

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 162**

51 Int. Cl.:

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 47/18 (2006.01)

C07K 14/51 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.10.2007 E 07818735 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2013 EP 2081551**

54 Título: **Formación de vesículas reconstituidas y secadas para un uso farmacéutico**

30 Prioridad:

06.10.2006 EP 06021093

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

08.04.2013

73 Titular/es:

**SCIL TECHNOLOGY GMBH (100.0%)
FRAUNHOFERSTRASSE 15
82152 MARTINSRIED, DE**

72 Inventor/es:

**HELLERBRAND, KLAUS;
SCHUETZ, ANDREAS y
SIGL, RAINER**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 400 162 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

Formación de vesículas reconstituidas y secadas para un uso farmacéutico

El presente invento se refiere a unas composiciones de vesículas reconstituidas y secadas (DRV = acrónimo de dried reconstituted vesicles) y a unas formulaciones basadas en agua de las mismas, que contienen uno o más agentes terapéuticos (p.ej. una proteína hidrófila). Más particularmente, éste se refiere a unas DRV's que comprenden por lo menos un lípido y un agente favorecedor de la fusión que, después de una reconstitución, forman unos grandes liposomas multilaminares que encapsulan a un agente activo en una fase acuosa.

Se sabe que los liposomas son útiles como vehículos de compuestos activos biológica y terapéuticamente, que facilitan el suministro de estos compuestos al cuerpo. Los liposomas comprenden generalmente una gotita encerrada de un lípido, que tiene un núcleo que contiene típicamente un compuesto en un medio acuoso. En ciertas formas de realización, el compuesto está unido químicamente con un componente de lípido o simplemente está contenido dentro del compartimiento interno acuoso del liposoma. Hay diferentes tipos de liposomas: unos liposomas multivesiculares (MVL's acrónimo de MultiVesicular Liposomes) con múltiples cámaras acuosas internas no concéntricas dentro de cada partícula de liposoma; unas vesículas multilaminares (MLV's acrónimo de MultiLamellar Vesicles) que tienen una serie de envolturas sustancialmente esféricas formadas por unas bicapas de lípidos interdispersadas con unas capas acuosas, que varían en cuanto a su diámetro hasta llegar a uno de 5 μm o mayor; unas vesículas unilaminares grandes (LUV's acrónimo de Large Unilamellar Vesicles) que varían en cuanto a su diámetro entre uno de 600 nm hasta de 1 μm o mayor, que tienen una bicapa de lípido que rodea a una fase acuosa no estructurada, grande; y unas pequeñas vesículas unilaminares (SUV's acrónimo de Small Unilamellar Vesicles), que son similares en su estructura a las LUV's excepto en que su diámetro es menor que aproximadamente 0,2 μm .

Se conocen bien en la especialidad una diversidad de métodos para preparar liposomas, varios de los cuales se describen en la obra Liposome Technology [Tecnología de los liposomas] 2ª edición en G. Gregoriadis, CRC Press Inc., Boca Raton (1993). Los retos principales de la tecnología de los liposomas son conseguir un alto nivel de carga de un agente activo dentro del liposoma y hacer que esa carga sea estable durante la manipulación y el almacenamiento. Otro reto es adaptar la velocidad de liberación del agente activo a unas metas específicas en la formulación de liposomas. Aunque la encapsulación de un material biológico en liposomas tiene un potencial importante para el suministro de fármacos a seres humanos, con frecuencia ha resultado problemática la producción de un material encapsulado a una escala comercial.

La mayor parte de los usos farmacéuticos para la aplicación por vía parenteral se enfocan sobre unos liposomas pequeños para evitar unos efectos colaterales indeseados tales como una embolia, tal como se han descrito para liposomas grandes. Además, por uso de liposomas pequeños, parecía que era más fácil producir un producto estable.

Hay diversos procedimientos conocidos para producir un material encapsulado de MLV's o bien a una pequeña escala o a una escala industrial (Rao, "Preparation of Liposomes on the Industrial Scale. Problems And Perspectives" [Preparación de liposomas a la escala industrial. Problemas y perspectivas], en Liposome Technology 2ª Edición en G. Gregoriadis, CRC Press Inc., Boca Raton, páginas 49-65 (1993)). En la mayor parte de los casos, una delgada película de lípido se deposita a partir de un disolvente orgánico sobre las paredes de un recipiente, se añade una solución acuosa del material que ha de ser encapsulado, y el recipiente se agita. Este procedimiento da como resultado una encapsulación del agente activo dentro de las MLV's. La principal desventaja de dicho procedimiento es la variación en la encapsulación y con frecuencia un atrapamiento bajo y no reproducible del agente biológico dentro de los liposomas, además de una degradación del agente biológico y una inestabilidad en almacenamiento de la suspensión liposomal.

Un método tal como se describe en el documento de patente europea EP0678017 produce unas vesículas multilaminares por congelación y descongelación (FATMLV's acrónimo de Freeze And Thaw MultiLamellar Vesicles). El método de FATMLV requiere que la congelación y la descongelación se hagan en la presencia del material que ha de ser atrapado. Sin embargo, el hecho de someter a unos materiales sensibles, tales como unas proteínas, a tal ruda manipulación física, da como resultado una desactivación o degradación del material. Además, unos frecuentes ciclos de congelación y descongelación no son factibles para una producción a gran escala y requieren un alto gasto técnico de funcionamiento.

Es sabido que los liposomas y sus contenidos pueden resultar relativamente inestables en una dispersión acuosa. Correspondientemente, los intentos para aumentar la corta vida en almacenamiento de una formulación liposomal por deshidratación han sido el foco de diversos métodos de preparación.

Un atrapamiento pasivo y un almacenamiento mejorados de liposomas que contienen un agente activo se han conseguido por uso de un método de deshidratación y rehidratación (documento EP0485143, documento de

solicitud de patente internacional WO90/03795, y documento EP0678017 y las referencias allí contenidas) en el que unos liposomas previamente formados se añaden a una solución acuosa que contiene un agente activo o se mezclan con una proteína liofilizada, seguido por una deshidratación de la mezcla y una subsiguiente rehidratación en un medio acuoso. Cuando la solución es secada para dar una mezcla de lípidos altamente viscosa, los liposomas individuales se fusionan para formar unas MLV's, que encapsulan al agente activo dentro de las láminas. Después de una rehidratación, se forman unas vesículas de lípidos, en las que el material está encapsulado. Este método conduce a una eficacia bastante baja de encapsulación, dependiente del fármaco que ha de ser encapsulado, debido a la inestabilidad de los liposomas, a la fuga del agente activo o a la inactivación o degradación física del material que ha de ser encapsulado.

Es conocido que la adición de un agente conservante (un agente conferidor de voluminosidad) del tipo de un azúcar antes de una deshidratación y una formación de un polvo de lípido secado puede conservar a unos liposomas, implicando una desecación por congelación. Los agentes conferidores de voluminosidad se describen en los documentos EP0678017, WO90/03795, WO97/42936, WO92/02208, EP190315 y en la obra Liposomes [Liposomas] 2ª edición, A Practical Approach [Un enfoque práctico], compilada por Vladimir P. Torchilin y Volkmar Weissig, Oxford University Press (2002). Ellos se usan para proteger a las vesículas contra el daño y la fuga del agente activo durante una liofilización y evitar una fusión de vesículas unilaminares pequeñas para formar unas estructuras multilaminares grandes.

El documento WO97/42936 describe un procedimiento para preparar unas MLV's secadas por congelación, que encapsulan a una composición anfífila de fármaco, además de sorbitol como un agente de estabilización de membranas.

El documento WO90/03795 describe el uso de agentes crioprotectores tales como un azúcar (p.ej. sacarosa, manitol, lactosa, trehalosa) y por lo menos una proteína (p.ej. una albúmina, gelatina o caseína) durante una desecación de las formulaciones liposomales para proteger al producto deshidratado con respecto del daño y deterioro durante una desecación por congelación (= liofilización) y una subsiguiente reconstitución, con el fin de mantener la integridad de la bicapa de liposomas (p.ej. se observa poca o ninguna fusión o conglomeración), y para evitar una fuga de los liposomas. Sin que se añadan agentes lioprotectores (protectores de liofilización) los liposomas se desploman completamente después de una desecación y una rehidratación y forman unas MLV's cuyos contenidos se han perdido en gran parte y cuyo gran tamaño impide una distribución apropiada para aplicaciones sistémicas.

Özer y colaboradores describen el uso de unos medios de crioprotección (protección criogénica) tales como polialcoholes y sacáridos y proteínas o aminoácidos para conservar la estructura y la integridad de bicapas de membranas y para evitar la fusión y la conglomeración de las vesículas por deshidratación y congelación (Özer, Y. y colaboradores (1988) Influence of Freezing and Freeze-drying on the Stability of Liposomes Dispersed in Aqueous Media [Influencia de la congelación y de la desecación por congelación sobre la estabilidad de liposomas dispersados en medios acuosos]. Acta Pharm. Technol. 34: 129-139).

