialmente) o Lyotropic PF1 (1%) o Lyotropic PF1 (2%) en un diseño cruzado aleatorizado de 3 vías. Los perros estuvieron en un programa de alimentación controlada, recibiendo aproximadamente 500 gramos de dieta canina certificada (5507) durante aproximadamente 7 días antes de la iniciación de la dosificación. Se ocultó la comida durante la noche antes de cada sesión de dosificación. Se pensó que los niveles de contaminantes que se sabía que estaban presentes en el pienso y el agua no podrían interferir en este estudio. Se aclimataron los animales usados en este estudio a las condiciones de laboratorio durante al menos 14 días antes de la iniciación de la fase con animales. Se seleccionaron seis perros (3 machos y 3 hembras) basándose en el aspecto general.

Se almacenaron los artículos de prueba de dispersión de fase cúbica ("LyoCell®") de la presente invención a aproximadamente 2-8°C y se protegieron de la luz. Se obtuvo Propoflo® de Abbott Laboratories y se almacenó a temperatura ambiente. Se obtuvieron los pesos corporales justo antes de la administración de la dosis y se usaron como base para la dosificación, y a todos los perros se les dosificó 6,0 mg/ml por cada una de las tres formulaciones. Se realizaron observaciones clínicas para determinar la mortalidad y el aspecto general al menos dos veces al día tras la administración de la dosis. Los parámetros para la evaluación incluyeron observaciones tras la dosificación. Todos los animales estuvieron constantemente atendidos desde la inducción de anestesia hasta el despertar (es decir, erguirse sobre las cuatro patas). Se registraron para cada perro la duración de tiempo desde la inyección (de inicio a fin; aproximadamente 30 segundos) hasta la inducción, despertar, postura esternal y para erguirse sobre las cuatro patas. Los animales se monitorizaron de manera continua para evaluar el nivel de anestesia usando el tono mandibular, los reflejos palpebral y flexor. No se produjo mortalidad durante los periodos de dosificación o tras la dosificación. Las alteraciones o características de respiración relevantes incluyeron la aparición de respiración irregular, apnea, disnea y regurgitación leve (sólo en 1 perro). Se produjo inducción de anestesia en el plazo de 1 minuto después del inicio de la inyección y podría describirse como una inducción sin complicaciones los perros a los que se les inyectaron las preparaciones de fase cúbica se comportaron de manera similar (es decir, características de respiración, acontecimientos reflejos y observaciones tras la dosificación) a aquellos a los que se les inyectó la preparación Propoflo® disponible comercialmente.

Características de respiración individual tras la dosis

| Día | Número USDA | Artículo de prueba | Frecuencia cardiaca después de la dosis (lpm) | Características de respiración |
|-----|-------------|--------------------|---|---|
| 1 | 4365500 | PF1 (1%) | 90 | Periodo inicial de respiración superficial rápida; luego patrón de respiración regular. |
| 1 | 4175654 | PF1 (1%) | 96 | Patrón de respiración regular. |
| 1 | 4169859 | PF1 (2%) | 108 | Patrón de respiración regular. Regurgitación a los 30 s tras la dosis, a los 35 min. 45 s, y 1:17:00 tras la dosis. |
| 1 | 4372646 | PF1 (2%) | 72 | Periodo inicial de apnea, luego patrón de respiración regular. |
| 2 | 4365500 | Propoflo® | 90 | Patrón de respiración regular. |
| 2 | 4175654 | Propoflo® | 96 | Patrón de respiración regular. |

| | | | | |
|---|---------|-----------|-----|--|
| 2 | 4169859 | PF1 (1%) | 102 | Periodo inicial de respiración superficial rápida; luego patrón de respiración regular. |
| 2 | 4372646 | PF1 (1%) | 66 | Periodo inicial de respiración superficial rápida; luego patrón de respiración regular. |
| 2 | 4361270 | PF1 (2%) | 96 | Periodo inicial de respiración superficial rápida; luego patrón de respiración regular. |
| 2 | 4360206 | PF1 (2%) | 78 | Periodo inicial de respiración superficial rápida; luego patrón de respiración regular. |
| 3 | 4365500 | PF1 (2%) | 102 | Periodo inicial de apnea, luego patrón de respiración regular. |
| 3 | 4175654 | PF1 (2%) | 78 | Periodo inicial de respiración superficial rápida; luego patrón de respiración regular. |
| 3 | 4169859 | Propoflo® | 90 | Patrón de respiración regular. |
| 3 | 4372646 | Propoflo® | 72 | Patrón de respiración regular. |
| 3 | 4361270 | PF1 (1%) | 66 | Periodo inicial de apnea, luego respiración superficial rápida, luego patrón de respiración regular. |
| 3 | 4360206 | PF1 (1%) | 84 | Patrón de respiración regular. |
| 4 | 4361270 | Propoflo® | 78 | Patrón de respiración regular. |
| 4 | 4360206 | Propoflo® | 72 | Patrón de respiración regular. |

Registro de anestesia

Propoflo®

| Número de animal | Número USDA | Artículo de prueba | INY a IND | INY a DESP |
|------------------|-------------|---------------------|----------------|----------------|
| 1M1 | 4365500 | Propoflo® Propoflo® | 0:00:33 | 0:08:09 |
| 1F4 | 4175654 | Propoflo® Propoflo® | 0:00:25 | 0:06:58 |
| 2M2 | 4169859 | Propoflo® | 0:00:32 | 0:20:49 |
| 2F5 | 4372646 | PROMEDIO | 0:00:24 | 0:15:43 |
| 3M3 | 4361270 | DESV. EST. | 0:00:25 | 0:13:22 |
| 3F6 | 4360206 | | 0:00:24 | 0:08:05 |
| | | | 0:00:27 | 0:12:11 |
| | | | 0:00:04 | 0:05:27 |

PF1 (1%)

| Número de animal | Número USDA | Artículo de prueba | INY a IND | INY a DESP |
|------------------|-------------|--------------------|-----------|------------|
| 1M1 | 4365500 | PF1 (1%) | 0:00:33 | 0:22:30 |
| 1F4 | 4175654 | PF1 (1%) | 0:00:30 | 0:19:01 |
| 2M2 | 4169859 | PF1 (1%) | 0:00:30 | 0:17:00 |
| 2F5 | 4372646 | PF1 (1%) | 0:00:27 | 0:18:01 |

| | | | | |
|-------------------|---------|----------|----------------|----------------|
| 3M3 | 4361270 | PF1 (1%) | 0:00:25 | 0:19:23 |
| 3F6 | 4360206 | PF1 (1%) | 0:00:37 | 0:18:38 |
| PROMEDIO | | | 0:00:30 | 0:19:05 |
| DESV. EST. | | | 0:00:04 | 0:01:52 |

PF1 (2%)

| Número de animal | Número USDA | Artículo de prueba | INY a IND | INY a DESP |
|-------------------|-------------|--------------------|----------------|----------------|
| 2M2 | 4169859 | PF1 (2%) | 0:00:44 | 0:34:19 |
| 2F5 | 4372646 | PF1 (2%) | 0:00:26 | 0:33:50 |
| 3M3 | 4361270 | PF1 (2%) | 0:00:40 | 0:20:39 |
| 3F6 | 4360206 | PF1 (2%) | 0:00:35 | 0:29:12 |
| 1M1 | 4365500 | PF1 (2%) | 0:00:34 | 0:09:22 |
| 1F4 | 4175654 | PF1 (2%) | 0:00:26 | 0:17:06 |
| PROMEDIO | | | 0:00:34 | 0:24:05 |
| DESV. EST. | | | 0:00:07 | 0:10:02 |

Resumen del registro de anestesia

| | Propoflo® | PF1 (1%) | PF1 (2%) |
|------------|-----------|----------|----------|
| INY a IND | 0:00:27 | 0:00:30 | 0:00:34 |
| INY a DESP | 0:12:11 | 0:19:05 | 0:24:05 |

INY = tiempo de inyección (inicio)

IND = tiempo de inducción

DESP = tiempo hasta el despertar

Formato = HH:MM:SS

Se inyectó cada artículo de prueba durante aproximadamente 30 segundos.

5 **Ejemplo 21.** El siguiente ejemplo describe una dispersión líquido-cristalina de carga estabilizada que contiene el fármaco anestésico local bupivacaína. Trabajando en una campana de flujo laminar, se disolvieron 0,900 gramos del anestésico local bupivacaína, en su forma de base libre, en 3,64 g de alfa-tocoferol (Aldrich Chemical Company, Milwaukee, WI) calentando hasta 55°C. Tras la disolución, se añadieron 1,820 g de agua estéril (Abbott Laboratories, Chicago, IL) y 3,640 g de Pluronic P123 (BASF Corporation, Mt. Olive, NJ) a la vitamina E. Se mezclaron los componentes para formar una fase cúbica inversa que fuera ópticamente isotrópica y de alta viscosidad. A continuación, se disolvieron 0,402 g de desoxicolato de sodio (Aldrich Chemical Company, Milwaukee, WI) se disolvieron en 39,6 ml de agua estéril. Se dispersó una cantidad de 8,048 g de fase cúbica en la disolución de desoxicolato de sodio, usando en primer lugar el homogeneizador (Brinkmann Polytron PT 3000) a 29k rpm durante 1 minuto, usando entonces el microfluidizador (Microfluidics modelo M110L) a aproximadamente 15.000 psi durante cinco ejecuciones de 1,5 minutos. La dispersión, denominada "Lyotropic/F4C," se inyectó en viales estériles usando una aguja de calibre 27 unida a un filtro de jeringa de PVDF de 0,45 µm (Millipore, Ireland).

20 Se analizó Lyotropic/F4C usando un analizador de tamaño de partícula submicrométrico N4 PLUS de Beckman Coulter. Se diluyó una gota de la dispersión con agua hasta que se obtuvo un nivel de intensidad de medición adecuado. La figura 15 ilustra los resultados de un análisis de tamaño de partícula con un tiempo de equilibración de cinco minutos y un tiempo de ejecución de tres minutos. Todas las partículas de la dispersión son menores que 400 nm. Además, se analizó Lyotropic/F4C usando un aparato DELSA 440SX de Beckman Coulter para análisis de dispersión de luz por electroforesis Doppler, fijado en modo de medición de potencial zeta. La figura 16 muestra la distribución de potencial zeta medida, usando cuatro ángulos de medición. En los cuatro ángulos, la distribución está centrada en -31 mV, que es un potencial zeta lo suficientemente intenso como para producir una dispersión estable.

Se sometió a prueba la formulación anterior en el modelo de “retirada de la pata” en rata para determinar la duración de la analgesia. Se estudiaron ratas Sprague-Dawley macho, que pesaban 400-450 g, en dos niveles de dosis: 1,0 mg/kg y 3,0 mg/kg. Se alojaron todas las ratas en condiciones habituales de acuerdo con las directrices AALAC, con acceso a comida y agua a voluntad. Se ocultó la comida, seis horas antes de la evaluación.

5 PROCEDIMIENTOS: Se anestesió brevemente cada rata mediante exposición al agente por inhalación halotano con el fin de facilitar el manejo del animal y asegurar la inyección precisa de los agentes de control y prueba. Una vez inconsciente, se realizó una pequeña incisión en la zona de la fosa poplíteica de la extremidad posterior. Se obtuvo la exposición del nervio ciático con retracción mínima. Utilizando una jeringa y aguja de tamaño apropiado, se inyectó o bien la formulación de bupivacaína-LyoCell® o bien el clorhidrato de bupivacaína patrón al perineurio del
10 nervio ciático. Se cerró entonces la incisión con una grapa quirúrgica de tamaño apropiado.

Se determinó el bloqueo del anestésico local para la nocicepción térmica mediante la exposición de la pata trasera de la extremidad posterior tratada a la superficie calentada de un aparato de prueba plantar térmica. Se mantuvieron las temperaturas de superficie en un intervalo de desde 50 hasta 54°C. Se registró mediante un cronómetro digital el periodo de latencia para presentar la retirada de la superficie calentada. Se encontró que el periodo de latencia inicial era de aproximadamente 1 a 3 segundos en patas traseras no anestesiadas. En un intento de minimizar la lesión térmica en la pata trasera, se limitó la exposición al aparato de prueba plantar térmica a 12 segundos. Los periodos de latencia que superaron los 6 segundos se consideraron indicativos de analgesia frente a la prueba térmica.

Se sometió a prueba a seis ratas para determinar la retirada de latencia de la extremidad posterior tratada después de 30 minutos y 60 minutos, y entonces cada hora durante unas cinco horas adicionales. A una dosis de 1 mg/kg de dosis de la formulación de fase cúbica, el efecto de bloqueo sensorial duró más de 5 horas, para 4 de las 6 ratas sometidas a prueba y más de 6 horas para dos de las seis ratas sometidas a prueba. Esta formulación mostró por tanto un aumento de la duración en comparación con la misma dosis de la formulación de disolución acuosa comercializada actualmente.

25 **Ejemplo 22.** Este ejemplo demuestra la estabilidad física a largo plazo de dispersiones de la presente invención. Se preparó en primer lugar una fase cúbica mezclando 5,7176 gramos de propofol, 7,8170 gramos de agua y 16,5300 gramos del tensioactivo de poloxámero Ethox L-122 en un tubo de ensayo de 50 ml y se agitó con una espátula hasta que estuvo todo en una fase. Se pusieron en un vaso de precipitados de 600 ml 1,0533 gramos de ácido desoxicólico de sodio, 400 ml de agua destilada y 21,0682 gramos de la fase cúbica. Esto se homogeneizó con un homogeneizador Brinkmann PT 10/35 hasta que el material se dispersó. Entonces se microfluidizó esto usando un aparato M1 10L de Microfluidics durante 10 ejecuciones de 1,5 minutos cada ejecución. Se inyectó entonces la dispersión en viales estériles mediante una aguja de calibre 18.

Se realizaron análisis de pH, tamaño de partícula (medido tal como se describe en el presente documento mediante un aparato de medición del tamaño de partícula Beckmann N4 Plus) y potencial zeta (tal como se describió, con un analizador DELSA) a intervalos regulares durante un periodo de seis meses. Los datos a los seis meses, notificados en la tabla a continuación, indican una excelente estabilidad para la dispersión de partículas.

35

| Prueba | Día 0 | 6 meses |
|---------------------|--------|---------|
| pH | 8,1 | 7,9 |
| Tamaño de partícula | 132 nm | 135 nm |
| Potencial zeta | -48 mV | -34 mV |

40 **Ejemplo 23.** Se preparó una fase cúbica inversa que contenía el anestésico etomidato disolviendo 0,0200 gramos de etomidato (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) en 0,300 g de vitamina E (Aldrich Chemical Company, Milwaukee, WI) y añadiendo 0,190 g de agua destilada y 0,488 g de Pluronic L122 (Ethox Chemicals, Greenville, SC). Después de mezclar meticulosamente esta composición, se comprobó que el material fuera ópticamente isotrópico y de alta viscosidad. A continuación, se disolvieron 0,024 g de tensioactivo aniónico docusato de sodio (Aldrich Chemical Company, Milwaukee, WI) en 5,992 g de agua destilada. Entonces, se añadieron 0,605 g de la fase cúbica al vaso de precipitados de 50 ml que contenía la disolución de tensioactivo y se dispersó usando un homogeneizador (Brinkmann PT 10/35) a velocidad 10 durante 10 minutos. Se inyectó la dispersión a un vial estéril usando una aguja de calibre 27 unida a un filtro de jeringa de PTFE de 0,20 µm (Millipore, Ireland). La observación en un microscopio Polyvar de Reichert-Jung funcionando en modo de contraste de interferencia diferencial (DIC) demostró que se había logrado un tamaño de partícula del orden de 200 nanómetros. Se analizó entonces la dispersión usando un aparato DELSA 440SX de Beckman Coulter para análisis de dispersión de luz por electroforesis Doppler, fijado en modo de medición de potencial zeta. La distribución de potencial zeta medida resultante, usando cuatro ángulos de medición, muestra la distribución centrada en -48,5 mV, que es un potencial zeta lo suficientemente intenso como para producir una dispersión estable. La concentración de etomidato en esta dispersión era del 0,2% ó 2 mg/ml.

