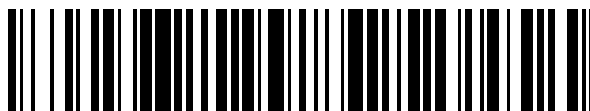


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 094**

51 Int. Cl.:  
**A61K 9/127** (2006.01)  
**A61J 3/00** (2006.01)

12

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **98957937 .0**
- 96 Fecha de presentación: **13.11.1998**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1030652**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.08.2000**

54 Título: **Producción de liposomas multivesiculares**

30 Prioridad:  
**14.11.1997 US 65856 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**29.06.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**29.06.2012**

73 Titular/es:  
**PACIRA PHARMACEUTICALS, INC.  
10450 SCIENCE CENTER DRIVE  
SAN DIEGO, CA 92121, US**

72 Inventor/es:  
**HARTOUNIAN, Hartoun;  
MEISSNER, Dagmar y  
PEPPER, Clint B.**

74 Agente/Representante:  
**Ungría López, Javier**

**ES 2 384 094 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

Producción de liposomas multivesiculares

5 **Antecedentes de la invención**

La presente invención se refiere en general al campo de métodos de encapsulación de sustancias fisiológicamente activas. Más específicamente, la invención se refiere a procesos de emulsificación para preparar formulaciones de liposomas multivesiculares, con características de liberación sostenida y las formulaciones producidas mediante esos procesos.

Cuando los fosfolípidos y muchos otros lípidos anfipáticos se dispersan suavemente en un medio acuoso los mismos se hinchan, se hidratan y forman de forma espontánea vesículas bicapas concéntricas multilamelares con capas de medio acuoso separando las bicapas lipídicas. Estos sistemas se denominan comúnmente liposomas multilamelares o vesículas multilamelares (MLV) y habitualmente tienen diámetros de desde 0,2 hasta 5  $\mu\text{m}$ . La sonicación de MLV da como resultado la formación de vesículas unilamelares pequeñas (SUV) que contienen una solución acuosa, unidas por una bicapa lipídica única con diámetros habitualmente entre el intervalo de desde 20 a 100 nm. Los liposomas multivesiculares (MVL) difieren de MLV y SUV en la manera en la que los mismos se preparan, en la disposición no concéntrica aleatoria de cámaras que contienen medio acuoso dentro del liposoma y en la inclusión de lípidos neutros necesarios para formar los MVL.

Se han usado diversos tipos de lípidos que difieren en longitud de cadena, saturación y grupo de cabeza durante años en formulaciones de fármacos liposómicos, incluyendo los liposomas unilamelares, multilamelares y multivesiculares mencionados anteriormente. Los lípidos neutros usados en la preparación de liposomas multivesiculares hasta la fecha han estado limitados principalmente a triglicéridos.

Los liposomas en diversas formas se han preparado mediante una diversidad de procesos diferentes. Sin embargo, la mayoría de tales procesos son adecuados únicamente para preparación a escala de laboratorio y no se pueden aumentar de escala fácilmente hasta tamaños de lote adecuados para producción comercial. Por tanto, existe una necesidad de procesos de preparación de liposomas que sean adecuados para preparación a gran escala. Entre los desafíos para el diseño de un proceso de preparación a gran escala eficiente y eficaz para liposomas (multivesiculares) está la necesidad de unir operaciones unitarias de una manera que eficaz. Tales operaciones unitarias incluyen: 1) primera emulsificación, 2) segunda emulsificación, 3) eliminación de disolvente, 4) filtración primaria y otras operaciones auxiliares necesarias para la producción a gran escala de MVL. El proceso también se puede llevar a cabo de una manera aséptica y tales procesos se consideran deseables.

La reología de emulsiones de agua-en-aceite (w/o) y específicamente los efectos de fracción de volumen y tamaño sobre la viscosidad, se han estudiado bien en la bibliografía. Los procesos de emulsión múltiples se usan actualmente en la industria farmacéutica para obtener productos farmacéuticos de liberación sostenida. Estos procesos en general comienzan con la formación de una emulsión con una fracción de volumen elevado de fase dispersa (0,6-0,85). Generalmente se usa mezcla de alto cizallamiento para obtener una emulsión de viscosidad elevada (de 5-100 veces la de la fase continua) que sea lo suficientemente estable para procesarse adicionalmente.

Se conoce que el cizallamiento de las emulsiones en un reactor discontinuo dará como resultado una reducción en el tamaño de las gotas en la emulsión. Cuando las fuerzas de cizallamiento del mezclador superan la tensión superficial en las gotas de fase discontinua, estas fuerzas actúan para romper las gotas y reducir el tamaño de gota medio. Esta reducción del tamaño de gota tiene efectos significativos sobre la reología de la emulsión, teniendo emulsiones de tamaño de gota más pequeño una viscosidad más elevada. El aumento de la viscosidad con un tiempo y velocidad de mezcla aumentados se debe a dos factores principales. En primer lugar, las gotas más pequeñas tienen una tensión superficial más elevada y son más rígidas, dando como resultado una emulsión con viscosidad más elevada. En segundo lugar, una reducción en el tamaño de la gota reduce la distancia de separación media entre las gotas, dando como resultado interacciones hidrodinámicas aumentadas entre las gotas. El efecto de tamaño de gota sobre la viscosidad de la emulsión aumenta a medida que disminuye el tamaño de la gota.

Después de que la emulsión w/o se ha formado y ya no está experimentando ningunas fuerzas de cizallamiento, continúan ocurriendo muchas interacciones dentro de la emulsión. En dispersiones concentradas, entra en juego el movimiento Browniano, especialmente si el tamaño de gota es pequeño. Ya que el movimiento Browniano provoca que las gotas se vuelvan aleatorizadas, las colisiones entre las gotas aumentan y se forman agregados. Adicionalmente, si una emulsión w/o consiste en lípidos con membranas de monocapa de las gotas que tienen sus cadenas hidrófobas orientadas en dirección contraria a las gotas, ocurren interacciones hidrófobas atractivas entre las gotas, que promueven la formación de agregados. Cuando la viscosidad de una emulsión que contiene agregados se mide a índices de cizallamiento bajo, la viscosidad es elevada, mientras que a índices de cizallamiento elevado los agregados se rompen y la viscosidad se reduce. Por tanto, las emulsiones w/o son pseudo plásticas.

Las emulsiones de agua en aceite en agua (w/o/w) se han preparado mediante la dispersión de emulsiones w/o en una segunda fase acuosa. La eliminación del disolvente de la fase oleosa mediante diversas técnicas da como

resultado materiales encapsulados, presentes en una segunda fase acuosa. Estos materiales han encontrado aplicaciones en productos alimenticios, cosméticos, tratamiento de aguas residuales y agentes farmacéuticos.

5 La eliminación del disolvente de la fase oleosa para producir tales materiales encapsulados se ha llevado a cabo pasando gas inerte a través de la emulsión w/o/w. Se ha observado que las técnicas convencionales pueden dar como resultado el daño de los materiales encapsulados, conduciendo a ruptura y pérdida de material en la segunda fase acuosa. Después de la etapa de eliminación de disolvente, los materiales encapsulados necesitan someterse a una etapa de filtración primaria.

10 La etapa de filtración primaria tiene varios objetivos: intercambio de la segunda solución acuosa por una solución fisiológicamente aceptable, ajuste de la concentración de las partículas basadas en lípidos multivesiculares y eliminación de fármaco no encapsulado. La estrategia principal de la técnica anterior para maximizar la productividad de diafiltración en la preparación de partículas basadas en lípido es reducir la colmatación y la polarización de gel de la membrana. Los parámetros de proceso básicos tales como índice de cizallamiento de pared, flujo de material permeado y presión transmembrana se pueden optimizar con el fin de conseguir este objetivo. Sin embargo, el éxito de estos esfuerzos de optimización está limitado ya que el flujo de material permeado cae significativamente durante el proceso de filtración primaria.

20 En la preparación de liposomas multivesiculares que encapsulan diversos fármacos y otros agentes activos, el proceso de diafiltración consume aproximadamente el 60% del tiempo de proceso real. Por lo tanto, existe una consideración económica para reducir el tiempo del proceso de diafiltración para reducir los costes operativos sin comprometer la calidad del producto. El enfoque usado en sistemas de flujo cruzado convencionales para reducir el tiempo de procesamiento aumentando el índice de cizallamiento de la pared o el área de superficie de la membrana es contraproducente debido a que los liposomas multivesiculares son sensibles a cizallamiento. El aumento del índice de cizallamiento y el área de superficie de membrana, que a su vez requiere el uso de una bomba más grande, da como resultado el daño de las partículas y la reducción del rendimiento de encapsulación.

25 Con frecuencia se necesita otra etapa de ajuste de concentración después de la filtración primaria, ya que la retención de filtración primaria es demasiado grande para permitir el ajuste en una etapa. Históricamente, se ha usado la decantación del producto de filtración primaria, aunque surgen varias dificultades con este enfoque. El incumplimiento de la esterilidad es un problema, así como también la necesidad de permitir un tiempo de reasentamiento largo después de un procedimiento de ese tipo. El ajuste de concentración mediante este método requiere mucho tiempo y no es particularmente preciso.

30 Los productos tienen que ser estériles para su uso en seres humanos y muchos otros organismos. Las técnicas de esterilización terminal convencionales tales como autoclave y radiación gamma pueden dañar productos delicados, incluyendo MVL.

40 Por lo tanto, debido a estos problemas, se necesitan métodos nuevos y mejores para reducir el tiempo de proceso y la tensión de cizallamiento sobre las partículas lipídicas, tales como partículas multivesiculares, durante la diafiltración. También se necesitan métodos que puedan producir de forma fiable producto estéril sin daño de producto innecesario.

### 45 **Sumario de la invención**

Se ha inventado un proceso nuevo para preparar MVL. Este proceso es adecuado para la fabricación a escalas comerciales. Los MVL se pueden producir asépticamente o se pueden someter a esterilización terminal no destructiva.

50 La invención proporciona un proceso como se define en las reivindicaciones para producir MVL proporcionando una emulsión de agua en aceite (w/o) que se prepara a partir de una fase acuosa dispersa en una fase de disolvente que contiene lípidos anfipáticos y neutros. Los lípidos anfipáticos se pueden elegir entre un grupo grande incluyendo fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas, esfingomielinas, lisofosfatidilcolinas, lisofosfatidiletanolaminas, fosfatidilglicerol, fosfatidilserinas, fosfatidilinositoles, ácidos fosfatídicos, cardiolipinas, acil trimetilamonio propano, diacil dimetilamonio propano, estearilamina y etil fosfatidilcolina. Los lípidos neutros se pueden seleccionar entre ésteres de glicerol, ésteres de glicol, ésteres de tocoferol, ésteres de esterol, alcanos y escualenos. Las sustancias fisiológicamente activas se pueden incluir en la fase acuosa o de disolvente y se eligen entre una amplia diversidad de materiales incluyendo antianginas, antiarrítmicos, agentes antiasmáticos, antibióticos, antidiabéticos, antifúngicos, antihistaminas, antihipertensivos, antiparasitarios, antineoplásicos, fármacos antitumorales, antivirales, glicósidos cardiacos, hormonas, inmunomoduladores, anticuerpos monoclonales, neurotransmisores, ácidos nucleicos, proteínas, agentes de radiocontraste, radionúclidos, sedantes, analgésicos, esteroides, tranquilizantes, vacunas, vasopresores, anestésicos, péptidos, profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de estos materiales. Los materiales específicos tales como citarabina, insulina, paclitaxel, 5-fluorouracilo, floxuridina, morfina, hidromorfina, dexametasona, metotrexato, bleomicina, vincristina, vinblastina, IgF-1, bupivacaína y amikacina se pueden incluir.

65

La invención proporciona una manera de aumentar de escala de forma precisa y rápida las reacciones al menos en 10 veces. Una emulsión inicial (que puede ser 0,2 a 40 litros) se prepara en un mezclador y tomando en cuenta la velocidad de cuchilla y la viscosidad medida, la emulsión se puede aumentar de escala para producir una emulsión con el mismo tamaño de partícula.

5 La emulsión w/o se dispersa en otra fase acuosa para preparar una emulsión de agua-en-aceite-en-agua (w/o/w). Esta segunda fase acuosa puede incluir azúcares y aminoácidos. El disolvente se elimina, poniendo en contacto la emulsión w/o/w con un flujo de gas inerte, por ejemplo, en varias etapas con diferentes caudales de gas. Los caudales de gas pueden aumentar o disminuir con el tiempo. Los mismos se pueden cambiar en etapas separadas o mediante desniveles de cambios de caudal. Los aumentos pueden ser de 2 a 5 veces los caudales iniciales y pueden estar seguidos por reducciones en el caudal. Después de la eliminación del disolvente, se forman los MVL.

15 Las etapas se pueden llevar a cabo asépticamente o los MVL se pueden esterilizar antes de llevar a cabo la carga del envase. En cualquier caso, se produce como resultado un producto de MVL que es adecuado de forma inmediata para administración en un sujeto. La emulsión w/o/w se puede preparar en un mezclador estático, tal como un mezclador de tipo Kenics o Koch. La emulsión w/o y la segunda fase acuosa se pueden mezclar en tales mezcladores estáticos a velocidades lineales de 100 a 500 cm/min. La emulsión w/o se puede preparar mezclando fases acuosas y de disolvente a proporciones de volumen de desde 0,33 a 1,6. La proporción de volumen de emulsión w/o a segunda fase acuosa puede variar desde 0,05 hasta 0,5 la preparación de la emulsión w/o/w.

20 La filtración primaria de la composición del MVL también se puede llevar a cabo y se puede realizar en una serie de etapas, concentración de 2 a 6 veces la concentración inicial, intercambio de tampón hasta un pH deseado, hasta que se alcance de 5 a 8 y opcionalmente, otra etapa de concentración. La filtración secundaria de la composición del MVL también se puede llevar a cabo, como una etapa de concentración final. Las etapas de filtración se pueden llevar a cabo con filtros de fibra hueca. Las etapas de filtración se pueden llevar a cabo con presiones transmembrana desde 0,7 kPa a 48,2 kPa (0,1 psi a 7 psi). Se puede llevar a cabo pulso inverso de cualquier proceso de filtración, incluyendo pulso inverso periódico que se produce cada 0,5 a 10 minutos y puede implicar del 0,01 al 5% del volumen del sistema. La contrapresión puede ser tan elevada como 68,9 kPa (10 psi).

30 También se puede llevar a cabo una etapa de ajuste de potencia adicional, que puede ser mediante decantación o mediante una filtración de flujo cruzado adicional. Los parámetros de tal filtración generalmente son como anteriormente y se eligen para proporcionar las potencias apropiadas que pueden ser necesarias para diversos productos.

35 En otro aspecto, la invención proporciona una composición de MVL producida mediante los procesos descritos anteriormente.

40 El término "esférula de disolvente" como se usa a lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones significa una gota esferoidea microscópica de disolvente no miscible en agua (que podría ser un disolvente orgánico), dentro de la cual existen múltiples gotitas más pequeñas de solución acuosa. Las esférulas de disolvente se suspenden y sumergen totalmente en una segunda solución acuosa. El uso del término "esférula" no se debe interpretar como que limita a las gotas a formas estrictamente o incluso sustancialmente esféricas. Las esférulas de disolvente pueden tomar cualquiera de una diversidad de formas.

45 El término "lípidos neutros" significa un aceite o grasa que no tiene capacidad de formación de membrana por sí mismo y que carece de un grupo de "cabeza" hidrófilo.

50 El término "lípidos anfipáticos" significa una molécula que tiene un grupo de "cabeza" hidrófilo y un grupo de "cola" hidrófobo y que tiene capacidad de formación de membrana. Como se usa en el presente documento, los lípidos anfipáticos incluyen aquellos que tienen una carga negativa neta, una carga positiva neta y lípidos zwitteriónicos. El término "lípidos zwitteriónicos" significa un lípidos anfipático con una carga neta de cero a pH 7,4. El término "lípidos aniónicos" significa un lípidos anfipático con una carga negativa neta a pH 7,4. El término "lípidos catiónicos" significa un lípidos anfipático con una carga positiva neta a pH 7,4.

55 El término "lípidos neutros" incluye aceites o grasas que no tienen capacidad de formación de vesícula por sí mismos y que carecen de un grupo de "cabeza" cargado o hidrófilo. Los ejemplos de lípidos neutros incluyen, pero sin limitación, ésteres de glicerol, ésteres de glicol, ésteres de tocoferol, ésteres de esterol que carecen de un grupo de "cabeza" cargado o hidrófilo y alcanos y escualenos.

60 Como se usa en el presente documento, la "semivida" de una formulación liposomal se refiere a la concentración de la sustancia no encapsulada ("fármaco libre") en una solución de almacenamiento, por ejemplo solución salina normal (cloruro de sodio al 0,9%) a una temperatura de almacenamiento, por ejemplo a 4 °C. Típicamente, la semivida se alcanza cuando más del 10% del fármaco encapsulado en la preparación se observa que está "libre", es decir, no encapsulado.

65

A través de la memoria descriptiva, se hace referencia a diferentes escalas, “escala de laboratorio”, “escala lab”, o “escala experimental”, que se refieren a reacciones y procesos de escalas menores a aproximadamente un litro, tal como 0,025 l o 0,2 l. El término “escala comercial” se refiere a la preparación de productos en cantidades o lotes mayores que o aproximadamente iguales a aproximadamente un litro (o aproximadamente 0,1 l para preparaciones de proteínas) hasta 100 l, por ejemplo 1, 10, 25 ó 75 l. Los volúmenes citados se refieren nominalmente al volumen final de producto listo para empaquetamiento. Por ejemplo, un proceso de “escala de 1 l” se somete a ajuste de escala para producir un volumen final de dosis apropiada que varía desde aproximadamente 0,7 hasta aproximadamente 1,2 l. Por ejemplo, un proceso de “escala de 25 l” se ajusta a escala para producir un volumen final de dosis apropiada que varía desde aproximadamente 17,5 hasta aproximadamente 30 l. El volumen real depende de la sustancia particular que se tiene que encapsular.

Como se usa en el presente documento, la expresión “medio similar a plasma”, significa una solución sintética que incluye además de solución salina normal, al menos algo de constituyentes de proteína o lípidos de plasma sanguíneo o componentes de otros fluidos biológicos, tales como fluido cerebroespinal (CSF) o fluidos intersticiales. Por ejemplo, la solución salina normal que contiene plasma humano tratado con citrato o albúmina sérica bovina (BSA) es un ejemplo de un “medio similar a plasma” según se usa el término en el presente documento.

La expresión “condiciones *in vivo*” significa la inyección real o el emplazamiento de MVL en un organismo e incluye la incubación denominada “*ex vivo*” de MVL en plasma o un medio similar a plasma a temperatura corporal (por ejemplo, 37 °C para seres humanos).

El término “mezclador estático” como se usa en el presente documento se refiere a un dispositivo que tiene por objeto colocarse en línea con uno o más conductos o tuberías de fluidos, que tienen una geometría interna diseñada para mezclar el fluido a medida que el mismo pasa a través del mezclador. El mezclador estático no tiene partes móviles y en general consigue su función mediante una disposición de paletas o tabiques deflectores que provocan flujo turbulento en condiciones apropiadas.

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el que se comprende comúnmente por un experto en la materia a la cual pertenece la presente invención. Aunque algunos métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en el presente documento se pueden usar en la práctica o en el ensayo de la presente invención, más adelante se describen métodos y materiales adecuados.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y de las reivindicaciones.

### Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es un diagrama esquemático de componentes significativos usados en una primera realización particular del proceso inventivo.

La Fig. 2 es un diagrama esquemático de componentes significativos usados en una segunda realización particular del proceso inventivo.

Las Fig. 3a es un perfil de caudal de gas transportador para un gradiente de etapa “alto-bajo”.

La Fig. 3b es un perfil de caudal de gas transportador para un gradiente de etapa “bajo-alto-bajo”.

La Fig. 4 es un diagrama esquemático de componentes significativos de una disposición experimental para diafiltración usando material permeado para pulso inverso.

La Fig. 5 es un diagrama esquemático de componentes significativos de una disposición experimental para diafiltración usando solución salina o cualquier otra solución acuosa para pulso inverso.

La Fig. 6 es un diagrama esquemático de los componentes significativos de una disposición experimental para filtración de flujo cruzado secundaria.

La Fig. 7a es un gráfico de tensión de cizallamiento frente a índice de cizallamiento para una emulsión w/o de citarabina preparada como se ha descrito en el Ejemplo 1.

La Fig. 7b es un gráfico de viscosidad evidente frente a índice de cizallamiento para una emulsión w/o de citarabina preparada como se ha descrito en el Ejemplo 1.

La Fig. 8a es un gráfico del efecto del tiempo y la velocidad de mezcla sobre la viscosidad relativa de una emulsión w/o de citarabina preparada en la escala de 100 ml como se ha descrito en el Ejemplo 1.

La Fig. 8b es un gráfico del efecto del tiempo la velocidad de mezcla sobre la viscosidad relativa de una emulsión w/o de citarabina preparada en la escala de 400 ml como se ha descrito en el Ejemplo 1.

La Fig. 9 es un gráfico que muestra el efecto de la temperatura de mezcla sobre la viscosidad de la emulsión de una emulsión w/o de citarabina preparada en la escala de 400 ml como se ha descrito en el Ejemplo 1.

La Fig. 10 es un gráfico que muestra la relación lineal entre la viscosidad relativa y el logaritmo natural de aportación de energía por volumen unitario de una emulsión w/o de citarabina preparada a escalas que varían desde 0,1 l hasta 20 l.

La Fig. 11 es un gráfico que muestra el efecto del tiempo de separación de gas a 375 y 500 litros por minuto sobre el porcentaje de morfina libre.

La Fig. 12 es un gráfico que muestra el efecto del tiempo de separación de gas sobre la concertación de

disolvente para dos condiciones de emulsión de cizallamiento elevado diferentes a diferentes caudales de gas: 375 LPM durante 17 min, 1000 LPM durante el resto del tiempo.

La Fig. 13 es un gráfico de barras de una comparación de tres lotes de preparaciones que contienen morfina y una preparación combinada que muestra el porcentaje de fármaco libre y el tamaño de partícula.

La Fig. 14 es un gráfico que muestra el efecto de la aportación de potencia normalizada en mezcladores estáticos de diversos tamaños y configuraciones sobre el tamaño de partícula de preparaciones que contienen citarabina y morfina preparadas a la escala de 0,2 l.