El documento EP0560138 describe unos liposomas reconstituidos y secados para la inclusión de sustancias lipófilas tales como nifedipina, y unos métodos para preparar estos liposomas que comprenden un fosfolípido, agentes antioxidantes, un agente crioprotector y un agente estabilizador del pH. Sin embargo, los métodos descritos son perjudiciales para unos agentes activos tales como proteínas. Unos agentes crioprotectores tales como azúcares reductores (p.ej. glucosa) modifican a las proteínas por reacción química y conducen a la formación de pequeñas vesículas que tienen p.ej. un diámetro medio de 40 a 200 nm.

El documento de patente de los EE.UU. U.S. 5.290.563 describe un método de encapsulación de sustancias heterogéneas tales como alérgenos protídicos y/o extractos alérgénicos dentro de unos liposomas, que comprenden por lo menos un lípido iónico sin añadir agentes crioprotectores. La presencia de dichas sustancias heterogéneas estabiliza a los liposomas.

Kim y colaboradores enseñan preparar liposomas por evaporación de disolventes orgánicos a partir de unas esférulas de cloroformo y éter suspendidas en agua (Kim, S. y colaboradores (1983) Preparation of multivesicular liposomes [Preparación de liposomas multivesiculares]. Biochim. Biophys. Acta 728: 339-348).

Cruz y colaboradores y las referencias allí existentes enseñan unos liposomas como sistemas de vehículo para proteínas. Los métodos descritos tienen unas desventajas similares a las que se han descrito más arriba, p.ej. usan disolventes orgánicos, conducen a una baja eficacia de encapsulación o no se pueden usar para una producción a gran escala (Cruz, M. E. y colaboradores (1989) Liposomes as carrier systems for proteins: factors affecting protein encapsulation. Liposomes in the Therapy of Infectious Diseases and Cancer [Liposomas como sistemas de vehículos para proteínas: factores que afectan a la encapsulación de proteínas. Liposomas en la terapia de enfermedades infecciosas y cánceres] 417-426).

5 El documento WO2007/067784 se refiere en términos generales a unas composiciones farmacéuticas de liposomas, que contienen uno o más agentes terapéuticos (p.ej. fármacos) hidrófobos. Sin embargo, el documento WO2007/067784 no afronta el problema de los liposomas que encapsulan a proteínas. De hecho éste enseña el uso de unos agentes crioprotectores, que estabilizan a las membranas de lípidos y/o impiden una formación de MLV's después de una rehidratación.

10 Kirby y colaboradores describen un método para la preparación de vesículas por deshidratación y rehidratación con alto rendimiento de atrapamiento de fármacos. Kirby y colaboradores informan de unos valores disminuidos del atrapamiento con una concentración inicial más alta de azúcares, debido a un efecto crioprotector de los azúcares, lo que da como resultado una estabilidad aumentada de pequeñas vesículas unilaminares (SUV) durante una congelación y una deshidratación (Kirby y colaboradores (1984) Dehydration-rehydration vesicles: A simple method for high yield drug entrapment in liposomes [Vesículas formadas por deshidratación y rehidratación: un método simple para un alto rendimiento de atrapamiento de fármacos en liposomas]. Biotechnology [Biotecnología] 2(11): 979-984).

15 El documento US4897353 describe un método de proteger a proteínas solubles de tal manera que su actividad biológica se conserve después de una congelación por exposición de las proteínas a un aminoácido, particularmente glicina, y a un ión de un metal de transición antes de la congelación.

Por lo tanto, un objeto del presente invento es proporcionar un método para preparar liposomas que encapsulan a proteínas en una forma secada que puede ser rehidratada, y que son útiles para una producción a gran escala.

20 Otro objeto del presente invento es proporcionar unas formulaciones de liposomas que puedan ser rehidratadas, almacenadas durante extensos períodos de tiempo mientras que están deshidratadas, y que después de una reconstitución se conviertan en una dispersión de vesículas multilaminares con un agente activo encapsulado en la fase acuosa de los liposomas.

25 Otro objeto del presente invento es evitar la necesidad de varias etapas de congelación y descongelación para la producción de las MLV's que encapsulan a agentes activos, con el fin de evitar una destrucción o desactivación de los agentes activos.

30 Otro objeto del presente invento es proporcionar un método para la deshidratación de liposomas y para su almacenamiento como una formulación de lípidos secada en la presencia de un agente activo, cuya formulación de lípidos secados pueda ser luego rehidratada por adición de una solución acuosa para formar unos liposomas multilaminares con una alta velocidad de encapsulación del agente activo, con lo cual es posible una conveniente reconstitución del producto secado.

Otro objeto del presente invento es proporcionar un método para la producción a gran escala de unas MLV's reconstituidas y secadas, que sea simple, factible y barato.

35 Otro objeto del presente invento es proporcionar vesículas reconstituidas y secadas con un tamaño de más que 1 μm para el tratamiento de enfermedades p.ej. enfermedades de huesos y/o cartílagos, tales como defectos osteocondrales y osteoartritis.

40 Otro objeto que subyace al presente invento es proporcionar un procedimiento de producción para liposomas que haga posible una alta eficacia de encapsulación de una proteína hidrófila, que evite el uso de disolventes orgánicos o detergentes, que se pueda llevar a cabo con facilidad a una gran escala, que produzca un producto estable después del almacenamiento sin ninguna destrucción de la proteína, que permita una liberación prolongada de la proteína y que proporcione unos liposomas que sean lo suficientemente grandes como para evitar un despeje rápido desde el sitio de aplicación.

En un aspecto, el invento se refiere a una composición farmacéutica secada que comprende un agente activo secado por congelación, que su vez comprende unas vesículas que por su parte comprenden

45 a) por lo menos un lípido, b) por lo menos un agente activo, c) un agente favorecedor de la fusión, y d) ningún agente estabilizador de membranas, en donde una rehidratación de la composición farmacéutica secada da como resultado la formación de unos liposomas multilaminares que tienen un diámetro liposomal medio de más que 1 μm , cuyos liposomas encapsulan al agente activo.

50 La composición farmacéutica secada de acuerdo con el invento puede ser almacenada establemente durante largos períodos de tiempo. De manera preferible, la composición farmacéutica secada del invento es una composición secada por congelación. Mientras que la composición es estable en la forma secada o secada por congelación, ella puede ser fácilmente reconstituida por adición de una solución acuosa. La adición de una solución acuosa da como resultado la formación de unos liposomas multilaminares que tienen un diámetro liposomal medio de más que 1 μm , de manera preferible de aproximadamente 1,5 μm o mayor. En estos liposomas multilaminares, el agente activo es

encapsulado con una alta eficiencia de encapsulación, que de manera preferible es por lo menos de 40 %, en particular de por lo menos 50 %, de manera más preferible de por lo menos 55 %, de manera incluso más preferible de por lo menos 60 % y de manera sumamente preferible de por lo menos 80 %.

5 La composición de la composición farmacéutica secada del invento comprende por lo menos un lípido, por lo menos un agente activo, por lo menos un agente favorecedor de la fusión y ningún agente estabilizador de membranas. De manera preferible, el por lo menos un agente activo es una proteína, en particular, una proteína hidrófila o un fragmento activo de la misma. Son particularmente preferidas unas proteínas que son un agente de regeneración de huesos y/o cartílagos, de manera preferible la CD-RAP. Unos preferidos agentes favorecedores de la fusión son unos aminoácidos de carácter alcalino, seleccionados, en particular, entre arginina, histidina, lisina o citrulina.
10 Además, se ha encontrado que es ventajoso proporcionar una composición farmacéutica secada que no contenga un agente estabilizador de membranas, es decir, en particular, en la ausencia de un azúcar protector, un alcohol de azúcar o un glicósido. Además, en algunas formas preferidas de realización del invento, la composición comprende también un anión inorgánico u orgánico tal como un succinato, fumarato, citrato, malato, fosfato, acetato o cloruro.

La composición farmacéutica secada es de manera preferible una composición estéril.

15 Sin una encapsulación con liposomas, incluso las proteínas grandes son despejadas con rapidez desde el sitio de aplicación, por ejemplo despejadas desde el fluido sinovial a través de la membrana sinovial y por lo tanto no estarán disponibles en una cantidad suficiente para inducir una regeneración de tejidos defectuosos tales como cartílagos o huesos. Para prolongar el período de tiempo de retención local de un agente activo, tal como un factor de crecimiento, en el sitio de aplicación, p.ej. el disco o sus alrededores dentro de la junta articular, los autores del
20 invento fueron capaces de proporcionar una formulación liposomal de una proteína (p.ej. una proteína hidrófila tal como CD-RAP o BMP, que comprende grandes vesículas multilaminares (MLV's) con un alto atrapamiento y una liberación controlada de la proteína.