50

Ejemplo 24. Se preparó una fase cúbica inversa que contenía el anestésico alfaxolona (5 α -pregnan-3 α -ol-11,20-diona) en primer lugar disolviendo 0,071 gramos de alfaxolona (Steraloids, Inc, Newport, RI) en 0,304 g de vitamina E (Aldrich Chemical Company, Milwaukee, WI) y 0,302 g linalool (Aldrich Chemical Company, Milwaukee, WI). Tras la disolución, se añadieron 0,385 g de agua destilada y 0,961 g de Pluronic L122 (Ethox Chemicals, Greenville, SC). Después de mezclar meticulosamente esta composición, el material era ópticamente isotrópico y de alta viscosidad. A continuación, se disolvieron 0,061 g del tensioactivo aniónico desoxicolato de sodio (Aldrich Chemical Company, Milwaukee, WI) y 0,090 g de glicina (Spectrum Chemical, Gardena, CA) en 4,150 g de agua destilada. Entonces, se añadieron 1,728 g de la fase cúbica al vaso de precipitados de 50 ml que contenía la disolución de tensioactivo y se dispersó usando un homogeneizador (Brinkmann PT 10/35) a velocidad 10 durante 6 minutos. Se filtró la dispersión de alfaxolona usando un filtro de jeringa de PVDF de 0,22 μ m (Millipore, Ireland). La observación en un microscopio Polyvar de Reichert-Jung funcionando en modo de contraste de interferencia diferencial (DIC) demostró que se había logrado un tamaño de partícula del orden de 200-300 nanómetros. La concentración de alfaxolona en esta dispersión era del 1% ó 10 mg/ml.

Se analizó la dispersión de alfaxolona usando un analizador de tamaño de partícula submicrométrico N4 PLUS de Beckman Coulter. Se diluyó una gota de la dispersión con agua hasta que se obtuvo un nivel de intensidad de medición adecuado. Tras un tiempo de ejecución de cinco minutos, este instrumento indicó que todas las partículas en la dispersión eran menores que 300 nm, de acuerdo por completo con los resultados de la microscopía óptica de contraste de interferencia diferencial. Se analizó entonces la dispersión de alfaxolona usando un aparato DELSA 440SX de Beckman Coulter para análisis de dispersión de luz por electroforesis Doppler, fijado en modo de medición de potencial zeta. Se diluyó 1:25 la dispersión con agua para lograr niveles del detector apropiados. La distribución de potencial zeta resultante, usando cuatro ángulos de medición, muestra la distribución centrada en -35,5 mV, que es un potencial zeta lo suficientemente intenso como para producir una dispersión estable. Aproximadamente 6 semanas después, se analizó de nuevo la dispersión de alfaxolona usando un analizador de tamaño de partícula submicrométrico N4 PLUS de Beckman Coulter. PCS indicó que la mayoría de las partículas en la dispersión eran menores que 350 nm. La observación en el microscopio DIC reveló partículas pequeñas, uniformes y sin precipitación de alfaxolona. Se midió de nuevo el potencial zeta y se encontró que no se distinguía de los datos originales.

Ejemplo 25. Se preparó la dispersión líquido-cristalina que contenía el fármaco anestésico local bupivacaína del ejemplo 21 ("F4C"). Se sometió a prueba la formulación en ratas Sprague-Dawley macho, que pesaban 210-260 g, en el modelo de "retirada de la pata" en rata del ejemplo 3 a un nivel de dosis, 1,0 mg/kg, como era la disolución de clorhidrato de bupivacaína patrón (Marcaine® comercializada por Astra-Zeneca). Con el fin de evitar cualquier sesgo por el traumatismo térmico, se evaluaron los grupos de prueba en dos segmentos:

Segmento 1. Se sometieron a prueba seis ratas para determinar la retirada de latencia de la extremidad posterior tratada c hora durante seis horas.

Segmento 2. Si cualquier animal(es) en el segmento 1 presentó analgesia continuada frente a la prueba térmica a las 6 horas, se inyectó a un segundo grupo de seis ratas y se evaluó cada hora sobre el aparato de prueba plantar térmica a las 16, 17 y 18 horas tras la administración. Se sometió a seguimiento a todas las ratas hasta la normalización de los periodos de latencia para asegurarse de que la lesión nerviosa inducida térmicamente no era un factor en periodos de latencia prolongados.

Los resultados resumen se exponen en las tres tablas en la tabla conjunta 1. En cada tiempo de medición , el grupo al que se le administró F4C contenía igual o más animales que presentaban bloqueo nervioso que el grupo al que se le administró la disolución patrón. Comenzando a las 4 horas tras la administración, el número de animales en el grupo de disolución patrón que experimentaron bloqueo disminuyó significativamente, mientras que todos los animales en el grupo de F4C permanecieron con bloqueo. Este también fue el caso a las 5 horas tras la administración. A las 16 horas tras la administración, experimentaron bloqueo por lo menos la mitad de los animales del grupo de F4C, y a las 18 horas experimentaron bloqueo 2 de 6 animales en el grupo de F4C. Debido a la intensa disminución de animales con bloqueo en el grupo de disolución de clorhidrato de bupivacaína patrón (sólo de 1 a 6 horas tras la administración), no se sometieron a prueba los animales en este grupo a de 16 a 18 horas. La duración relativa en este ejemplo era de aproximadamente $[16 \text{ h}]/[4 \text{ h}] \times 100\% = 400\%$, y la dosis relativa del 100%, haciendo el factor de amplificación de aproximadamente 4,0.

Tabla conjunta 1

RESUMEN: NUMERO DE BLOQUEOS

| | 1 h | 2 h | 3 h | 4 h | 5 h | 6 h | 16 h | 17 h | 18 h |
|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|
| F4C | 6 | 6 | 6 | 6 | 3 | 3 | 1 | 2 | |
| Marcaine | 6 | 6 | 4 | 3 | 3 | 1 | NP | NP | NP |

RESUMEN: PUNTUACIONES TOTALES (en segundos)

| | 1 h | 2 h | 3 h | 4 h | 5 h | 6 h | 16 h | 17 h | 18 h |
|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|
| F4C | 71 | 71 | 66 | 72 | 65 | 49 | 43 | 31 | 33 |
| Marcaine | 69 | 66 | 51 | 44 | 40 | 31 | NP | NP | NP |

RESUMEN: PUNTUACIONES PROMEDIO

| | | 1 h | 2 h | 3 h | 4 h | 5 h | 6 h | 16 h | 17 h | 18 h |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|------|------|------|------|------|
| F4C | 11,38 | 11,83 | 11,00 | 12,00 | 10,83 | 8,17 | 7,17 | 5,17 | 5,50 | |
| Marcaine | 11,50 | 11,00 | 8,50 | 7,33 | 6,67 | 5,17 | NP | NP | NP | |

NP = no sometido a prueba

5 **Ejemplo 26.** Se preparó la dispersión líquido-cristalina que contenía el fármaco anestésico local bupivacaína del ejemplo 21 ("F4C"). Se sometió a prueba la formulación en ratas Sprague-Dawley macho, que pesaban 200-275 g, en el modelo de "retirada de la pata" en rata del ejemplo 3 en tres niveles de dosis, 1,0 mg/kg, 0,67 mg/kg y 0,33 mg/kg, sometiéndose a prueba seis ratas por cada formulación para cada dosis. La disolución de clorhidrato de bupivacaína patrón (Marcaine®) también se sometió a prueba en los mismos tres niveles de dosis. Se suministraron los artículos de prueba a una concentración del 1,5% de agente activo, y se diluyó según se requirió con agua estéril para inyección para administrar las dosis de 0,67 mg/kg y 0,33 mg/kg. Se suministró la bupivacaína patrón a una concentración del 10 0,75%, y se diluyó según se requirió con agua estéril para inyección para administrar la dosis de 0,33 mg/kg. Se sometieron a prueba las ratas para determinar la latencia de retirada de la pata a las dos horas tras la administración, y entonces comenzando las cuatro horas tras la administración cada hora hasta ocho horas tras la administración.

15 Los resultados resumen se exponen en las tres tablas en la tabla conjunta 2. A las ocho horas tras la administración, más de la mitad de los animales a los que se les administró F4C, en los tres niveles de dosis, experimentaron un efecto de bloqueo sensorial, mientras que ninguno de los animales a los que se les administró la disolución de clorhidrato de bupivacaína patrón lo hizo (tabla 1). De hecho, ninguno de los animales a los que se les administró la disolución patrón experimentó bloqueo a las 5 horas o después. Esta diferencia de efecto entre la formulación F4C y la disolución de clorhidrato de bupivacaína patrón a lo largo de los grupos de dosis también se manifiesta en las puntuaciones totales (en segundos) (tabla 2) y la puntuación promedio (tabla 3): todos los animales a 20 los que se les administró F4C experimentaron bloqueo con una duración considerablemente más larga que aquellos a los que se les administró la disolución patrón a cualquiera de las dosis administradas. Por tanto, los animales a los que se les administró F4C a 0,33 mg/kg mostraron un bloqueo más largo y considerablemente mayor que los animales a los que se les administró la disolución patrón, incluso a tres veces la dosis. Además, entre los animales a los que se les administró F4C, los dos grupos de menor nivel de dosis mostraron un efecto de bloqueo sensorial importante. Ellos 25 también mostraron puntuaciones totales y puntuaciones promedio similares, si acaso algo menores, en comparación con el grupo de dosis de 1,0 mg/kg, particularmente en comparación con los animales a los que se les administró disolución de clorhidrato de bupivacaína patrón. El grupo al que se le administró F4C a la menor dosis de prueba, 0,33 mg/kg, mostraron el mismo número de animales con bloqueo que el grupo al que se le administró dos veces la dosis (0,67 mg/kg), y mostraron incluso puntuaciones totales y puntuaciones promedio mayores que el grupo de 0,67 mg/kg.

Tabla conjunta 2

RESUMEN: NUMERO DE BLOQUEOS

| | 2 h | 4h | 5 h | 6 h | 7 h | 8 h |
|---------------|-----|----|-----|-----|-----|-----|
| F4C 0,33 | 6 | 6 | 6 | 5 | 5 | 4 |
| F4C 0,67 | 6 | 6 | 6 | 4 | 4 | 4 |
| F4C 1,0 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| Marcaïne 0,33 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Marcaïne 0,67 | 6 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Marcaïne 1,0 | 6 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |

RESUMEN: PUNTUACIONES TOTALES (en segundos)

| | 2 h | 4h | 5 h | 6 h | 7 h | 8 h |
|---------------|-----|----|-----|-----|-----|-----|
| F4C 0,33 | 69 | 66 | 65 | 61 | 57 | 53 |
| F4C 0,67 | 70 | 61 | 56 | 49 | 46 | 46 |
| F4C 1,0 | 70 | 69 | 66 | 64 | 61 | 59 |
| Marcaïne 0,33 | 46 | 24 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Marcaïne 0,67 | 69 | 37 | 25 | 0 | 0 | 0 |
| Marcaïne 1,0 | 61 | 48 | 30 | 24 | 0 | 0 |

RESUMEN: PUNTUACIONES PROMEDIO

| | 2 h | 4h | 5 h | 6 h | 7 h | 8 h |
|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| F4C 0,33 | 11,50 | 11,00 | 10,83 | 10,17 | 9,50 | 8,83 |
| F4C 0,67 | 11,67 | 10,17 | 9,33 | 8,17 | 7,67 | 7,67 |
| F4C 1,0 | 11,67 | 11,50 | 11,00 | 10,67 | 10,17 | 9,83 |
| Marcaïne 0,33 | 7,67 | 4,00 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Marcaïne 0,67 | 11,50 | 6,17 | 4,17 | 0 | 0 | 0 |
| Marcaïne 1,0 | 10,17 | 8,00 | 5,00 | 4,00 | 0 | 0 |

Ejemplo 27. Se encontró que el tensioactivo Pluronic 123, combinado con agua y varios hidrófobos no parafínicos, formaban fases cúbicas inversas en composiciones específicas. Las composiciones encontradas incluyeron las siguientes composiciones de fases cúbicas inversas:

Pluronic 123 (47,8%) / aceite de naranja (26,1%) / agua (26,1%);

5 Pluronic 123 (45,7%) / isoeugenol (21,7) / agua (32,6%); y

Pluronic 123 (47,8%) / aceite de limón (26,1%) / agua (26,1%).

10 Además, estas fases cúbicas pueden solubilizar fármacos de baja solubilidad. Se preparó bupivacaína como base libre (solubilidad en agua inferior al 0,1% en peso) disolviendo 1,00 g de clorhidrato de bupivacaína en 24 ml de agua. Se añadió una cantidad equimolar de NaOH 1 N para precipitar bupivacaína como base libre, que se liofilizó entonces. Se combinaron en un tubo de ensayo de vidrio, 0,280 g bupivacaína como base libre, 0,685 g agua y 0,679 g linalool y se sonicaron para descomponer las partículas de bupivacaína. Entonces se añadieron 0,746 g del tensioactivo Pluronic P 123 (poloxámero 403). Se agitó y calentó la muestra para disolver el fármaco cristalino. Se centrifugó la muestra durante quince minutos. La muestra había formado una fase transparente, altamente viscosa que era ópticamente isotrópica en microscopía de polarización.

15 Se preparó también una segunda muestra usando el mismo cristal líquido, entonces formulándola en micropartículas recubiertas con triptofanato de zinc. Estas micropartículas cargadas de bupivacaína son adecuadas para

inyección subcutánea, como una formulación de liberación lenta del anestésico local con el propósito de prolongar la acción farmacológica y bajar su perfil de toxicidad.

5 Se examinaron entonces estas dos muestras por dispersión de rayos X de ángulo pequeño. Se recopilieron los datos en una línea de rayos X de ángulo pequeño con radiación de cobre, espejos de Frank, una cámara de muestra y trayectoria de vuelo evacuada, un detector de área de múltiples hilos Bruker, y una distancia de muestra a detector de 58 cm (intervalo de espaciado d de 172 a 15 angstroms). Puesto que el mayor espaciado d observado en esta muestra estaba cerca al límite de detección con esta cámara, se ejecutó también en una línea de rayos X de ángulo pequeño 2D de 6 metros con radiación de cobre, óptica multicapa Osmic, colimación con agujero puntual, una cámara de muestra llena de helio de trayectoria de vuelo evacuada y un detector de área de hilos múltiples Bruker y una distancia de muestra a detector de 328 cm. A 328 cm, el detector tiene un intervalo de 90 a 700 angstroms. Se cargó el primer material en un capilar de rayos X de d.i. de 1,5 mm de Charles Supper Corp. La muestra se ejecutó a 18°C. Las imágenes bidimensionales desde la distancia de 58 cm se integraron con un tamaño de escalón de 0,02 grados dos-theta. Se integraron datos desde la línea de 6 metros con un tamaño de escalón de 0,002 grados dos-theta y esas representaciones gráficas se superpusieron con las ejecuciones en la distancia más corta, y se obtuvo una excelente concordancia entre las posiciones de pico registradas con las dos cámaras.