La Fig. 15 es un gráfico que muestra el efecto de velocidad lineal a través de mezcladores estáticos de diversos tamaños y configuraciones sobre el tamaño de partícula de preparaciones que contienen citarabina preparadas a la escala de 0,2 l.

La Fig. 16 es un gráfico que muestra el efecto de velocidad lineal a través de mezcladores estáticos de diversos tamaños y configuraciones sobre la eficacia de encapsulación de preparaciones que contienen citarabina preparadas a la escala de 0,2 l.

La Fig. 17 es un gráfico que muestra el efecto de la temperatura sobre el tamaño de partícula medio de segunda emulsión de citarabina procesada a través de un mezclador estático Kenics 3/16" provisto de 16 elementos de mezcla.

La Fig. 18 es un gráfico que muestra el efecto de la temperatura sobre la eficacia de encapsulación de segunda emulsión de citarabina procesada a través de un mezclador estático Kenics 3/16" provisto de 16 elementos de mezcla.

La Fig. 19 es un gráfico que muestra el efecto del pulso inverso de volumen del 1% del flujo del material retenido cada 5 minutos sobre el flujo de material permeado de una preparación de MVL de citarabina.

La Fig. 20 es un gráfico que muestra el efecto de la variación del intervalo de tiempo de pulso inverso desde 1 hasta 10 minutos para volúmenes de pulso inverso de 67 ml y 135 ml sobre el flujo de material permeado de una preparación de citarabina.

La Fig. 21 es un gráfico que muestra el efecto de la variación del volumen de pulso inverso desde 0 hasta 140 ml para intervalos de pulso inverso de 2,5 y 5 minutos sobre el flujo de material permeado de una preparación de MVL de citarabina.

La Fig. 22 es un gráfico que muestra el efecto de la presión transmembrana sobre el tiempo de proceso a dos velocidades diferentes de material retenido, 61 pm y 81 pm.

### Descripción detallada

La invención como se define en las reivindicaciones presenta un método para producir formulaciones de liposomas multivesiculares (MVL) a gran escala. Estos MVL pueden contener sustancias fisiológicamente activas, en cuyo caso el MVL proporciona liberación controlada de las sustancias fisiológicamente activas. El proceso proporciona reproducibilidad excelente para los MVL con respecto a especificaciones de producto importantes. La invención también presenta métodos para el aumento de escala rápido y reproducible de procesos de escala más pequeña a escalas grandes.

La producción de liposomas multivesiculares (MVL) requiere varias etapas de proceso. Un ejemplo de producción a escala lab se expone en Sankaram *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 5.766.627 incorporado en el presente documento por referencia. En resumen, el método para preparar MVL a escala del laboratorio es el siguiente: se prepara una emulsión de agua-en-aceite (w/o) capturando en un componente lipídico compuesto de al menos un lípido anfipático y al menos un lípido neutro en uno o más disolventes no miscibles en agua volátiles para el componente lipídico, un primer componente acuoso no miscible que opcionalmente y preferentemente contiene una sustancia biológicamente activa que se tiene que encapsular y opcionalmente añadiendo, a cualquiera o tanto al componente lipídico como al primer componente acuoso, un ácido u otro excipiente para modular la velocidad de liberación de las sustancias biológicamente activas encapsuladas a partir del MVL. La mezcla se emulsifica y después se mezcla con un segundo componente acuoso no miscible para formar una segunda emulsión de agua-en-aceite-en-agua (w/o/w). La turbulencia necesaria para la formación de la segunda emulsión se proporciona mecánicamente (por ejemplo mediante rotor/estator, homogeneizador u otro mezclador de cizallamiento elevado), mediante energía ultrasónica, atomización con boquilla y similares o mediante combinaciones de las mismas, para formar esférulas de disolvente suspendidas en el segundo componente acuoso. Las esférulas de disolvente contienen múltiples gotas acuosas con la sustancia que se tiene que encapsular disuelta en las mismas (véase, por ejemplo, Kim *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta* (1983) 728: 339-48). Para una revisión exhaustiva de diversos métodos de preparación de ULV y MVL, véase Szoka *et al.*, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, (1980) 9: 465-508.

La invención como se define en las reivindicaciones proporciona un proceso para la producción de partículas basadas en liposoma a gran escala.

También se proporcionan métodos asépticos en los presentes procesos. Aunque la esterilización de un recipiente cargado final como forma de dosificación es un proceso con frecuencia preferido en la preparación farmacéutica para asegurar un riesgo mínimo de contaminación microbiana en un lote, los MVL preparados en los presentes procesos son susceptibles de daños inaceptables cuando se someten a algunas técnicas de esterilización terminales, tal como autoclave y radiación gamma. En ausencia de esterilización terminal no dañina validada, algunas realizaciones de la invención utilizan técnicas asépticas, en las cuales el producto se prepara de acuerdo

con una serie de etapas asépticas diseñadas de forma cuidadosa. Las mismas se diseñan para prevenir la introducción de microorganismos viables en los componentes, cuando son estériles, o una vez que un proceso intermedio ha vuelto al producto masivo o sus componentes libres de microorganismos viables. Los productos definidos como procesados asépticamente pueden consistir en componentes que se han esterilizado mediante medios asépticos. Por ejemplo, los productos a granel que son líquidos filtrables, se pueden esterilizar mediante filtración. Los componentes del recipiente vacío finales se pueden esterilizar mediante calor; calor seco para viales de vidrio o autoclave para componentes de sello de goma. Los requerimientos para instalaciones de carga y de procesamiento apropiadamente diseñadas, validadas y mantenidas se refieren a: un entorno de aire libre de microorganismos viables y diseñado para permitir el mantenimiento eficaz de unidades de suministro de aire; entrenamiento de personal equipados y vestidos de forma adecuada. Las normas publicadas disponibles para áreas de trabajo controlado incluyen: Federal Standard N° 209B, Clean Room and Work Station Requirements for a Controlled Environment, 24 de abril de 1973; NASA Standard for Clean Room and Work Stations for Microbially Controlled Environment, publicación NHB5340.2, agosto 1967; y Contamination Control of Aerospace Facilities, U.S. Air Force, T.O. 00-25-203, 1 de diciembre de 1972, cambio 1, 1 de octubre de 1974.

En el procesamiento aséptico, uno de los controles de laboratorio más importantes es el establecimiento de un programa de supervisión ambiental. Las muestras se recogen a partir de áreas en las cuales los componentes y el producto están expuestos al ambiente, incluyendo cuartos de mezcla y áreas de preparación de componente. La calidad microbiológica de áreas de procesamiento aséptico se supervisa para determinar si las condiciones asépticas se mantienen o no durante actividades de carga y cierre. Se lleva a cabo la toma de muestras de rutina y ensayo de aire, suelos, paredes y superficies de equipos de la habitación. Este programa establece la eficacia del equipamiento de limpieza y desinfección y superficies de contacto de producto y asegura que los contaminantes potenciales se mantienen a un nivel aceptable. Los desinfectantes se comprueban para asegurar que su eficacia frente a la flora microbiana normal se mantiene. Se mantienen los programas de toma de muestras, incluyendo emplazamientos y frecuencia de tomas de muestra. También se emplean muestreadores de aire pasivo tales como placas de sedimentación (placas de Petri).

Las operaciones de ensamblaje aséptico se validan mediante el uso de un medio nutriente de cultivo microbiológico para simular operaciones de carga de producto estéril. Los mismos se conocen como "cargas de medios estériles". El medio nutriente se manipula y se expone a los operarios, equipo, superficies y condiciones ambientales para simular de forma cercana la misma exposición que experimentará el propio producto. Los recipientes del producto de fármaco sellados cargados con los medios después se incuban para detectar crecimiento microbiológico y los resultados se evalúan para determinar la probabilidad de que cualquier unidad de producto farmacéutico se pueda contaminar durante las operaciones de carga y cierre reales. La carga de medio, junto con una supervisión ambiental exhaustiva puede ser particularmente valiosa para validar el procesamiento aséptico de soluciones, suspensiones y polvos estériles. El medio líquido de carga, como parte de la validación de procesamiento de polvos, puede necesitar el uso de equipo y/o etapas de procesamiento que de otra manera no estarían relacionados con operaciones de polvo de rutina.

Se utilizan procedimientos de limpieza-en-el sitio (CIP) y esterilización-en-el sitio (SIP). Estos procedimientos se conocen generalmente en la técnica. Sin embargo, la supervisión de la temperatura en los purgadores de vapor es parte de la invención. De acuerdo con este procedimiento, se admite un vapor en los recipientes y líneas de carga para realizar la esterilización, la temperatura en los puntos de salida se supervisa hasta que se asegura la muerte bacteriana. En este punto, los sellos se cierran y el sistema se esteriliza para uso adicional.

El ensayo de esterilidad de lotes de producto se lleva a cabo directamente después de que el lote se fabrica como un ensayo de control de calidad de producto final. El ensayo se realiza de acuerdo con diversos procedimientos encontrados en la Farmacopea de los Estados Unidos (U.S.P.) y las regulaciones de la FDA.

Las etapas de procesos individuales para producción a gran escala de tales productos se detallan adicionalmente más adelante.

#### Primera emulsión

En la práctica de la invención, la primera emulsión se forma mediante la mezcla a alto cizallamiento de dos soluciones no miscibles. En general, una solución comprende lípidos y/o aceites que forman liposoma disueltos en un disolvente no miscible en agua (que podría ser un disolvente orgánico) y la otra solución comprende una primera formulación acuosa. Con frecuencia se añade un compuesto fisiológicamente activo a al menos una de las soluciones, más típicamente a al menos la primera fase acuosa. La primera fase acuosa con frecuencia también incluye agentes de tamponamiento de pH, agentes osmóticos, compuestos de modificación de liberación y similares. También puede haber ácidos de diversos tipos incluidos en la primera fase acuosa, como se detalla en el documento WO 98/334883. La fase de disolvente no miscible también puede comprender polímeros o copolímeros biodegradables, como se detalla en el documento WO 00/03660.

La primera emulsión se mezcla mediante medios mecánicos, ultrasonido, atomización con boquilla o similares, hasta que se alcanza el tamaño de gota deseado. También se puede emplear mezcla estática (que se describirá con

detalle más adelante) en esta etapa, para preparar la primera emulsión w/o.

En general, para preparar liposomas multivesiculares, es necesario que al menos un lípido anfipático y al menos un lípido neutro estén incluidos en el componente lipídico. Los lípidos anfipáticos pueden ser lípidos zwitteriónicos, aniónicos o catiónicos. Los ejemplos de lípidos anfipáticos zwitteriónicos son fosfolípidos, tales como fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas, esfingomielinas, lisofosfatidilcolinas, lisofosfatidiletanolaminas y sustancias similares. Los ejemplos de lípidos anfipáticos aniónicos son fosfatidilgliceroles, fosfatidilserinas, fosfatidilinositoles, ácidos fosfatídicos, cardiolipinas y materiales similares. Los ejemplos de lípidos anfipáticos catiónicos son acil trimetilamonio propano, diacil dimetilamonio propano, estearilamina y etil fosfatidilcolina. Los ejemplos de lípidos neutros son triglicéridos, ésteres de propilenglicol, ésteres de etilenglicol y escualeno. Los ejemplos de triglicéridos útiles son aquellos que incluyen trioleína y tripalmitoleína, tridimiristoleína trilinoleína, tributirina, tricaprilina, tricaproína y tricaprina. Las cadenas grasas en los triglicéridos útiles en la presente invención pueden ser todas iguales o completamente diferentes (triglicéridos de cadena mixta), incluyendo todas diferentes. Las cadenas grasas tanto saturadas como insaturadas (incluyendo insaturadas múltiples) son útiles en la presente invención. Los ésteres de propilenglicol pueden ser diésteres mixtos de ácidos caprílico y cáprico.

Como se usa en el presente documento, el término "componente de lípido neutro" significa lípido neutro o mezcla de lípidos neutros, usados en la preparación de los liposomas multivesiculares.

El componente de lípido neutro puede comprender un lípido neutro único o el componente de lípido neutro puede comprender una mezcla de un lípido neutro de liberación lenta y un lípido neutro de liberación rápida en un intervalo de proporción molar desde aproximadamente 1:1 hasta 1:100, por ejemplo desde aproximadamente 1:4 hasta 1:18, en el que el índice de liberación del compuesto biológicamente activo disminuye en proporción con el aumento de la proporción del lípido neutro de liberación lenta al lípido neutro de liberación rápida. Por conveniencia, la proporción molar del lípido neutro de liberación lenta al lípido neutro de liberación rápida se denomina en el presente documento la "proporción molar de lípido neutro lento:rápido".

El "lípido neutro de liberación lenta" se puede seleccionar entre triglicéridos que tienen restos de éster de ácido graso mono insaturado que contienen desde aproximadamente 14 a 18 carbonos en la cadena acilo y en general que tienen un peso molecular desde aproximadamente 725 hasta 885 y aquellos con restos de éster de ácido graso saturado que contienen desde aproximadamente 10 a 12 carbonos en la cadena acilo y en general tienen un peso molecular desde aproximadamente 725 hasta 885; y mezclas de los mismos. Se pueden usar ésteres de colesterol tales como oleato de colesterol y ésteres de propilenglicol. Los lípidos neutros de liberación lenta ilustrativos para su uso en el método de la presente invención incluyen trioleína, tripalmitoleína, trimiristoleína, trilaurina y tricaprina, siendo los más preferidos trioleína o tripalmitoleína.

El "lípido neutro de liberación rápida" se puede seleccionar entre triglicéridos que tienen restos de éster de ácido graso mono insaturados que contienen desde aproximadamente 6 hasta 8 carbonos en la cadena acilo y que tienen un peso molecular desde aproximadamente 387 hasta 471 y mezclas de los mismos. Sin embargo, el uso de un componente de lípido neutro en MVL que contiene uno o más lípidos neutros con una cadena acilo de seis o menos carbonos (especialmente el uso de tricaproína como el lípido neutro único) da como resultado la liberación rápida de los compuestos encapsulados tras el contacto en el entorno *in vivo*. Por lo tanto los lípidos neutros con una cadena de acilo de seis o menos carbonos se deben usar únicamente en combinación con uno o más lípidos neutros que tengan un resto acilo de cadena más larga. Los lípidos neutros de liberación rápida ilustrativos incluyen tricaprilina y mezclas de tricaprilina y tricaproína o mezclas de triglicéridos C<sub>6</sub> a C<sub>8</sub> de cadena mixta. Los diésteres de propilenglicol con restos acilo de ocho o diez carbonos, oleato de colesterol y octanoato de colesterol también se pueden usar como lípidos neutros.

La primera emulsión puede contener varias sustancias útiles, incluyendo componentes saporíferos o de fragancia, productos cosméticos, materiales de desecho o materiales farmacéuticos, incluyendo materiales fisiológicamente activos. Estas sustancias se pueden introducir en las fases acuosa o de disolvente. En determinadas realizaciones preferidas, la primera emulsión puede contener al menos una sustancia fisiológicamente activa. Esto produce composiciones farmacéuticas que contienen MVL. Las sustancias fisiológicamente activas son aquellos compuestos o entidades químicos o biológicos naturales, sintéticos o sometidos a ingeniería genética que tienen utilidad para modular los procesos fisiológicos con el fin de producir el diagnóstico de, la profilaxis frente a o el tratamiento de una afección indeseada en un ser vivo. Las sustancias fisiológicamente activas incluyen fármacos tales como antianginas, antiarrítmicos, agentes antiasmáticos, antibióticos, antidiabéticos, antifúngicos, antihistaminas, antihipertensivos, antiparasitarios, antineoplásicos, fármacos antitumorales, antivirales, glicósidos cardíacos, hormonas, inmunomoduladores, anticuerpos monoclonales, neurotransmisores, ácidos nucleicos, proteínas, agentes de radiocontraste, radionúclidos, sedantes, analgésicos, esteroides, tranquilizantes, vacunas, vasopresores, anestésicos, péptidos y similares. Los profármacos que forman las sustancias fisiológicamente activas indicadas tras la interacción local con el medio intracelular, células o tejidos también se pueden emplear en la invención. También se contemplan como útiles en la presente invención cualquier sal farmacéuticamente aceptable de una sustancia fisiológicamente activa particular que sea capaz de formar una sal de este tipo, incluyendo sales de haluros, sales de fosfato, sales de acetato y otras sales.



Como alternativa, la sustancia fisiológicamente activa podría ser hidrófoba y en este caso la misma se podría introducir en la fase de disolvente no miscible en agua en la primera fase de emulsificación. Las sustancias fisiológicamente activas anfipáticas se pueden introducir en la fase acuosa o de disolvente, dependiendo de su solubilidad en estas fases.

5 Son de particular interés los antibióticos de aminoglicósido semisintético, tales como amikacina; antidiabéticos; péptidos tales como insulina; fármacos antitumorales tales como paclitaxel; antineoplásicos incluyendo citarabina, 5-fluorouracilo y floxuridina; analgésicos opioides alcaloides incluyendo morfina e hidromorfina; anestésicos locales incluyendo bupivacaína; esteroides adrenocorticales antiinflamatorios sintéticos incluyendo dexametasona; antimetabolitos incluyendo metotrexato; antibióticos glicopeptídicos incluyendo bleomicina; vincalécoblastinas y agentes oncolíticos estatmocinéticos incluyendo vincristina y vinblastina; hormonas, proteínas de plasma; citoquinas, factores de crecimiento, ADN y ARN a partir de una diversidad de organismos y oligonucleótidos antisentido.

15 Las sustancias fisiológicamente activas se pueden usar en solitario o en combinación con la limitación de que la cantidad de la sustancia fisiológicamente activa en la composición farmacéutica sea suficiente para posibilitar el diagnóstico de, la profilaxis frente a o el tratamiento de una afección indeseada en un ser vivo. Las composiciones farmacéuticas se puedan administrar a un ser vivo mediante cualquier vía deseada, por ejemplo, intramuscular, intra-articular, epidural, intraperitoneal, subcutánea, intravenosa, intralinfática, oral, submucosal, transdérmica, rectal, vaginal, intranasal, intraocular y mediante implante debajo de diferentes tipos de epitelios, incluyendo el epitelio bronquial, el epitelio gastrointestinal, el epitelio urogenital y las diversas membranas mucosas del organismo. En general, la dosis variará con la edad, condición, sexo y alcance de la afección indeseada en el paciente y se puede determinar por un experto en la materia. El intervalo de dosificación apropiado para uso en seres humanos incluye un intervalo de desde 0,1 a 6.000 mg de la sustancia fisiológicamente activa por metro cuadrado de área de superficie. El intervalo de dosificación alterno se puede basar en peso en lugar de área de superficie.

25 Con referencia la Fig. 1, que muestra un diagrama esquemático de los componentes significativos usados en el proceso inventivo, las fases continua y dispersa se almacenan en dos recipientes separados, recipiente de fase continua 1 y recipiente de fase dispersa 2. En los procesos actuales, la fase continua es una fase acuosa y la fase dispersa es una fase de disolvente volátil no miscible en agua. Cualquier sustancia fisiológicamente activa que se pueda encapsular puede estar presente en cualquier recipiente. Preferentemente, tales sustancias están en la fase acuosa. Estas soluciones se transfieren simultáneamente, secuencialmente o de forma alternativa al primer recipiente de emulsificación 3, pasando a través de los filtros 4, que proporcionan filtración estéril. La primera emulsión (w/o) se prepara mediante emulsificación usando mezclador de cizallamiento elevado 5 o un dispositivo equivalente. Como alternativa, la mezcla estática (que se describirá con detalle más adelante) también se puede emplear para producir una primera emulsión.

40 La filtración estéril de todos los fluidos que entran en el proceso de producción de MVL es esencial para un proceso aséptico, como se prevé en una realización de la presente invención. La clasificación de tamaños de poro de membranas de filtro es mediante una clasificación nominal que refleja la capacidad de la membrana de retener microorganismos del tamaño representado por cepas especificadas, no mediante la determinación de un tamaño de poro promedio y el establecimiento de distribución de tamaños. Las membranas de filtro de esterilización son aquellas capaces de retener el 100% de un cultivo de  $10^7$  organismos de una cepa de *Pseudomonas diminuta* (ATCC 19146) por cm cuadrado de superficie de membrana bajo una presión de no menos de 30 psi (206,84 kPa). Tales membranas de filtro se clasifican nominalmente como 0,22  $\mu\text{m}$  o 0,2  $\mu\text{m}$ , dependiendo del fabricante. Las membranas de filtro bacterianas capaces de retener únicamente microorganismos grandes (incluyendo *Serratia marcescens* (ATCC 14756)) se marcan con una clasificación nominal de 0,45  $\mu\text{m}$ . Las membranas de filtro usadas en los presentes procesos son de tipo 0,2  $\mu\text{m}$  y se usan en todas las líneas de suministro desde solución líquida y tanques de almacenamiento de gas hasta recipientes y líneas de transferencia usadas para fabricar el producto.

50 Durante la mezcla, las gotas de la fase discontinua se deforman debido al cizallamiento ejercido hasta que las fuerzas de cizallamiento superan las fuerzas de tensión superficial. En este punto, las gotas se rompen en gotas más pequeñas. Para un sistema de disolvente no miscible en agua y acuoso determinado, la calidad de la emulsión se controla mediante la fracción de volumen de cada fase, temperatura, velocidad de mezcla y tiempo. Adicionalmente, la elección del recipiente y del dispositivo de cizallamiento afectará también a la emulsión.

55 Las características de la etapa de emulsión w/o se pueden determinar mediante separación de fase en campo gravimétrico, distribución de tamaño de gota, viscosidad de emulsión y conductividad de la fase continua. Se puede usar un viscosímetro capilar a índices de cizallamiento elevados para determinar la viscosidad independiente de una emulsión. Los viscosímetros capilares son tubos capilares a los cuales se puede unir un manómetro y válvula. El flujo a partir de este tubo se mide y se calcula la viscosidad de acuerdo con la ecuación de Hagen-Poiseuille:

$$Q = (\pi R^4 \Delta P) / 8 \mu L$$

65 en la que Q es el caudal volumétrico a través del tubo capilar, R es el radio del tubo capilar,  $\Delta P$  es la caída de presión a lo largo del tubo capilar,  $\mu$  es la viscosidad de la solución al índice de cizallamiento definido y L es la

longitud del tubo capilar.