Los autores del invento proporcionan una composición farmacéutica parenteral que comprende una composición de liposomas y de una proteína liofilizada, que es estable frente a la degradación al efectuar un almacenamiento a largo
25 plazo y que puede ser reconstituida para producir grandes liposomas multilaminares que comprenden una proteína hidrófila. Las vesículas reconstituidas y secadas, aquí usadas, son por ejemplo unos productos granulares secos, que después de la adición de un medio acuoso se dispersan para formar una formulación liposomal multilaminar que comprende el componente activo biológico. Ventajosamente, se evitan los problemas de estabilidad tales como una conglomeración u oxidación del agente activo, por uso de liposomas secados de acuerdo con el invento. Además, se consiguió una alta eficacia de encapsulación de ingredientes hidrófilos tales como proteínas por ejemplo agentes de regeneración de huesos y/o cartílagos que incluyen las BMP's y/o CD/RAP. En contraste con la técnica anterior, los
30 autores del invento son ahora capaces de proporcionar una composición farmacéutica estable con una alteración minoritaria del agente activo que forma una torta liofilizada estable que puede ser reconstituida con facilidad y rapidez por un medio acuoso con un atrapamiento por inclusión reproducible del agente activo, una mejorada estabilidad en almacenamiento y un importante aumento en la distribución de tamaños de los liposomas multilaminares cuando están siendo rehidratados.
35

Los liposomas rehidratados del invento poseen una prolongada resistencia *in situ* después de una inyección p.ej. dentro del fluido sinovial, del espacio intraarticular, de un disco o la parte circundante de un disco y por lo tanto superan las limitaciones del estado actual de la técnica en el sector del tratamiento de una enfermedad de
40 cartílagos. La proteína tiene una acción inmediata debido a la presencia de un agente activo fuera del liposoma y un efecto retardador o prolongado después de una degradación de los liposomas. La presencia de un agente activo durante un largo período de tiempo hace posible un efecto beneficioso continuado sobre células tales como células condrogénicas y sinoviales, o una producción de proteoglicanos, asegurando de esta manera un efecto regenerador o una deceleración de la progresión de una enfermedad, mediada por el agente activo. Cuando se administra la
45 formulación resultante del presente invento dentro de la junta afectada (p.ej. una junta osteoartrosica), la formulación resultante puede aprovechar un efecto protector sobre la estructura de la junta y un efecto antiinflamatorio y/o regenerador mediado por el agente activo, un efecto lubricante del liposoma, un efecto viscosuplementario y/o un efecto de sustitución del fluido sinovial.

También se encuentra dentro del alcance del presente invento un procedimiento para la preparación de una
50 composición de liposomas secados, que después de una rehidratación con una solución acuosa forma unos liposomas multilaminares con un diámetro liposomal medio de más que 1 μm , que encapsulan a un agente activo, el cual comprende las etapas de a) hidratación de un lípido, de una mezcla de lípidos o de una película de lípidos en la ausencia de un disolvente orgánico, b) generación de vesículas unilaminares pequeñas de manera preferible con un diámetro medio comprendido entre 50 y 200 nm, c) adición de una solución acuosa de un agente activo, d) después
55 de, antes de o conjuntamente con la etapa c), adición de un agente favorecedor de la fusión y opcionalmente de un anión inorgánico u orgánico, y e) deshidratación de dicha dispersión de lípidos sin la adición de un agente estabilizador de membranas.

Las vesículas unilaminares pequeñas preparadas en la etapa b) tienen de manera preferible un diámetro medio de por lo menos 50, en particular de por lo menos 60 y de manera más preferible de por lo menos 70 nm y un diámetro máximo de preferiblemente 200 nm, en particular 150 nm y de manera más preferible 120 nm.

5 Una ventaja particular del procedimiento del presente invento reside en el hecho de que la filtración en condiciones estériles se puede realizar después de las etapas b) y c). De esta manera, se puede proporcionar una composición farmacéutica secada estéril.

Después de las operaciones de preparación de las etapas a) y d), las formulaciones pueden ser almacenadas, p.ej. bajo un vacío a 4°C, de manera preferible a la temperatura ambiente.

10 Debido al tamaño de los liposomas con MLV's y debido a la sensibilidad térmica de muchos agentes activos tales como proteínas, no es factible una filtración en condiciones estériles ni una esterilización terminal de dicha formulación farmacéutica conocida. Estos impedimentos se superaron con el procedimiento de producción aséptica de acuerdo con el invento.

15 El invento por lo tanto proporciona, además, un procedimiento para la preparación de una composición administrable de liposomas que comprende unos liposomas multilaminares con un diámetro liposomal medio de más que 1 µm, que encapsulan a un agente activo, el cual comprende las etapas de a) hidratación de un lípido, de una mezcla de lípidos o de una película de lípidos en la ausencia de un disolvente orgánico, b) generación de pequeñas vesículas unilaminares de manera preferible con un diámetro medio comprendido entre 50 y 200 nm, c) adición de una solución acuosa de un agente activo, d) después de, antes de o conjuntamente con la etapa c), adición de un agente favorecedor de la fusión y opcionalmente de un anión inorgánico o orgánico, e) deshidratación de dicha dispersión de lípidos sin la adición de un agente estabilizador de membranas, f) rehidratación con una solución acuosa y formación de unas vesículas multilaminares que tienen un diámetro liposomal medio de más que 1 µm, que encapsulan al agente activo, en donde una etapa de filtración en condiciones estériles se realiza después de las etapas b) y/o c).

25 En particular, usando una solución acuosa estéril en la etapa f), se puede obtener una composición estéril que comprende liposomas con MLV.

También se abarca la provisión de un estuche que comprende una composición farmacéutica secada tal como se describe aquí y, en particular, en la reivindicación 1, y una solución acuosa para una rehidratación de la composición farmacéutica secada.

30 En la técnica anterior se describen unos agentes lioprotectores si se desea una desecación por congelación. Unos disacáridos, tales como sacarosa, lactosa y trehalosa, son los agentes lioprotectores más preferidos. Se deberían evitar unos monosacáridos tales como glucosa o sorbitol o unos excipientes con un bajo peso molecular, tales como aminoácidos y sales inorgánicas, debido a su baja temperatura de transición y de desplome en el estado congelado (Liposomes 2ª edición, A Practical Approach, compilada por Vladimir P. Torchilin y Volkmar Weissig, Oxford University Press, página 157 (2002)). Sin embargo, los autores del invento encontraron que el uso de aminoácidos de carácter alcalino, p.ej. arginina, como agentes conferidores de voluminosidad, no protege a las vesículas durante la desecación por congelación pero, sorprendentemente, favorece el proceso de fusión que es esencial para obtener unas vesículas multilaminares con unos diámetros de 1 µm y mayores. Además de este efecto, el uso de estos aminoácidos apoya sorprendentemente a la estabilidad de la proteína formulada durante la desecación por congelación. La conjunción de estos dos efectos – por una parte, la desestabilización de las membranas de lípidos y, por otra parte, la estabilización de fármacos, era hasta ahora totalmente desconocida.

45 En contraste con los liposomas de la técnica anterior, tales como los MVL's descritos por ejemplo por Kim y colaboradores (Kim, S. y colaboradores (1983) Preparation of multivesicular liposomes [Preparación de liposomas multivesiculares]. Biochim.Biophys.Acta 728: 339-348), la ventaja de los actuales liposomas es que se evitan unos disolventes orgánicos tales como cloroformo. Las formulaciones de liposomas del invento están de manera preferible exentas de disolventes orgánicos y contienen, en particular, menos que 2 % en peso, de manera preferible menos que 1 % en peso, de manera más preferible menos que 0,1 % en peso y de manera sumamente preferible 0 % de un disolvente orgánico. Además, el invento proporciona el establecimiento de un método de producción a gran escala para la producción de vesículas reconstituidas y secadas que forman MLV's después de una rehidratación para usos farmacéuticos.

50 Una ventaja del método del invento reside en que pueden ser evitadas unas etapas adicionales de purificación de liposomas, que se describen en los métodos de la técnica anterior para eliminar el material que no había sido atrapado dentro del núcleo liposomal acuoso o entre las envolturas liposomales. En vez de esto, una ventaja reside en que una parte de la proteína no incorporada, que de manera preferible está unida de manera no covalente con la superficie de los liposomas, hace posible una liberación inicialmente rápida del agente activo, p.ej. una proteína libre, después de haberse administrado la composición farmacéutica a un individuo que necesita de ella.

Una ventaja adicional del método del presente invento es una alta encapsulación de una proteína (p.ej. la CD-RAP) en las MLV's usando el método del presente invento en comparación con una eficacia de encapsulación más baja de las MLV's producidas por los métodos de la técnica anterior. Además, con el uso con el procedimiento del presente invento se forman liposomas multilaminares en vez de los liposomas unilaminares grandes de los métodos de la técnica anterior, tales como el de reconstitución del polvo de lípidos secados por congelación con una solución de proteínas.

El término "vesículas multilaminares (MLV's)" significa unos liposomas que contienen múltiples bicapas de lípidos que forman dos o más envolturas, particularmente vesículas de lípidos multilaminares bifásicas. Las vesículas de lípidos bifásicas comprenden una pluralidad de bicapas de lípidos, distanciadas entre sí, que comprenden un componente formador de liposomas y opcionalmente un agente activo biológico. Las vesículas de lípidos comprenden unos compartimientos periféricos con soluciones acuosas, formados entre las bicapas de lípidos, y un compartimiento de núcleo central, que comprende la solución acuosa que opcionalmente incluye un agente activo.

Los términos "encapsulación, atrapamiento o captación" se usan aquí para la disposición de sustancias, en particular sustancias hidrófilas, en el núcleo acuoso o entre dos envolturas vecinas de un liposoma. La cantidad de material atrapado en el interior de los liposomas puede ser determinada por unos métodos conocidos en la técnica anterior, tales como una purificación por centrifugación tal como se describe en *Liposomes 2^a edición, A Practical Approach*, compilado por P. Torchilin y Volkmar Weissig, Oxford University Press (2002), una diálisis tal como se describe en *Liposomes, A Practical Approach*, compilado por R. R. C. New, IRL Press (1990) o los métodos que se describen en los Ejemplos del invento.