15 Se usó el programa de software de análisis de picos de rayos X JADE, de Materials Data Analysis, Inc., para analizar los datos resultantes para determinar la presencia y posición de los picos. Dentro de ese programa, se aplicó la opción "ajuste de centroide".

20 Los datos de SAXS muestran picos Bragg determinados por JADE en las posiciones 154,6, 80,6, 61,6 y 46,3 angstroms. Estos picos se indexan para una estructura de fase cúbica del grupo espacial de fase cúbica observado comúnmente de $Pn\bar{3}m$ (ver Pelle Ström y D. M. Anderson, Langmuir, 1992, vol. 8, pág. 691 para una discusión detallada de las estructuras de fase cúbica observadas más comúnmente y sus patrones de SAXs). Estos cuatro picos de hecho se indexan como los picos (110), (211), (222) y (420) de este grupo espacial (n.º 229), con un parámetro de red de 210 angstroms. La segunda muestra presenta un pico, a 104,6 angstroms, que parece indexarse como el pico (200) de la misma red. La segunda muestra también presenta tres picos con espaciados d menores que 25 angstroms que se deben claramente a la cubierta de triptofanato de zinc cristalina.

30 El isoeugenol es un componente mayoritario del aceite de ilang-ilang y de otros aceites esenciales, y ha sido el centro de varios estudios de toxicidad demostrando su baja toxicidad. El linalool es un componente mayoritario del aceite de cilantro así como también de otros aceites esenciales tales como aceites de naranja y canela, y se considera no parafínico según la definición facilitada anteriormente porque la longitud máxima de cadena hidrocarbonada saturada es de sólo 5; la naturaleza no parafínica de este compuesto se pone de relieve por la presencia de no sólo enlaces insaturados sino además ramificación, carbonos terciarios y un grupo hidroxilo. El linalool ha sido también el objeto de estudios intensivos sobre toxicidad que muestran casi universalmente baja toxicidad y mutagenicidad, y en particular se notificó que la DL50 para inyección subcutánea en ratones era de 1,470 mg/kg. Ver el informe NIEHS preparado por Technical Resources International, Inc. con el n.º de contrato NO2-CB-50511, junio de 1997, revisado en sept. de 1997.

35 Los Pluronic (también denominados poloxámeros) son una clase abundante de tensioactivos que incluyen variantes que cubren una amplia gama de pesos moleculares y HLB (equilibrio hidrófilo-hidrófobo). Aquellos con bajos HLB son de baja solubilidad al agua, especialmente si son de alto PM, y P123 es un ejemplo de un tensioactivo de este tipo que, no obstante, tiene un grupo PEG suficientemente grande como para formar estructuras de autoasociación en una amplia gama de condiciones. Además, su PM relativamente alto también fomenta la formación de fases líquido-cristalinas (en contraposición a líquidas), lo que es muy favorable en el presente contexto. También se sabe que los Pluronic interaccionan fuertemente con biomembranas de modo que mejora la absorción celular de fármacos, y de hecho pueden inhibir determinadas proteínas de flujo de salida, tales como glicoproteína P y otras proteínas MDR que son responsables de la resistencia a múltiples fármacos. La fosfatidilcolina, por ejemplo, no ha demostrado, o ni siquiera se ha especulado que sepa este autor, que desempeña esta última función en la administración de fármacos. Los Pluronic como una clase son el objeto de un Drug Master File con la FDA, y un número figura en una lista explícitamente en la lista de Principios Inactivos de 1996 como que están aprobados para formulaciones inyectables, lo que indica su baja toxicidad.

40 **Ejemplo 28.** Se formuló la fase cúbica del ejemplo 1 como micropartículas recubiertas (de acuerdo con la patente estadounidense 6.482.517 que se incorpora al presente documento como referencia), y mostró en pruebas en ratas que la formulación aumenta fuertemente la duración de acción de bupivacaína. Se combinó una cantidad de 10,930 g de Pluronic P123 con 2,698 g de bupivacaína como base libre, 10,912 g de linalool y 5,447 g de agua estéril, y se agitó para formar una fase cúbica inversa. De esto, se combinaron 24,982 gramos de fase cúbica en un matraz con 62,807 g de una disolución de dietanolamina-N-acetilriptófano; esta última se preparó mezclando 16,064 g de dietanolamina, 36,841 g de agua estéril y 22,491 g de N-acetilriptófano y se sonicó para combinarse. Se agitó en primer lugar la mezcla de fase cúbica/dietanolamina-NAT, entonces se homogeneizó, y finalmente se procesó en un microfluidizador de Microfluidics hasta un tamaño de partícula menor que 300 nm. Mientras que el material aún estaba en el microfluidizador, se añadieron 47,219 g de una disolución al 25% en peso de acetato de zinc y 5,377 g de dietanolamina, y la mezcla total se microfluidizó durante 20 ejecuciones de 1,5 minutos cada una. Se inyectaron entonces cinco ml de una mezcla caliente (60°C) de agua y sorbitano-monopalmitina (6%) durante la microfluidización, y a continuación 5 ml de una disolución acuosa de albúmina al 14%. Después de microfluidización adicional, se dividió la

dispersión en 42 tubos de centrífuga de 3,5 ml de dispersión cada uno, y se añadieron aproximadamente 0,14 g de carbón activado Norit a cada tubo, y se agitó el tubo durante 15 minutos en un oscilador. Se centrifugó entonces cada tubo durante 5 minutos en una centrífuga de mesa a 6000 rpm. Se prefiltró entonces la dispersión, se filtró luego a 0,8 micras usando filtros Millex AA, se puso entonces en una vial sellado y se envió a una instalación para pruebas con animales.

Se sometió a prueba la formulación en ratas Sprague-Dawley macho, que pesaban 220-250 g. Se mantuvieron los animales en condiciones habituales, con acceso a comida y agua a voluntad. Se les anestesió brevemente con halotano para facilitar la inyección. Entonces se sometió a prueba el bloqueo del nervio ciático realizando en primer lugar una pequeña incisión en el espacio de la fosa poplítea sobre la región del nervio ciático; se visualizó entonces el nervio ciático, se identificó y se inyectó entonces el agente de prueba o control Marcaine en la vaina del nervio ciático y se cerró quirúrgicamente la incisión. Se determinó el bloqueo de la nocicepción térmica poniendo la rata sobre la superficie de vidrio de un aparato de prueba plantar térmica (modelo 336, IITC Inc.), con la superficie mantenida a 30°C. Se enfocó una fuente de calor radiante móvil debajo del vidrio sobre la pata trasera de la rata, y se registró la latencia de retirada de la pata mediante un cronómetro digital. Se encontró que la latencia inicial era de 10 segundos. Se sometieron a prueba las ratas para determinar la latencia a los 30 minutos y cada hora después de eso.

Se encontró que el efecto de bloqueo sensorial con el patrón bupivacaína HCl al 0,5%, a una dosis de 3 mg/kg, era de 4-5 horas, en completa concordancia con la duración bien conocida de bloqueo nervioso de Marcaine®. Por el contrario, a la misma dosis de 3 mg/kg de la formulación de fase cúbica, el efecto de bloqueo sensorial duró aproximadamente 22-26 horas. Además, el propio tiempo de latencia aumentó enormemente en el caso de la fase cúbica con relación al caso de la disolución, indicando un profundo bloqueo del dolor. La eficacia del fármaco, por tanto, no sólo no se vio disminuida sino que en realidad mejoró mediante esta formulación. Se observa que mientras que esta dosis de 3 mg/kg no era supertóxica y en efecto, no hubo muertes o tampoco secuelas graves, tampoco era subtóxica según la definición anterior; es decir, con respecto a esta última, ésta no sería una dosis que se encontraría dentro del intervalo recomendado de uso rutinario. La duración relativa en este ejemplo era de aproximadamente el 600% y la dosis relativa (basada en la dosis terapéutica convencional de 1 mg/kg) era del 300%, haciendo el factor de amplificación de aproximadamente 2,0.

Ejemplo 29. Se combinó una cantidad de 15,027 g de Pluronic P123 con 2,703 g de bupivacaína como base libre, 10,972 g de tocoferol (vitamina E) y 5,464 g de agua estéril, y se agitó para formar una fase cúbica inversa. De esto, se combinaron 25,018 gramos de fase cúbica en un matraz con 62,872 g de una disolución de dietanolamina-N-acetiltriptófano; esta última se preparó mezclando 16,037 g de dietanolamina, 36,838 g de agua estéril y 22,5031 g de N-acetiltriptófano y se sonicó para combinarse. Se agitó en primer lugar la mezcla de fase cúbica/dietanolamina-NAT, entonces se homogeneizó y finalmente se procesó en un microfluidizador de Microfluidics hasta un tamaño de partícula menor que 300 nm. Mientras que el material aún estaba en el microfluidizador, se añadieron 47,279 g de una disolución de acetato de zinc al 25 % en peso y 5,371 g de dietanolamina, y se microfluidizó la mezcla total durante 21 ejecuciones de 1,5 minutos cada una. Se inyectaron entonces cinco ml de una mezcla caliente (60°C) de agua y sorbitano-monopalmitina (6%) durante la microfluidización, y a continuación 5 ml de una disolución acuosa de albúmina al 15%. Después de microfluidización adicional, se dividió la dispersión en tubos de centrífuga de 3,5 ml de dispersión cada uno, y se añadieron aproximadamente 0,14 g de carbón activado Norit a cada tubo, y se agitó el tubo durante 15 minutos en un oscilador. Se centrifugó entonces cada tubo durante 5 minutos en una centrífuga de mesa a 6000 rpm. Entonces se prefiltró la dispersión, luego se filtró a 0,8 micras usando filtros Millex AA, se puso entonces en una vial sellada y se envió a una instalación para pruebas con animales. A esta formulación se le dio la referencia "F2V".

Se sometieron a prueba estas formulaciones en ratas Sprague-Dawley macho en el modelo de "retirada de la pata" para determinar la duración de la analgesia. Se estudiaron ratas Sprague-Dawley macho, que pesaban 200-260 g a un nivel de dosis, 1,0 mg/kg. Se mantuvieron las temperaturas de superficie en un intervalo de desde 50 hasta 54°C. Se registró mediante cronómetro digital el periodo de latencia para presentar retirada de la pata de la superficie calentada. Se encontró que el periodo de latencia de referencia era de aproximadamente 1 a 3 segundos en patas traseras no anestesiadas. En un intento de minimizar la lesión térmica de la pata trasera, se limitó la exposición máxima al aparato de pruebas plantares térmicas a 12 segundos. Los periodos de latencia que superaron los 6 segundos se consideraron indicativos de analgesia frente a la prueba térmica. Cada grupo comprendía seis ratas, y se sometieron a prueba para determinar la latencia de retirada de la pata de la extremidad posterior tratada cada hora comenzando una hora tras la administración y continuando durante seis horas tras la administración. Con el fin de evitar cualquier sesgo por el traumatismo térmico, se evaluaron los grupos de prueba en dos segmentos, tal como se describió anteriormente.

Los resultados resumen se exponen en tres tablas en la tabla conjunta 3. En cada tiempo de medición, todos los grupos a los que se les administró F2V contenían igual o más animales que mostraban bloqueo nervioso que los grupos a los que se les administró la disolución de clorhidrato de bupivacaína patrón. Comenzando a las 4 horas tras la administración, el número de animales en el grupo de la disolución de clorhidrato de bupivacaína patrón que experimentaron bloqueo disminuyó significativamente, mientras que todos los animales en los grupos de F2V permanecieron con bloqueo. Este también fue el caso a las 5 horas tras la administración y continuó siendo el caso para el grupo de F2V a las 6 horas tras la administración. A las 16 horas tras la administración, experimentaron bloqueo más de la mitad del grupo de F2V. A las 17 horas experimentaron bloqueo 5 de los seis animales en el grupo de F2V. Debido a la intensa disminución de animales con bloqueo en el grupo de disolución de clorhidrato de bupivacaína patrón (sólo de 1 a 6 horas tras la administración), no se sometieron a prueba los animales en este grupo a de 16 a 18 horas. Las

puntuaciones totales (en segundos) y las puntuaciones promedio para cada grupo son sistemáticas, y muestran puntuaciones significativamente mayores para el grupo de F2V que la disolución de clorhidrato de bupivacaína patrón a las cinco horas tras la administración y después. La duración relativa en este ejemplo era de aproximadamente $[17 \text{ h}]/[4 \text{ h}] \times 100\% = 425\%$, y la dosis relativa del 100%, haciendo el factor de amplificación de aproximadamente 4,25.

5

Tabla conjunta 3

RESUMEN: NUMERO DE BLOQUEOS

| | 1 h | 2 h | 3 h | 4 h | 5 h | 6 h | 16 h | 17 h | 18 h |
|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|
| F2V | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 4 | 5 | 1 |
| Marcaïne | 6 | 6 | 4 | 3 | 3 | 1 | NP | NP | NP |

RESUMEN: PUNTUACIONES TOTALES (en segundos)

| | 1 h | 2 h | 3 h | 4 h | 5 h | 6 h | 16 h | 17 h | 18 h |
|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|
| F2V | 72 | 71 | 68 | 71 | 70 | 64 | 53 | 56 | 37 |
| Marcaïne | 69 | 66 | 51 | 44 | 40 | 31 | NP | NP | NP |

RESUMEN: PUNTUACIONES PROMEDIO

| | 1 h | 2 h | 3 h | 4 h | 5 h | 6 h | 16 h | 17 h | 18 h |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|------|------|
| F2V | 12,00 | 11,83 | 11,33 | 11,83 | 11,67 | 10,67 | 8,83 | 9,33 | 6,17 |
| Marcaïne | 11,50 | 11,00 | 8,50 | 7,33 | 6,67 | 5,17 | NP | NP | NP |

NP = no sometido a prueba

10

Ejemplo 30. Se preparó la dispersión líquido-cristalina de partículas recubiertas que contenía el fármaco anestésico local bupivacaína del ejemplo 29 ("F2V"). Se sometió a prueba la formulación en ratas Sprague-Dawley macho, que pesaban 200-275 g, en el modelo de "retirada de la pata" en rata del ejemplo 103 en tres niveles de dosis, 1,0 mg/kg, 0,67 mg/kg y 0,33 mg/kg, sometiéndose a prueba seis ratas para cada formulación para cada dosis. La disolución de clorhidrato de bupivacaína patrón (Marcaïne®) también se sometió a prueba en los mismos tres niveles de dosis. Se suministraron los artículos de prueba a una concentración de agente activo del 1,5%, y se diluyó según se requirió con agua estéril para inyección para administrar las dosis de 0,67 mg/kg y 0,33 mg/kg. Se suministró la bupivacaína patrón a una concentración del 0,75%, y se diluyó según se requirió con agua estéril para inyección para administrar la dosis de 0,33 mg/kg. Se sometieron a prueba las ratas para determinar la latencia de retirada de la pata a las dos horas tras la administración, y entonces comenzando a las cuatro horas tras la administración cada hora durante siete horas tras la administración.