En condiciones de proceso a escala "lab" o "experimental", la viscosidad determinada experimentalmente será la meta para procesos a escala más grande. Como se ha descrito más adelante, la viscosidad es indicativa de tamaño de partícula en emulsiones w/o. Se obedecen un conjunto de "reglas", mediante las cuales se puede conseguir la misma viscosidad y, por lo tanto, el mismo tamaño de partícula, tras el aumento de escala. Por ejemplo, mediante el mantenimiento de una proporción de diámetro de cuchilla de cizallamiento a diámetro de recipiente constante, la viscosidad a "escala lab" (desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 3 litros) se puede conseguir de forma aproximada a escalas más grandes, hasta 50 veces la "escala lab". Ya que la velocidad de cuchilla está definida por  $\pi$  veces el diámetro de cuchilla, por la rpm de cuchilla, en un proceso de escala pequeña se prepara una emulsión con una viscosidad determinada. Para conseguir la misma velocidad a una escala más grande, se elige el recipiente. Su diámetro determina el diámetro de la cuchilla y la velocidad de la cuchilla se desea que sea la misma entre las dos escalas. Esto permite una determinación de la rpm de cuchilla apropiada. Se realiza la comparación entre la viscosidad a la escala más grande y a la escala más pequeña. Para minimizar las diferencias, se puede poner en práctica un método adicional para conseguir la viscosidad a "escala lab". Existe una correlación entre la aportación de energía en un sistema de emulsión y la viscosidad independiente de la emulsión. Esta correlación se observó que era independiente de la escala para sistemas de mezcla geoméricamente similares.

La aportación de energía en una emulsificación se define en la Ecuación 1 como:

$$E/V = n^3 D^5 t/V \quad (1)$$

en la que E es la aportación de energía teórica, n es la rpm de la placa de cizallamiento, D es el diámetro de la placa de cizallamiento, t es el tiempo y V es el volumen de solución. La aportación de energía por volumen es independiente de la escala (Díaz, M. *et al.*, "Mixing Power, External Convection and Effectiveness in Bioreactors", Biotechnology and Bioengineering, Vol. 51, 1996, págs. 131-140). La aplicación de esta rpm a la escala más grande da como resultado la misma viscosidad a diferentes escalas y, por lo tanto, el mismo tamaño de partícula. Esta es una forma sencilla, rápida y fiable de aumentar la escala de emulsificaciones. Por supuesto, el mismo procedimiento se podría usar para la disminución de escala de una emulsificación a gran escala, pero prácticamente, se desea con mayor frecuencia el aumento de escala.

Las fracciones de volumen de la fase dispersa a la fase continua para la primera emulsificación pueden variar desde aproximadamente 1,6 hasta aproximadamente 0,33 y preferentemente son desde aproximadamente 6/4 hasta aproximadamente 4/6. Las velocidades de impulsor para la primera emulsificación pueden variar desde aproximadamente 2000 rpm hasta aproximadamente 16.000 rpm dependiendo de la escala. Por ejemplo, aquellas emulsificaciones realizadas a escala experimental pueden tener velocidades de impulsor de desde aproximadamente 8000 hasta aproximadamente 16.000 rpm y aquellas realizadas a la escala comercial varían desde aproximadamente 2000 hasta aproximadamente 5000 rpm. Los tiempos de mezcla para la primera emulsificación pueden variar desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 100 minutos. Los tiempos de mezcla preferidos varían desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 60 minutos.

Típicamente, la temperatura del recipiente de reacción se controla por medio de una camisa de agua. Las temperaturas de mezcla para la primera emulsificación pueden variar desde aproximadamente 15 °C hasta aproximadamente 40 °C. Las temperaturas de mezcla preferidas son desde aproximadamente 20 °C hasta 32 °C.

El tamaño de gota en la primera emulsión variará dependiendo de la aportación de energía, los componentes usados, la fracción de volumen de soluciones acuosa y orgánica y la estabilidad y perfiles de liberación deseados, pero en general estará en el intervalo de aproximadamente 0,05 hasta aproximadamente 3  $\mu\text{m}$ , preferentemente desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 1  $\mu\text{m}$ . El tamaño de gota se puede determinar directamente (por ejemplo, microscópicamente) o indirectamente, por ejemplo en base al tiempo de mezcla o la viscosidad de la mezcla. Se obtienen diferentes tamaños de gota variando el método de emulsificación (por ejemplo, ajustando la velocidad del impulsor en el caso de la emulsificación mecánica) y la temperatura.

### Segunda emulsión

Posteriormente la primera emulsión se mezcla como una segunda solución acuosa y se emulsifica para formar una emulsión w/o/w que comprende esférulas de disolvente suspendidas en el segundo componente acuoso.

La segunda solución acuosa puede comprender agentes de tamponamiento de pH, agentes osmóticos, azúcares, aminoácidos, electrolitos, conservantes y otros excipientes conocidos en la técnica de formas de dosificación semisólidas. Los ejemplos de tales constituyentes incluyen lisina, dextrosa y glucosa.

La mezcla y emulsificación se pueden conseguir a través de medios mecánicos incluyendo dispositivos de tipo de cizallamiento elevado, rotor/estator y homogeneizadores, ultrasonido, atomización con boquilla, mezclador de tipo de cizallamiento, mezclador estático, impulsor, tubería porosa u otros medios que se conoce que producen emulsiones w/o/w.

Nuevamente con referencia a la Fig. 1, la primera emulsión se transfiere desde el primer recipiente de emulsificación 3 hasta el segundo recipiente de emulsificación 7. Este recipiente puede ya contener la segunda fase acuosa, transferida desde el almacenamiento en el segundo recipiente de fase acuosa 6, a través de un filtro de esterilización en línea 8. Como alternativa, la primera emulsión en la segunda fase acuosa se puede introducir simultáneamente o la primera emulsión se puede introducir en primer lugar. En una realización del proceso inventivo, se usa un dispositivo de cizallamiento para dispersar la emulsión w/o en la segunda solución acuosa para formar una emulsión w/o/w que comprende esférulas de disolvente. El tamaño de esférula de disolvente es dependiente de la calidad de la primera emulsión, la segunda fase acuosa y el volumen de fracción de la emulsión w/o en la segunda solución acuosa. Adicionalmente, los parámetros de proceso tales como velocidad de mezcla, tiempo, temperatura y geometría del equipo de mezcla influirán sobre la emulsión w/o/w. Las esférulas de disolvente de la emulsión w/o/w son un intermedio de proceso lábil y es necesaria la progresión rápida a la etapa de eliminación del disolvente.

Los tiempos de mezcla para las segundas emulsificaciones realizadas en mezcladores de tipo de cizallamiento varían desde aproximadamente 1 minuto hasta aproximadamente 10 minutos. La temperatura del segundo recipiente de emulsificación varía desde aproximadamente 20 °C hasta aproximadamente 50 °C. Las temperaturas elevadas pueden ayudar a la eliminación del disolvente en algunas realizaciones de la invención.

Como alternativa, la segunda emulsificación se consigue simultáneamente pasando la primera emulsión y la segunda solución acuosa a través de un mezclador estático. En la Fig. 2 se muestra un proceso particular sugerido esquemático de esta etapa.

Con referencia a la Fig. 2, la primera emulsión está contenida en el primer recipiente de emulsión 1 y se suministra a través de una línea de alimentación a través del regulador de flujo de la primera emulsión 2 hasta que se mezcla con la segunda fase acuosa, contenida en el segundo recipiente acuoso 3. El flujo de la segunda fase acuosa se controla mediante un medidor de flujo y se regula mediante un medio de flujo de segunda fase acuosa 4 que puede ser un medidor, válvula de control o bomba. Posteriormente la corriente mezclada se introduce en un mezclador estático 5, que sale hacia el segundo recipiente de segunda emulsión 6.

Los mezcladores estáticos están disponibles en una diversidad de tamaños y diseños; sin embargo, es un asunto de experimentación de rutina la selección de uno que sea capaz de proporcionar una emulsión que tenga el tamaño de partícula deseado (y la distribución de tamaño de partícula) al rendimiento deseado de material. Además, se puede aumentar el diámetro del mezclador o emplear varios mezcladores estáticos en paralelo para aumentar el rendimiento o en serie para reducir el tamaño de partícula. Los mezcladores estáticos desplegados en serie o en paralelo se pueden usar con otros componentes, incluyendo un medio de eliminación de disolvente, entre mezcladores estáticos. Otros componentes se podrían introducir en esta fase del proceso. Por ejemplo, se podría usar como alternativa un evaporador de película delgada como la primera etapa de eliminación de disolvente. Los mezcladores estáticos incluyen aquellos fabricados por Koch y Kenics, o mezcladores estáticos de estos tipos de diseño generales, como se describe más adelante adicionalmente.

Los mezcladores estáticos presentan una alternativa muy atractiva a los mezcladores discontinuos de cizallamiento elevado para la preparación de emulsiones. Algunas ventajas de un mezclador estático en comparación con un tanque agitado son el coste de capital bajo, la complejidad baja (no incluye partes móviles), bajo coste de mantenimiento y bajo requerimiento de espacio. Además, debido a la estructura del mezclador estático, es posible un régimen de mezcla más homogéneo ya que no existen regiones "muertas". La utilización de un mezclador estático potencia la flexibilidad de equipo de proceso existente ya que el tamaño del lote se puede variar fácilmente y el mezclador se adapta fácilmente a un proceso continuo. Este concepto es de interés especial en una planta piloto en la que diferentes procesos utilizan el mismo tipo de equipo de proceso. Aunque los mezcladores estáticos se han usado en la industria química y de la alimentación para la preparación de dispersiones y emulsiones, su uso para la preparación de MVL no se ha informado.

Los mezcladores estáticos son tubos con elementos de mezcla insertados en la tubería interior. Estas inserciones provocan restricciones e impacto que da como resultado un entorno de cizallamiento elevado. Cuando se pasan dos corrientes, líquida y/o gaseosa, a través del mezclador estático, se obtienen diversos grados de mezcla. Dependiendo de la miscibilidad y las velocidades combinadas de las dos corrientes, se puede producir una solución, dispersión o emulsión homogénea.

Los diversos elementos de mezcla en un mezclador estático crean diferentes tipos de mezcla. Se pueden observar tres acciones de mezcla diferentes en un mezclador estático: 1) separaciones dos-por-dos, 2) mezcla radial y 3) mezcla hacia atrás. Una combinación de dos o tres de estas acciones de mezcla ocurren simultáneamente, cuyo alcance depende del diseño del mezclador estático.

El mezclador Kenics contiene elementos de mezcla con una forma helicoidal única que dirigen el flujo de material radialmente hacia las paredes de la tubería y de nuevo hacia el elemento. Mediante la combinación de elementos con dirección helicoidal alterna, se invierte el momento de la mezcla radial en cada elemento de mezcla. Los elementos del mezclador Koch son láminas corrugadas soldadas entre sí para formar canales abiertos. Se pueden

insertar diversos elementos colocándolos a 90° en relación el uno con el otro.

Para un diseño de mezclador determinado, la acción de mezcla depende de la velocidad a través del mezclador estático y del índice de cizallamiento aplicado a la corriente de fluido. Para la preparación de una emulsión, las gotas se rompen en gotas más pequeñas mediante extensión y división. Las velocidades lineales a través de los mezcladores estáticos de acuerdo con el presente proceso pueden variar desde aproximadamente 100 cm/minuto hasta aproximadamente 500 cm/minuto. Las velocidades lineales preferidas son desde 220 hasta aproximadamente 400 cm/minuto.

10 La emulsificación o dispersión de dos fluidos no miscibles usando mezcladores estáticos depende de diversos factores tales como la viscosidad de las emulsiones w/o, la proporción de fase de disolvente acuoso a fase de disolvente no miscible en agua y superficie del mezclador. La fracción de volumen de la primera emulsión a la segunda fase acuosa puede variar desde aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 0,5.

#### 15 Eliminación del disolvente

Una vez que se ha preparado la segunda emulsión, el disolvente no miscible en agua volátil se elimina, dando como resultado la formación de MVL. Con referencia de nuevo a la Fig. 1, la eliminación del disolvente se puede realizar en el recipiente de la segunda emulsión 7, en un recipiente que sirve como un recipiente de inyección pero que no está equipado necesariamente para realizar la segunda emulsificación, o directamente en un mezclador estático, como se ha descrito anteriormente. Esto se consigue haciendo burbujear un gas transportador inerte a través de la solución usando medios de suministro de gas 9 tales como un anillo de inyección o dispositivo similar. El medio de suministro de gas generalmente tiene varios agujeros a través de los cuales se introduce el gas en la segunda emulsión. El número de agujeros puede variar desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 10.000 o más. Los agujeros tienen un diámetro específico, que puede variar desde aproximadamente 0,03 a aproximadamente 2,54 mm.

30 Como una alternativa, el gas transportador se puede barrer a través de la superficie de capa delgada de solución para eliminar el disolvente, tal como haciendo fluir un gas inerte en sentido contrario al de una película delgada de segunda emulsión que fluye a lo largo de una columna rellena. La velocidad de eliminación de disolvente es crítica para obtener un producto óptimo. Se ha observado que las variaciones en la velocidad de eliminación del disolvente son importantes en la optimización del producto.

35 Existe un punto crítico durante la etapa de eliminación del disolvente, en la cual la apariencia óptica de la suspensión cambia significativamente, por ejemplo, si el disolvente es cloroformo, la misma cambia desde una apariencia similar a leche a una apariencia más translúcida. Antes de este punto, se observó que las partículas multivesiculares eran muy susceptibles a la ruptura y otros daños. Por lo tanto, la transición a través de esta etapa crítica necesita ser tan corta como sea posible. Si se usa un ajuste de inyección, una eliminación rápida de disolvente a un caudal de gas transportador elevado seguida por la eliminación lenta de disolvente residual a caudal reducido (como en la Fig. 3a) mejoró los rendimientos de proceso. Con el fin de reducir la formación de espuma excesiva, un perfil alternativo es una velocidad inicialmente reducida hasta antes de la etapa crítica, aumento hasta flujo elevado para la transición a través de la etapa crítica y después un flujo reducido para eliminar los disolventes residuales (Fig. 3b). La formación de espuma en fases posteriores puede ser una consideración mayor a escalas de producción más bajas, tales como la escala de 1 l. Escalas de producción más elevadas, tales como la escala de 25 l, pueden no necesitar el uso de un caudal de gas reducido en fases posteriores. Las composiciones particulares pueden ser más susceptibles de formar espuma que otras. Por ejemplo, MVL que contiene morfina puede necesitar caudales iniciales algo más bajos, independientemente de la escala. Los caudales, número de etapa y la duración de cada etapa necesitan determinarse experimentalmente para cada producto y escala.

50 En general, la velocidad lineal de burbujas que escapan a partir del medio de suministro de gas en la escala de 25 l debería ser menor que o similar al de la escala de 1 l. Las velocidades lineales para burbujas de gas inerte usadas para eliminación de disolvente pueden variar desde aproximadamente 50,80 cm/segundo hasta aproximadamente 2540 cm/segundo, preferentemente desde aproximadamente 127 hasta aproximadamente 2032 cm por segundo.

55 En general, para la escala de 25 l, se puede utilizar una amplia diversidad de etapas de eliminación de disolvente, caudales de gas inerte y secuencias. Por ejemplo, una etapa de eliminación de disolvente inicial que usa menos de 500 lpm de caudal de flujo de gas inerte (preferentemente menos de aproximadamente 400 lpm) durante desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 30 minutos (preferentemente desde aproximadamente 6 hasta aproximadamente 20), seguido por un flujo de gas inerte de al menos aproximadamente 700 lpm (preferentemente al menos aproximadamente 1000 lpm) durante desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 10 minutos (preferentemente desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 8 minutos), seguido por un flujo de gas inerte de desde aproximadamente 100 hasta aproximadamente 400 lpm (preferentemente desde aproximadamente 150 hasta aproximadamente 350 lpm) producirán resultados aceptables. Como alternativa, la última etapa de flujo a caudal de gas reducido puede no ser necesaria para que el producto sea aceptable. En tales casos, el flujo de gas inerte de al menos 700 lpm se puede continuar durante desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 90 minutos (preferentemente desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 60 minutos). Los caudales para la

escala de 1 l son aproximadamente 25 veces más bajos, por ejemplo desde 10 hasta 40 veces más bajos. En cualquier caso, el flujo de gas tiene que ser suficiente para eliminar el disolvente a una velocidad que no dificulte de forma innecesaria la producción de MVL.

- 5 La eliminación de disolvente (separación) se puede conseguir mediante inyección o extracción con un gas inerte, tal como nitrógeno o argón. Por ejemplo, se puede hacer burbujear nitrógeno a través de la emulsión a partir de tubos de inyección o fritas (si la escala es relativamente pequeña) suministrados en el fondo del recipiente.

#### Filtración primaria

10 El producto de MVL resultante experimenta una filtración primaria, por ejemplo mediante diafiltración o filtración de flujo cruzado. La etapa de filtración primaria tiene varios objetivos: intercambio de la segunda solución acuosa por una solución isotónica, concentración de las partículas basadas en lípidos multivesiculares, eliminación de fármaco no encapsulado. La filtración primaria, también conocida como diafiltración, es un método empleado para la  
15 purificación y separación de MVL a partir de mezclas complejas en virtud de las características físicas de MVL. Por ejemplo, la característica física más común usada es el tamaño. Esta filtración implica filtración de flujo cruzado, al contrario de filtración de punto muerto. En la filtración de flujo cruzado, una suspensión se hace circular bajo presión y en contacto con un filtro, de forma que un material permeado (el material que pasa a través del filtro) sale del sistema y el material retenido (el material que no pasa a través del filtro) se queda atrás. Después la suspensión se  
20 vuelve concentrada en el material que no pasa a través del filtro. En los procesos en los cuales una primera solución se tiene que intercambiar por una segunda solución, la segunda solución se introduce en el lado del material retenido del filtro, hasta que el material permeado consiste gradualmente en la segunda solución. Para este momento, la primera solución se ha lavado de la suspensión.

25 Como se ilustra en la Fig. 1, durante la filtración primaria, la suspensión de partículas multivesiculares se transfiere a un recipiente de material retenido **10** y se hace circular nuevamente a través de filtros de filtración primaria **11** usando una bomba de material retenido **12**. Como alternativa, se puede usar presión, del gas inerte por ejemplo, para llevar a cabo la filtración. Los filtros de filtración primaria pueden ser de diversas configuraciones y tamaños, tales como fibra hueca y placa y filtros de marco. Los filtros preferidos son filtros de fibra hueca. Éstos se pueden  
30 fabricar de una diversidad de materiales. Se pueden emplear aquellos fabricados de polisulfona, tales como aquellos comercializados por A/G Technology Corp. (Needham, MA). Otros filtros útiles se fabrican a partir de acetato de celulosa, celulosa regenerada o polipropileno. Las membranas útiles incluyen aquellas clasificadas desde 0,07 hasta 0,45 µm. Las membranas preferidas son de aproximadamente 0,1 a 0,2 µm.

35 La bomba puede ser de diversos tipos, tales como bombas peristálticas o de desplazamiento positivo de lóbulo rotatorio. El material permeado **13** se elimina continuamente hasta que se alcanza un peso predeterminado en el recipiente de material retenido. El material permeado se puede controlar usando una válvula o bomba o se puede permitir que el mismo fluya libremente. Cuando se alcanza un peso predeterminado en el recipiente de material retenido, la solución de intercambio se añade a partir del tanque de almacenamiento **14** usando medios de bombeo  
40 **15** que pueden ser una bomba peristáltica o equivalente a la misma velocidad que se elimina el material permeado. Como alternativa, el proceso se puede activar mediante presión, por ejemplo, presión de gas inerte. La velocidad de adición de la solución de intercambio se puede controlar haciendo coincidir el caudal de material permeado o manteniendo un peso constante en el recipiente del material retenido. Después de varios intercambios de volumen o una vez que el material retenido alcanza un valor de pH diana, la adición de solución de intercambio se detiene. En  
45 este punto, el material retenido se concentra hasta un peso diana final.

Las presiones transmembrana (suma de presión en la entrada del material retenido y la presión en la salida del material retenido, dividida entre dos, menos la presión en el material permeado) puede variar desde aproximadamente 0,7 kPa (0,1 psi) hasta aproximadamente 48,2 kPa (7 psi). Las contrapresiones del material  
50 retenido pueden variar desde cero hasta aproximadamente 68,9 kPa (10 psi).

La estrategia principal para optimizar una etapa de diafiltración es reducir la colmatación y la polarización de gel de la membrana. Los parámetros de proceso básicos tales como el índice de cizallamiento de pared, el flujo de material permeado y la presión transmembrana se pueden optimizar con el fin de conseguir esta meta. Sin embargo, el éxito  
55 está limitado ya que el flujo de material permeado puede caer significativamente durante un proceso de diafiltración.

Para potenciar la recuperación de flujo y reducir la polarización de gel de membrana y la colmatación, se puede usar pulso inverso del material permeado durante el proceso de filtración primaria. El pulso inverso es la inversión intermitente, incluyendo periódica, del flujo de material permeado con el fin de distribuir la capa de polarización de  
60 gel y devolver las partículas a la corriente del material retenido. Como alternativa, el pulso inverso puede utilizar una corriente de proceso a contracorriente separada para lavar la membrana de filtración primaria. Después de que se completa un pulso inverso, el flujo de material permeado se recupera al valor inicial. Este método da como resultado un aumento significativo en el flujo de material permeado promedio y por tanto reduce el tiempo de proceso de filtración primaria para partículas basadas en lípidos. La reducción del tiempo de proceso puede aumentar el  
65 rendimiento del proceso para materiales sensibles al cizallamiento. Adicionalmente, el uso de este método permite la producción semicontinua ya que se pueden desarrollar lotes múltiples antes de que sea necesaria la limpieza de la

membrana. Por tanto, mediante el método de la invención, la capacidad así como también el tiempo de proceso y el rendimiento de formulaciones de partículas basadas en lípidos, tales como MVL, se puede aumentar.

5 La siguiente sección describe la mejora de un proceso de filtración primaria con respecto al tiempo, capacidad y rendimiento de la aplicación en una técnica de pulso inverso en el material permeado para la filtración primaria de partículas basadas en lípidos multivesiculares. El ajuste propuesto incluye la inversión intermitente del flujo de material permeado para eliminar la capa de polarización de gel en la membrana de filtración primaria. La solución usada para el pulso inverso puede ser cualquier solución acuosa, tal como una solución salina o material permeado. Los parámetros de proceso cruciales que se tienen que optimizar son la presión transmembrana (TMP), frecuencia y volumen durante el pulso inverso y el tiempo de procesamiento.