Por el concepto de "sin la adición de un agente estabilizador de membranas" se entiende que no se añade ninguna sustancia o ésta está presente en una cantidad que inhiba la fusión de fragmentos o vesículas de liposomas, p.ej. para inhibir la formación de vesículas multilaminares. Ejemplos de agentes estabilizadores de membranas son azúcares protectores, alcoholes de azúcares o glicósidos en una concentración protectora junto a las superficies internas y/o externas. En una concentración de 50 mM de un azúcar tal como trehalosa, las vesículas tienen generalmente el mismo tamaño que antes de la deshidratación. Con unas concentraciones de un azúcar, p.ej. unas concentraciones de trehalosa de 125 mM o mayores, no hay casi ninguna diferencia estructural discernible entre vesículas antes o después de una deshidratación. Sin embargo, se pueden incluir pequeñas cantidades de dicho agente estabilizador de membranas, si ellas no inhiben una fusión de los liposomas después de una desecación, p.ej. una formación de MLV's. Los agentes estabilizadores de membranas están presentes de manera preferible en la composición del invento en una proporción de $\leq 5\%$ (p/v = en peso/volumen), de manera preferible de $\leq 2,5\%$ (p/v), de manera más preferible de $\leq 1\%$ (p/v), de manera incluso más preferible de $\leq 0,1\%$ (p/v) y de manera sumamente preferible de 0% (p/v).

Un "agente activo, agente activo biológico o compuesto activo biológico" deberá significar cualquier agente que tenga un efecto terapéutico, biológico, farmacológico, farmacéutico (p.ej. que trate, reprima, mejore, prevenga, retrase la iniciación o reduzca el riesgo de desarrollo de una o más enfermedades, trastornos o condiciones o síntomas de las/los mismas/os) y/o cosmético. El efecto terapéutico puede ser local o sistémico y puede ser objetivo o subjetivo. De manera preferible, un agente activo es una proteína, en particular una proteína hidrófila, de manera más preferible una proteína para la regeneración de huesos y/o cartílagos.

Un "agente estabilizador de membranas" deberá significar un agente que, cuando sea añadido en una cierta concentración o en un cierto intervalo de concentraciones, proteja a los liposomas con respecto a la destrucción o la fuga del agente activo encapsulado mientras que está siendo secado. Éste puede ser un azúcar protector, un alcohol de azúcar o un glicósido, en particular un mono- o disacárido o un aminoglicósido. Unos azúcares y glicósidos protectores incluyen unos excipientes tales como trehalosa, maltosa, sacarosa, glucosa, lactosa, dextrano, estreptomina y dihidro-estreptomina.

Un "agente favorecedor de la fusión" favorece o hace posible la fusión de conjuntos de lípidos para formar MLV's. Adicionalmente, un agente favorecedor de la fusión significa de manera preferible un excipiente o componente que estabiliza a la estructura nativa del agente activo, p.ej. una proteína. Además, un agente favorecedor de la fusión no protege de manera preferible a las SUV's durante la desecación o con respecto de la rotura de bicapas de lípidos SUV's, p.ej. por formación de cristales de hielo. Un agente favorecedor de la fusión puede ser una sustancia amorfa o que cristalice parcialmente o una sustancia tamponadora, que conduzca a una fragmentación, rotura o apertura de membranas de lípidos durante un proceso de deshidratación, tal como una desecación por atomización, para permitir una encapsulación de un agente activo mientras que se forman las MLV's por una subsiguiente rehidratación. Dichas sustancias incluyen aminoácidos, en particular aminoácidos de carácter alcalino y de manera preferible arginina, histidina, citrulina, lisina y las correspondientes sales tales como las de fosfato, sulfato o cloruro o mezclas de ellas. De manera preferible, el agente favorecedor de la fusión es añadido en una cantidad suficiente para hacer posibles unas condiciones isotónicas después de una rehidratación de la formulación liposomal secada (vesículas reconstituidas secadas, DRV's). Además el agente favorecedor de la fusión no tiene de manera preferible ningún impacto negativo (p.ej. de oxidación) sobre el agente activo, p.ej. la proteína que ha de ser encapsulada.

El término “enfermedad degenerativa del disco (con el acrónimo DDD)” es un proceso crónico caracterizado en parte por una pérdida progresiva del contenido de proteoglicanos y de agua en el núcleo pulposo, que puede resultar manifiesta en múltiples trastornos tales como un dolor idiopático de la parte baja de la espalda, una herniación de disco, una disrupción discal interna o discos fisurados, una radiculopatía, una estenosis espinal, una ciática inducida por un núcleo pulposo herniado, una ciática, una escoliosis idiopática y/o una mielopatía. El grado de degeneración de un disco puede ser clasificado por análisis de una MRI (formación de imágenes por resonancia magnética) preoperatoria.

Para la finalidad del presente invento, el término “transdiscalmente” incluye pero no se limita a una inyección dentro de un disco intervertebral, en particular, dentro del núcleo pulposo (con el acrónimo NP) de un disco intervertebral que incluye un disco intacto, un disco degenerado en diferentes etapas, un disco herniado, un disco roto, un disco exfoliado o un disco fisurado. Si el volumen que ha de ser inyectado puede causar una presión sobre el NP, por lo menos una parte del NP se puede eliminar antes de una inyección o aplicación del implante para la columna espinal. En algunos casos, el volumen del material eliminado es aproximadamente la cuantía de volumen $\pm 20\%$ que ha de ser aplicada. El término “transdiscalmente” incluye también una inyección dentro del anillo fibroso (con el acrónimo AF) de un disco en degeneración o intacto, como más arriba se ha descrito para el NP. En los casos en que se aplica un tamaño mayor de un material de vehículo, puede ser necesaria una eliminación parcial o total del disco antes de la aplicación de la composición farmacéutica de acuerdo con el invento. Esto incluye además proporcionar el implante en un sitio fuera pero estrechamente adyacente a la pared del AF o la placa extrema de un cuerpo vertebral adyacente, esto puede evitar la punción del AF y por lo tanto una carga potencial sobre el disco.

Se pretende que el término “lípidos”, cuando se usa en el presente contexto, designe a cualquier sustancia que se pueda usar para la preparación de bicapas de lípidos. Unos típicos lípidos incluyen glicolípidos, lecitina, fosfolípidos, ceramidas y mezclas de los mismos.

Unos lípidos apropiados, hidrogenados o no, que están presentes individualmente o en mezclas de acuerdo con el presente invento, incluyen unos lípidos neutros o cargados positivamente, tales como lecitinas o fosfolípidos naturales. Ejemplos de lípidos son fosfatidilcolina (PC), fosfatidilcolina de huevo (EPC), fosfatidilserina (PS), colesterol (Chol), diestearoil-fosfatidilcolina (DSPC), esfingomielina (SM), dioleil-fosfatidilcolina (DOPC), dioleil-fosfatidilglicerol (DOPG), dilauroil-fosfatidilcolina (DLPC), fosfatidilglicerol (PG), dimiristoil-fosfatidilcolina (DMPC), dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC), gangliósidos, ceramidas, fosfatidilinositol (PI), ácidos fosfáticos (PA), fosfato de dicetilo (DcP), dimiristoil-fosfatidilcolina (DMPC), un gangliósido y otros glicolípidos, estearilamina, dipalmitoil-fosfatidilglicerol (DPPG), y otros lípidos sintéticos o semisintéticos. Los fosfolípidos pueden ser unos lípidos naturales derivados de yemas de huevo, de plantas de soja o de otros animales u otras plantas, tales como lecitina de yema de huevo, lecitina de soja y similares. La formulación liposomal es típicamente una mezcla de por lo menos un lípido, de manera más preferible de por lo menos dos lípidos, tales como colesterol y fosfatidilcolina, y de manera todavía más preferible de tres o más lípidos.

En una forma de realización adicionalmente preferida, los lípidos comprenden menos de 20, 15, 10, 8, 5, 3 ó 1 por ciento en peso (% p) de lípidos insaturados, basado en la cantidad total de lípidos. De manera preferible, los lípidos son unos lípidos neutros saturados.

Los lípidos insaturados y/o neutros son unos lípidos preferidos de acuerdo con el presente invento para aumentar la estabilidad de los liposomas formados y para mejorar la liberación prolongada para una aplicación farmacéutica con la finalidad del invento que se describe dentro de esta memoria descriptiva. Los lípidos insaturados tienen una temperatura de transición muy baja. Puesto que los lípidos estarán en una fase cristalina líquida durante todas las fases de producción, la manipulación, p.ej. el dispersamiento, o la rehidratación para dar liposomas es mucho más fácil y rápida. Si la temperatura está cerca de o cruza la temperatura de transición de fases de los lípidos, el resultado sería una fuerte pérdida del compuesto incorporado.