15

20

25

30

35

Los resultados resumen se exponen en tres tablas en la tabla conjunta 4. A las siete horas tras la administración, más de la mitad de los animales a los que se les administró F2V, en los tres niveles de dosis, experimentaron un efecto de bloqueo sensorial, mientras ninguno de los animales a los que se les administró disolución de clorhidrato de bupivacaína patrón lo hizo (tabla 1). De hecho, ninguno de los animales a los que se les administró disolución de clorhidrato de bupivacaína patrón experimentó bloqueo a las 6 horas o después. Esta diferencia en el efecto entre la formulación F2V y la disolución de clorhidrato de bupivacaína patrón a lo largo de los grupos de dosis se manifiesta también en las puntuaciones totales (en segundos) (tabla 2) y la puntuación promedio (tabla 3): todos los animales a los que se les administró F2V experimentaron bloqueo con una duración significativamente más prolongada que aquellos a los que se les administró la disolución de clorhidrato de bupivacaína patrón a cualquiera de las dosis administradas. Por tanto, los animales a los que se les administró F2V a 0,33 mg/kg mostraron un bloqueo más prolongado y significativamente mayor que los animales a los que se les administró la disolución de clorhidrato de bupivacaína patrón, incluso a tres veces la dosis. Además, entre los animales a los que se les administró F2V, los dos grupos de menor nivel de dosis mostraron un efecto de bloqueo sensorial importante. Además mostraron puntuaciones totales y puntuaciones promedio similares o mayores en comparación con el grupo de dosis de 0,67 mg/kg y 1,0 mg/kg, particularmente en comparación con los animales a los que se les administró disolución de clorhidrato de bupivacaína patrón. El grupo al que se le administró F2V a la menor dosis de prueba, 0,33 mg/kg, mostraron el mismo número de animales con bloqueo que el grupo al que se le administró dos veces la dosis (0,67 mg/kg) y uno más que el grupo al que se le administró tres veces la dosis (1,0 mg/kg).

5

Centrándose en los resultados a 0,33 mg/kg, se observa que la duración de acción fue de más de 7 horas (el tiempo máximo permitido debido a restricciones experimentales), puesto que 5 de 6 ratas experimentaron bloqueo aún después de 7 horas. Esto permite poner un límite inferior en el factor de amplificación. Usando esta cifra de 7 horas, la duración relativa en este ejemplo era de $[7 \text{ h}]/[4 \text{ h}] \times 100\% = 175\%$, y la dosis relativa del 33%, haciendo el factor de amplificación de aproximadamente 5,25.

Tabla conjunta 4

RESUMEN: NUMERO DE BLOQUEOS

| | 1 h | 2 h | 3 h | 4 h | 5 h | 6 h | 7 h |
|---------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| FV2 0,33 | 6 | 6 | 6 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| FV2 0,67 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 5 | 5 |
| FV2 1,0 | 6 | 6 | 6 | 6 | 5 | 5 | 4 |
| Marcaine 0,33 | 6 | 6 | 3 | 2 | 0 | 0 | NP |
| Marcaine 0,67 | 6 | 6 | 1 | 0 | 1 | 0 | NP |
| Marcaine 1,0 | 6 | 5 | 5 | 3 | 3 | 0 | NP |

RESUMEN: PUNTUACIONES TOTALES (en segundos)

| | 1 h | 2 h | 3 h | 4 h | 5 h | 6 h | 7 h |
|---------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| FV2 0,33 | 70 | 66 | 58 | 61 | 57 | 58 | 55 |
| FV2 0,67 | 72 | 63 | 72 | 67 | 66 | 55 | 56 |
| FV2 1,0 | 72 | 63 | 70 | 65 | 60 | 54 | 52 |
| Marcaine 0,33 | 72 | 54 | 46 | 36 | 28 | 28 | NP |
| Marcaine 0,67 | 72 | 58 | 33 | 27 | 29 | 24 | NP |
| Marcaine 1,0 | 68 | 53 | 52 | 46 | 39 | 24 | NP |

RESUMEN: PUNTUACIONES PROMEDIO

| | 1 h | 2 h | 3 h | 4 h | 5 h | 6 h | 7 h |
|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|------|------|
| FV2 0,33 | 11,67 | 11,00 | 9,67 | 10,17 | 9,50 | 9,67 | 9,17 |
| FV2 0,67 | 12,00 | 10,50 | 12,00 | 11,17 | 11,00 | 9,17 | 9,33 |
| FV2 1,0 | 12,00 | 10,50 | 11,67 | 10,83 | 10,00 | 9,00 | 8,67 |
| Marcaine 0,33 | 12,00 | 9,00 | 7,67 | 6,00 | 4,67 | 4,67 | NP |
| Marcaine 0,67 | 12,00 | 9,67 | 5,50 | 4,50 | 4,83 | 4,00 | NP |
| Marcaine 1,0 | 11,33 | 8,83 | 8,67 | 7,67 | 6,50 | 4,00 | NP |

NP = no sometido a prueba

10

15

Ejemplo 31. En este ejemplo, se solubilizó el fármaco anticancerígeno paclitaxel en una fase cúbica de Pluronic-aceite esencial-agua, que se encapsuló mediante una cubierta zinc-NAT como en el ejemplo 2. Se preparó la fase cúbica mezclando 0,070 g de goma benjuí, 0,805 g de aceite esencial de albahaca y 0,851 g de aceite de ilang-ilang, calentando para disolver la goma benjuí, entonces añadiendo 265 mg de paclitaxel, 3,257 g de aceite de menta verde, 0,640 g de aldehído de fresa, 0,220 g de ácido etilhexanoico, 1,988 g de agua desionizada y finalmente 3,909 g de Pluronic 103. Se realizó el encapsulamiento de manera similar a como en el ejemplo anterior, excepto que se usó una homogeneización corta en lugar de microfluidización. No se incorporó monopalmitina, y se omitió saltándose la etapa de purificación con carbón Norit. Se puso la dispersión en viales y se enviaron para pruebas de absorción oral en perros.

5 Se les realizó una canulación a perros Beagle, de 10-12 kg de peso, para permitir la administración de la formulación directamente en el duodeno. Se sabe que paclitaxel muestra una absorción muy baja administrado por vía oral o por vía intraduodenal. En efecto, incluso en la formulación de Taxol^R, que incluye un gran volumen de tensioactivo (Cremophor EL) y etanol, que son ambos agentes de fluidización de membrana, la biodisponibilidad es menor que aproximadamente el 10%.

Se midieron los niveles en sangre de paclitaxel antes de la dosis, a los 20 minutos, 40 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 8 horas, 10 horas y 24 horas. Los resultados de un experimento con la formulación de fase cúbica fueron tal como siguen:

| Punto de tiempo | Concentración en sangre (ng/ml) |
|-----------------|---------------------------------|
| 20 min. | 79,4 |
| 40 min. | 149 |
| 1 hora | 122 |
| 2 horas | 100 |
| 3 horas | 79,5 |
| 4 horas | 70,1 |
| 8 horas | 43,2 |
| 10 horas | 31,1 |
| 24 horas | 17,6 |

10 Estos niveles en sangre, que se prolongan durante muchas horas, indican un alto grado de absorción de paclitaxel y niveles sistémicos sostenidos, y por tanto una mejora muy fuerte de la eficacia debido al vehículo de fase cúbica en el que se disolvió el paclitaxel. Como comparación, la patente estadounidense 6.730.698 concedida a Broder *et al.* muestra resultados de administración oral en ratas de 9 mg/kg, es decir, una dosis 9 veces mayor que la usada en este presente ejemplo, en el que se alcanzaron niveles en sangre máximos de aproximadamente 30 ng/ml, y después de sólo 4 horas disminuyeron hasta menos de 10 ng/ml. Si se toma que la duración de acción relativa del fármaco viene dada aproximadamente (y de manera bastante conservadora, se podría argumentar) por $[24 \text{ h}]/[4 \text{ h}] \times 100\% = 600\%$, y que la dosis relativa es de $[1 \text{ mg/kg}]/[9 \text{ mg/kg}] = 11\%$, entonces el factor de amplificación en este caso es de aproximadamente el $600\% / 11\% = 54,0$. Aunque este resultado drástico fue un resultado de fase temprana y no debe tomarse como un resultado reproducible sistemáticamente, sí que proporciona una indicación en cuanto al potencial inherente en las formulaciones de esta invención en el campo de la administración oral de fármacos. Por supuesto, el paclitaxel se conoce bien por mostrar toxicidades sistémicas dependientes de la dosis importantes.

25 Aunque se ha descrito la invención en cuanto a sus realizaciones preferidas, los expertos en la técnica reconocerán que la invención puede ponerse en práctica con modificación dentro del espíritu y alcance de las reivindicaciones adjuntas. Por consiguiente, la presente invención no debe limitarse a las realizaciones tal como se describieron anteriormente, sino que debe incluir además todas las modificaciones y equivalentes de las mismas dentro del espíritu y alcance de la descripción proporcionada en el presente documento.

REIVINDICACIONES

1. Partícula cargada de manera iónica, no recubierta estabilizada de un material de fase cúbica inversa o fase hexagonal inversa, mediante lo cual dicha partícula tiene un potencial zeta de ≥ 25 mV o < -25 mV.
- 5 2. Partícula cargada de manera iónica, no recubierta de un material de fase cúbica inversa o fase hexagonal inversa según la reivindicación 1, en la que dicho material de fase cúbica inversa o fase hexagonal inversa está formado por al menos un componente activo y al menos un segundo componente, en la que al menos uno del grupo que consiste en
- (i) dicho al menos un componente activo, y
- (ii) dicho al menos un segundo componente
- 10 tiene una carga catiónica o aniónica.
3. Composición que comprende una partícula cargada de manera iónica, no recubierta de un material de fase cúbica inversa o fase hexagonal inversa y un líquido que comprende un disolvente polar, estabilizándose dicha partícula cargada de manera iónica, no recubierta en dispersión en dicho líquido mediante lo cual dicha partícula tiene un potencial zeta de ≥ 25 mV o < -25 mV.
- 15 4. Composición según la reivindicación 3, que comprende:
- una partícula cargada de manera iónica, no recubierta de un material de fase cúbica inversa o fase hexagonal inversa en la que dicho material de fase cúbica inversa o fase hexagonal inversa está formado por al menos un componente activo y al menos un segundo componente, en la que al menos uno del grupo que consiste en
- (i) dicho al menos un componente activo, y
- 20 (ii) dicho al menos un segundo componente
- tiene una carga catiónica o aniónica; y
- un líquido que comprende un disolvente polar, estabilizándose dicha partícula cargada de manera iónica, no recubierta en dispersión en dicho líquido.
- 25 5. Partícula o composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, mediante lo cual dicha partícula tiene un potencial zeta de > 30 mV o < -30 mV.
6. Partícula o composición según las reivindicaciones 1–5, en la que la carga iónica de dicha partícula se debe a la presencia de al menos un compuesto asociado a bicapa, cargado.
7. Partícula o composición según la reivindicación 6, en la que el compuesto asociado a bicapa, cargado se selecciona del grupo que consiste en albúmina, caseína, estearilamina, succinato de tocoferol, azul de metileno, monoesterato de aluminio, sal de ácido glicocólico, sal de ácido desoxicólico, sal de ácido 2-etilhexanoico, sal de riboflavina, sal de fosfato de riboflavina, dodecilsulfato de sodio, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, sal de N-acetilriptófano, sal de triptófano, sal de tirosina, sal de fenilalanina, sal de oxiquinolina y sal de docusato.
- 30 8. Partícula o composición según la reivindicación 6, en la que la razón en peso del compuesto asociado a bicapa, cargado con respecto al material de fase cúbica inversa o fase hexagonal inversa es de entre 0,01:1 y 0,15:1.
- 35 9. Partícula o composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la razón en peso del compuesto asociado a bicapa cargado con respecto al material de fase cúbica inversa o hexagonal inversa es de entre 0,02:1 y 0,08:1.
- 40 10. Partícula o composición según las reivindicaciones 1 a 5, en la que el agente activo es un compuesto farmacéutico o nutricional.
11. Partícula o composición según la reivindicación 10, en la que el compuesto farmacéutico se elige del grupo que consiste en anestésicos generales, anestésicos locales, compuestos anticancerígenos, relajantes musculares, hipnóticos, sedantes, analgésicos, antipiréticos, antiinflamatorios no esteroideos, esteroides, antiinflamatorios esteroideos, opiáceos, cannabinoides, antibióticos y proteínas.
- 45 12. Partícula o composición según la reivindicación 11, en la que el anestésico general se selecciona del grupo que consiste en propofol, eugenol, alfaxalona, alfadolona, eltanolona, propanidid, ketamina, etomidato y pregnanolona.

13. Partícula o composición según la reivindicación 12, en la que dicho agente activo es propofol.
14. Partícula o composición según la reivindicación 12, en la que dicho agente activo es etomidato.
- 5 15. Partícula o composición según la reivindicación 11, en la que dicho anestésico local se selecciona del grupo que consiste en bupivacaína, lidocaína, procaína, tetracaína, mepivacaína, etidocaína, ropivacaína, cloroprocaína, cocaína, benzocaína, pramoxina, prilocaína, proparacaína, dibucaína y oxibuprocaína.
16. Partícula o composición según la reivindicación 15, en la que dicho anestésico local es bupivacaína.
17. Partícula o composición según las reivindicaciones 1 a 4, en la que la carga iónica de dicha partícula es catiónica y el potencial zeta de dicha partícula no recubierta es más positivo que +25 milivoltios.
- 10 18. Partícula o composición según las reivindicaciones 1 a 4, en la que la carga iónica de dicha partícula es aniónica y dicho potencial zeta es más negativo que -25 milivoltios.
19. Partícula o composición según las reivindicaciones 1 a 5, en la que el agente activo es un compuesto nutricional.
20. Partícula o composición según las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además un diluyente de alto coeficiente de reparto en dichas partículas no recubiertas.
- 15 21. Partícula o composición según la reivindicación 20, en la que dicho diluyente de alto coeficiente de reparto es la vitamina E.
22. Partícula o composición según las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicho material de fase cúbica inversa o fase hexagonal inversa comprende un tensioactivo o lípido.
- 20 23. Partícula o composición según la reivindicación 22, en la que dicho tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, Arlatone G, Tween 85, monooleato de glicerol, monoglicéridos insaturados de cadena larga, monooleato de sorbitano, docusato de calcio, Pluronic con menos de aproximadamente el 30% de grupos PEO en peso, Pluronic L122, Pluronic 123 y Pluronic L101.
- 25 24. Partícula o composición según las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicho material de fase cúbica inversa o fase hexagonal inversa comprende fosfatidilcolina y uno o más de fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico y fosfatidilserina.
25. Partícula o composición según las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicha partícula, composición o material es farmacéuticamente aceptable para inyección.
26. Partícula o composición según las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicha partícula, composición o material es farmacéuticamente aceptable para su aplicación tópica o intraocular.
- 30 27. Partícula o composición según la reivindicación 6, mediante lo cual el compuesto asociado a bicapa, cargado se selecciona de ácido desoxicólico y colatos relacionados, y ácido glicocólico y colatos relacionados.
28. Partícula o composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un aminoácido soluble zwitteriónico en una cantidad suficiente para ajustar la tonicidad, preferiblemente glicina, valina o prolina.
- 35 29. Uso de una partícula, composición o material según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para la preparación de un producto farmacéutico.
30. Formulación farmacéuticamente aceptable que comprende una composición o partícula de fase líquido-cristalina liotrópica cúbica inversa o hexagonal inversa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o una combinación de las mismas, y uno o más agentes farmacológicos en asociación con dicho material de fase líquido-cristalina liotrópica cúbica inversa o hexagonal inversa o combinación del mismo, que tiene una duración de acción aumentada de una dosis dada de dicho uno o más agentes farmacológicos en relación con la duración de acción de dicha dosis dada de dicho uno o más agentes farmacológicos en ausencia de dicha formulación farmacéuticamente aceptable, en un factor de amplificación, calculado como una duración relativa dividida entre una dosis relativa del 100%, igual o superior a 2.
- 40 31. Formulación farmacéuticamente aceptable que comprende la composición o partícula de fase líquido-cristalina liotrópica cúbica inversa o hexagonal inversa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o una combinación de las mismas, y uno o más agentes farmacológicos en asociación con dicho material de fase líquido-cristalina liotrópica cúbica inversa o hexagonal inversa o combinación del mismo, que tiene una dosis disminuida de dicho uno o más agentes farmacológicos que provocan una determinada duración de acción en relación con una dosis de dicho uno o más agentes farmacológicos que provocan dicha determinada duración
- 50

de acción en ausencia de dicha formulación farmacéuticamente aceptable, en un factor de amplificación, calculada como una duración relativa dividida entre una dosis relativa, igual o superior a 2.