10 Un ejemplo de un ajuste de la producción para el pulso inverso que usa material permeado se muestra en la Fig. 4. Durante el proceso de filtración primaria, la suspensión en el recipiente de material retenido **1** localizado sobre medios para mantener un peso constante **2** tales como una balanza o celda de carga, se hace circular nuevamente a través del módulo o módulos de flujo cruzado **3**. Estos módulos pueden tener cualquier configuración si el fabricante recomienda la posibilidad de la presurización inversa de la membrana. La recirculación se consigue usando una bomba de material retenido **4** de tipo de bomba peristáltica o del tipo de bomba de desplazamiento positivo tal como una bomba de lóbulo rotatorio. La contrapresión **5** se produce en la línea de retorno según se desee mediante el ajuste de la válvula de material retenido **6**. La presión transmembrana durante esta operación se puede supervisar en base a las lecturas de presión en la entrada del material retenido **7**, el retorno del material retenido **5** y el material permeado **8**. La solución de intercambio de tampón se suministra a partir del recipiente de retención **9** usando una bomba **10** del tipo peristáltico o de otro tipo. Durante el funcionamiento normal, con el material permeado en la dirección de avance, el caudal del material permeado se supervisa mediante un medidor de flujo **11** y se controla usando una válvula de control **12** tal como una válvula de aguja u otro medio equivalente para controlar el flujo. El material permeado se puede recoger en un recipiente de desperdicios **13** supervisando el peso usando el dispositivo de pesado **14** tal como una balanza u otro aparato equivalente. Durante el pulso inverso con el material permeado en la dirección inversa, el flujo de material permeado se interrumpe con la válvula de material permeado **15**. La válvula de gas inerte **16** en el lado del material permeado se abre presurizando el depósito de material permeado en línea **17** a una presión mayor que la presión del material retenido. Esto obliga al material permeado a fluir en la dirección inversa. El caudal durante el pulso inverso se puede controlar suministrando presión de gas inerte **18** a partir de un depósito de gas inerte **19**. Después de un periodo de tiempo predeterminado o hasta que se haya introducido un volumen de solución de pulso inverso predeterminado, se reanuda el proceso de filtración normal.

20 El ajuste para usar solución salina u otra solución acuosa para el pulso inverso es similar al ajuste usado para el pulso inverso con material permeado (Fig. 5). El ajuste para la filtración primaria real es el mismo que en la Fig. 4 (puntos **1-14**). Sin embargo, el ajuste difiere en el método de introducir la solución de pulso inverso en el módulo de flujo cruzado. La solución de pulso inverso se almacena en el recipiente **17** que está bajo presión positiva **18** del suministro de gas inerte **19**. Durante el pulso inverso usando una solución acuosa diferente al material permeado, la válvula de permeado **15** se cierra y la válvula de pulso inverso **16** se abre. Esto permite que la solución de pulso inverso fluya en la dirección inversa. Después de un periodo de tiempo predeterminado o hasta que un volumen predeterminado de la solución de pulso inverso se haya introducido, se reanuda el proceso de filtración primaria normal.

25 Los volúmenes de pulso inverso pueden variar desde aproximadamente el 0,05% del volumen del sistema hasta aproximadamente el 2% del volumen del sistema, pero preferentemente están entre aproximadamente el 0,1% y aproximadamente el 0,5% del volumen del sistema. El intervalo entre los pulsos inversos puede variar desde aproximadamente 10 segundos hasta aproximadamente 10 minutos, pero preferentemente está entre aproximadamente 1 minuto y aproximadamente 5 minutos. El "volumen de sistema" se define como el volumen del material de la etapa de eliminación del disolvente y se puede calcular fácilmente a partir del tiempo de pulso inverso y el periodo entre pulsos inversos, dado el caudal.

30 Volviendo a la Fig. 1, después de la finalización de la etapa de filtración primaria, el producto final se transfiere al recipiente de almacenamiento **16**. La suspensión de partículas multivesiculares puede necesitar el ajuste hasta su potencia de fármaco final después de la finalización de la etapa de filtración primaria. Los procedimientos en esta fase diferirán dependiendo de si el material está demasiado diluido o demasiado concentrado.

35 Si el material está demasiado diluido, la concentración se puede conseguir en una etapa de microfiltración adicional usando un sistema más pequeño que el sistema de filtración primaria. Como alternativa, el sobrenadante se puede decantar después de un periodo de asentamiento extendido. Para la decantación, el sobrenadante se elimina del material de filtración post-primaria después de un tiempo de asentamiento que es al menos aproximadamente 24 horas, pero preferentemente es al menos aproximadamente 48 horas. Esto implica insertar un tubo de nivel en el material a granel estéril y bombear de forma aséptica sobrenadante hasta que el sedimento esté sustancialmente aislado. El material después se suspende nuevamente durante 15 minutos usando una placa de agitación o dispositivo equivalente y se toman muestras insertando una pipeta estéril en el material a granel. Debido a los requerimientos de esterilidad, esta operación se realiza en un entorno de Clase 100. El volumen ajustado después

se almacena a 2-8 °C hasta que se obtienen los resultados analíticos. En el caso de potencia baja después de la decantación, el procedimiento se puede repetir nuevamente, incluyendo el periodo de asentamiento. Como alternativa, se puede llevar a cabo una etapa de filtración de flujo cruzado secundaria (descrita con detalle más adelante).

5 Si el material está demasiado concentrado, la adición de solución isotónica puede diluirlo hasta la concentración diana. Las potencias de las sustancias fisiológicamente activas pueden variar a lo largo de un intervalo amplio. Por ejemplo, la potencia de una composición de MVL que contiene proteína puede ser del orden de µg/ml, mientras que para otros compuestos, el intervalo de potencia puede ser más elevado. Por ejemplo, las potencias de MVL que  
10 contienen citarabina pueden variar desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 15 mg/ml, preferentemente desde aproximadamente 8 hasta aproximadamente 12 mg/ml, más preferentemente desde aproximadamente 9 hasta aproximadamente 11 mg/ml. Por ejemplo, las potencias de MVL que contienen morfina pueden variar desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 15 mg/ml, preferentemente de aproximadamente 8 hasta aproximadamente 12 mg/ml. Una vez que se ha alcanzado la potencia de fármaco correcta, el material se puede  
15 cargar, usando procedimientos de carga estériles. Los procedimientos de carga estériles apropiados serán evidentes para los expertos en la materia.

#### Filtración de flujo cruzado secundaria

20 La filtración de flujo cruzado secundaria es una alternativa a la decantación para el ajuste de la potencia del material a granel de preparaciones de MVL que contienen sustancia fisiológicamente activa. Adicionalmente, la etapa de filtración primaria descrita previamente puede tener también un “estancamiento” grande, o volumen muerto para reducir eficazmente el volumen hasta un valor deseado. Otra ventaja principal de la filtración de flujo cruzado secundaria es la eliminación de la etapa de decantación, reduciendo de ese modo el riesgo de incumplimiento de  
25 esterilidad significativamente a la vez que se ahorra tiempo de operación. Además, el uso de filtración de flujo cruzado secundaria puede mejorar los rendimientos de producto significativamente. La etapa de filtración de flujo cruzado secundaria también se puede usar para maximizar la eficacia permitiendo la combinación de múltiples lotes de productos.

30 Un ajuste de proceso típico se representa en la Fig. 6. Con referencia a la Fig. 6, se muestra un recipiente de material retenido 1, que contiene el producto de la etapa de filtración primaria descrita anteriormente.

Esta suspensión de partículas se bombea a través de una línea de alimentación mediante medios de bombeo 2, que pueden ser una bomba peristáltica u otra bomba conocida en la técnica, hacia la entrada del módulo de filtración de  
35 flujo cruzado secundaria 3. Este puede ser un módulo de tipo de fibra hueca. El monitor de presión de entrada 4 está presente en la entrada del módulo y el monitor de presión de salida 5 está presente en la salida del módulo. El material permeado se arrastra para descartarse o analizarse, pero pasa a través del monitor de presión de material permeado 6. La salida del material retenido conduce de nuevo al recipiente de material retenido, que está en un medio de pesado 7 que permite la supervisión del progreso de la etapa de filtración de flujo cruzado secundaria. El  
40 material retenido circula nuevamente a través del módulo de filtración de flujo cruzado hasta que se consigue una concentración diana. La concentración diana se observa que se correlaciona linealmente con el peso, de forma que se puede calcular un peso diana.

45 La filtración de flujo cruzado secundaria generalmente se usa en el proceso inventivo para reducir los volúmenes a partir del volumen resultante de la etapa de filtración primaria hasta aproximadamente el 10% al 90% de este volumen resultante.

Las presiones transmembrana para filtración de flujo cruzado secundario pueden variar desde aproximadamente 0,7 kPa (0,1 psi) hasta aproximadamente 48,2 kPa (7 psi). Las contrapresiones del material retenido pueden variar  
50 desde cero hasta aproximadamente 68,9 kPa (10 psi).

Para productos que contienen sustancias farmacéuticamente activas preparados de acuerdo con un proceso de escala de 1 l o un proceso de escala de 25 l, los tamaños de partícula finales varían desde aproximadamente 13 hasta aproximadamente 18 micrómetros. El porcentaje de fármaco libre varía desde aproximadamente el 0,3 hasta  
55 aproximadamente el 2,0%. El porcentaje de sustancia activa encapsulada obtenido a partir del proceso completo, calculado a partir de una cantidad total de sustancia activa introducida en la primera solución acuosa, varía desde aproximadamente el 17 hasta aproximadamente el 50%. Tales rendimientos dependen del producto particular y dependen menos de la escala. Sin embargo, dentro de un producto dado, de acuerdo de los procesos inventivos, los rendimientos son altamente reproducibles.

60 Los MVL que contienen sustancia farmacéuticamente activa producidos mediante procesos de la invención se pueden usar solos o en combinación con otros materiales farmacéuticamente activos, con la limitación de que la cantidad de sustancia en el MVL que contiene sustancia farmacéuticamente activa sea suficiente para posibilitar el diagnóstico de, la profilaxis frente a o el tratamiento de una afección existente indeseada en un organismo vivo. En  
65 general, la dosis variará con la edad, condición, sexo y alcance de la afección indeseada en el paciente y se puede determinar por un experto en la materia. El intervalo de dosificación apropiado para uso humano incluye un intervalo

desde 0,1 hasta 6.000 mg de la sustancia fisiológicamente activa por metro cuadrado de área de superficie corporal.

Los MVL que contienen sustancia farmacéuticamente activa de la invención se pueden administrar por vía parenteral mediante inyección o mediante infusión gradual a lo largo del tiempo. Las composiciones se pueden administrar por vía intravenosa, por vía intraperitoneal, por vía intramuscular, por vía subcutánea, intracavidad o por vía transdérmica. Los expertos en la materia conocerán otros métodos de administración. Para algunas aplicaciones, tales como administración subcutánea, la dosis necesaria puede ser bastante pequeña, pero para otras aplicaciones, tales como administración intraperitoneal, la dosis necesaria puede ser muy grande. Aunque se pueden proporcionar dosis fuera del intervalo de dosificación anterior, este intervalo abarca la amplitud de uso de prácticamente todas las sustancias fisiológicamente activas.

Con referencia a la esterilidad, la validación y los controles ambientales, se llevó a cabo un programa de validación de carga de medios (FDA Guideline, junio 1987, página 22 que abarca Aseptic Assembly Operations) regularmente, usando criterios que dieron como resultado un grado elevado de confianza de que la garantía de esterilidad está dentro o supera las normas aceptadas en la industria.

Todos los lotes preparados se han sometido al Ensayo de Endotoxina Bacteriana (también conocido como ensayo del lisado de amebocitos de limulus - LAL), el Ensayo del Promoción de Crecimiento y los Ensayos Bacteriostáticos y Fungistáticos, según se detallan en la USP. En ningún caso ninguno de los lotes falló estos ensayos.

La invención se describirá adicionalmente en los siguientes ejemplos.

### Ejemplos

Todos los productos se usan de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La determinación del tamaño de partícula se realizó en un determinador de tamaño de partícula Horiba LA910 en el modo convencional, excepto cuando se ha indicado otra cosa. Las muestras (con volúmenes de entre 50 y 400  $\mu$ l, dependiendo del producto y de la concentración de muestra) para la determinación del tamaño de partícula se diluyeron en 10 ml de solución salina.

Lipocrit es una medida de la proporción volumétrica del sedimento sólido (después de la centrifugación) con relación al volumen total de la suspensión. Las mediciones se realizaron llenando un tubo de hematocrito (Baxter B4416-1) con muestra seguido por centrifugación en una centrífuga IEC Centra-4B a 2200 rpm o una Sorvall 6000D a 2000 rpm durante 10 minutos.

El grado de encapsulación o la eficacia de encapsulación (% de encapsulación) de cualquier sustancia fisiológicamente activa en la suspensión después de la separación de disolvente o filtración primaria se determinó mediante métodos de espectroscopia de UV, o mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Las muestras se ensayaron para determinar la concentración de fármaco tanto total como del sobrenadante. El porcentaje de fármaco libre se calculó como % libre =  $(1 - \text{Lipocrit}) (C_{\text{sup}})/(C_{\text{total}})$ , donde  $C_{\text{sup}}$  es la concentración de fármaco en el sobrenadante,  $C_{\text{total}}$  es la concentración del fármaco total y Lipocrit es el porcentaje volumétrico de sedimento. El grado de encapsulación es el 100% - %libre.

Se realizaron mediciones de viscosidad usando un viscosímetro capilar. El viscosímetro capilar es un tubo de acero inoxidable silanizado (1,08 mm de diámetro interior, 50 cm de longitud o 0,55 mm de diámetro interior, 50 cm de longitud; Alltech) unido a un recipiente de presión y un manómetro digital y válvula posicionada a la entrada del tubo capilar. El flujo del tubo se recogió en un cilindro graduado. El viscosímetro se calibró usando patrones de aceite mineral Canon con viscosidades de 9,178 cP y 18,78 cP a 20 °C. Los recipientes de primera emulsión se mantuvieron a 20 °C durante la mezcla a menos que se estuvieran investigando efectos de temperatura. La temperatura de las muestras se registró tras la salida del tubo capilar. La misma no varió más de +/- 5° con un promedio de 20,78 °C y una desviación típica de 0,85 °C. Los recipientes de segunda emulsión se mantuvieron en general a temperaturas más elevadas, por ejemplo 40 °C.

Para la determinación de la eliminación de disolvente, se tomaron muestras cada cinco minutos a partir de una composición que contenía esférulas de disolvente que experimentaba eliminación de disolvente y se sometió a análisis cromatográfico de rutina.

Para todos los gráficos presentados, el ajuste de líneas a través de los puntos de datos representan el mejor ajuste para los datos experimentales.

#### Ejemplo 1 Viscosidad como una herramienta de aumento de escala en primeras emulsificaciones

El proceso de primera emulsión implicó la mezcla de dos soluciones no miscibles filtradas estériles a una velocidad de cuchilla de impulsor específica usando una placa de cizallamiento durante un tiempo designado. La primera solución fue una colección de lípidos polares y no polares disueltos en un disolvente no miscible en agua volátil. La



segunda contenía un fármaco activo en solución acuosa. Las cantidades de material bruto se sometieron a ajuste de escala directamente. Para asegurar que la primera emulsión era consistente entre escalas, se eligió una variable dependiente que era independiente de escala: viscosidad. Se ha establecido una relación entre viscosidad y tiempo de mezcla de la primera emulsión, como se describe en las Figs. 8a y 8b.

Después de que la viscosidad de la primera emulsión se hubo medido a la escala de 1 l (12,8 cP), se determinó la rpm de agitador a esta escala. Se mantuvo constante la misma velocidad de cuchilla de la placa de cizallamiento en las escalas tanto de 1 l como de 25 l. La velocidad de cuchilla es igual al producto del diámetro del impulsor,  $\pi$  y la rpm de la cuchilla. La proporción de diámetro de impulsor a diámetro de recipiente se mantuvo constante durante el ajuste de escala. Los diámetros de recipiente se llevaron a escala directamente. Por lo tanto, conociendo los factores de escala, se calculó la rpm del aumento de escala. Este enfoque dio como resultado una viscosidad de solución de 11,1 cP a estas rpm de aumento de escala. La revisión de los datos mostró que la rpm calculada no aportó cizallamiento suficiente en la emulsión para obtener la viscosidad deseada (12,8 cP). La siguiente etapa fue el uso de la aportación de energía por volumen unitario para determinar cuánta potencia era necesaria para aumentar la viscosidad desde 11,1 cP hasta 12,8 cP. Esta aportación de energía por volumen unitario se define en la Ecuación 1 como:

$$E/V = n^3 D^5 t/V \quad (1)$$

en la que E es la aportación de energía teórica, n es la rpm de placa de cizallamiento, D es el diámetro de placa de cizallamiento, t es el tiempo y V es el volumen de solución. La aportación de energía por volumen se asume que es independiente de la escala (Díaz, M. *et al.*, "Mixing Power, External Convection and Effectiveness in Bioreactors", *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 51, 1996, págs. 131-140). Se calculó la energía adicional por volumen necesaria para aumentar la viscosidad en el sistema a escala reducida desde 11,1 cP hasta 12,8 cP. Este valor se usó para determinar la rpm nueva para el sistema al que se ha aumentado de escala. La viscosidad se midió frente al tiempo en la escala de 25 l.

Las primeras emulsiones se colmataron a cuatro escalas diferentes que varían desde 20 ml hasta 50 l. Todos los mezcladores usaron cuchillas de tipo de dispersión de alto cizallamiento tal como las placas de cizallamiento. Como alternativa, se podría usar una combinación de jaula ranurada y conos de mezcla a escalas más elevadas (10 l a 25 l). La velocidad de mezcla y el tiempo de mezcla de la agitación fueron los parámetros que se tenían que variar.

Las emulsiones w/o se formaron mediante mezcla de cizallamiento elevado de una solución acuosa que incluía 470 g de sulfato de morfina (Mallinckrodt Pharmaceuticals, Chesterfield MO), 85,8 g de ácido clorhídrico al 10% (Spectrum) y 22,6 kg de agua para inyección. La fase de disolvente no miscible en agua incluía los siguientes tensioactivos: 32,0 g de fosfatidilglicerol de dipalmitoilo (DPPG, Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL), 2123 g de dioleil fosfadilcolina DOPC (Avanti) y 114 g de colesterol (Spectrum). También, se disolvieron 3,25 g de trioleína (Avanti) y 10,5 g de tricaprilina (Avanti) en la fase de disolvente no miscible en agua (22,9 kg de cloroformo).

La primera emulsión se realizó a 3600 rpm, durante 960 segundos a 25 °C y presión de espacio de cabeza de 20,68 kPa en un recipiente de primera emulsión provisto de una jaula de mezcla de 4,5".

Se obtuvo una caracterización reológica de la emulsión w/o midiendo su viscosidad relativa a lo largo de un intervalo grande de índices de cizallamiento. La emulsión w/o se observó que era seudoplástica, dando como resultado una relación lineal entre la tensión de cizallamiento y el índice de cizallamiento cuando se representan en una escala log-log (Figura 7a). La naturaleza seudoplástica de las emulsiones w/o concentradas se cree que se debe a la presencia de aglomeraciones a índices bajos de cizallamiento que se degradan y no están presentes a los índices de cizallamiento elevados.

La Figura 7b confirma la naturaleza seudoplástica de la emulsión representando la viscosidad relativa (viscosidad medida/viscosidad de fase continua) frente a el índice de cizallamiento. La viscosidad decayó exponencialmente con respecto al índice de cizallamiento. Con el fin de comparar de forma no apropiada las viscosidades de emulsión, los resultados experimentales se midieron únicamente dentro de la región de equilibrio de 2500 s<sup>-1</sup> y superiores.

Las emulsiones w/o se prepararon a varias velocidades y tiempos de mezcla. Los cambios en los parámetros de mezcla dieron como resultado emulsiones que variaban en su viscosidad independiente (Figura 8a). Estos resultados demostraron un aumento logarítmico único en la viscosidad relativa con un tiempo de mezcla creciente a lo largo de una velocidad de mezcla constante. Cuando las emulsiones se cambiaron de escala mediante un factor de cuatro se observó la misma relación logarítmica entre el tiempo de mezcla y la viscosidad (Figura 8b).

Se prepararon varias emulsiones w/o a temperaturas que variaban entre 22 °C y 32 °C. El efecto de la temperatura de formación sobre la viscosidad de la emulsión se caracterizó en la Figura 9, mostrando que la temperatura de formación de emulsión tenía un efecto lineal directo sobre la viscosidad de la emulsión. A temperaturas más elevadas la membrana lipídica se volvió más maleable y las gotas se degradaban más fácilmente. De esta manera, las emulsiones preparadas a temperaturas más elevadas tenían un tamaño de gota medio más pequeño y por lo tanto una viscosidad aparente más elevada.

Se realizaron mediciones de viscosidad adicionales con el viscosímetro capilar usando un tubo capilar de diámetro más pequeño con el fin de determinar si estaban presentes efectos de pared. El hecho de que ambas mediciones se solapaban confirmó que los efectos de pared en el viscosímetro capilar eran insignificantes para los presentes fines. Si los efectos de pared hubieran estado presentes, se hubiera esperado la observación de efectos de pared más elevados, viscosidad más baja, con el tubo de diámetro más pequeño.

Con el fin de utilizar mejor la relación entre la viscosidad y la aportación de energía, el gráfico se linealizó representando la energía en una escala logarítmica (Figura 10). Adicionalmente, se añadieron datos a dos de las escalas más grandes. Se estableció una relación lineal entre la viscosidad de emulsión w/o y la aportación de energía a la emulsión a lo largo de un aumento de escala de 200 veces. De esta manera se puede elegir una viscosidad de emulsión deseada y la aportación de energía necesaria correspondiente se puede encontrar en la Figura 10. A una escala determinada la velocidad de mezcla y el tiempo se pueden variar posteriormente para conseguir la aportación de energía necesaria.

### 15 Ejemplo 2. Tamaño de partícula como una herramienta de aumento de escala en segundas emulsificaciones

Se formó una emulsión de agua-aceite-agua combinando la primera emulsión con un volumen mucho más grande de una segunda solución acuosa. El diámetro de partícula final y la distribución de tamaño fueron una función de la configuración del impulsor, rpm y tiempo de mezcla. El tamaño y la distribución de partícula se midieron usando un analizador de tamaño de partícula (Horiba, modelo 910). El diámetro de placa de cizallamiento y la rpm se cambiaron de escala desde el sistema de 1 l siguiendo el procedimiento usado en el sistema de la primera emulsión.