De manera preferible, las composiciones farmacéuticas parenterales más arriba descritas comprenden dos lípidos, de manera preferible dos lípidos neutros, de manera más preferible fosfatidilcolina (PC) y colesterol (Chol). De manera preferible, la relación en tantos por ciento en peso de los dos lípidos (p.ej. PC:Chol) basada en la cantidad total de lípidos, puede ser de aproximadamente 2 a aproximadamente 7, de aproximadamente 2 a aproximadamente 6, de aproximadamente 2 a aproximadamente 5, de aproximadamente 3 a aproximadamente 7, de aproximadamente 3 a aproximadamente 6, de aproximadamente 3 a aproximadamente 5, de aproximadamente 2,7 a aproximadamente 5,4, de aproximadamente 2,8 a aproximadamente 5,2, de aproximadamente 2,8 a aproximadamente 4,2, o de aproximadamente 2,8 a aproximadamente 3,2 (p.ej. 3, 4 ó 5).

Aunque se ha descrito que los lípidos neutros proporcionan con frecuencia conglomerados de MLV's, no se podría observar ninguna conglomeración para los MLV's del presente invento.

De manera preferible, la mezcla de lípidos está cargada eléctricamente. Ejemplos de lípidos catiónicos incluyen cloruro de dioctadecil-dimetil-amonio (DOPAC), N-(2,3-dioleiloxi)propil-N,N,N-trimetil-amonio (DOTMA), bromuro de didodecil-amonio (DDAB), 1,2-dioleiloxi-3-trimetilamonio propano (DOTAP), 3-N-(N',N'-dimetil-aminoetano)-

carbamoyl colesterol (DC-Chol), 1,2-dimiristoiloxipropil-3-dimetilhidroxietil amonio (DMRIE), trifluoroacetato de 2,3-dioleiloxi-N-[2(espermina-carboxamido) etil]-N,N-dimetil-1-propanaminio (DOSPA) y similares.

5 Unos ejemplos de lípidos aniónicos son bien conocidos para los expertos en la especialidad e incluyen, pero no se limitan a, cardiolipina, palmitato de ascorbilo, diestearoil-fosfatidilglicerol (DSPG), un ácido fosfatídico y fosfatidilserina (PS). Otros lípidos aniónicos incluyen amidas de fosfatidil etanolamina tales como anandamidas y metanandamidas, fosfatidil serina, fosfatidil inositol y ésteres de ácidos grasos del mismo, fosfatidil etilen glicol, lisolípidos de carácter ácido, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido araquidónico, ácido oleico, ácido linolénico, ácido linoleico, ácido mirístico, sulfolípidos y sulfátidos, ácidos grasos libres, tanto saturados como insaturados, y derivados cargados negativamente de los mismos. De manera más preferible, el lípido aniónico es un ácido fosfatídico, un fosfatidil glicerol, un éster de ácido graso de fosfatidil glicerol, una fosfatidil etanolamina anandamida, una fosfatidil etanolamina metanandamida, una fosfatidil serina, un fosfatidil inositol, un éster de ácido graso de fosfatidil inositol, un fosfatidil etilen glicol, un lisolípido de carácter ácido, un sulfolípido, un sulfátido, un ácido graso libre saturado, un ácido graso libre insaturado, un ácido palmítico, un ácido esteárico, un ácido araquidónico, un ácido oleico, un ácido linolénico, un ácido linoleico o un ácido mirístico. Cualquiera de los lípidos aniónicos que aquí se describen puede ser fluorado reemplazando por lo menos un átomo de hidrógeno por un átomo de flúor.

Para obtener una encapsulación mejorada de una sustancia soluble en agua tal como la CD-RAP, los componentes lípidos se seleccionan de manera preferible de tal modo que por lo menos un lípido esté cargado eléctricamente con el fin de aumentar la encapsulación del agente activo. Por lo tanto, en otra forma de realización, la composición farmacéutica parenteral comprende hasta 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 2 %, 1 %, entre aproximadamente 10 % y 1 %, entre aproximadamente 5 % y 1 %, entre 0,1 % y 0,5 % (p/p = peso/peso) de lípidos cargados eléctricamente, basado en la cantidad total de lípidos.

De manera preferible, el lípido cargado eléctricamente es cardiolipina o palmitato de ascorbilo, de manera preferible entre 0,1 % y 5 % (p/p) de los lípidos totales, entre 0,1 % y 3 % (p/p), entre 0,1 % y 1,5 % (p/p), entre 0,1 % y 1 % (p/p) de cardiolipina o palmitato de ascorbilo de los lípidos totales.

25 Un ejemplo preferido de una apropiada mezcla de lípidos es la de fosfatidilcolina (PC), colesterol (Chol) y palmitato de ascorbilo, de manera preferible la de PC : Chol : palmitato de ascorbilo en una relación de 60 % -1 % : 0 % - 40 % : 0 % - 5 %, de manera más preferible en una relación de 70 %-90 % : 7 %-30 % : 0,1 %-3% y de manera sumamente preferible en una relación de 70 %-80 % : 20 %-28 % : 0,1-1,5 % (p/p) del contenido total de lípidos.

30 Contrariamente a lo que se esperaba a partir del estado de la técnica, que enseña que las especies de fosfolípidos cargadas eléctricamente pueden ser importantes para reducir el tamaño de los liposomas (Liposomes 2ª edición, A Practical Approach, compilada por Vladimir P. Torchilin y Volkmar Weissig, Oxford University Press (2002), página 7 primer párrafo) y pueden tener un efecto negativo sobre la retención de sustancias después de una desecación por congelación y una rehidratación, los autores del invento encontraron de manera sorprendente que la adición de un lípido cargado eléctricamente aumenta el tamaño de las MLV's después de surestitución (compárese la Fig. 3).

35 Los liposomas pueden incluir además un lípido derivatizado con un polímero hidrófilo para formar lipopolímeros. Dichos lipopolímeros comprenden de manera preferible unos lípidos modificados en su grupo de cabeza con un polímero o bien por un enlace covalente o por un enlace no covalente. El lipopolímero puede ser introducido en el liposoma o bien añadiendo el lipopolímero a una mezcla de lípidos que forma el liposoma o preparando primeramente un liposoma y luego incorporando el lipopolímero en la capa externa del liposoma previamente formado. Los lipopolímeros se describen por ejemplo en el documento WO2006/027786 incorporado aquí por su referencia.

Una proteína de acuerdo con el invento comprende por ejemplo una proteína hidrófila.

45 De manera preferible, las proteínas hidrófilas son agentes de regeneración de cartílagos o de huesos, p.ej. agentes promotores de cartílagos o proteínas morfogenéticas óseas (con el acrónimo BMP). Dichos agentes, en particular, comprenden unos miembros de la familia del TGF- β (acrónimo de transforming growth factor = factor de crecimiento de transformación), Roberts y Sporn, Handbook of Experimental Pharmacology [Manual de farmacología experimental] 95 (1990), páginas 419-472), del grupo DVR (de repetición variable directa) (Hötten y colaboradores, Biochem. Biophys. Res. Comm. 206 (1995), páginas 608-613 y la bibliografía adicional allí citada) incluyendo los BMP's (proteínas morfogenéticas óseas), Rosen y Thies, Growth Factors in Perinatal Development [Factores de crecimiento en el desarrollo perinatal] (1993), páginas 39-58) y los GDF's (acrónimo de growth differentiation factors = factores de diferenciación del crecimiento), la inhibina/activina (Vale y colaboradores. The Physiology of Reproduction [La fisiología de la reproducción], segunda edición (1994), páginas 1861-1878), y las familias de proteínas de GDNF, de SOX, de IGF y de EGF.

55 Unos miembros interesantes de la superfamilia de los TGF- β o unas variantes activas de los mismos comprenden las proteínas TGF- β tales como TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4, TGF- β 5 (documentos (U.S. [5.284.763](#); EP