- 32. Formulación farmacéuticamente aceptable según las reivindicaciones 30 ó 31, en la que el factor de amplificación es igual o superior a 4.
- 5 33. Formulación farmacéuticamente aceptable según las reivindicaciones 30 a 31, en la que la formulación está en forma de una suspensión de partículas compuestas por material líquido-cristalino liotrópico cúbico inverso o hexagonal inverso o una combinación del mismo.
- 34. Formulación farmacéuticamente aceptable según las reivindicaciones 30 a 33, en la que uno de dicho uno o más agentes farmacológicos es un anestésico local.
- 10 35. Formulación farmacéuticamente aceptable según la reivindicación 34, en la que el anestésico local es bupivacaína.

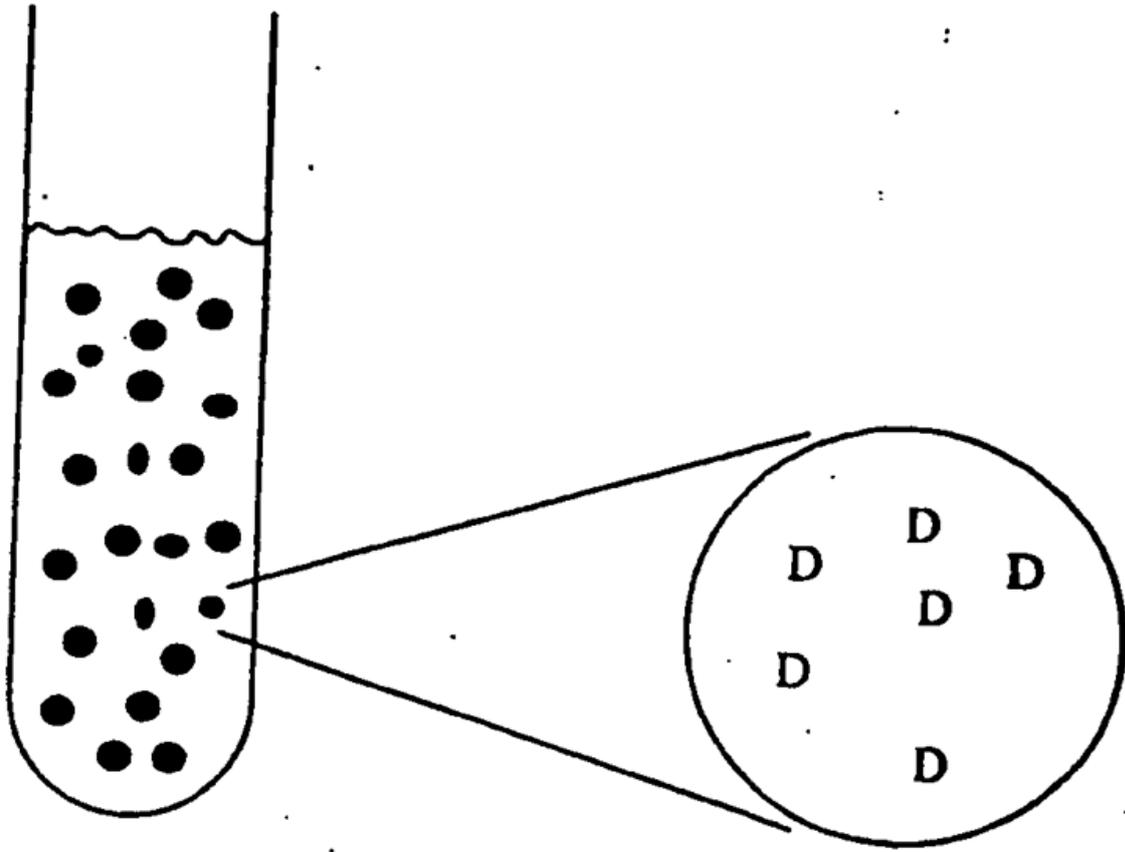


Figura1

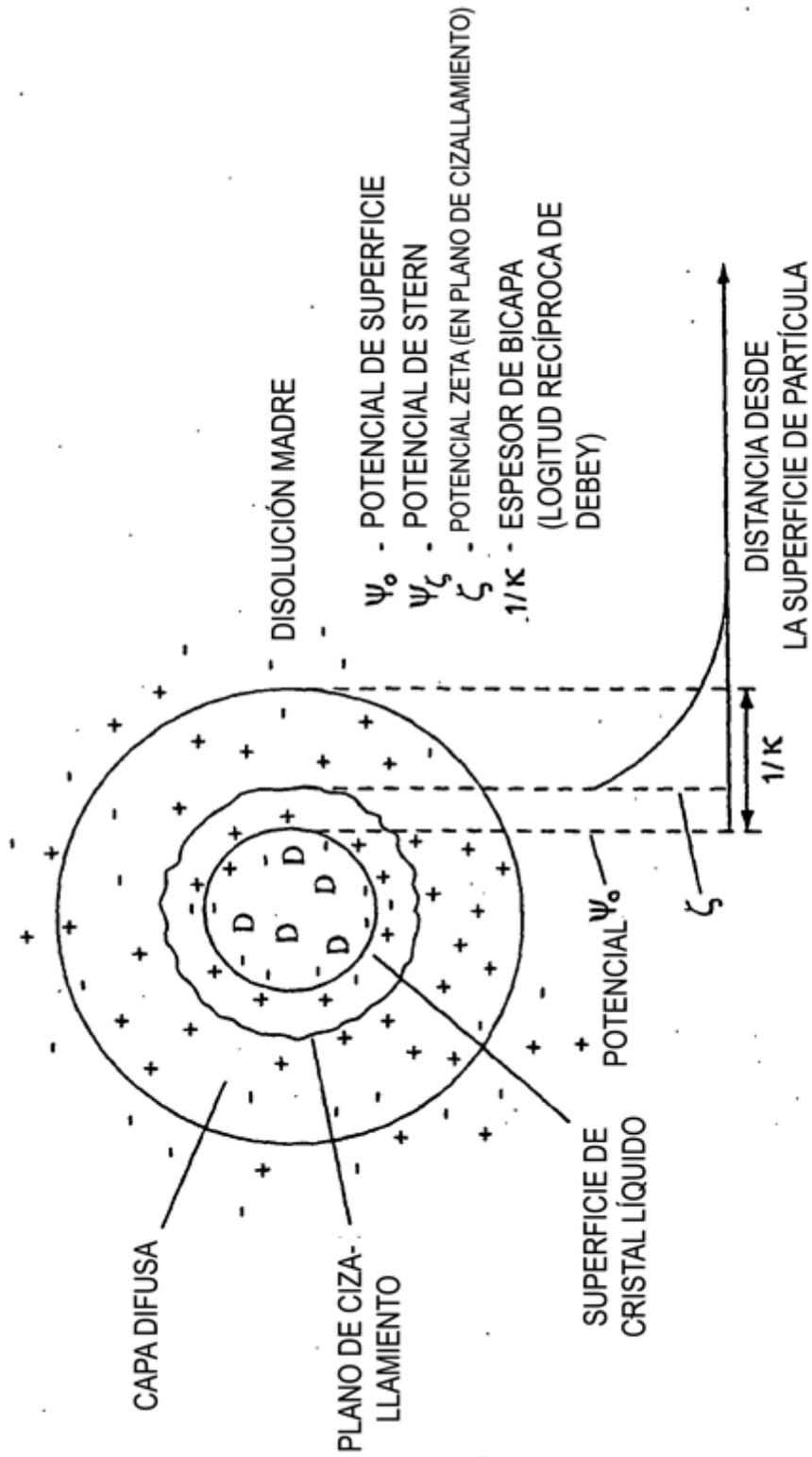