La segunda solución acuosa consistía en: 21,88 kg de dextrosa, 503 g de lisina y 382 kg de agua para inyección. Los cálculos de aumento de escala iniciales para la segunda emulsión de la preparación que contiene morfina del Ejemplo 1 en la escala de 25 l indicaron que se debería usar una placa de cizallamiento de 22,86 cm a 500 rpm. Sin embargo, en estas condiciones de mezcla, la solución no se mezcló adecuadamente. Las rpm bajas no combinaron de forma suficiente la primera emulsión más densa con la segunda solución acuosa. Además, regiones de densidad elevada dentro del reactor hicieron que el proceso de separación de disolvente fuera ineficaz. Las partículas generadas en estas condiciones tenían de 10 a 12  $\mu\text{m}$ . La especificación de tamaño de partícula para este producto es 13 a 18  $\mu\text{m}$ .

La velocidad de agitación se tuvo que aumentar para mezclarse en la primera emulsión. A través de la observación, 1000 rpm demostraron ser suficientes. A las rpm más elevadas, el tamaño de partícula se volvería incluso más pequeño. La aportación de energía por volumen se mantuvo reduciendo el diámetro del impulsor desde 22,86 cm hasta 11,43 cm. La placa de cizallamiento se reemplazó con una jaula ranurada de 11,43 cm. El tiempo de mezcla fue 300 segundos a 40 °C a 1000 rpm.

Este proceso generó partículas de 14 a 16 micrómetros. El proceso de separación de disolvente también se mejoró espectacularmente, ya que la mezcla mejorada dispersó completamente la capa densa de cloroformo que podría permanecer en el fondo del tanque de cizallamiento, permitiendo que se eliminara más eficazmente mediante la corriente de gas inerte.

La desviación típica del tamaño de partícula se redujo desde 6,2 hasta 4,5  $\mu\text{m}$  cuando la placa de cizallamiento de 22,86 cm se reemplazó con la jaula ranurada de 11,43 cm. Existen dos razones probables para esta reducción significativa en la desviación típica del tamaño de partícula. En primer lugar, a rpm más elevada, más solución se expuso al borde de cizallamiento. La exposición aumentada redujo la variabilidad de tamaño global. En segundo lugar, la jaula ranurada impartió cizallamiento uniforme a todas las partículas que pasaban a través de la misma. La exposición a cizallamiento a partir de una placa de cizallamiento no fue uniforme.

### 50 Ejemplo 3. Eliminación del disolvente

La emulsión w/o/w generada en la segunda etapa de emulsificación del Ejemplo 2 aún contenía disolvente en este punto. El disolvente se separó de la emulsión a través de inyección de gas. El control del índice de la velocidad de eliminación de disolvente fue crítico. Durante la separación, se tomaron muestras regulares para medir la concentración de disolvente y para controlar la encapsulación de fármaco. Sin la concentración del fármaco libre comenzaba a aumentar durante la separación, ocurría daño de partícula. Los caudales de gas iniciales se aumentaron 25 veces para igualar el aumento de volumen. El tiempo del procesamiento para la separación de disolvente se mantuvo constante inicialmente entre escalas. Una vez que se hubo eliminado el disolvente, las partículas se volvieron rígidas y más estables.

El perfil de inyección inicial del sistema de esférula de disolvente que contiene morfina de 25 l, en base al proceso de 1 l, usó tres caudales diferentes. La primera fase ajustó el flujo a 375 l por minuto (lpm) durante 17 minutos. Después la solución se inyectó a 1000 lpm durante 5 minutos, seguido por 250 lpm durante 28 minutos. La razón para reducir el caudal de la primera y última fase en la escala de 1 l fue para reducir la formación de espuma, que puede ser una preocupación durante los primeros 10-20 minutos para preparaciones que contienen morfina. En el proceso de 25 l, la formación de espuma no fue un problema significativo en las últimas fases, debido al uso de un

recipiente de forma relativamente alta y estrecha. Si no se usaba este recipiente y la velocidad de inyección es mayor que 500 lpm, la trampa de espuma llena toda la capacidad. También, a 500 lpm en el recipiente más pequeño y bajo, se observó que el porcentaje de “fármaco libre” (sustancia fisiológicamente activa no encapsulada) aumentaba significativamente, indicando la alteración de partícula. Esto se presenta en la Figura 11.

5 A 375 lpm, el “porcentaje de fármaco libre” fue similar al observado en la escala de 1 l. En todos los experimentos de 25 l, la inyección a 1000 lpm después de 17 minutos no influyó sobre la eficacia de encapsulación y la formación de espuma adicional fue insignificante. Cuatro segundas emulsiones idénticas se separaron del disolvente en condiciones idénticas con el fin de demostrar que el disolvente se eliminaba de forma consistente por debajo de la concentración especificada de 100 ppm. Los datos mostraron que 17 minutos de inyección a 375 lpm seguido por 25 minutos de inyección a 1000 lpm eran suficientes para reducir la concentración de disolvente por debajo de 100 ppm. La concentración de disolvente se llevó de forma rutinaria a menos de 1 ppm a los 60 minutos de la eliminación de disolvente. Cuatro lotes idénticos demostraron que el proceso de eliminación de disolvente era reproducible.

15 El tiempo de separación mínimo posible se determinó mediante la inyección con el caudal disponible máximo de 1250 lpm. Este experimento demuestra que, en el mejor de los casos, únicamente 9 minutos se podrían ahorrar del tiempo de procesamiento actual. Esto se demuestra en la Figura 12. En estas condiciones, la trampa de espuma se llenó completamente y el porcentaje libre estuvo por encima del 50%. Por estas razones, el tiempo de procesamiento actual de 42 minutos se consideró aceptable.

#### 20 Ejemplo 4. Aumento de escala de intercambio de tampón y concentración

Después de la separación del disolvente de las partículas del Ejemplo 4, las partículas se suspendieron en una solución que generalmente no es adecuada para inyección. La suspensión que contiene morfina se transfirió a un módulo de filtración de flujo cruzado en el cual se concentró y la segunda solución acuosa se intercambió por solución salina u otra solución fisiológica. Los parámetros estudiados durante el flujo cruzado son: tiempo de procesamiento, caudal de material permeado, rendimiento de etapa y estabilidad de producto final. En el cambio de escala, la velocidad lineal a través de los filtros de flujo tangencial se mantuvo constante. El área de filtro se aumentó para proporcionar el caudal de material permeado deseado. En el diseño, se minimizó el estancamiento del sistema de flujo cruzado.

Este producto fue químicamente estable a lo largo de dos años en almacenamiento en frío. Se estableció un protocolo de estabilidad acelerado para acortar el tiempo necesario para recoger los datos. Actualmente, las especificaciones de liberación de morfina requirieron que el porcentaje de fármaco libre en la solución no excediera el diez por ciento de fármaco encapsulado total antes de 21 días a 37 °C. El producto final se colocó en viales y se almacenó a 37 °C. Se tomaron muestras regularmente a lo largo del tiempo y se analizaron para determinar el porcentaje de fármaco libre.

El diseño de ingeniería inicial del sistema de filtración de flujo cruzado redujo la necesidad de desarrollo de proceso. A partir de los primeros desarrollos, la concentración y el intercambio de tampón se comportaron como se esperaba. Los caudales de material permeado fueron constantes a través de todo el proceso a 5,0 lpm. El tiempo de procesamiento fue relativamente consistente con el proceso de 1 l a 2,5 horas. El rendimiento de etapa para la filtración de flujo cruzado fue el 85 por ciento. La eficacia de encapsulación global fue el 41 por ciento que era consistente con el rendimiento a la escala de producción de 1 l.

El material producido en esta escala fue muy estable. Los datos de estabilidad mostraron que el porcentaje de fármaco libre no superaba el diez por ciento máximo hasta el día 38 a 37 °C. Los criterios de estabilidad actuales exigen que un producto aceptable supere 21 días a esta temperatura. Se obtuvieron resultados aceptables similares a partir de preparaciones de citarabina.

#### 50 Ejemplo 5. Procesamiento de lote múltiple

En la producción farmacéutica de rutina, los procesos de limpieza-en-el-sitio (CIP) y esterilización-en-el-sitio (SIP) consumen la mayor parte del tiempo de procesamiento. Por tanto, en procesos convencionales, únicamente aproximadamente el 30% del tiempo se dedica a las etapas de fabricación directa y el resto es limpieza y esterilización para el próximo lote.

La presente invención proporciona procesamiento de lote múltiple. El procesamiento de lote múltiple implica la producción de lotes idénticos y la combinación posterior o secuencial de lotes para procesamiento aguas abajo adicional, haciendo de este modo más eficaz el uso de “tiempo muerto”, durante el ciclo de CIP y SIP.

En una preparación que contiene morfina a escala de 1 l, se produjeron tres lotes de producto y se combinaron después de la etapa de eliminación de disolvente y SIP, pero antes de la limpieza. Cada lote y la composición combinada se analizaron para determinar porcentaje de morfina libre y tamaño de partícula. Los datos se presentan en la Figura 13.

La consistencia excelente entre los lotes consecutivos se obtuvo, como se esperaba. La preocupación más significativa surgió con relación a la etapa de filtración de flujo cruzado, que utiliza filtros que podrían colmatarse con el uso extendido. Se aplicó pulso inverso a este sistema para parte del segundo lote y la mayoría del tercer lote. El pulso inverso no influyó sobre la calidad del producto. El sistema de 25 l se diseñó específicamente para operar a 75 l usando este procesamiento de lote múltiple.

#### Ejemplo 6. Mezcla estática

Se prepararon los siguientes materiales para ensayo con mezcladores estáticos. Para una escala de 25 l, el proceso de mezclador estático de preparación que contiene morfina, los componentes químicos y las cantidades fueron como se enumeran en los Ejemplos 1 y 2.

Se preparó una preparación de citarabina con una primera fase acuosa de 30 g/l de citarabina y 51,31 g/l de HCl (10% p/v), una fase de disolvente no miscible en agua volátil de 2,06 mg/ml de DPPG, 2,15 mg/ml de trioleína, 7,66 mg/ml de colesterol, 10,34 mg/ml de DOPC y 0,76 ml/ml de agua para inyección (API) en cloroformo y una segunda fase acuosa de 70,6 g/l de dextrosa (50%) y 6,29 g/l de L-lisina. La citarabina se preparó a la escala de 10 l.

Se preparó una preparación de morfina con una primera fase acuosa de 21,32 g/l de sulfato de morfina y 3,84 g/l de HCl (10% p/v), una fase de disolvente no miscible en agua de 2,081 mg/ml de DPPG, 0,211 mg/ml de trioleína, 7,72 mg/ml de colesterol, 9,58 mg/ml de DOPC, 0,683 mg/ml de tricaprilina y 0,764 mg/ml de API en cloroformo y una segunda fase acuosa de 152 g/l de dextrosa (50%) y 1,59 g/l de L-lisina. Las preparaciones de morfina se prepararon a escalas de 1, 10 y 25 l.

Se preparó una preparación de factor de crecimiento similar a insulina (IgF-1) con una primera fase acuosa de 14,5 g/l de IgF-1 en sacarosa al 5%/citrato 20 mM, una fase de disolvente no miscible en agua de 2,08 mg/ml de DPPG, 1,79 mg/ml de trioleína, 7,68 mg/ml de DEPC y 1,492 mg/ml de API en cloroformo y una segunda fase acuosa de glicina al 1,49%, NH<sub>4</sub>OH 0,041 N y 329,2 g/l de L-lisina.

Se prepararon preparaciones de amikacina con una primera fase acuosa de 80 g/l de base libre de amikacina, en 168 g/l de ácido sulfúrico (pH 8) o 60 g/l de base libre de amikacina en 50,9 g/l de ácido sulfúrico (pH 9), una fase de disolvente no miscible en agua de 2,07 mg/ml de DPPG, 2,16 mg/ml de trioleína, 7,69 mg/ml de colesterol, 10,4 mg/ml de DOPC y 0,78 ml/l de API en cloroformo y una segunda fase acuosa de 95,84 g/l de sacarosa y 6,56 g/l de L-lisina.

Se prepararon primeras emulsiones de cada preparación usando un tanque agitado de cizallamiento elevado (100 ml, 400 ml, 2000 ml y 40 l), hasta que se alcanzó el tamaño de partícula deseado. El tamaño de partícula se determinó usando un determinador de tamaño de partícula Horiba LA910, usando muestras de 50 µl o 400 µl diluidas en 10 ml de solución salina.

La proporción de volumen de la corriente de alimentación de primera emulsión a la corriente de alimentación de segunda fase acuosa fue única para cada proceso, pero en general varió desde 0,075 hasta 0,35. Las corrientes de alimentación se suministraron a un mezclador estático usando una bomba de lóbulo rotatorio o un recipiente con nitrógeno presurizado como la fuerza impulsadora. Se usaron los siguientes Mezcladores Estáticos Kenics™: 3/16" OD, con 27,16 ó 9 elementos; 1/4" OD con 21 elementos; 1/2" OD con 21 elementos; y 1,5" OD con 24 elementos. Se usó el siguiente mezclador estático Koch: mezclador SMV-DY, 1/4" con 5 elementos. Se emplearon la siguiente bombas: bomba Watson Marlow modelo N° 604S; bombas Cole Parmer modelo N° 7523-20; y bomba de lóbulo rotatorio G+H, modelo N° GHPD322.

El caudal de la primera emulsión en un recipiente receptor inmediatamente antes del mezclador estático se supervisó mediante un medidor de flujo en línea (medidor de Flujo, EG y G, modelo N° FT6-871W-LEGA1) y se controló mediante una válvula en la salida del recipiente a presión. Los caudales son dependientes de escala y por lo tanto no son útiles para el aumento de escala. Las velocidades lineales son más útiles, que se determinan dividiendo el flujo entre el área de sección transversal de un mezclador estático particular usado.

La primera emulsión se suministró a 25 °C, mientras que la segunda solución acuosa se suministró a 35 °C. Los caudales son dependientes del tamaño del mezclador estático pero la velocidad lineal se mantuvo constante para diferentes tamaños de mezclador estático. Las velocidades lineales ilustrativas se muestran en la Figura 15. Por lo tanto, si un mezclador Kenics de 1/2" O.D. (área superficial de 0,28 cm<sup>2</sup>) se usó a 4,9 lpm, un mezclador Kenics de 1,5" O.D. (área superficial de 3,76 cm<sup>2</sup>) se usaría a 66 lpm. El recipiente receptor mantuvo la segunda emulsión resultante a 35 °C. Después se llevó a cabo la eliminación del disolvente. El cloroformo se eliminó mediante extracción con N<sub>2</sub> (escala 100 ml) o inyección con N<sub>2</sub> (escalas más grandes). La extracción se logró colocando muestras de 50 ml en matraces de Erlenmeyer de 1 l en un baño de agua giratorio ajustado a 37 °C. Los matraces se sellaron con la excepción de una línea de suministro de N<sub>2</sub> y una línea de ventilación para N<sub>2</sub> y CHCl<sub>3</sub>. Se aplicó nitrógeno a una velocidad de 55-75 SCFH durante 15 minutos.

La suspensión resultante se concentró mediante filtración de flujo cruzado, usando membranas de fibra hueca de polisulfona de 0,2  $\mu\text{m}$  (A/G Technology, CFP-2-E-5A, tamaño de poro 0,2  $\mu\text{m}$ ). El material inyectado se procesó en tres etapas: concentración inicial, filtración primaria y concentración final. La concentración inicial concentró el material hasta la mitad del volumen original. Se usó diafiltración para intercambiar la segunda solución acuosa con una solución salina acidificada. La etapa de concentración final se usó para llevar el producto hasta su volumen de especificación.

Los análisis de producto de fármaco total y libre se realizaron de la manera siguiente. Para determinación de citarabina total, 0,5 ml de muestra de segunda emulsión se diluyeron y las partículas se lisaron con 0,5 ml de alcohol isopropílico (IPA). Estas muestras después se sometieron a agitación vorticial durante varios segundos. A continuación, 100 ml de la muestra sometida a agitación vorticial se diluyeron hasta 10 ml con HCl 0,1 N. La absorbancia de las muestras se leyó usando espectrofotómetro de UV (Cecil) a 280 nm. Para determinación de citarabina en sobrenadante (libre), 1 ml de muestra de segunda emulsión se pipeteó en viales Eppendorf y se centrifugó en una centrífuga de Eppendorf durante 2,5 minutos a un ajuste de 8,5. Después una alícuota de 100  $\mu\text{l}$  de este sobrenadante se diluyó hasta 10 ml con HCl 0,1 N. De la absorbancia de la muestra se leyó posteriormente usando un espectrofotómetro de UV a 280 nm.

Para determinación de morfina total, 250  $\mu\text{l}$  de muestra de segunda emulsión se diluyeron y las partículas se lisaron con 750  $\mu\text{l}$  de IPA. Estas muestras después se sometieron a agitación vorticial durante 15 segundos. A continuación, la muestra sometida a agitación vorticial se diluyó hasta 1:10 con hidróxido de sodio al 2%/solución salina normal al 0,8% y se sometió a agitación vorticial. La absorbancia de las muestras se leyó usando espectrofotómetro UV (Cecil) a 280 y 340 nm. Para determinación de morfina en sobrenadante (libre), 1,0 ml de muestra de segunda emulsión se centrifugaron durante 2,5 minutos en el ajuste de 8,3 usando una centrífuga Eppendorf. Una alícuota de 100  $\mu\text{l}$  de este sobrenadante se diluyó posteriormente en 10 ml de hidróxido de sodio/solución salina normal y se sometió a agitación vorticial durante 15 segundos. La absorbancia de la muestra se leyó posteriormente usando un espectrofotómetro UV a 280 y 340 nm.

Para determinación de IgF-1 total, 100  $\mu\text{l}$  de muestra de segunda emulsión se diluyeron en 900  $\mu\text{l}$  de IPA al 87,5%/HCl 2 N al 12,5% y se sometieron a agitación vorticial. Después de 45 minutos en hielo, 200  $\mu\text{l}$  de solución Tris 1 M, pH 9 se añadieron y se sometieron a agitación vorticial nuevamente. La muestra se sometió a microcentrifugación a 14.000 rpm durante 2 minutos y 200  $\mu\text{l}$  de muestra se añadieron a 800  $\mu\text{l}$  de acetonitrilo al 10% (ACN)/ácido trifluoroacético al 0,2% (TFA) en un vial de HPLC y se desarrolló en la HPLC. La HPLC fue una Waters Symmetry C<sub>18</sub> (P/N WAT054205) con columna de protección, P/N WAT054225. El tiempo de desarrollo fue 17 minutos con un tiempo posterior de 9 minutos (temperatura de horno 45 °C). El caudal inicial fue 0,8 ml/min con un volumen de inyección de 100  $\mu\text{l}$  con una velocidad de arrastre de 167  $\mu\text{l}$ . Se usó un detector DAD, tomando muestras cada 0,16 segundos, supervisando a 214 y a 275. Se usó un gradiente de acetonitrilo al 10%/ácido trifluoroacético al 0,2% y acetonitrilo al 90%/ácido trifluoroacético al 0,2%. Los espectros de pico controlados se almacenaron desde 190-400 nm. Se usaron diluciones en serie de material de reserva de IgF-1 en ácido acético 100 mM como patrón (1,875 mg/ml a 0,029 mg/ml).

La preparación del IgF-1 sedimentado fue de la manera siguiente. Una alícuota de 100  $\mu\text{l}$  de suspensión se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos. Se añadió 1,00 ml de IPA al 87,5%/HCl 2 N al 12,5% al sedimento y se incubó en hielo durante 45 minutos. 200  $\mu\text{l}$  de solución Tris 1 M, pH 9 se añadieron y la mezcla se sometió nuevamente a agitación vorticial. La muestra se sometió a microcentrifugación a 14.000 rpm durante 2 minutos. 200  $\mu\text{l}$  de muestra se añadieron a 800  $\mu\text{l}$  de acetonitrilo al 10%/ácido trifluoroacético al 0,2% en un vial de HPLC y se colocó en la columna de HPLC. El sobrenadante del sedimento se diluyó 5 ó 10 veces usando acetonitrilo al 10%/ácido trifluoroacético al 0,2% y se colocó en un vial de HPLC y se colocó en la columna de HPLC.

Para la determinación de amikacina libre en el sobrenadante, la suspensión se centrifugó a 800 g durante 3 minutos usando un Sorvall RT-6000B. 40  $\mu\text{l}$  del sobrenadante se añadieron a 30  $\mu\text{l}$  de solución salina normal y 150  $\mu\text{l}$  de IPA, se agitó vorticialmente suavemente y se incubó a 55 °C durante una hora. Para determinación de amikacina total en la suspensión, las muestras se diluyeron 1:10 en solución salina normal y se agitaron vorticialmente vigorosamente. Esta solución se diluyó 1:4 en IPA y se agitó vorticialmente suavemente y después se incubó a 55 °C durante una hora. Las muestras de segunda emulsión extraída en sacarosa-lisina se lavaron en solución salina y se analizaron usando un inmunoensayo de Fluorescencia de Concentración de Partícula (PCFIA). 1 ml de tampón fosfato 123 mM, pH 7,4 se añadió a cada preparación de muestra y se agitó vorticialmente vigorosamente. 15  $\mu\text{l}$  de cada muestra se añadieron posteriormente a un tubo de cultivo de vidrio que contenía 3 ml de tampón fosfato 123 mM, pH 7,4. Perlas de poliestireno se recubrieron con anticuerpo anti-amikacina (The Binding Site, San Diego, CA) se incubaron con una combinación de amikacina marcada fluorescentemente (El Sitio de Unión) y analito que contenía amikacina. La cantidad de amikacina marcada con fluorescente unida a la perlas se midió con un Analizador de Concentración de Fluorescencia (FCA) con señal de 485/535 nm y señal de referencia 590/620 nm.

La aportación de energía ( $\text{kg m}^3/\text{s}$ ) en un mezclador estático se puede expresar como la velocidad lineal por la caída de presión.