0376785; U.S. [4.886.747](#); DNA 7 (1988), páginas 1-8. EMBO J. 7 (1988), páginas 3737-3743, Mol. Endo. 2 (1988), páginas 1186-1195, J. Biol. Chem. 265 (1990), páginas 1089-1093), las proteínas OP1, OP2 y OP3 (documentos U.S. [5.011.691](#), U.S. [5.652.337](#), WO91/05802) así como las BMP-2, BMP-3, BMP-4 (documentos WO88/00205, U.S. [5.013.649](#) y WO89/10409, Science 242 (1988), páginas 1528-1534), BMP-5, BMP-6 y BMP-7 (OP1) (Proc. Natl. Acad. Sci. 87 (1990), páginas 9841-9847; documento WO90/11366), BMP-8 (OP2) 1 (documento WO 91/18098), BMP-9 (documento WO 93/00432), BMP-10 (documento WO 94/26893), BMP-11 (documento WO 94/26892), BMP-12 (documento WO 95/16035), BMP-13 (documento WO 95/16035), BMP-15 (documento WO 96/3671 0), BMP-16 (documento WO 98/12322), BMP-3b (Biochem. Biophys. Res. Comm. 219 (1996), páginas 656-662), GDF-1 (documento WO 92/00382 y Proc. Natl. Acad. Sci. 88 (1991), páginas 4250-4254), GDF-8 (documento WO 94/21681), GDF-10 (documento WO 95/10539), GDF-11 (documento WO 96/01845), GDF-5 (CDMP1, MP52) (documentos WO 95/04819; WO96/01316; WO94/15949, WO96/14335 y WO93/16099 y Nature 368 (1994), páginas 639-643), GDF-6 (CDMP2, BMP-13) (documento WO 95/01801, WO96/14335 y WO95/16035), GDF-7 (CDMP3, BMP-12) (documento WO 95/01802 y WO95/10635), GDF-14 (documento WO 97/36926), GDF-15 (documento WO 99/06445), GDF-16 (documento WO 99/06556), 60A (Proc. Natl. Acad. Sci. 88 (1991), páginas 9214-9218), DPP (Nature 325 (1987), páginas 81-84), Vgr-1 (Proc. Natl. Acad. Sci. 86 (1989), páginas 4554-4558), Vg-1 (Cell 51 (1987), páginas 861-867), dorsalina (Cell 73 (1993), páginas 687-702), MIS (Cell 45 (1986), páginas 685-698), pCL13 (documento WO 97/00958), BIP (documento WO 94/01557), inhibina α , activina β A y activina β B (EP 0222491), activina β C (MP121) (documento WO 96/01316), activina β E y GDF-12 (documentos WO 96/02559 y WO98/22492), activina β D (Biochem. Biophys. Res. Comm. 210 (1995), páginas 581-588), GDNF (Science 260 (1993), páginas 1130-1132, documento WO93/06116), neurturina (Nature 384 (1996), páginas 25 467-470), parsefina (Neuron 20 (1998), páginas 245-253, documento WO97/33911), artemina (Neuron 21 (1998), páginas 1291-1302), Mic-1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (1997), páginas 11514-11519), univina (Dev. Biol. 166 (1994), páginas 149-158), ADMP (Development 121 (1995), páginas 4293-4301), nodal (Nature 361 (1993), páginas 543-547), screw (tornillo) (Genes Dev. 8 (1994), páginas 2588-2601) o combinaciones de las mismas. Otras proteínas útiles incluyen unas construcciones artificiales biosintéticas biológicamente activas que incluyen proteínas biosintéticas diseñadas usando secuencias de dos o más proteínas morfogenéticas conocidas. Ejemplos de construcciones artificiales biosintéticas se describen en el documento US [5.011.691](#) (p.ej. las COP-1, COP-3, COP-4, COP-5, COP-7 y COP-16). Un ejemplo de un útil miembro de la familia de las proteínas SOX (p.ej. la SOX-9) se describe en el documento WO96/17057. La divulgación de las publicaciones citadas, incluyendo a las patentes o solicitudes de patentes, se incorpora aquí por su referencia.

En una forma de realización, el agente de regeneración de cartílagos o huesos se selecciona entre el conjunto de proteínas con un dominio SH3 o con un dominio que adopta un pliegue de dominio similar a SH3 tal como la CD-RAP. Los dominios SH3 o dominios similares a SH3 se describen por ejemplo en la cita de Stoll y colaboradores (Stoll, R. y colaboradores (2003) Backbone dynamics of the human MIA protein studied by (15)N NMR relaxation: implications for extended interactions of SH3 domains [Dinámicas de esqueleto de la proteína MIA humana estudiada por relajación de RMN (15)N: implicaciones para interacciones prolongadas de dominios SH3]. Protein Sci. 12: 510-519; Stoll, R. y colaboradores (2001). La proteína de actividad inhibidora del melanoma (MIA, acrónimo de melanoma inhibitory activity) humana extracelular adopta un pliegue similar al dominio SH3. Embo J 20: 340-349) y puede ser determinada por medio de la predicción de un pliegue SH3 por un servidor 3D-PSSM Web publicado en la cita de Kelley y colaboradores (Kelley, L. A. y colaboradores (2000) Enhanced genome annotation using structural profiles in the program 3D-PSSM [Anotación aumentada en el genoma usando perfiles estructurales en el programa 3D-PSSM]. J Mol.Biol 99: 499-520). Los dominios SH3, también denominados dominios con homología de Src, son unas moléculas proteínicas que son halladas en muchas proteínas intracelulares. Hasta ahora, no se describió que las proteínas con un dominio SH3 fuesen útiles en el tratamiento de trastornos espinales.

En otra forma de realización, el agente de regeneración de cartílagos o huesos es una proteína que específicamente se puede fijar a fibronectina, a fragmentos de fibronectina y/o a secuencias ricas en prolina, tal como se describen por ejemplo en la bibliografía (Stoll, R. y colaboradores (2001) The extracellular human melanoma inhibitory activity (MIA) protein adopts an SH3 domain-like fold [La proteína de actividad inhibidora de melanoma (MIA) humana extracelular adopta un pliegue similar al dominio SH3]. Embo J 20: 340-349; Homandberg, G. A. y Hui, F. (1996) Association of proteoglycan degradation with catabolic cytokine and stromelysin release from cartilage cultured with fibronectin fragments [Asociación de la degradación de proteoglicanos con liberación de citocinas catabólicas y de estromelisin a partir de un cartílago cultivado con fragmentos de fibronectina]. Arch. Biochem. Biophys. 334: 325-331; Homandberg, G. A. y colaboradores (1997) Fibronectin-fragment-induced cartilage chondrolysis is associated with release of catabolic cytokines [La condrolisis de cartílagos inducida por fragmentos de fibronectina está asociada con la liberación de citocinas catabólicas]. Biochem. J 321 (Pt 3): 751-757).

En una forma de realización el agente de regeneración de cartílagos o de huesos comprende un dominio de fijación a fibronectina o integrina. La fijación del factor de diferenciación y mantenimiento de cartílagos a proteínas intracelulares, tales como fibronectina o fragmentos de fibronectina, así como integrinas, se puede determinar por ejemplo por un ELISA. La fibronectina, los fragmentos o las integrinas de la misma se pueden aplicar como revestimiento sobre superficies de materiales plásticos y se exponen al factor de diferenciación y mantenimiento de cartílagos. La magnitud de la fijación puede ser determinada por un anticuerpo monoclonal engarzado con una peroxidasa contra el factor de diferenciación y mantenimiento de cartílagos. La fijación a una integrina puede

también ser determinada como ha sido descrito por la cita de Bauer y colaboradores, que aquí se incorpora por su referencia (Bauer, R. y colaboradores (2006) Regulation of integrin activity by MIA [Regulación de la actividad de integrinas por la MIA]. J Biol Chem 281: 11669-11677).

5 De manera preferible, los agentes de regeneración de cartílagos o huesos son definidos como a) unas proteínas de condrocitos que comprenden o tienen la secuencia madura de la CD-RAP (SEQ ID No 1) y fragmentos funcionales o variantes de la misma, b) unas proteínas que tienen una homología de secuencias de por lo menos un 63 %, de manera preferible de un 80 %, y de manera más preferible de un 90 % con la secuencia de aminoácidos con el esqueleto de cuatro cisteínas terminales de C de la CD-RAP, los aminoácidos 12 a 107 de la SEQ ID No. 1, o c) 10 unas proteínas que tienen cualquiera de las secuencias genéricas 1 hasta 3 que aquí se definen (SEQ ID No 2, 3 y 4).

Unos fragmentos funcionales que tienen la misma función biológica que la CD-RAP, tienen de manera preferible una longitud de por lo menos 20, en particular de por lo menos 40 y de manera más preferible de por lo menos 50, de manera sumamente preferible 80 aminoácidos contiguos de la secuencia mostrada en SEQ ID NO:1. De manera preferible, los fragmentos funcionales comprenden los aminoácidos de las posiciones desde 1 hasta 50, desde 1 hasta 70, desde 1 hasta 80, desde 20 hasta 80, o desde 20 hasta 107 de la SEQ ID No 1.

Secuencia de la CD-RAP madura (SEQ ID No 1)

GPMPKLADRKLCADQECSHPI SMAVALQDYMAPDCRFLTIHRGOVYVFSKLGKGRGLFWGGSVQGDYYGDLAARL
GYFPSSIVREDQTLKPGKVDVKTKDWFYCC

20 Secuencia genérica 1 (SEQ ID No 02)

C X₄ C X₁₇ C X₁₂ V X₁₁₋₁₃ W X₇₋₁₈ F X₄ V X₂₁ C X

Secuencia genérica 2 (SEQ ID No 03)

K X C X D X E C X₁₁ D X₃ P D C X₁₂ V X₂ K L X₇₋₉ W X G S X₅₋₁₃ G Y F P X₃ V X₁₈ D F X C X

25

Secuencia genérica 3 (SEQ ID No 04)

K X C X D X₂ C X₈ A X₂ D X₃ P D C R F X₅ G X V X₅ K L X₇ W X G S V X₁₂ G Y F P X₂₂ D F X C Q

30 en las que los "X" en cada aparición representan independientemente cualquier aminoácido y el número en subíndice representa el número de cualquier aminoácido. De manera preferible los "X" representan independientemente un aminoácido presente en la naturaleza y, en particular, A, R, N, D, B, C, Q, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y ó V.