Figura 2

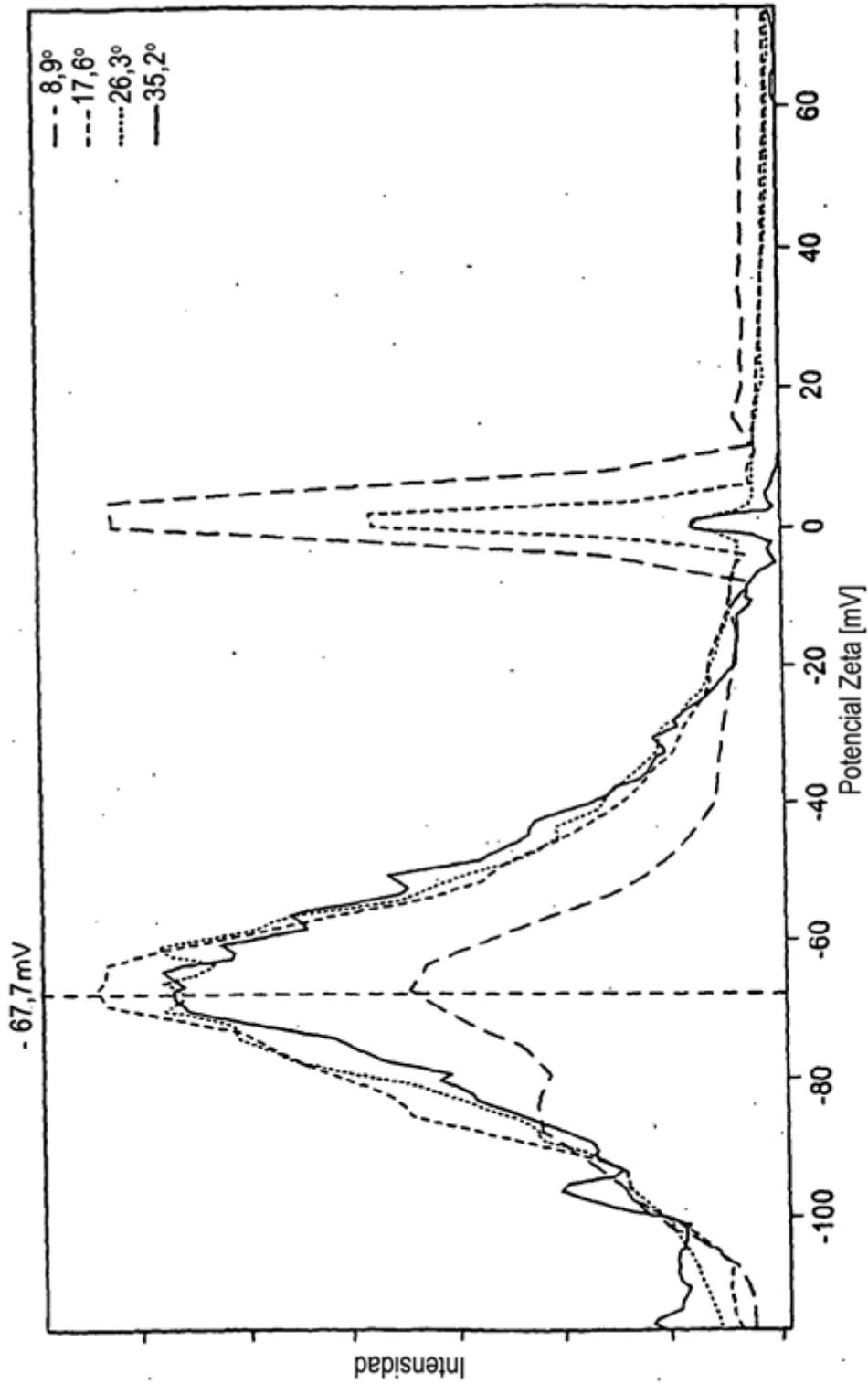


Figura 3

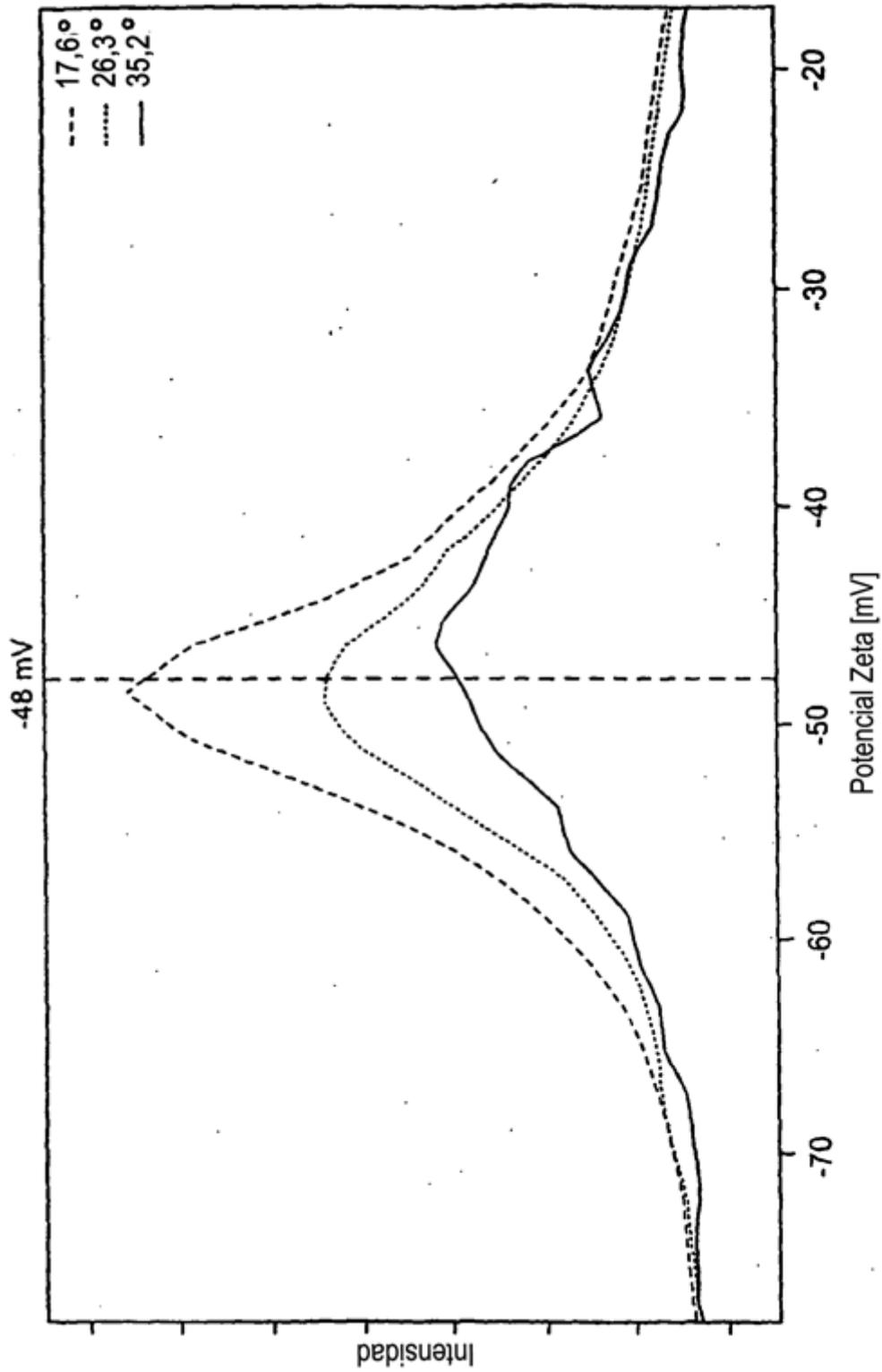


Figura 4

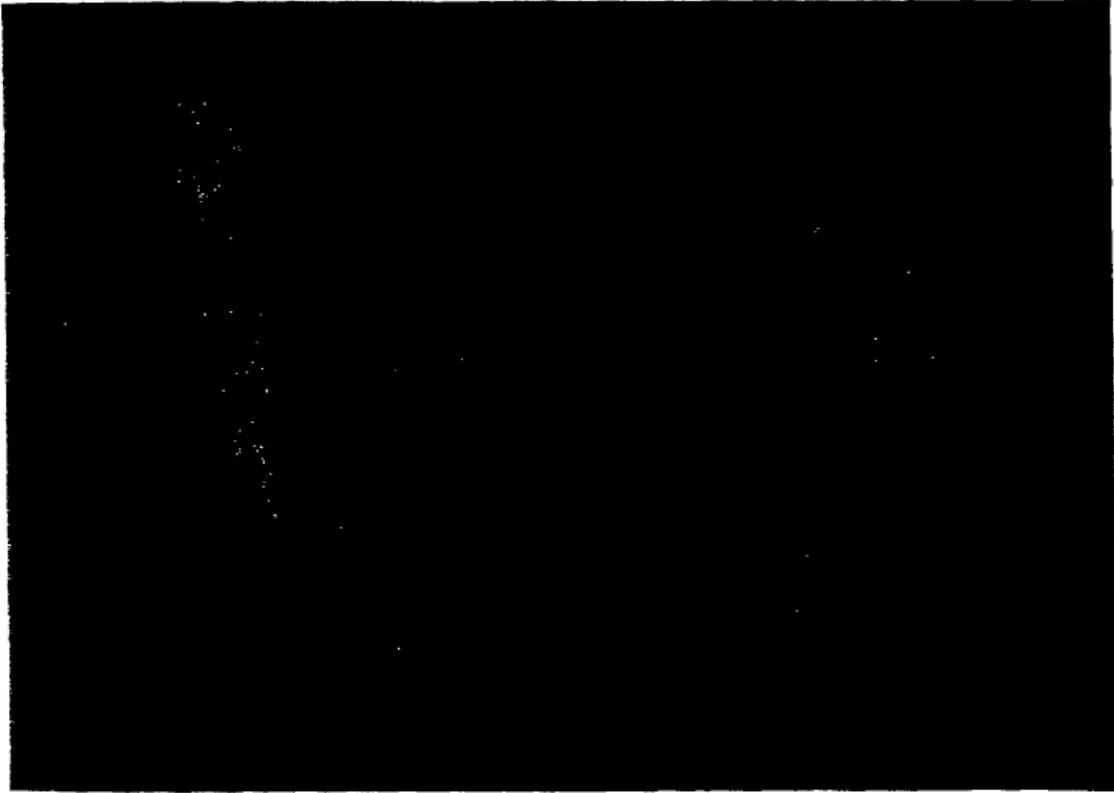


Figura 5

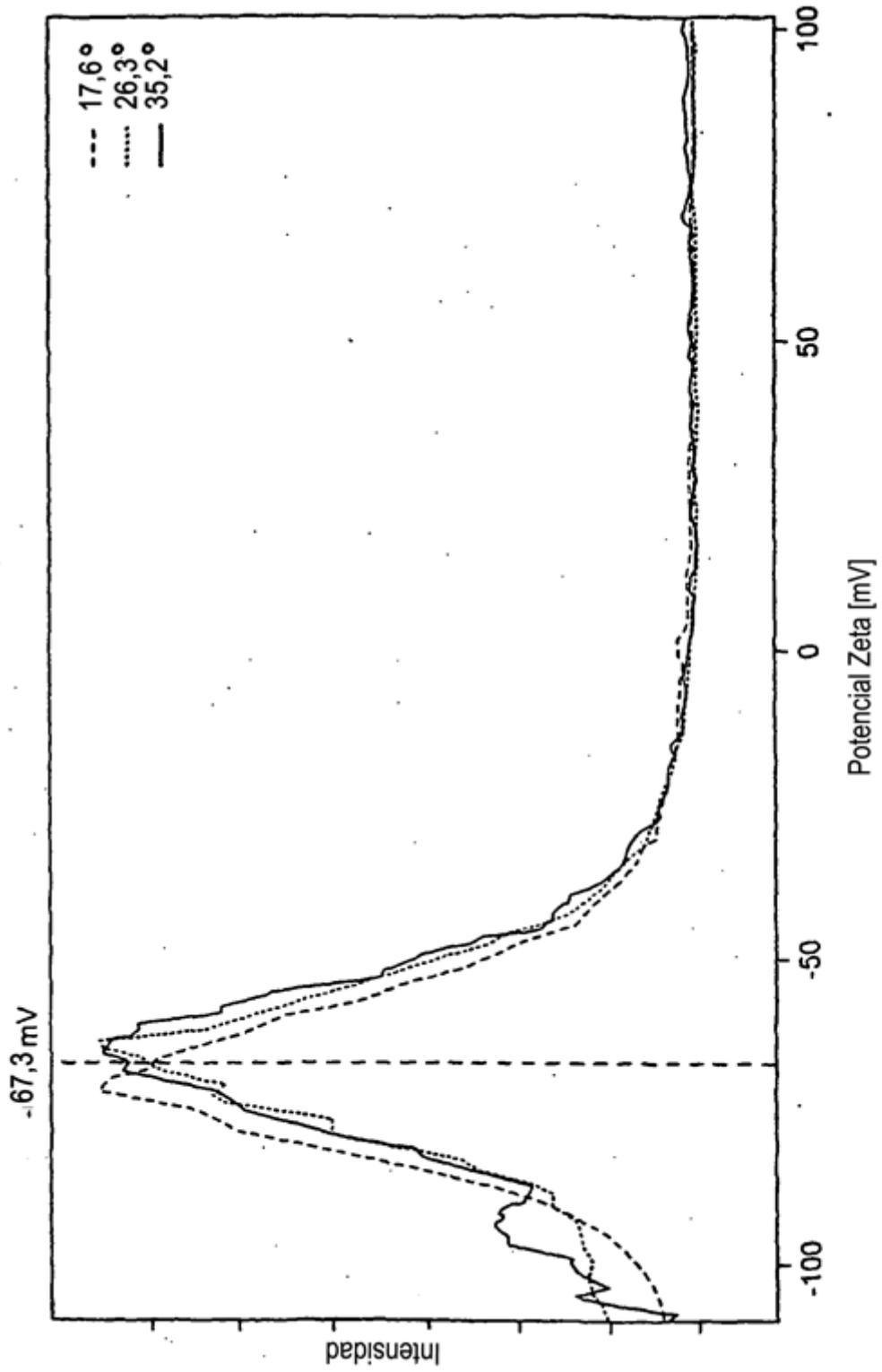


Figura 6

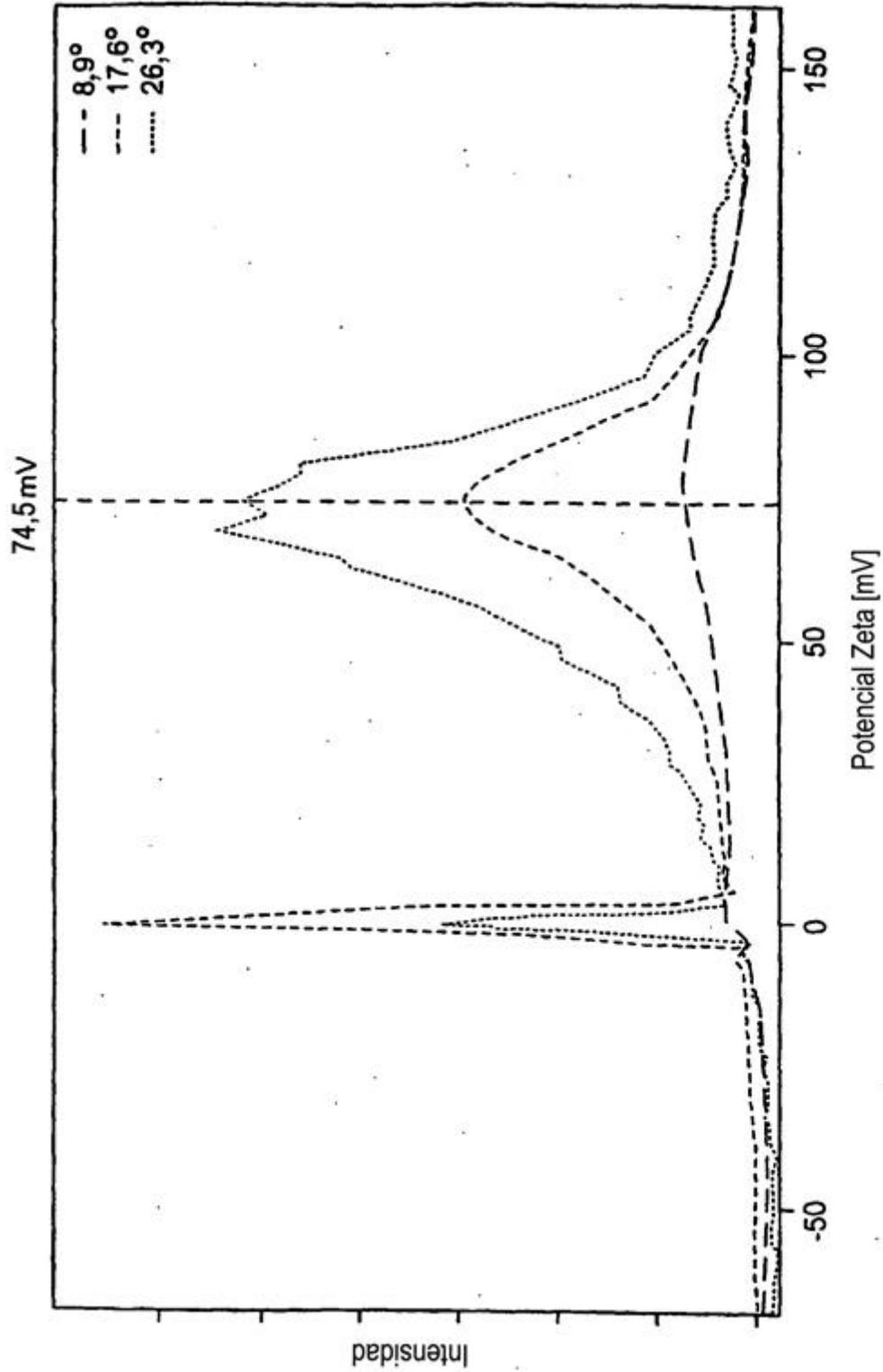


Figura 7

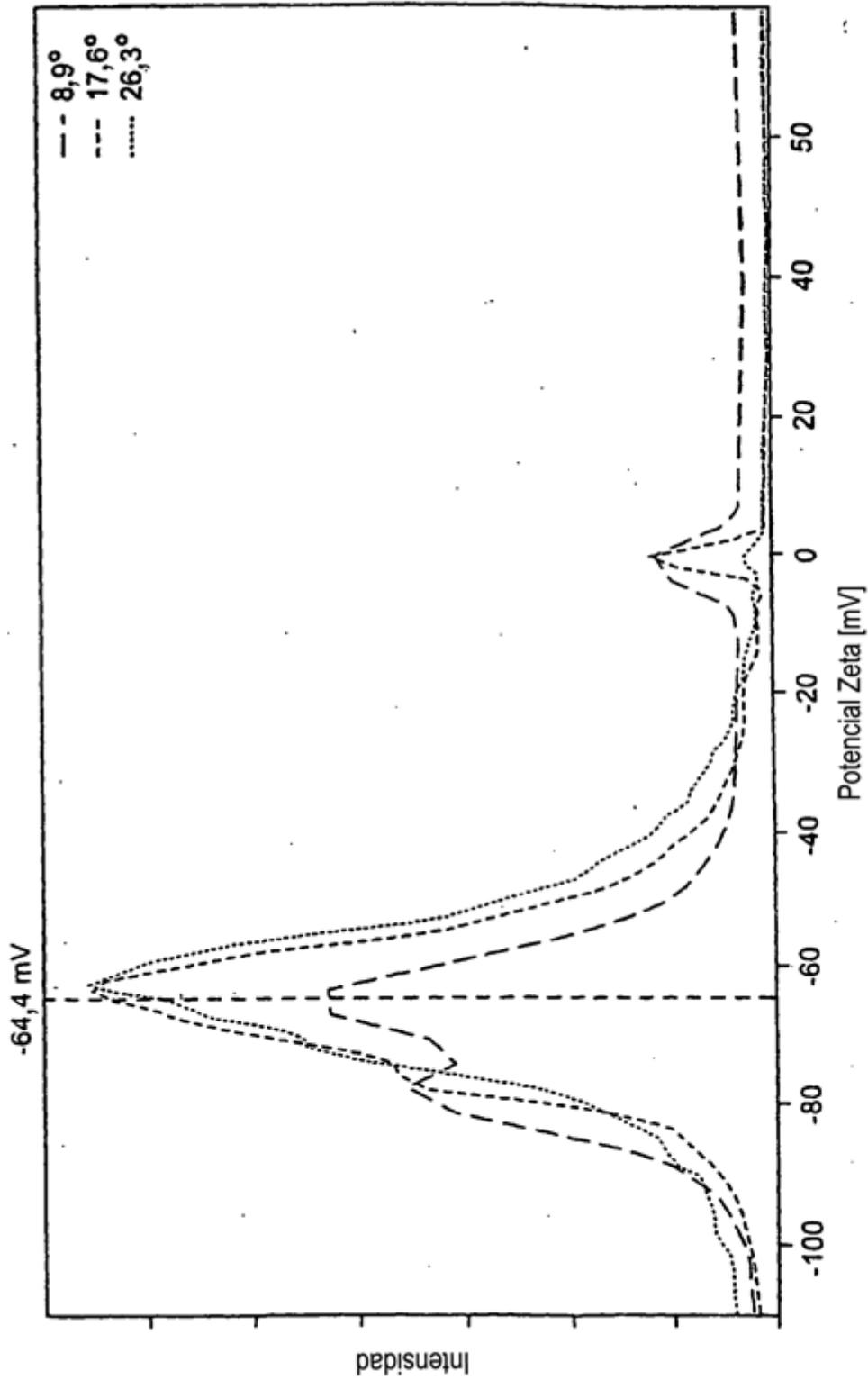


Figura 8

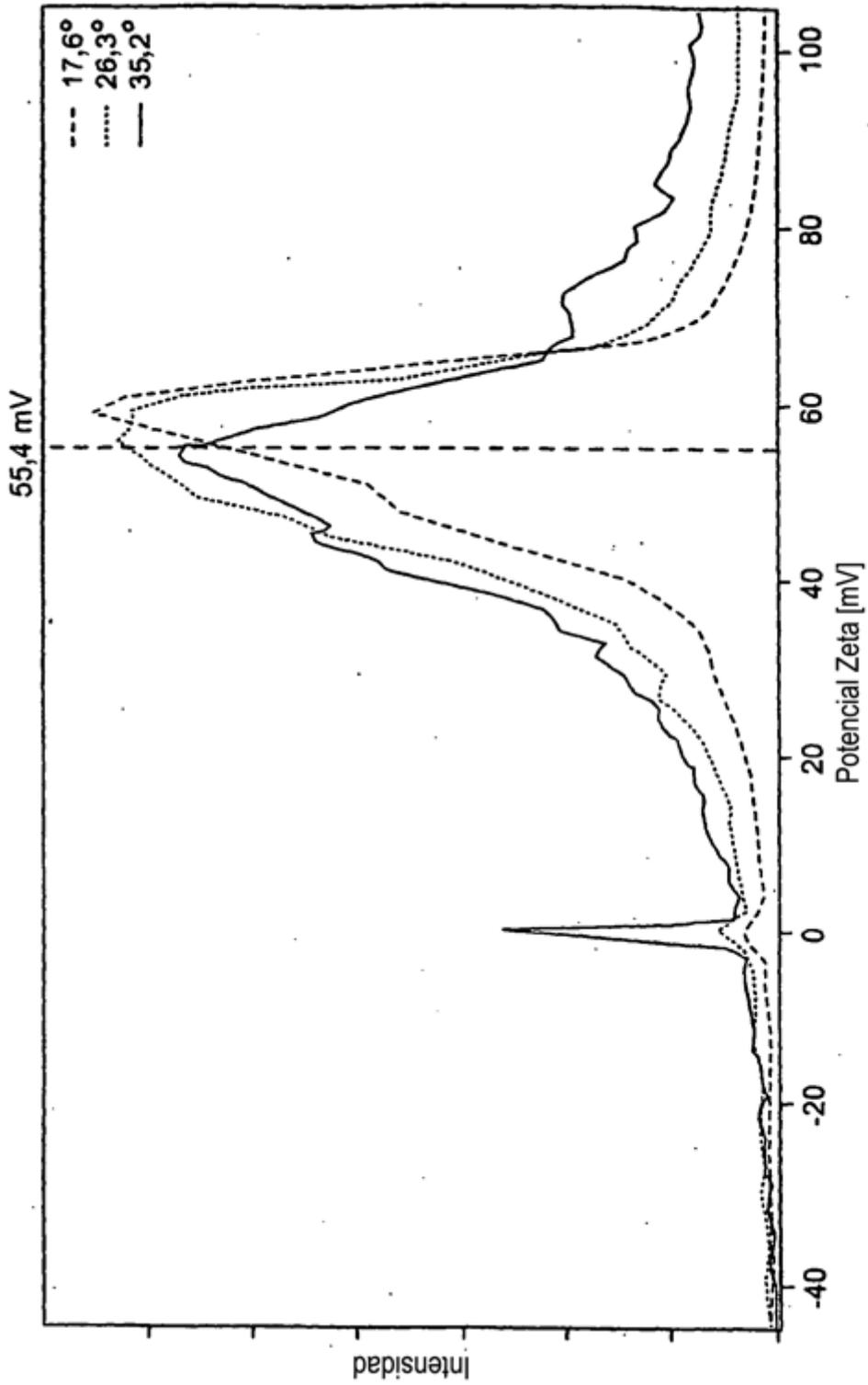