Potencia = (caudal lineal a través del mezclador) \* (caída de presión a través del mezclador) (2)

La potencia normalizada se obtiene dividiendo la potencia entre el área de corte transversal de la tubería del mezclador estático. La variación de los tamaños de partícula que contienen citarabina y morfina resultantes con aportación de potencia normalizada en un mezclador estático se muestra gráficamente en la Figura 14. Como se muestra en la Figura 14, la pendiente de la línea del producto de citarabina es más pronunciada que la de la preparación de morfina. Esto refleja la barrera aumentada a la formación de partículas para la preparación de citarabina. La preparación de morfina, por el contrario, muestra una energía de activación baja para formación de partícula. Esta tendencia se observó independientemente de la longitud del mezclador estático. La variación en la proporción de volumen de la primera emulsión a la segunda fase acuosa no tuvo un efecto significativo sobre el tamaño de partícula o la eficacia de la encapsulación.

La correlación de tamaño de partícula-potencia normalizada para un sistema de emulsión es una herramienta muy útil para el aumento de escala de un mezclador estático. Para un tamaño de partícula determinado, se puede obtener la potencia normalizada a partir de la Figura 14. Después, para un caudal determinado, se puede calcular la caída de presión para diversos diámetros de mezclador estático usando la expresión para aportación de energía dada en la Ecuación 2. Es evidente a partir de la Figura 14 que la correlación de tamaño de partícula-potencia es específica para un sistema de emulsión particular. Para partículas del mismo tamaño, se requiere menos potencia para emulsificar la formulación que contiene morfina que la formulación que contiene citarabina.

El mezclador Koch se seleccionó para comparar con el mezclador Kenics™. El mezclador Koch contiene elementos de mezcla rígidos hechos de láminas de acero inoxidable corrugadas soldadas entre sí. Un elemento se inserta a una desviación de 90 ° del elemento siguiente. El mezclador Koch usado aquí tenía 5 elementos y un diámetro interior de 9,5 mm. Debido al área de sección transversal más grande, se necesitaron caudales más elevados para igualar las velocidades lineales obtenidas usando el mezclador Kenics™. El aumento de la velocidad lineal redujo el número y el volumen de tamaños de partícula ponderadas. Los datos sugieren que el mezclador Koch mezcla más eficazmente que el mezclador Kenics™ ya que velocidades lineales y caídas de presión más bajas produjeron partículas del mismo tamaño. Sin embargo, ambos mezcladores produjeron emulsiones similares con respecto a la eficacia de encapsulación.

#### Ejemplo 7. Estudios de estabilidad

Con el fin de determinar semivida, los estudios de estabilidad se realizaron en condiciones de almacenamiento normal (4 °C) y temperatura elevada (37 °C). La temperatura de 37 °C se usó para acelerar la desestabilización como un parámetro para evaluar el proceso inventivo. El propósito de los estudios de estabilidad acelerada fue evaluar el parámetro de proceso de una manera más temporalizada de lo que sería posible a la temperatura más baja. El material final después de la diafiltración y el ajuste a la concentración específica de producto se cargó en viales que contenían 2 ml o 5 ml cada uno. La mitad de estos viales se mantuvieron a 4 °C y la mitad se mantuvieron a 37 °C. Periódicamente se sacó un vial de cada temperatura y se analizó para Lipocrit, concentración de fármaco total y concentración de fármaco libre. La semivida acelerada a 37 °C es el periodo de tiempo hasta que únicamente el 90% del fármaco total encapsulado originalmente permanece encapsulado. Las concentraciones de fármaco no encapsulado típicas en tiempo cero son aproximadamente el 0,01% a aproximadamente el 2,00%.

#### Ejemplo 8. Efecto de longitud de mezclador, tamaño de mezclador y velocidad lineal sobre el tamaño de partícula y la eficacia de encapsulación

El tamaño de partícula y la eficacia de encapsulación se midieron como una función de la longitud del mezclador estático y la velocidad lineal. La Figura 15 muestra el efecto de velocidad lineal sobre el tamaño de partícula que contiene citarabina creadas con un mezclador estático Kenics 3/16" con diversas longitudes y un mezclador Kenics 1/4". Se puede observar que el aumento de la velocidad lineal provoca una reducción en el tamaño de partícula. Los datos sugieren que existe un efecto de la longitud del mezclador sobre el tamaño de partícula medio, es decir, el mezclador más corto de 9 elementos crea partículas iguales o más grandes que el mezclador de 16 elementos, mientras que las partículas preparadas con el mezclador de 27 elementos son aproximadamente 1-2 µm más pequeñas. Este efecto puede indicar que la etapa de emulsificación en el mezclador estático no ha alcanzado aún el equilibrio y parece ser la función del tiempo de residencia de emulsión en el mezclador. El aumento del número de elementos da como resultado un aumento en el tiempo de residencia. Un tamaño de partícula de equilibrio se puede alcanzar tras la extensión del tiempo de residencia a una velocidad lineal dada.

El efecto del diámetro del mezclador a diversas velocidades lineales sobre el tamaño de partícula y la eficacia de encapsulación de la mezcla de la segunda emulsión en preparaciones de citarabina se determinó para evaluar la escalabilidad de proceso. La Figura 16 muestra los datos para el efecto de la eficacia de encapsulación de diversas velocidades lineales usando un mezclador Kenics 1/4" y los mezcladores de 3/16" pulgadas de diversas longitudes como se ha descrito para la determinación del tamaño de partícula anteriormente. La eficacia de encapsulación varía entre el 70% y el 80% para los tres mezcladores. El % de encapsulación promedio para todos los mezcladores era aproximadamente el 74,8% con una desviación típica del 3,4%. Las eficacias de encapsulación para los mezcladores Kenics™ individuales se resumen en la Tabla 1. Las eficacias de encapsulación se determinaron en

muestras después de extracción.

**Tabla 1. Eficacias de Encapsulación Promedio para Mezcladores Estáticos Kenics™**

dimensiones del mezclador	% de encapsulación promedio (des. tip.)	Nº de observaciones
3/16", 9 elementos	72,8(1,7)	8
3/16", 16 elementos	75,2 (3,4)	22
3/16", 27 elementos	74,6(1,5)	5
1/4", 24 elementos	75,7 (4,4)	12
global	74,8 (3,4)	47

5

Los datos sugieren que la eficacia de encapsulación es independiente de la velocidad lineal y la longitud del mezclador del mismo diseño de mezclador.

Ejemplo 9. Efecto de la temperatura sobre la mezcla de segunda emulsión:

10

Se realizaron mediciones para estudiar el efecto de la temperatura sobre la mezcla de la segunda emulsión de una preparación de citarabina como se ha descrito en el Ejemplo 1. El intervalo de temperatura estudiado estuvo entre 25 °C y 47 °C. Para este conjunto de experimentos, se usó el mezclador Kenics 3/16" que contiene 16 elementos de mezcla. Se suministró la solución de glucosa-lisina usando la bomba de desplazamiento positivo a un caudal constante total de 1740 ml/minuto. Muestras de la segunda emulsión se retiraron para extracción y análisis. La Figura 17 muestra que el efecto de la temperatura sobre el número medio de tamaño de partícula ponderado no es significativo y es bastante menor. La Figura 18 muestra que no existe un efecto sobre los cambios en temperatura sobre la eficacia de encapsulación.

15

Ejemplo 10. Reproducibilidad de mezcla de segunda emulsión usando mezcladores estáticos

20

La reproducibilidad de segunda emulsión de una preparación de citarabina como se describe en el Ejemplo 1 usando un mezclador estático se evaluó. La primera emulsión de citarabina a partir del sistema de escala experimental (100 ml) se emulsificó con una segunda solución acuosa de glucosa-lisina como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 2 usando un mezclador estático Kenics 3/16" (16 elementos) usando un caudal de aproximadamente 1750 ml/min. El caudal corresponde a una velocidad lineal de aproximadamente 330 cm/s. La temperatura de glucosa-lisina se mantuvo constante a 40 °C y la proporción volumétrica de las corrientes fue 1:5,67 (primera emulsión: glu-Lys). Las muestras se extrajeron y se analizaron para determinar el tamaño de partícula (número ponderado) y eficacia de encapsulación. Los datos de desarrollos individuales se muestran en la Tabla 2.

25

30

**Tabla 2. Reproducibilidad de Segunda Emulsión Usando Mezcladores Estáticos**

Caudal (ml/min)	% de Encapsulación	Tamaño de partícula medio (µm)
1750	80,0	15,3
1740	75,0	14,9
1740	78,5	14,5
1776	75,7	14,8
1740	77,1	15,2
Promedio	77,3	14,95
Desviación Típica	2,0	0,34
RSTD	3%	2%

35

Los datos demuestran que tanto el tamaño de partícula como el % de encapsulación son muy reproducibles.

El estudio de reproducibilidad expuesto anteriormente se repitió usando primera emulsión que contiene morfina, preparada como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 5. El tamaño de partícula ponderado por número varió con la velocidad lineal del mezclador (correlación  $R^2 = 0,857$ ) y dio como resultado tamaños de partícula más pequeños que con citarabina (aproximadamente 9,5 µm frente a aproximadamente 15 µm con citarabina a 350 cm/s). La eficacia de encapsulación varió entre el 78% y el 87% y fue independiente de la velocidad lineal.

40

Se prepararon cuatro lotes de MVL que contenían morfina a la escala de 1 l usando un mezclador estático para segunda emulsificación. La primera emulsión se preparó como se ha descrito anteriormente. Un lote se preparó usando un mezclador estático de 1/4". Sin embargo, la velocidad lineal baja necesaria para formulaciones que contienen morfina dio como resultado un tiempo de proceso de más de 10 minutos, de forma que se usó un mezclador ID 1/2" para los tres lotes restantes. Los resultados se muestran en la Tabla 3 más adelante.

45

**Tabla 3. Efecto de tamaño de mezclador estático sobre parámetros de producto**

Análisis	mezclador estático 1/4"	mezclador estático 1/2"
Tamaño de partícula medio, antes del flujo cruzado ( $\mu\text{m}$ )	11,3 ( $0\% \leq 5$ ( $\mu\text{m}$ ))	11,18 ( $0\% \leq 5$ ( $\mu\text{m}$ ))
Tamaño de partícula medio, después de flujo cruzado ( $\mu\text{m}$ )	NA	11,63 ( $0\% \leq 5$ ( $\mu\text{m}$ ))
Eficacia de encapsulación (%)	68,6	67,8

5 Los resultados demostraron que el tamaño de partícula medio y la eficacia de encapsulación después de inyección son comparables para los dos mezcladores. Con la especificación de tamaño de partícula posterior a flujo cruzado del 0% de partículas a  $\leq 5 \mu\text{m}$ . Por tanto, el mezclador estático proporciona un producto altamente reproducible a escala comercial. La estabilidad acelerada de las tres muestras que pasaron a través del mezclador 1/2" mostró que todos los lotes eran estables durante al menos 20 días a 37 °C, con algunas muestras superando más de 27 días.

#### 10 Ejemplo 11. Pulso inverso de material permeado en filtración primaria

La pulsación hacia atrás de material permeado es un método para reducir o alterar la capa de polarización de gel durante la diafiltración con un filtro de fibra hueca. Esto puede aumentar la eficacia en un sistema de filtración de flujo cruzado con respecto a flujo de material permeado, área de superficie de membrana total y tiempo de proceso. El flujo cruzado se condujo para permitir un tiempo de respuesta de lote más rápido, más replicas y menos consumo de material. Los parámetros de proceso se bajaron de escala 20 veces a partir de un proceso de escala más grande. La diafiltración usada en este ejemplo consistió en tres etapas: concentración inicial, concentración de tampón y concentración final. El flujo de material retenido se mantiene constante durante la concentración inicial y el intercambio de tampón. Durante la concentración final, el flujo se reduce en el 40%. El efecto del flujo es una caída súbita en esta etapa del flujo cruzado. Este cambio normal y esperado permite menos fuerza de cizallamiento sobre las partículas de MVL. Todos los datos de flujo de material permeado se corrigieron a 20 °C. La comparación de los datos de reducción de escala indica que los perfiles de flujo de material permeado en ambas escalas concuerdan y se usan como un control.

25 El efecto del pulso inverso se determinó de la manera siguiente. Durante una filtración de flujo cruzado sin bomba de material permeado, el flujo de material permeado típicamente disminuye poco después del inicio del proceso. Esta reducción está causada por la combinación de dos efectos: la aparición de la capa de polarización de gel y colmatación de membrana. Invertiendo periódicamente el flujo de material permeado hacia pulso inverso con material Permeado o cualquier otra solución acuosa, el flujo de material permeado se recupera hasta su nivel inicial. Esto aumenta el flujo de material permeado promedio y por lo tanto, disminuye el tiempo de proceso global significativamente. La caída en el flujo de material permeado a aproximadamente 60 minutos para el lote con pulso inverso se debe a la reducción en la velocidad de material retenido. Estos efectos se observan en la Figura 19. Para esta medición, se aplicó una presión inversa de aproximadamente 27,58-34,47 kPa a la línea de material retenido durante la filtración de flujo cruzado. El pulso inverso se condujo con 68,95-82,74 kPa en la línea de pulso inverso.

35 La diafiltración se evaluó además variando el intervalo entre pulsos para dos volúmenes de pulso inverso, 67 ml y 135 ml (sistema 0,2 x). Los resultados se muestran en la Figura 20. El volumen de pulso inverso es directamente proporcional a la duración del pulso inverso a presión transmembrana constante (TMP). La reducción del intervalo de tiempo desde 10 minutos entre pulsos aumenta el flujo promedio hasta que se alcanza un intervalo de aproximadamente tres minutos. A intervalos mayores de aproximadamente 2,5 minutos, los beneficios del pulso inverso se ven superados por la desventaja del volumen adicional que se tiene que eliminar. A intervalos más cortos, el flujo promedio se reduce debido a que el volumen de pulso inverso se bombea repetitivamente.

45 El efecto del volumen de pulso inverso sobre el tiempo de proceso se evaluó a intervalos constantes de 2,5 y 5 minutos. La Figura 21 muestra que existe un volumen de pulso inverso óptimo para cada intervalo de 2,7 ml y 27 ml. A volúmenes de pulso inverso por debajo del óptimo, existe un descenso marcado, indicando que el volumen de pulso inverso es insuficiente para levantar la capa de polarización de gel completamente. Se realizó un experimento de pulso inverso en el que no se usó volumen de pulso inverso, sino que la válvula de material permeado se debería cerrar durante 2 segundos (tiempo promedio necesario para pulso inverso 67 ml). La recuperación de flujo fue mala, demostrando que es el pulso inverso del fluido, no a la interrupción intermitente del flujo de material permeado que elimina la capa de gel. A volúmenes más elevados que el óptimo, el flujo desciende casi linealmente debido al volumen de pulso inverso excesivo.

55 La Tabla 4 presenta el efecto de la diafiltración sobre los tiempos de proceso de diversos intervalos entre pulsos, usando diversos volúmenes de pulso inverso.



**Tabla 4. Efecto de Diafiltración de Pulso Inverso sobre Tiempos de Proceso**

Intervalo entre pulsos (minutos)	Volumen de pulso inverso (ml)	Ahorro de tiempo para diafiltración (%)
2	67,5	40
2,5	67,5	37
5	2,7	34
5	6,75	38
5	27	36,5
2,5	2,7	44
2,5	27	41,5
2,5	67,5	41,5
2,5	94,5	33

5 Estos datos muestran que intervalos largos entre pulsos inversos y duraciones de pulso inverso pequeñas (es decir, volúmenes de pulso inverso pequeño) pueden provocar una recuperación de flujo de material permeado incompleta. Además, existe un intervalo óptimo entre pulsos inversos y volumen de pulso inverso para maximizar el flujo de material permeado, reduciendo de ese modo el tiempo de proceso de un proceso de diafiltración. Para el sistema ensayado, el ahorro de tiempo máximo conseguido usando pulso inverso fue del 44%.

#### 10 Ejemplo 12. Diafiltración de pulso inverso automatizada

Se instaló un equipo especial sensible a un programa informático registrado para la automatización de experimentos de pulso inverso. La automatización permitió el ensayo de volúmenes de pulso inverso más pequeños (hasta el 0,1% de corriente de volumen de pulso inverso o 2,7 ml) y diversos intervalos de pulso inverso (tan cortos como 1 minuto).  
15 La automatización del proceso de pulso inverso también aumentó la precisión de los aumentos de etapa en volumen de pulso inverso debido a que el volumen se determina en una escala de tiempo de milisegundos y no implica tiempo de reacción humano antes de que las válvulas se ajusten. Como parte del proceso de automatización, se instaló un medidor de flujo y se acopló al ordenador. El medidor de flujo proporcionó una representación instantánea del flujo, en lugar de un promedio a lo largo de un minuto, como es el caso del pulso inverso manual.

20 Se ha observado de forma consistente que el tiempo de proceso se reduce significativamente con el uso de automatización para todos los grupos de parámetros de proceso ensayados. Por ejemplo, cuando se usó un intervalo de dos minutos con un pulso inverso de volumen del 2,5%, el tiempo de proceso promedio manual fue de 85,9 minutos (desviación típica 6,7 minutos, 6 mediciones). El desarrollo automatizado comparable se completó en  
25 60 minutos. Una ventaja adicional de la automatización del proceso de pulso inverso es que se puede graficar una representación más precisa de la formación de capa de gel y la eliminación.

#### Ejemplo 13. Filtración de flujo cruzado secundaria

30 El material a granel antes del ajuste a partir de una preparación de citarabina se preparó a la escala de 10 l siguiendo procedimientos convencionales como se ha descrito anteriormente. Se prepararon lotes no estériles usando el equipo de 10 l realizando los siguientes ciclos: primera emulsión, segunda emulsión, inyección, diafiltración de flujo cruzado incluyendo una etapa de activación y circuito A y B de limpieza-en-el-sitio (CIP).

35 El material postfiltración primaria a partir de una preparación de citarabina como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1 (aproximadamente 32 kg) se concentró posteriormente usando un sistema de filtración de flujo cruzado secundario. El módulo de flujo cruzado era un módulo AGT de 0,2  $\mu$  (A/G Technology), N° de catálogo CFP-2-E-55. El volumen estaba contenido en el recipiente de producto de 10 l. El material retenido se circuló nuevamente usando una bomba Watson Marlow de serie 700 mientras que se supervisaba el peso material retenido usando la escala de  
40 suelo. El material permeado se supervisó manualmente y con un medidor de flujo de turbina EG y G. La entrada del material retenido, en la salida del material retenido y las presiones de material permeable se supervisaron para determinar la presión transmembrana (TMP). En algunos experimentos, se aplicó presión inversa a la línea de retorno que supervisaba el aumento de presión en la presión de entrada.

45 El efecto del índice de cizallamiento de pared (es decir, velocidad de materiales retenidos), presión transmembrana e índice de material permeado inicial sobre el tiempo de proceso y el rendimiento se determinaron. Se desarrollaron cinco lotes en exactamente las mismas condiciones para determinar la variabilidad. Se observó una correlación lineal entre la concentración de citarabina total y el volumen final de material después de la filtración de flujo cruzado secundaria. Por tanto, la cantidad de citarabina que pasa a través de la membrana es insignificante.  
50

La concentración promedio para todos los lotes combinados fue 10,4 mg/ml (desviación típica 0,6 mg/ml). El rendimiento de etapa para ajuste mediante filtración de flujo cruzado secundaria fue el 96,9% (desviación típica del 2,7%), mientras que el rendimiento de etapa para ajuste mediante decantación fue el 92,8% (desviación típica 3,4%). Por tanto, existe una mejora del 8,4% en el rendimiento global asociada con el uso de filtración de flujo

cruzado secundaria como una etapa de ajuste.

Ejemplo 14. El efecto de la velocidad de material retenido sobre el tiempo de proceso y el rendimiento

- 5 El efecto de la velocidad de material retenido en la segunda filtración sobre el tiempo proceso y el rendimiento se determinó para velocidades del material retenido entre 6 lpm y 10 lpm y se muestra en la Tabla 5.

**Tabla 5. Efecto de velocidad de material retenido sobre parámetros de proceso.**

	velocidad de material retenido (litros/minuto)	tiempo (minutos)	rendimiento de flujo cruzado
"control"	8	50	94,5%
"control"	8	50	97,2%
reducción de material retenido	7,1	47	98,1%
reducción de material retenido	6	51	95,7%
aumento de material retenido	10	50	95,1%

- 10 No se aplicó presión inversa a la corriente de material retenido y el flujo de material permeado no se controló. La Tabla 5 muestra que no existe prácticamente ningún efecto sobre los parámetros del proceso que surjan de los cambios en la velocidad de material retenido entres estos valores.

15 Ejemplo 15. Efecto de la presión transmembrana sobre parámetros de proceso

- El efecto de la presión transmembrana (TMP) en filtración secundaria sobre el tiempo de proceso y el rendimiento se evaluó a dos velocidades de material retenido diferentes, 8 lpm y 6 lpm. Cuando no se aplica presión inversa sobre la línea de material retenido, la TPM inicial es aproximadamente 0,7 psi a aproximadamente 0,9 psi. Esta TMP se comparó con un aumento de aproximadamente 1 psi. Los datos en la Tabla 6 sugieren que el rendimiento de proceso no se vio afectado por los cambios en TMP.

**Tabla 6. Efecto de Presión Transmembrana sobre el Rendimiento de Proceso**

caudal	TMP inicial (psi)	Rendimiento (%)
8 lpm	0,9	94,5
8 lpm	0,85	97,2
8 lpm	1,6	104,2
8 lpm	1,5	95,5
6 lpm	0,7	95,7
6 lpm	1,4	101,0
6 lpm	1,6	98,6

- 25 Sin embargo, existe una reducción significativa en el tiempo de proceso para ambas velocidades de material retenido como se muestra en la Figura 22. El tiempo de proceso se podría reducir desde aproximadamente 50 minutos hasta tan bajo como aproximadamente 35 minutos aplicando una TMP de 10,34 a 11,03 kPa correspondiente a un aumento de presión de entrada de 20,68 kPa.

30 Ejemplo 16. Especificaciones de liberación de filtración de flujo cruzado secundario

- Cinco lotes que se prepararon a parámetros de proceso constantes y dos otros lotes se ensayaron exhaustivamente para especificaciones de liberación. Los ensayos de producto fueron ensayo de liberación *in vitro* de contenido lipídico y 2-8 °C de semivida. La conclusión es que la presencia de finos en el producto preparado con filtración de flujo cruzado secundaria (y que se eliminan del producto en la etapa de proceso de decantación) no influye negativamente sobre las propiedades de producto *in vitro*.

40 Ejemplo 17. Comparación de especificación de producción de escala de 1 l a 25 l

- El producto que contenía morfina producido tanto por los procesos de 1 l y 25 l de la invención se comparó. La emulsificación secundaria se llevó a cabo con un mezclador de cizallamiento como se especifica en el Ejemplo 2. Los resultados de especificación del producto se presentan en la Tabla 7.