35 De manera particularmente preferible, el agente de regeneración de cartílagos o huesos es la CD-RAP (proteína sensible al ácido retinoico, derivada de cartílagos), también denominada MIA (actividad inhibidora de melanomas), OTOR (proteína derivada de fibrocitos, FOP, MIAlike, MIAL) y TANGO 130 que pertenece a una clase de proteínas secretadas) (Bosserhoff, A. K. y colaboradores (2004) Characterization and expression pattern of the novel MIA homolog TANGO [Caracterización y patron de expresión del nuevo homólogo de MIA TANGO]. Gene Expr. Patterns. 4: 473-479; Bosserhoff, A. K. y Buettner, R. (2003) Establishing the protein MIA (melanoma inhibitory activity) as a marker for chondrocyte differentiation [Establecimiento de la proteína MIA (actividad inhibidora de melanomas) como un marcador para la diferenciación de condrocitos]. Biomaterials 24: 3229-3234; Bosserhoff, A. K. y colaboradores (1997) Mouse CD-RAP/MIA gene: structure, chromosomal localization, and expression in cartilage and chondrosarcoma. [El gen de CD-RAP/MIA de ratón: estructura, localización cromosomal y expresión en un cartílago y condrosarcoma] Dev. Dyn. 208: 516-525; WO00/12762). La CD-RAP o MIA es una proteína con 130 aminoácidos (documentos EP 0710248 y EP 1146897, plenamente incorporados aquí por su referencia) que es un marcador altamente específico para la diferenciación de condroides.

50 De manera preferible, la proteína de acuerdo con el invento comprende las CD/RAP (MIA), BMP-2, BMP-7, BMP-12, BMP-13, GDF-5 (MP-52), TGF-beta1, TGF-beta2, TGF-beta3, TGF-alfa, o fragmentos activos o combinaciones de las mismas, de manera sumamente preferible la CD/RAP (MIA).

55 La proteína aquí considerada puede ser expresada a partir de un ADN o ADNc genómico truncado o intacto o a partir de ADN's sintéticos, en células anfitrionas procarióticas o eucarióticas. Las proteínas pueden ser aisladas a partir de los medios de cultivo o de los cuerpos de inclusión y/o replegadas para formar composiciones activas biológicas. Véanse, p.ej. el documento EP 0710248 y Loughheed y colaboradores (Loughheed, J. C. y colaboradores (2001) Structure of melanoma inhibitory activity protein, a member of a recently identified family of secreted proteins [Estructura de la proteína con actividad inhibidora de melanomas, un miembro de una familia recientemente identificada de proteínas secretadas]. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 98: 5515-5520) para protocolos ilustrativos de la purificación de proteínas recombinantes de la CD-RAP. Una descripción detallada de cómo ensayar la actividad (p.ej. de condrogénesis) de dichas proteínas aisladas se describe en las citas de Tscheudschilsuren y colaboradores and Stoll y colaboradores (Tscheudschilsuren, G. y colaboradores (2005) Regulation of mesenchymal stem cell and chondrocyte differentiation by MIA [Regulación de la diferenciación de células tronco y condrocitos por la MIA].

60

Experimental Cell Research 1-10; Stoll, R. y colaboradores (2003) Backbone dynamics of the human MIA protein studied by $(15)\text{N}$ NMR relaxation: implications for extended interactions of SH3 domains. Protein Sci. 12: 510-519), cuyas divulgaciones se incorporan por su referencia al presente texto. Un bioanálisis para la inducción de cartílagos se describe en los Ejemplos 2 hasta 5 en el documento EP 1146897, incorporado por su referencia a la presente.

5 De manera preferible, el agente favorecedor de la fusión se usa en una cantidad suficiente para evitar un estrés osmótico en un entorno fisiológico y/o para mantener condiciones unas iso-osmolares para aplicaciones parenterales. De manera preferible, el agente promotor de la fusión se usa en una proporción de menos que 8 % (m/v = masa/volumen) basada en el material en forma de partículas antes de la desecación, de manera
10 preferible menos de 5 %, de manera preferible entre 2 % y 5 %.

En una forma de realización preferida, la composición farmacéutica parenteral que comprende vesículas que contienen una proteína secada por congelación, comprende también el agente favorecedor de la fusión en una cantidad suficiente para formar una dispersión isotónica de liposomas después de una rehidratación con la solución acuosa. De manera preferible, el pH de la dispersión de liposomas rehidratados está situado entre un pH de 4 y un
15 pH de 9, entre un pH de 5 y un pH de 8, de manera preferible entre un pH de 6 y un pH de 7,5.

Apropiados aniones inorgánicos u orgánicos son p.ej. los de succinato, fumarato, citrato, malato, fosfato, acetato, cloruro, de manera preferible fosfato.

De manera preferible, el agente promotor de la fusión es fosfato de arginina, de manera preferible fosfato de arginina entre 100 y 800 mM, de manera más preferible entre 100 y 600 mM o de manera sumamente preferible entre 280 y
20 400 mM después de una reconstitución de los liposomas liofilizados.

Otros/as aditivos o sustancias adicionales tales como agentes antioxidantes, tales como metionina, ácido ascórbico, tocoferol, butilhidroxitolueno (BTH), butilhidroxianisol, galato de propilo, una sustancia cargada eléctricamente tal como estearilamina, oleilamina, fosfato de dicetilo o una similar, se pueden ajustar de una manera apropiada. De manera preferible, el aditivo es butilhidroxitolueno (BTH), butilhidroxianisol y/o metionina, de manera preferible entre
25 0,1 y 5 % (p/p) de los lípidos totales, entre 0,1 y 3 % (p/p), entre 0,1 y 1,5 % (p/p), entre 0,1 y 1 % (p/p) de agentes antioxidantes, p.ej. butilhidroxitolueno, del total de lípidos, y/o una concentración final situada entre 5 y 100 mM de metionina de liposomas rehidratados, de manera más preferible entre 5 y 50 mM, de manera sumamente preferible en una concentración final comprendida entre 10 y 25 mM de metionina de liposomas rehidratados. Unas sustancias adicionales pueden ser las que sirven para mejorar la liberación prolongada, aumentar la vida mitad o semivida de
30 los liposomas o para dirigir al liposoma y por lo tanto al fármaco hacia un tipo particular de tejido o célula.

Además del agente activo, la composición farmacéutica de liposomas del presente invento puede comprender adicionales agentes activos terapéutica o biológicamente. Por ejemplo, pueden estar presentes unos factores terapéuticos útiles en el tratamiento de una indicación particular, p.ej. una osteoartritis, tales como uno o más
35 agentes inhibidores que están implicados en la destrucción de componentes de cartílagos articulares o sinoviales, no se limitan a anti-metaloproteinasas, compuestos de ciclinas, agentes antagonistas de citocinas, corticoesteroides, agentes inhibidores de los TNF; agentes inhibidores de las IL, sustancias anti-angiogénicas, agentes inhibidores de agreganasa, agentes inhibidores de la cinasa p38, agentes inhibidores de la apoptosis, agentes inhibidores de hialuronidasa y agentes inhibidores de enzimas proteolíticas. Unos factores que reprimen la inflamación, que incluyen infliximab, etanercept, adalimumab, nerelimonmab, lenercept y similares, o combinaciones de los mismos,
40 pueden ser también parte constituyente de la composición. Se considera también que la composición farmacéutica de liposomas puede incluir unos componentes extracelulares de matriz tales como el ácido hialurónico o un derivado del mismo, que incluye sales, ésteres, ésteres internos y derivados sulfatados, de manera preferible un éster parcial del ácido hialurónico.

Se considera también que el invento cubre una composición farmacéutica parenteral o un procedimiento para su preparación de acuerdo con una cualquiera de las formas de realización del presente invento, en las que más de un
45 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % de los liposomas formados después de una rehidratación con una encapsulación del agente activo en una solución acuosa, son liposomas multilaminares. Con más detalle, el anterior porcentaje significa que después de una rehidratación se forman unos liposomas en los que el porcentaje más arriba indicado representa la proporción formada de los liposomas totales.

50 En una forma de realización, la solución acuosa está tamponada o no tamponada, de manera preferible no tamponada, de manera sumamente preferible es agua para inyección.

En una forma preferida de realización, los liposomas multilaminares, que de manera preferible están como una dispersión de liposomas, tienen una osmolaridad de 200 a 400 mosmol, de manera preferible de 250 a 350 mosmol.

En una forma de realización, la composición farmacéutica parenteral de acuerdo con el invento contiene por lo
55 menos 0,125 pmol de la proteína, de manera preferible 1,25 pmol de la CD-RAP por μmol del lípido liposomal.

En una forma de realización los liposomas multilaminares de acuerdo con el invento se preparan mediante el procedimiento de deshidratación y rehidratación que se ha descrito más arriba, que contiene un agente activo intra- y extra-liposomal, en una solución, de manera preferible en una solución isotónica.

5 Otra forma preferida de realización abarca una composición farmacéutica que comprende unas vesículas que a su vez comprenden una proteína secada por congelación, que comprende a) fosfatidilcolina, colesterol y palmitato de ascorbilo en una relación de aproximadamente 78-80 % por 19,5 %-28 % por 0,5-2 % de los lípidos totales, b) un agente inductor de huesos y/o cartílagos de manera preferible la CD-RAP y c) un agente promotor de la fusión, de manera preferible fosfato de arginina con un valor del pH comprendido entre un pH de 4 y un pH de 9, de manera preferible entre un pH de 5 y un pH de 8, de manera sumamente preferible entre un pH de 6 y un pH de 7,5, en el
10 que unos liposomas multilaminares, que tienen un espacio acuoso interno que comprende el agente inductor de huesos y/o cartílagos con un diámetro liposomal medio de más que 1 μm , comprendido de manera preferible entre 1 μm y 2,5 μm , se forman después de una rehidratación de una composición secada con una solución acuosa que encapsula al agente activo.