Figura 9

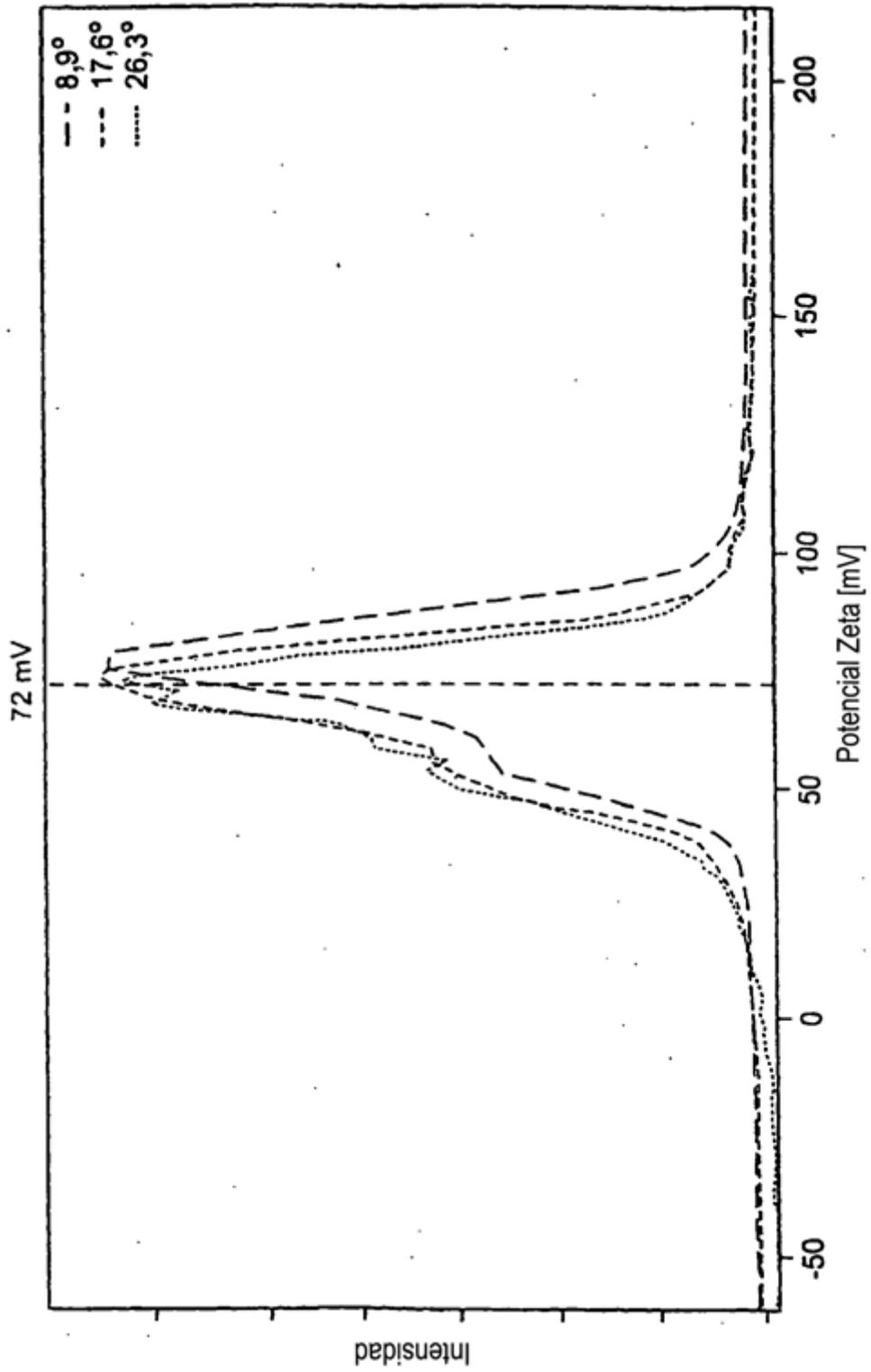


Figura 10

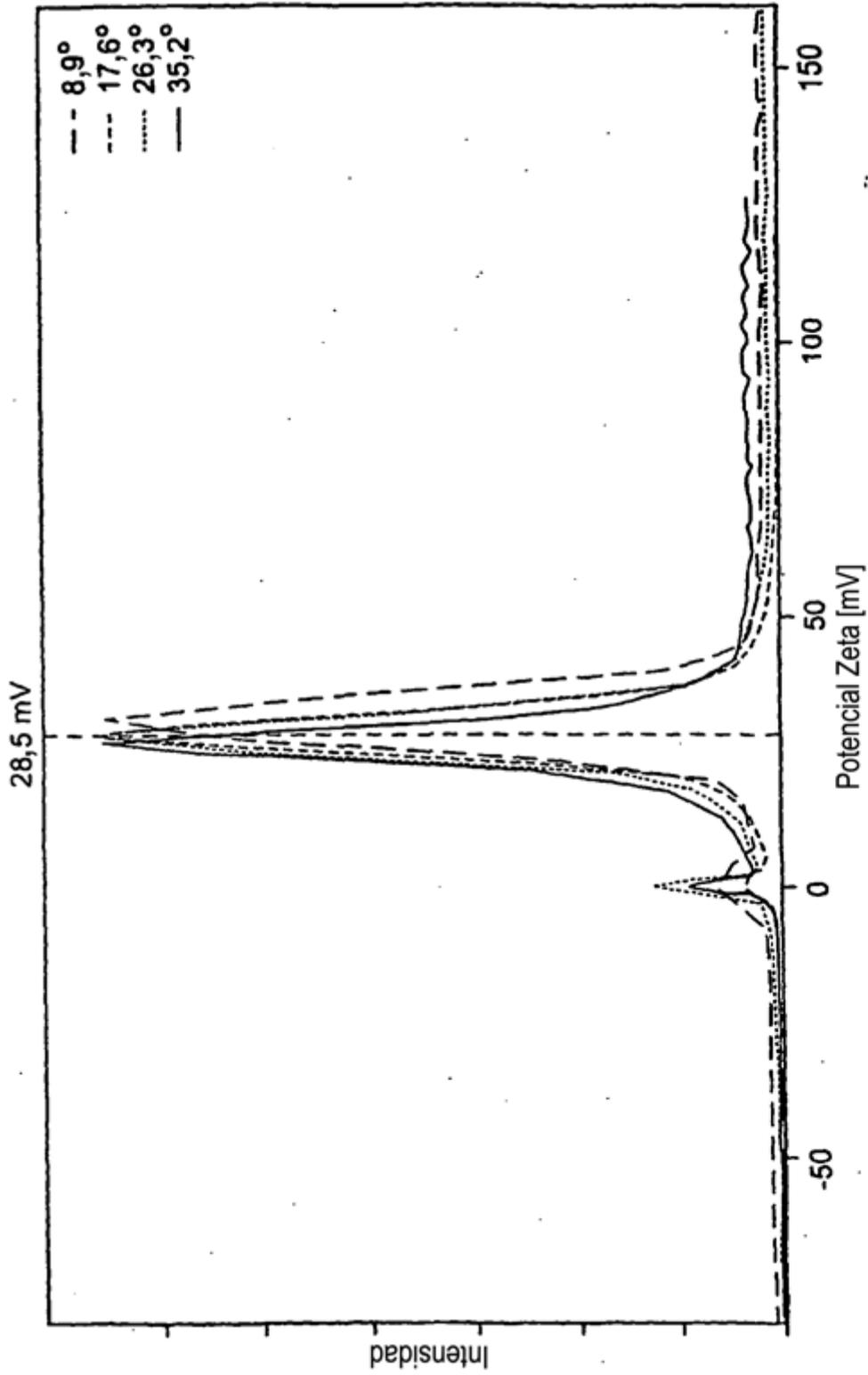


Figura 11

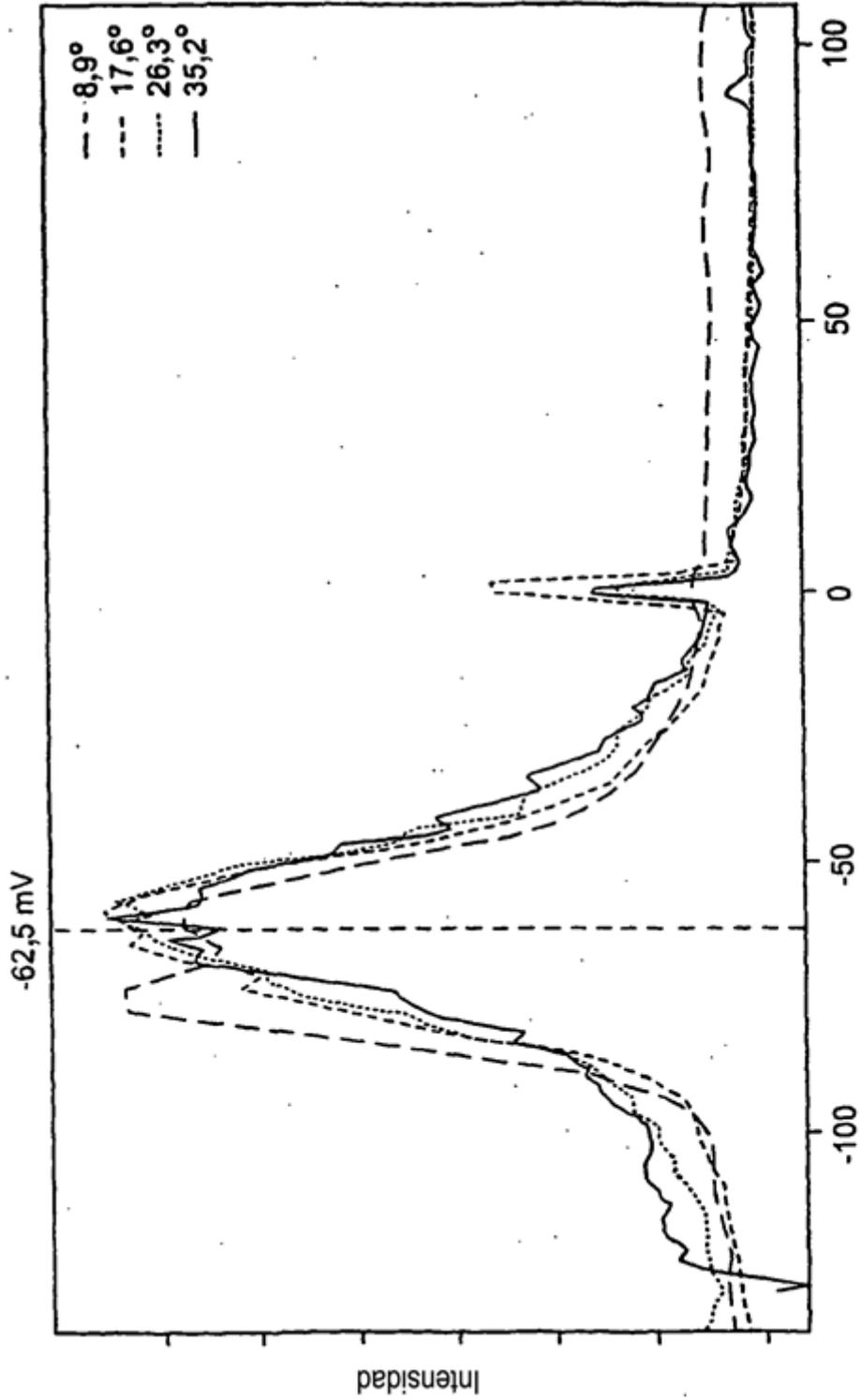


Figura 12

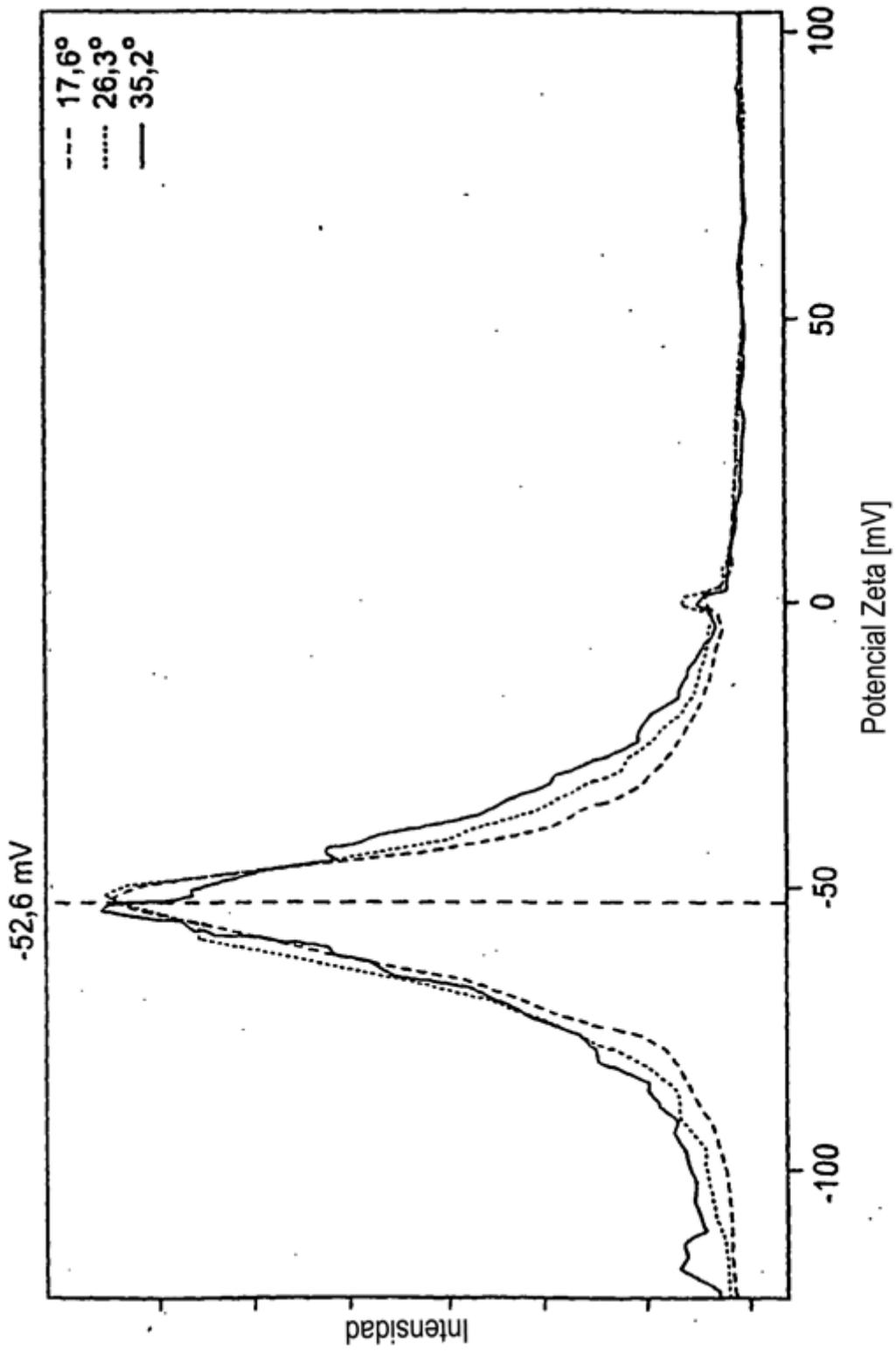


Figura 13

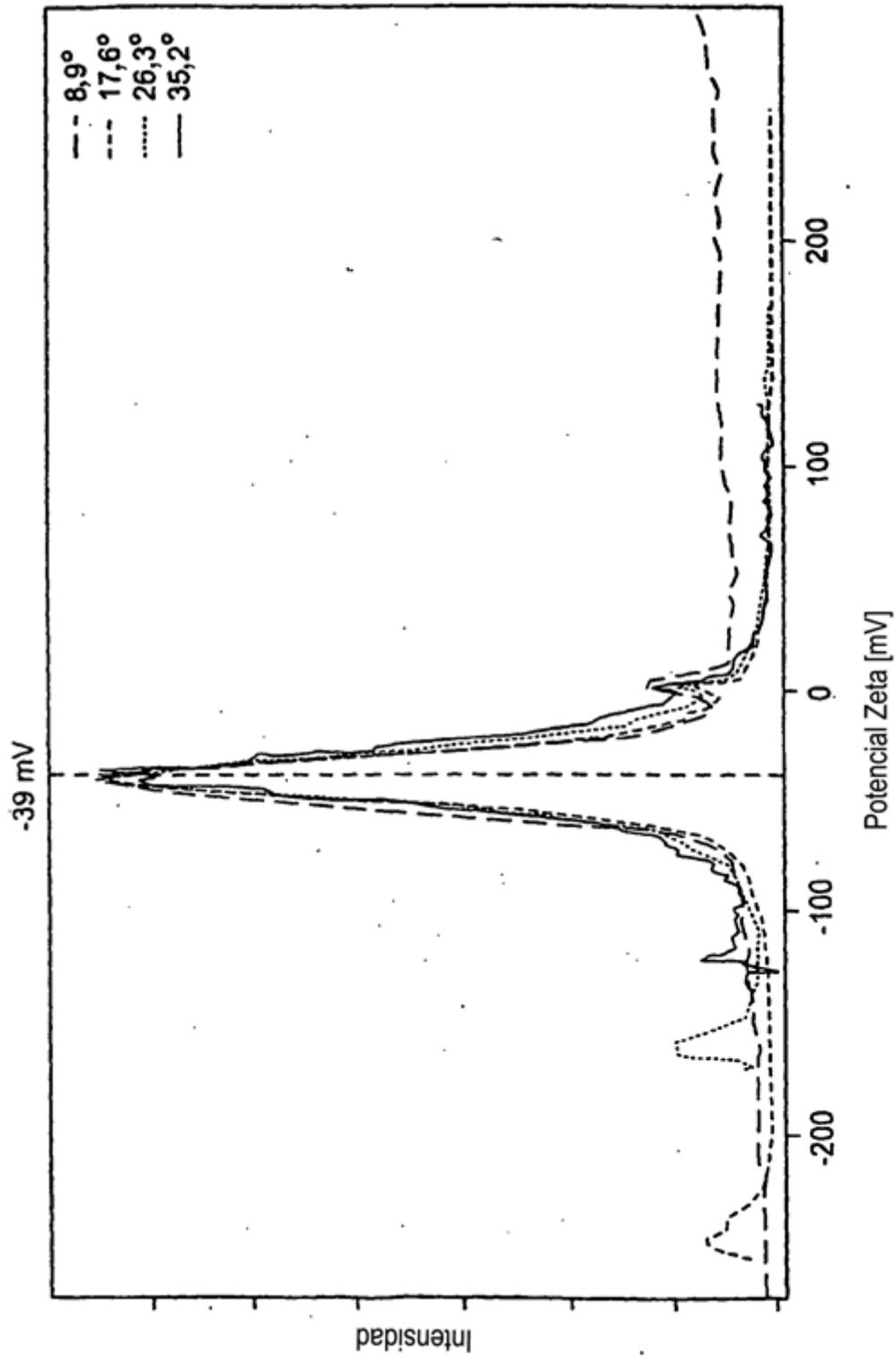


Figura 14

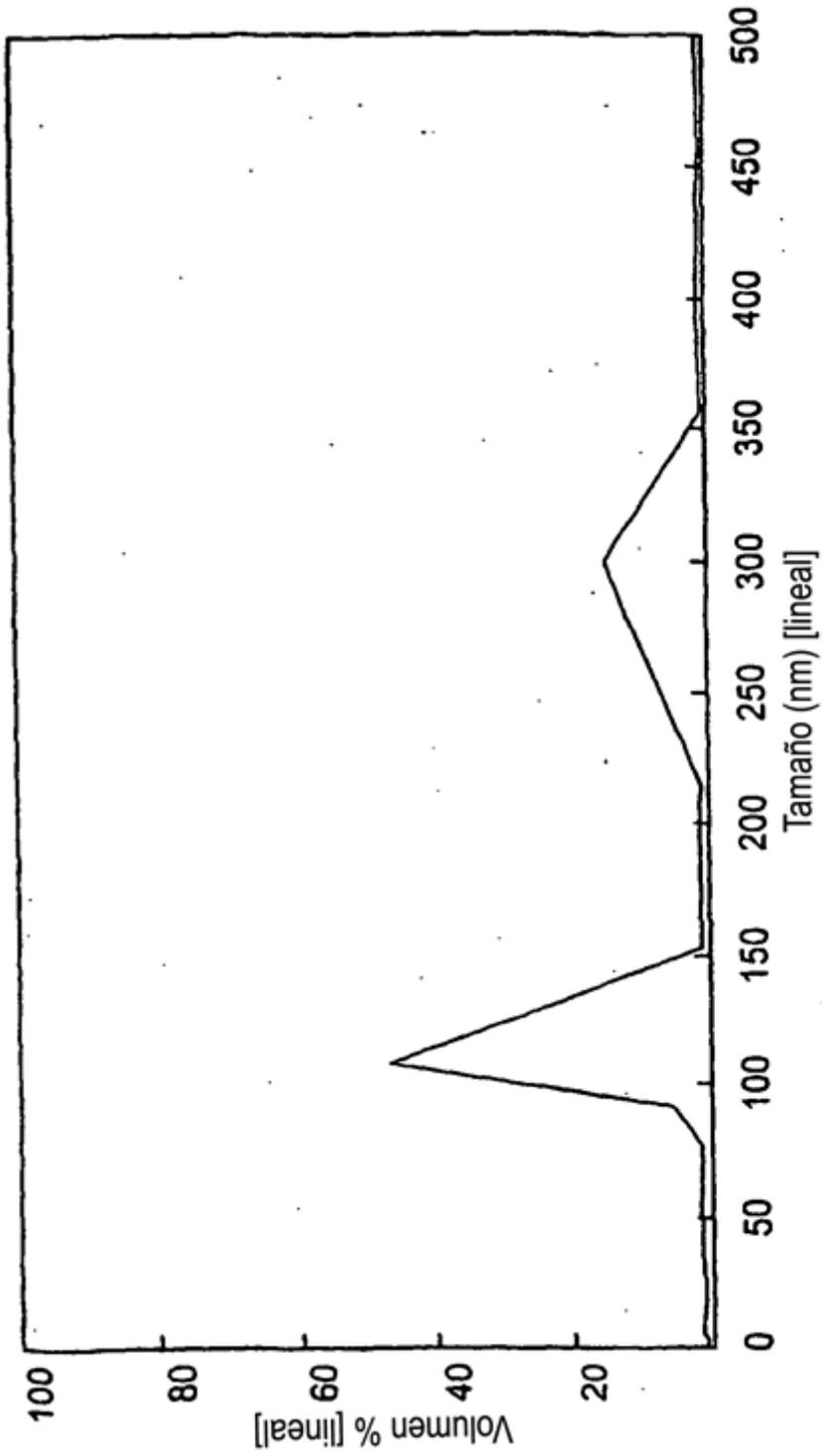


Figura 15

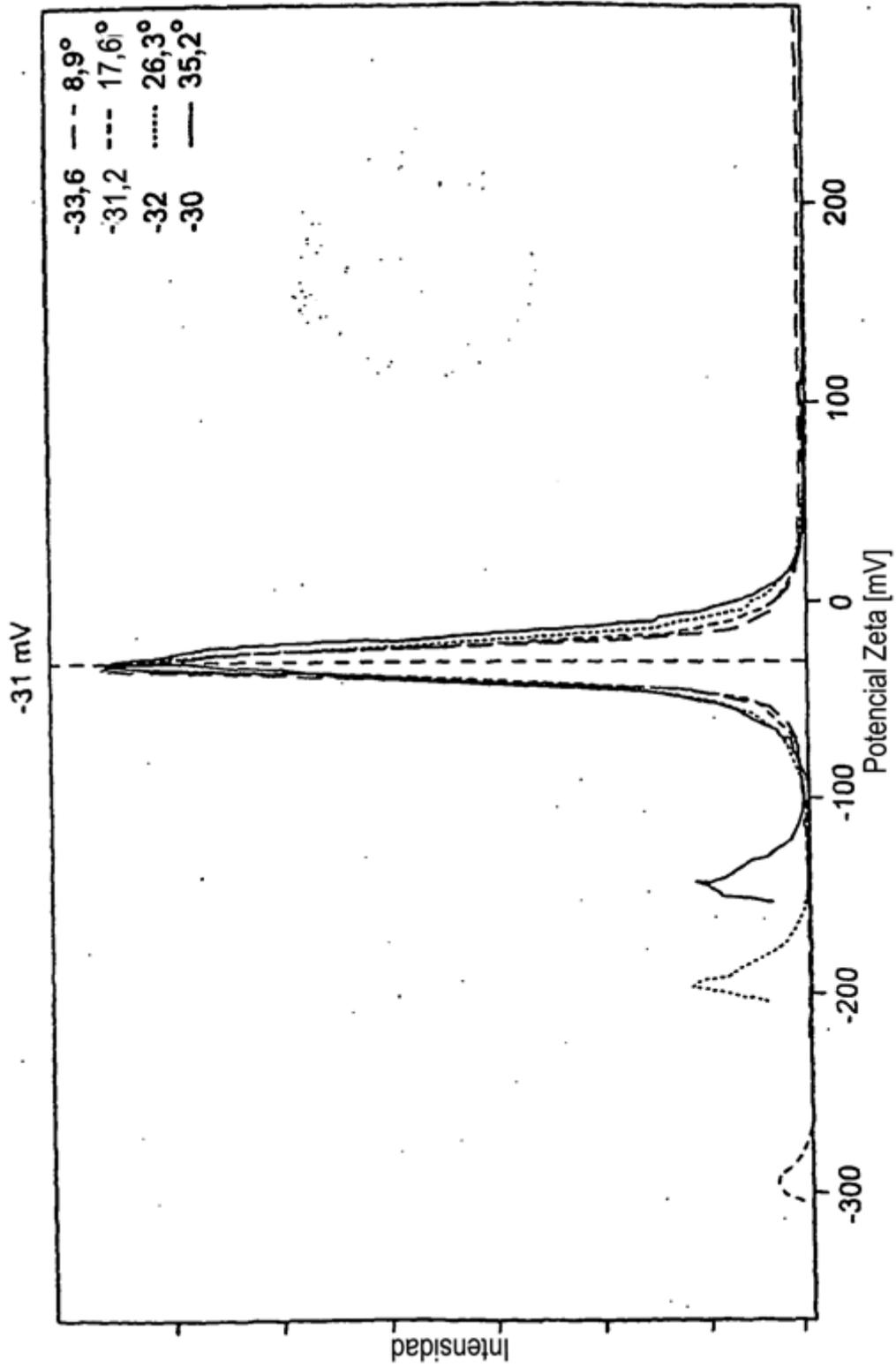


Figura 16