45

**Tabla 7. Comparación de Especificación de Producto**

Especificación de producto	1 l	25 l
Tamaño de Partícula (micrómetros)	16,3	15,5
Porcentaje de Morfina Libre (%)	1,4	1,4
Morfina Total (g/l)	10,4	10,5
Porcentaje Encapsulado (%)	46	41

## REIVINDICACIONES

1. Un proceso para preparar una composición de partícula liposomal multivesicular, en el que el proceso es adecuado para preparar cantidades de dicha composición entre 1 y 100 litros, comprendiendo el proceso:
- 5 a) proporcionar un volumen de una primera emulsión mezclando un volumen de una primera fase acuosa y un volumen de una fase de disolvente no miscible en agua volátil, comprendiendo dicha fase de disolvente al menos un lípido anfipático y al menos un lípido neutro, en el que la proporción de volumen de la primera fase acuosa a la fase de disolvente no miscible en agua es desde 0,33 hasta 1,6;
- 10 b) mezclar y emulsificar dicha primera emulsión y un volumen de una segunda fase acuosa en un mezclador para proporcionar un volumen de una segunda emulsión, comprendiendo dicha segunda emulsión esféricas de disolvente en una fase acuosa continua, en la que la proporción de volumen de la primera emulsión en la segunda fase acuosa es desde 0,05 hasta 0,5;
- 15 c) retirar el disolvente no miscible en agua volátil de las esféricas de disolvente de la segunda emulsión para formar un volumen de composición de partícula liposomal multivesicular, en el que dicha eliminación de disolvente comprende poner en contacto la segunda emulsión con un flujo de gas inerte; y en el que dicho proceso comprende además filtración primaria de la composición de partícula liposomal multivesicular;
- 20 en el que todas las etapas se llevan a cabo en condiciones asépticas y en el que todas las soluciones se someten a filtración estéril, y en el que la composición de partícula liposomal multivesicular es adecuada para administración a seres humanos.
2. El proceso de la reivindicación 1, en el que al menos un lípido anfipático se selecciona entre el grupo que consiste en fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas, esfingomielinas, lisofosfatidilcolinas, lisofosfatidiletanolaminas, fosfatidilglicerol, fosfatidilserinas, fosfatidilinositoles, ácidos fosfatídicos, cardiolipinas, acil trimetilamonio propano, diacil dimetilamonio propano, estearilamina y etil fosfatidilcolina.
- 25 3. El proceso de la reivindicación 1, en el que al menos un lípido neutro se selecciona entre el grupo que consiste en ésteres de glicerol, ésteres de glicol, ésteres de tocoferol, ésteres de esteroles, alcanos y escualenos.
- 30 4. El proceso de la reivindicación 1, en el que la segunda fase acuosa comprende además al menos un azúcar.
5. El proceso de la reivindicación 1, en el que la segunda fase acuosa comprende además al menos un aminoácido.
- 35 6. El proceso de la reivindicación 1, en el que la filtración primaria comprende:
- 40 a) una primera concentración de la composición de partícula liposomal multivesicular, que da como resultado un aumento de concentración de 2-6 veces; y b) un intercambio de tampón, que da como resultado un pH de la composición de partícula liposomal multivesicular de entre 5 y 8.
7. El proceso de la reivindicación 6, comprendiendo además una segunda etapa de concentración.
- 45 8. El proceso de la reivindicación 1, en el que la filtración primaria se lleva a cabo mediante filtración de flujo cruzado con un filtro de fibra hueca.
9. El proceso de la reivindicación 8, en el que la filtración primaria se conduce a una presión transmembrana de desde 0,7 kPa (0,1 psi) a 48,2 kPa (7 psi).
- 50 10. El proceso de la reivindicación 1, en el que la filtración primaria comprende además pulso inverso con un volumen de pulso inverso y una presión inversa de material retenido.
11. El proceso de la reivindicación 10, en el que el pulso inverso es periódico.
- 55 12. El proceso de la reivindicación 11, en el que la etapa de pulso inverso ocurre desde cada 0,5 hasta cada 10 minutos.
13. El proceso de la reivindicación 12, en el que la etapa de pulso inverso ocurre desde cada 1 hasta cada 5 minutos.
- 60 14. El proceso de la reivindicación 10, en el que el volumen de pulso inverso es desde el 0,01% hasta el 5% del volumen de filtración primaria inicial.
- 65 15. El proceso de la reivindicación 14, en el que el volumen de pulso inverso es desde el 0,01% hasta el 1,0% del volumen de filtración primaria inicial.

16. El proceso de la reivindicación 10, en el que la filtración primaria se conduce a una presión inversa de material retenido de desde 0 kPa (0 psi) hasta 68,9 kPa (10 psi).
- 5 17. El proceso de la reivindicación 1, comprendiendo además ajuste de potencia de la composición de partícula liposomal multivesicular.
18. El proceso de la reivindicación 17, en el que el ajuste de potencia se lleva a cabo mediante filtración secundaria.
- 10 19. El proceso de la reivindicación 17, en el que el ajuste de potencia se lleva a cabo mediante decantación de la composición de partícula liposomal multivesicular.
20. El proceso de la reivindicación 1, en el que la eliminación del disolvente comprende una serie de etapas de eliminación de disolvente, en el que el caudal de gas varía en las diferentes etapas.
- 15 21. El proceso de la reivindicación 20, en el que una primera etapa de eliminación de disolvente se **caracteriza por** un caudal de gas inerte que es menos que el de una segunda etapa.
- 20 22. El proceso de la reivindicación 21, en el que el caudal de gas de la primera etapa de eliminación de disolvente es desde el 20% hasta el 50% del de la segunda etapa.
23. El proceso de la reivindicación 20, en el que una primera etapa de eliminación de disolvente se **caracteriza por** un caudal de gas inerte que es mayor que el de una segunda etapa.
- 25 24. El proceso de la reivindicación 23, en el que el caudal de gas de la primera etapa de eliminación de disolvente es desde el 120% hasta el 400% del de la segunda etapa.
- 30 25. El proceso de la reivindicación 21, comprendiendo además una tercera etapa de eliminación de disolvente, en el que el caudal de gas de la tercera etapa de eliminación del disolvente es menor que el de la segunda etapa de eliminación del disolvente.
- 35 26. El proceso de la reivindicación 1, en el que la composición de partícula liposomal multivesicular comprende una sustancia fisiológicamente activa encapsulada.
- 40 27. El proceso de la reivindicación 26, en el que la sustancia fisiológicamente activa se selecciona entre el grupo que consiste en antianginas, antiarrítmicos, agentes antiasmáticos, antibióticos, antidiabéticos, antifúngicos, antihistaminas, antihipertensivos, antiparasitarios, antineoplásicos, fármacos antitumorales, antivirales, glicósidos cardiacos, hormonas, inmunomoduladores, anticuerpos monoclonales, neurotransmisores, ácidos nucleicos, proteínas, agentes de radiocontraste, radionúclidos, sedantes, analgésicos, esteroides, tranquilizantes, vacunas, vasopresores, anestésicos, péptidos, profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.
28. El proceso de la reivindicación 27, en el que la sustancia fisiológicamente activa se selecciona entre citarabina, insulina, paclitaxel, 5-fluorouracilo, floxuridina, morfina, hidromorfina, dexametasona, metotrexato, bleomicina, vincristina, vinblastina, IgF-1, bupivacaína y amikacina.

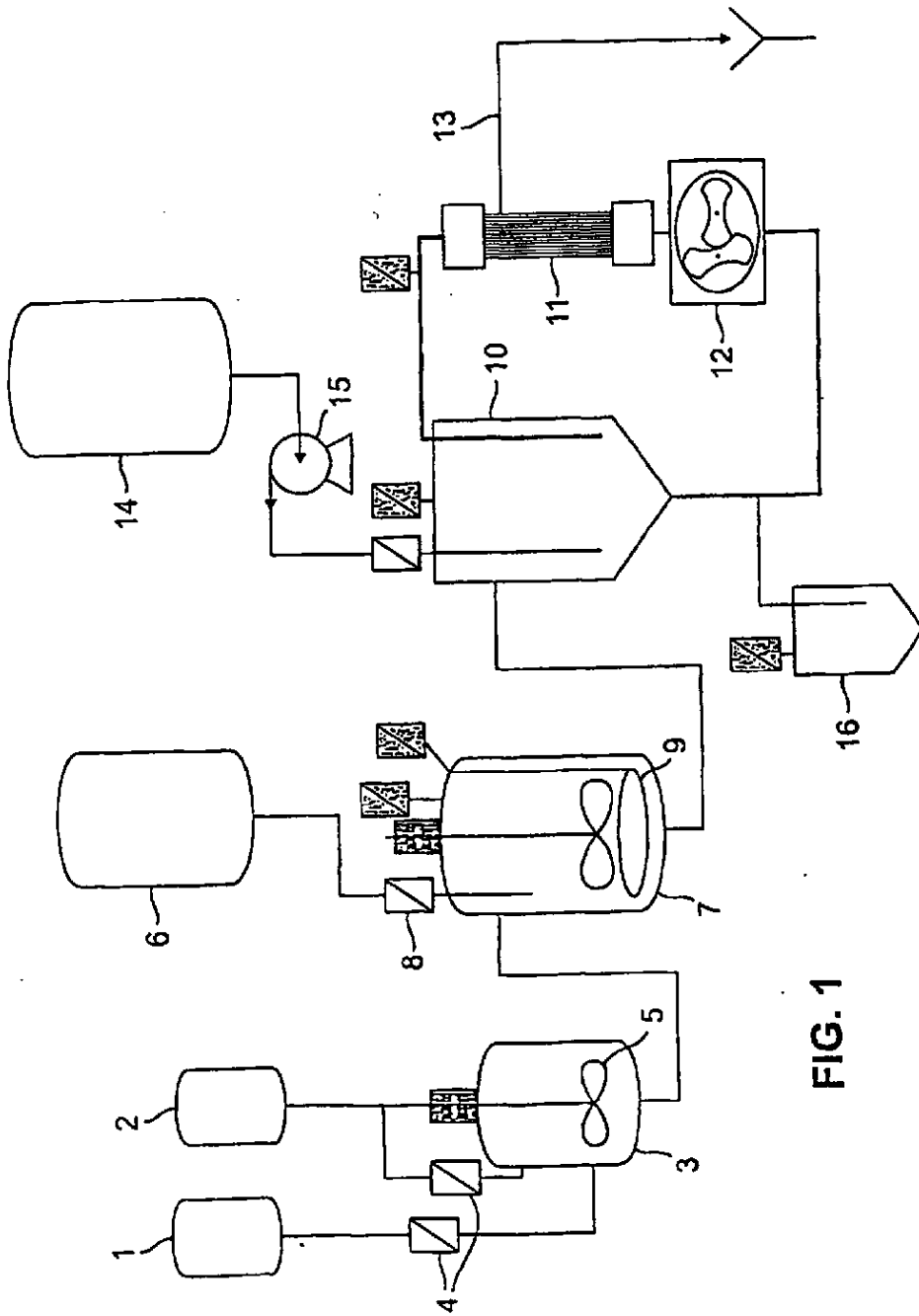


FIG. 1

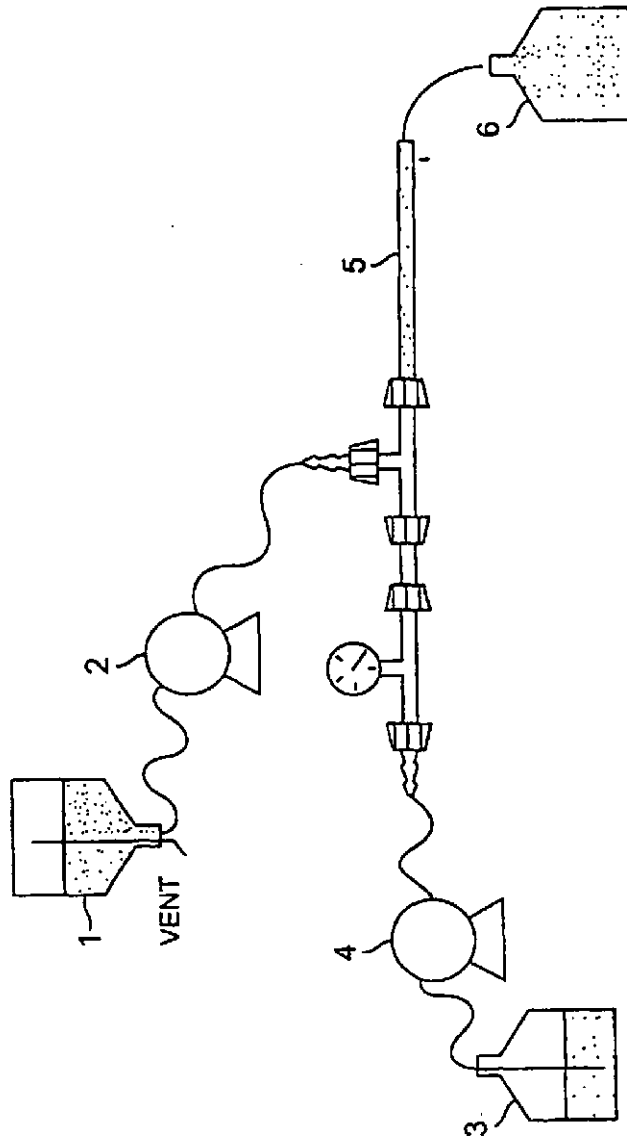
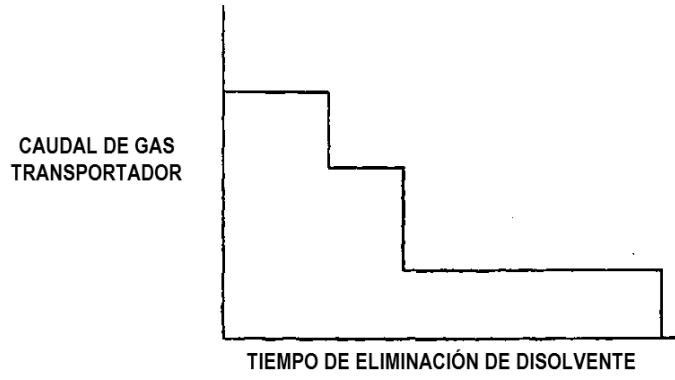
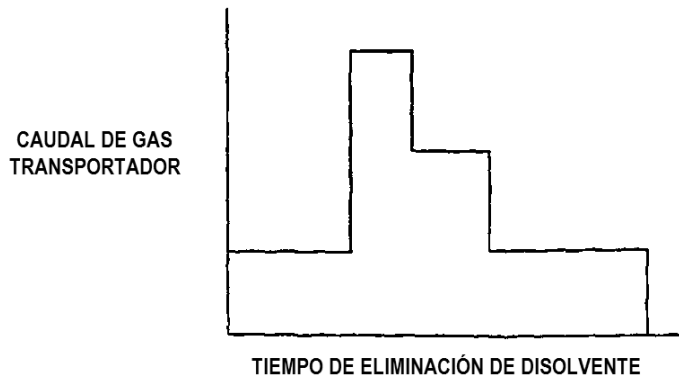


FIG. 2



**FIG. 3a**



**FIG. 3b**



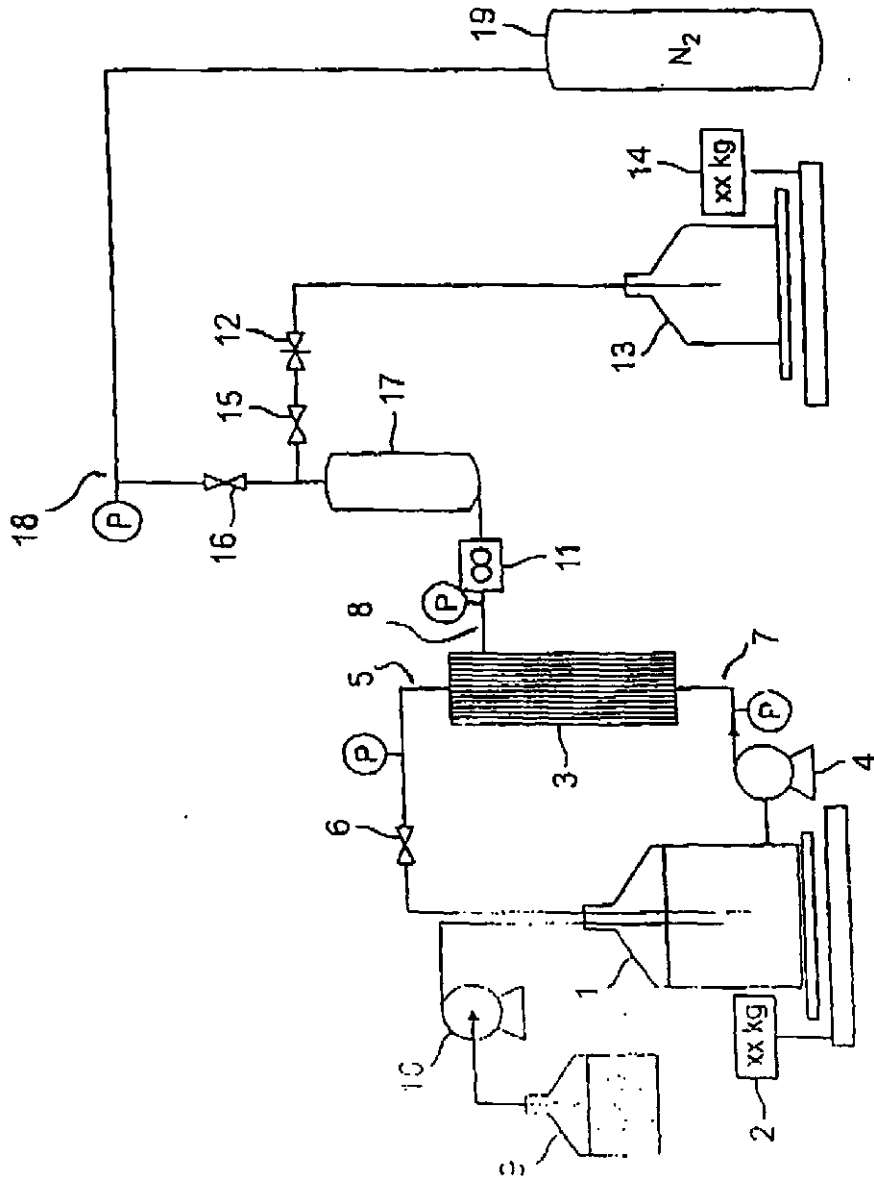


FIG. 4

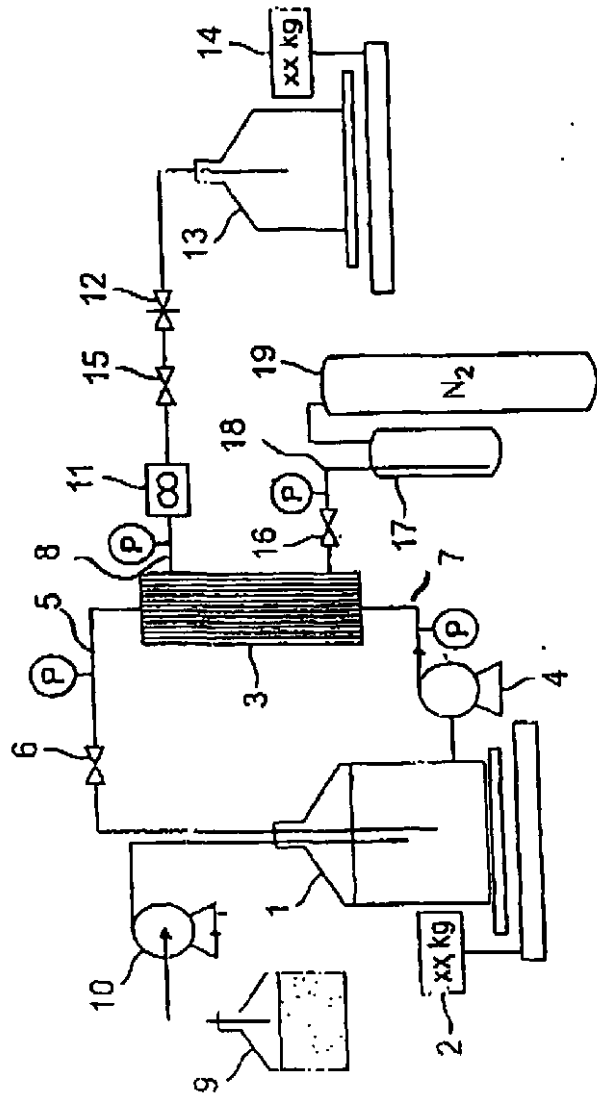


FIG. 5

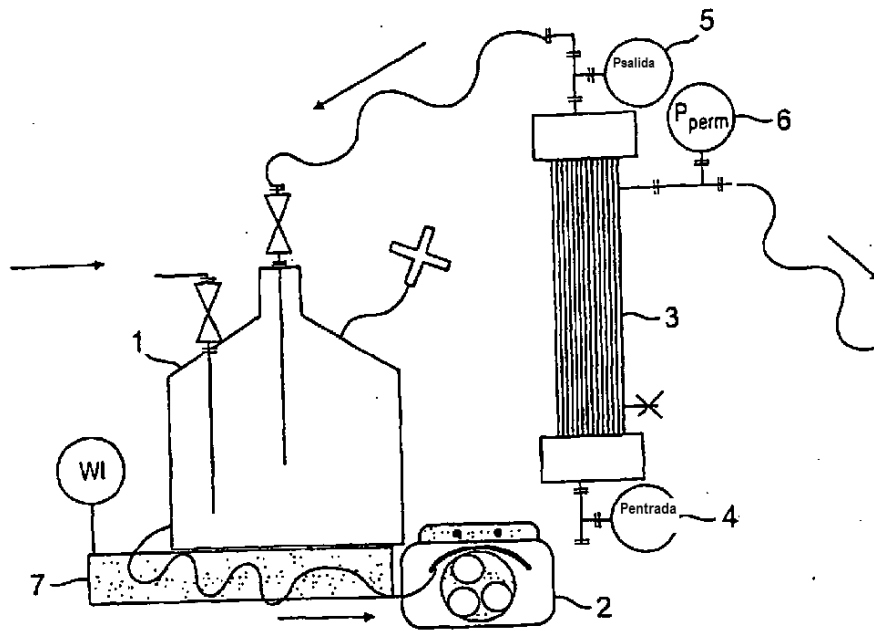


FIG. 6

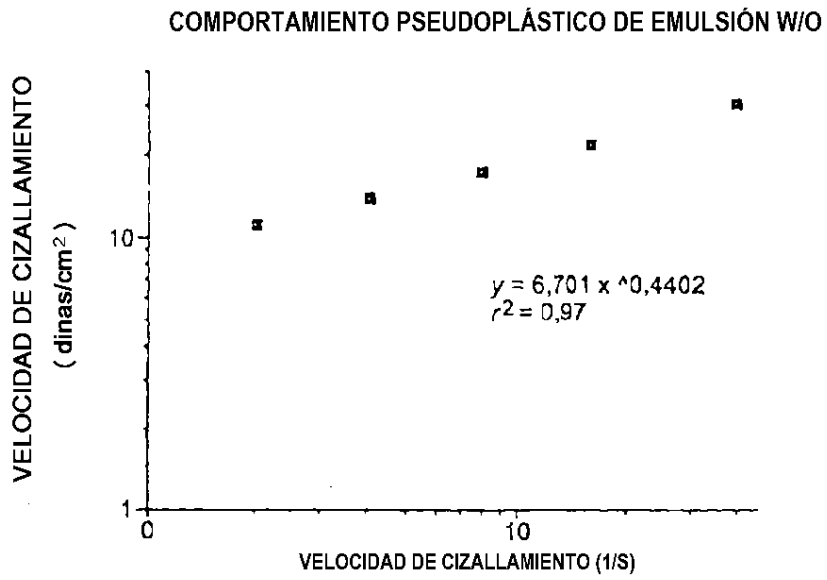


FIG. 7a

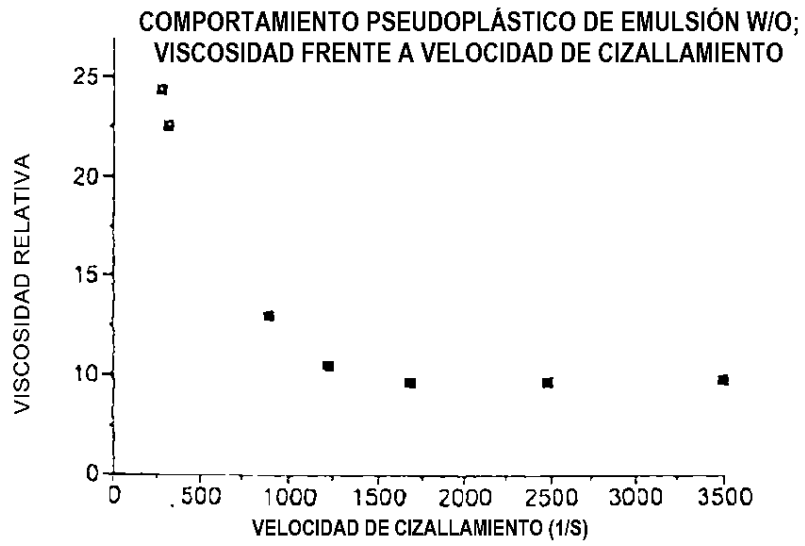


FIG. 7b

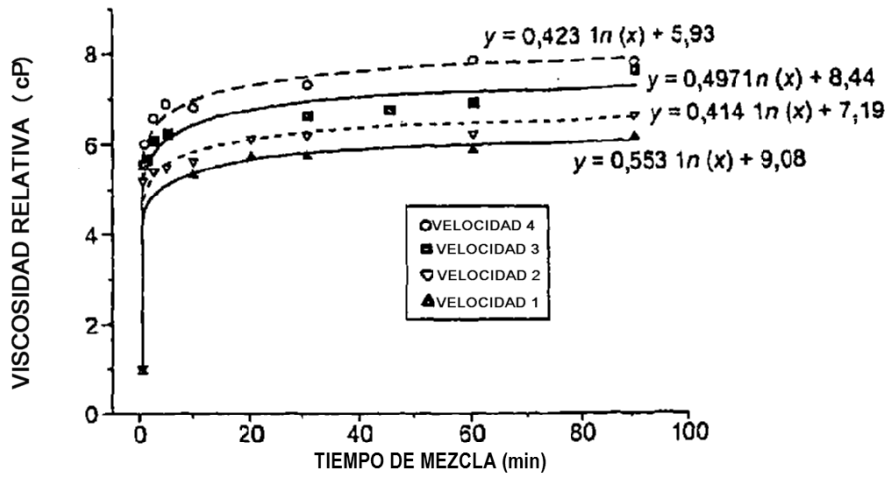


FIG. 8a

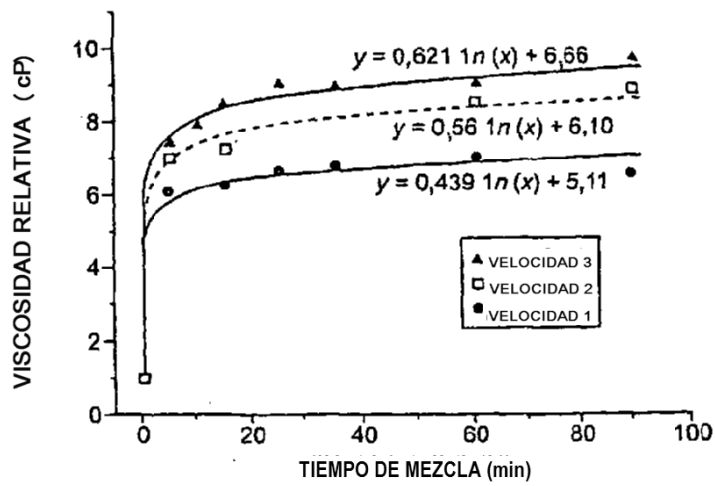


FIG. 8b

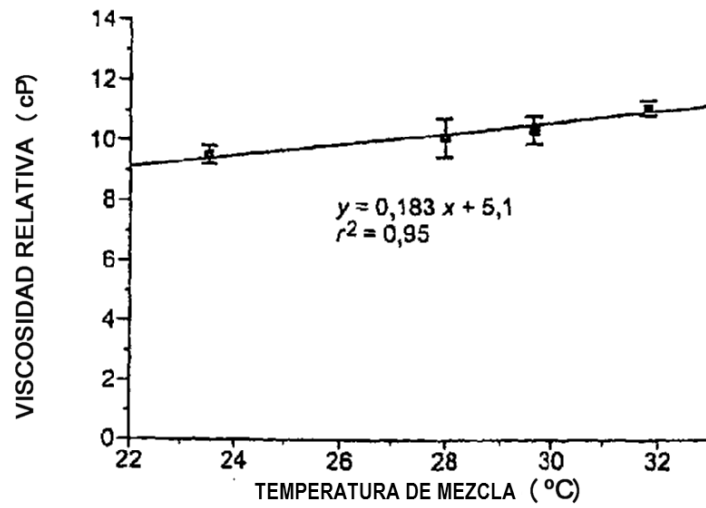


FIG. 9

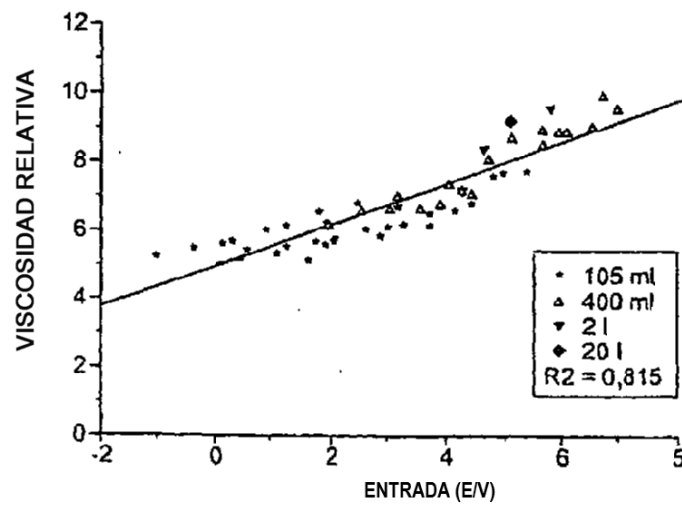


FIG. 10

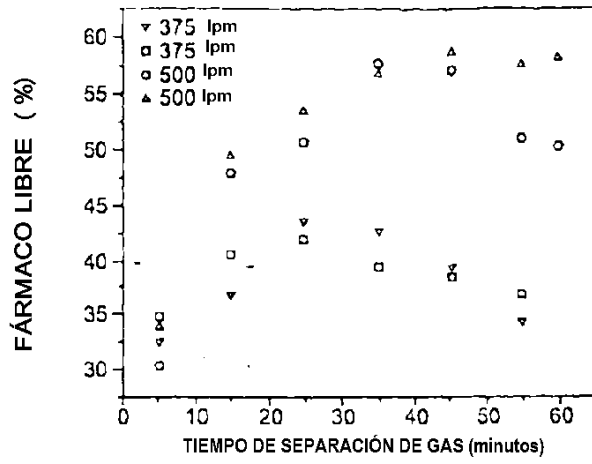


FIG. 11

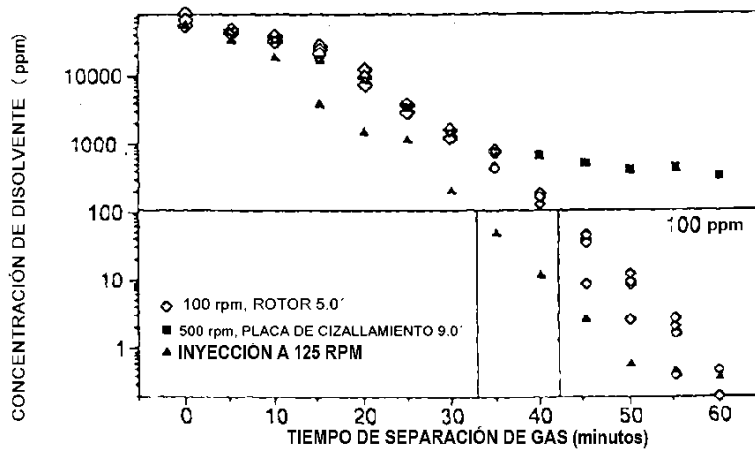


FIG. 12

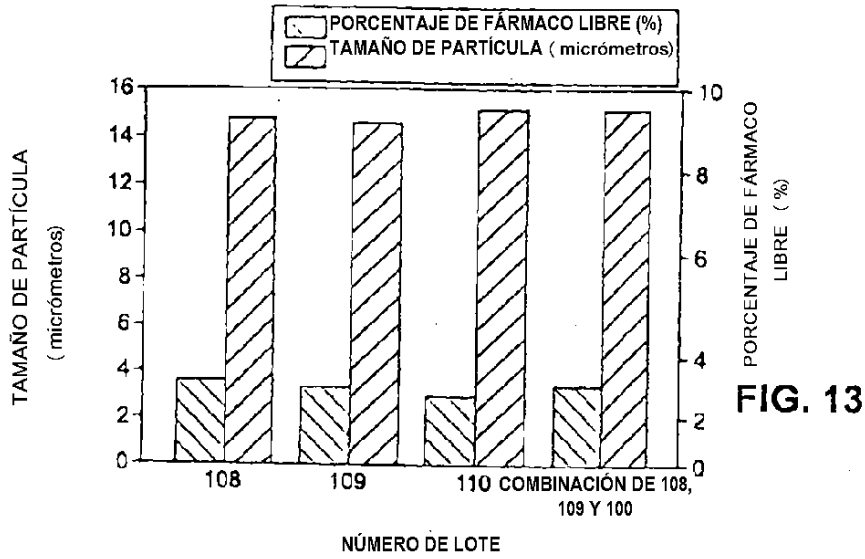


FIG. 13

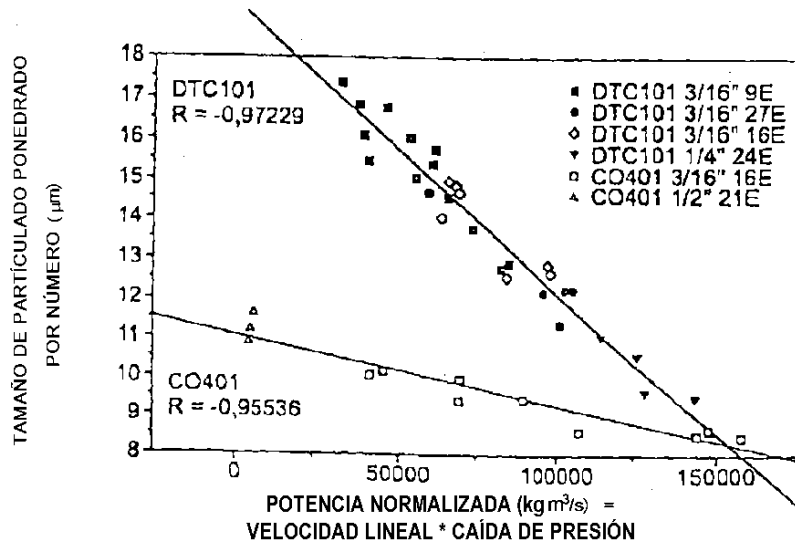


FIG. 14



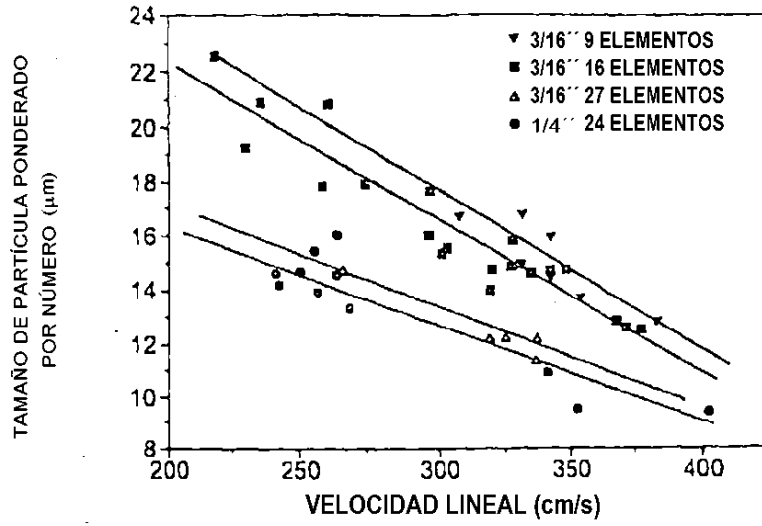


FIG. 15

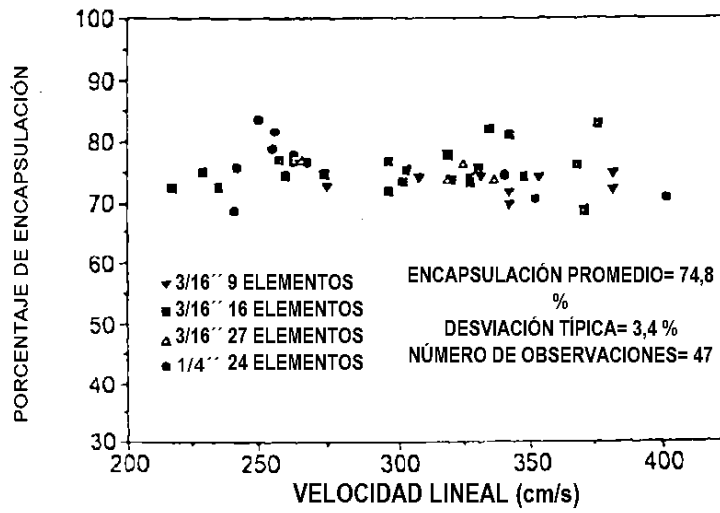


FIG. 16

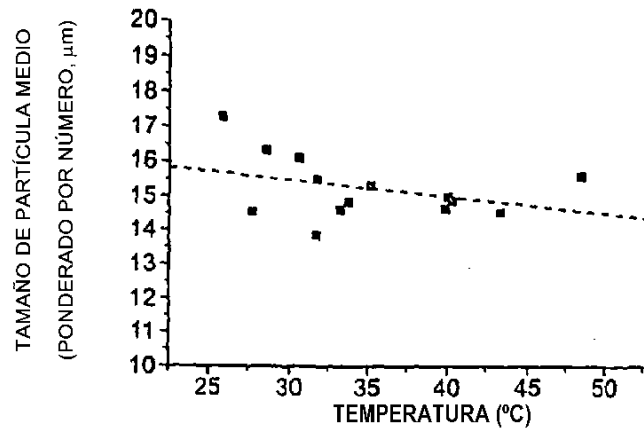


FIG. 17

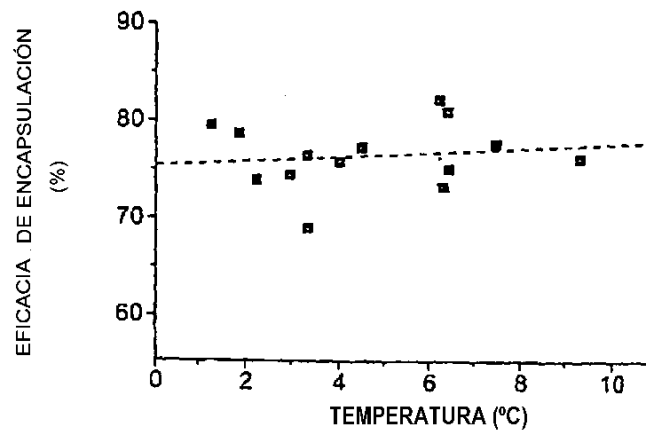


FIG. 18

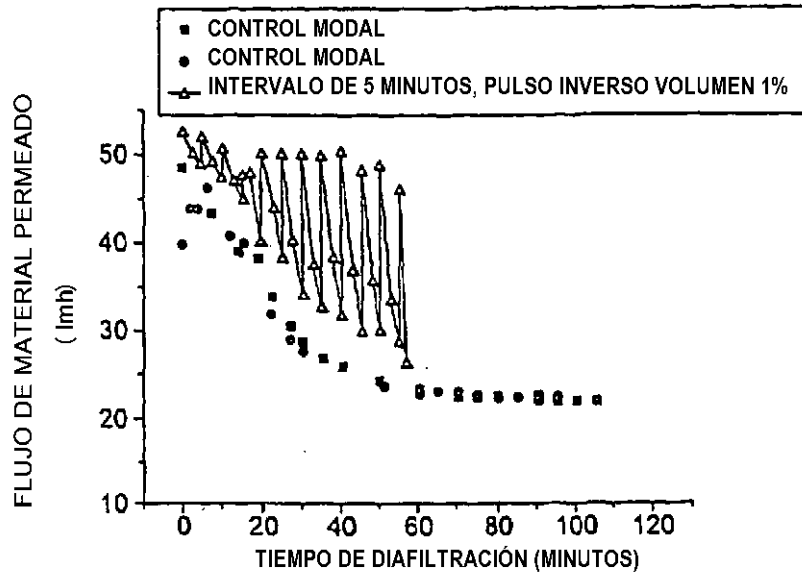


FIG. 19

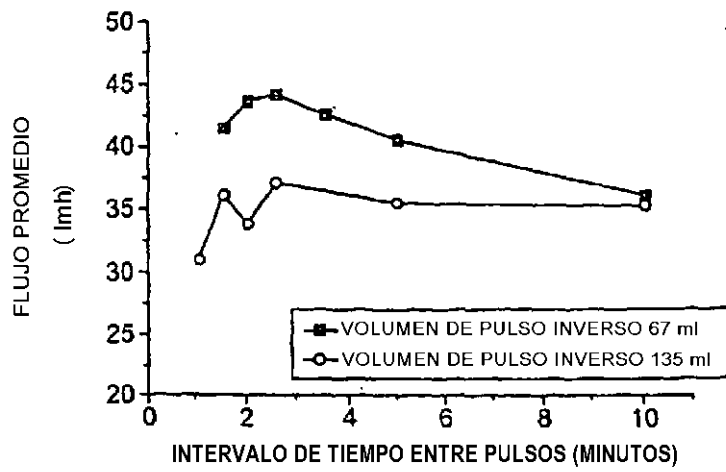


FIG. 20

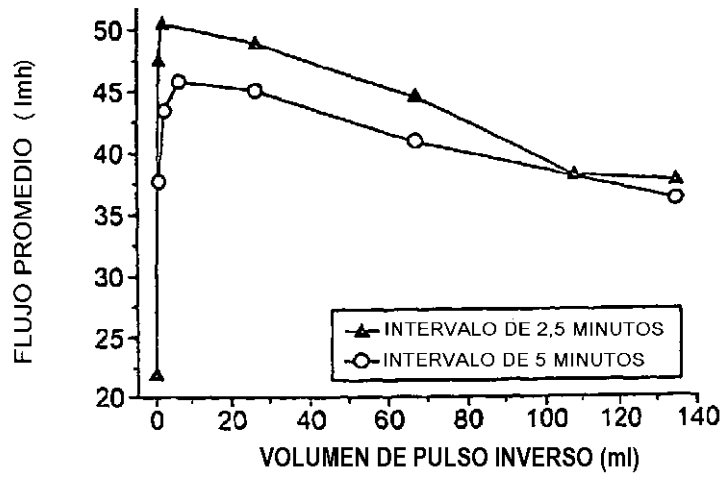


FIG. 21

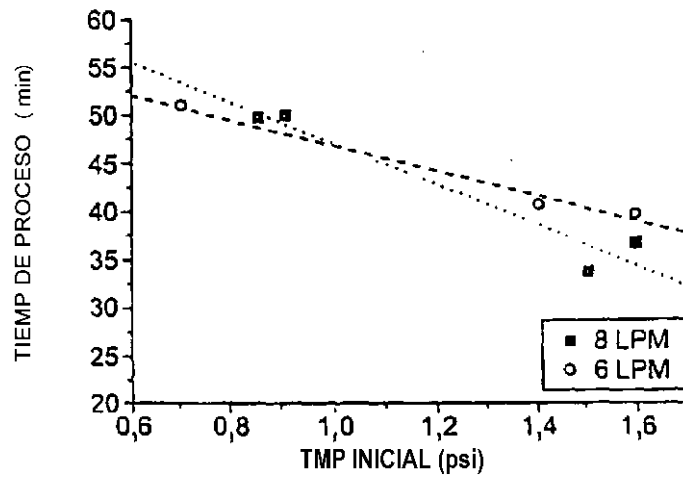


FIG. 22