15 Los procedimientos del presente invento proporcionan una composición de liposomas secadaos así como una composición de liposomas reconstituidos. La composición de liposomas secados es de manera preferible secada por congelación y/o esterilizada. La composición de liposomas reconstituidos es de manera preferible administrable por vía parenteral y también estéril. En particular los procedimientos permiten una alta eficacia de encapsulación y una alta concentración intraliposomal de proteínas después de una rehidratación en un medio acuoso y de una formación de liposomas multilaminares.

20 Estos procedimientos comprenden las etapas de hidratación de un lípido, de una mezcla de lípidos o de una película de lípidos en la ausencia de un disolvente orgánico, con lo que se forman unas grandes MLV's, y de subsiguiente generación de pequeñas vesículas unilaminares o liposomas que tienen de manera preferible un diámetro medio comprendido entre 50 y 200 nm, entre 50 y 150 nm, entre 50 y 120 nm o entre 70 y 120 nm.

25 De acuerdo con el presente invento, un lípido o una mezcla de lípidos, tal como un polvo de lípidos, se puede hidratar por adición de una solución acuosa. La solución acuosa puede ser tamponada o no tamponada (p.ej. una solución a granel de proteínas tamponada o no tamponada). De manera preferible, la solución acuosa contiene por lo menos 50 % (p/p), de manera más preferible por lo menos 90 % (p/p) y de manera sumamente preferible por lo menos 99 % (p/p) de agua. Una película de lípidos se puede preparar por disolución de los lípidos en una solución orgánica, tal como por ejemplo en terc.-butanol, y por subsiguiente desecación bajo una corriente de nitrógeno o por liofilización.
30

Están disponibles varias técnicas de generar pequeños liposomas unilaminares y de clasificar por tamaños los liposomas. Estos métodos incluyen una diversidad de técnicas que aplican una fuerza suficiente para reducir el tamaño de los liposomas y producir unas vesículas unilaminares más pequeñas. Dichos métodos incluyen una
35 homogeneización, que fragmenta a los liposomas grandes en unos más pequeños por cizalladura. En un procedimiento típico de homogeneización, los liposomas son recirculados a través de un homogeneizador de emulsiones hasta que se alcance el tamaño deseado, p.ej. un diámetro medio comprendido entre 50 y 200 nm, entre 50 y 150 nm, entre 50 y 120 nm o entre 70 y 120 nm. Unos homogeneizadores a alta presión usados para la producción de liposomas se describen por ejemplo en la obra de Liposomes 2^a edición, A Practical Approach, compilada por Vladimir P. Torchilin y Volkmar Weissig, Oxford University Press (2002). Otros métodos incluyen una
40 extrusión de liposomas a través de unas membranas porosas de policarbonato bajo presión. En general, la dispersión de liposomas es movida en ciclo varias veces a través de la membrana. Se pueden usar membranas de poros sucesivamente más pequeños para la reducción gradual del tamaño. Unos filtros o unas membranas preferidos/as tienen un tamaño menor o igual que 250 nm, 200 nm, 150 nm, 100 nm, 80 nm, 50 nm o 15 nm. Unas pasadas preferidas en los ciclos son 1, de manera más preferible 2, de manera sumamente preferible 3 o más. Otros
45 métodos adicionales son una sonicación (tratamiento con ultrasonidos), una microfluidización o una cizalladura mecánica, así como unas combinaciones de diferentes métodos. El tamaño de los liposomas se puede vigilar usando unos métodos convencionales tales como dispersamiento de la luz.

Después de una formación de pequeños liposomas unilaminares, se añade una solución acuosa de proteínas a los pequeños liposomas unilaminares generados. Después de, antes de o conjuntamente con esta etapa, se añade un agente favorecedor de la fusión.
50

Una etapa de esterilización se puede incluir después de la formación de las SUV's y/o después de la adición de la solución acuosa de proteínas. Una etapa de esterilización, p.ej. una filtración en condiciones estériles, se puede realizar por filtración a través de un filtro estéril con un tamaño de poros de 0,22 μm . Ejemplos de dichos filtros estériles son Ultipor N66 (de PALL), Acrodisc 4455T (de PALL) o Millex GV SLGV025LS (de Millipore).

55 En una forma preferida de realización, la concentración de proteínas está situada entre 25 $\mu\text{g/ml}$ y 10 mg/ml , pero más típicamente entre 250 $\mu\text{g/ml}$ y 2,5 mg/ml de una formulación liposomal multilaminar reconstituida.

5 Preferiblemente, el agente favorecedor de la fusión está comprendido en el producto y en los procedimientos del invento en una cantidad suficiente para formar una dispersión isotónica de liposomas después de una rehidratación con la solución acuosa, preferiblemente en una concentración comprendida entre 50 mM y 800 mM, entre 200 mM y 600 mM y de manera sumamente preferible entre 250 mM y 400 mM. Preferiblemente, el valor del pH de los liposomas multilaminares rehidratados y/o de la dispersión de liposomas está situado entre un pH de 4 y un pH de 9, de manera más preferible entre un pH de 5 y un pH de 8, de manera sumamente preferible entre un pH de 6 y un pH de 7,5.

10 Una deshidratación de dicha dispersión de lípidos incluye una liofilización o desecación por congelación. Se apreciará que se pueden usar en el invento unos métodos de desecación distintos de una liofilización, por ejemplo una desecación en vacío, una desecación bajo una corriente de nitrógeno, o una desecación por atomización, en bandejas y en tambores. En otra forma de realización, una deshidratación de dicha dispersión de lípidos consiste en una fragmentación, rotura o apertura de pequeñas vesículas unilaminares por deshidratación p.ej. por liofilización o desecación por congelación.

15 Opcionalmente, una etapa adicional, p.ej. una etapa de filtración a través de membranas, tales como membranas de policarbonato. se puede incluir después de cualquiera de las etapas de producción más arriba descritas, con el fin de eliminar por ejemplo cristales de sustancias lipófilas.

Unos aditivos que incluyen los más arriba descritos (p.ej. agentes antioxidantes o estabilizadores) se pueden incluir en cualquiera de las etapas de proceso del presente invento.

20 En una forma deshidratada, es decir secada, en particular secada por congelación, la composición puede ser almacenada de una manera estable durante largos periodos de tiempo.

25 El producto deshidratado (p.ej. una "torta" liofilizada) puede luego ser reconstituido mediante la adición de agua destilada, de una solución acuosa o de otra solución apropiada, tamponada o no tamponada. Los liposomas pueden ser resuspendidos o rehidratados en la solución acuosa por suave movimiento en remolino de la solución. La rehidratación se puede realizar a la temperatura ambiente o a otra temperatura apropiada para la composición de los liposomas y sus contenidos internos. La rehidratación de la formulación liposomal forma una suspensión o dispersión de liposomas multilaminares que tienen una distribución y una morfología de tamaños aumentados en comparación con la suspensión original de liposomas antes de la desecación.

30 En otra forma preferida de realización, unas vesículas multilaminares que encapsulan a la proteína, se forman sustancialmente durante una rehidratación de la composición de liposomas liofilizados (etapa e), más preferiblemente, en donde los liposomas multilaminares no se forman durante la deshidratación de dicha dispersión de lípidos (etapa d).

Preferiblemente, la eficacia de atrapamiento o la alta incorporación de por lo menos un compuesto activo biológico es de más que 40 %, 55 %, más que 60 %, más que 70 % y más que 80 % del agente activo.

35 El presente invento cubre unas composiciones farmacéuticas que comprenden unas vesículas reconstituibles secadas que a su vez comprenden una proteína secada por atomización, que comprenden vesículas, y unos métodos de su producción con una conglomeración o degradación despreciable o no detectable del agente activo.

40 En una forma preferida de realización, más de un 60 %, 80 %, 90 %, 95 % o aproximadamente 100 % de los liposomas de MLV rehidratados mantienen o tienen una distribución de tamaños mayores que 1 μm , de manera más preferible entre 1,0 μm y 5 μm , entre 1,5 μm y 5 μm , entre 1,0 μm y 3 μm , de manera sumamente preferible entre 1,2 μm y 2,5 μm . Los diámetros medios de vesículas se pueden determinar por examen con un microscopio electrónico, por microscopia de correlación de fotones, por dispersamiento de luz láser, por difracción de rayos láser (p.ej. en un Mastersizer[®]) o mediante técnicas de oscurecimiento de la luz (p.ej. con un Accusizer[®]) o métodos adicionales tal como se describen en la obra de Liposomes 2^a edición, A Practical Approach, compilada por Vladimir P. Torchilin y Volkmar Weissig, Oxford University Press (2002).

45 Un método preferido es la microscopia por correlación de fotones

Un aspecto adicional del presente invento comprende una composición farmacéutica secada por congelación, obtenible por un método del invento, así como una composición farmacéutica reconstituída, obtenible por los métodos que aquí se describen.

50 Unos liposomas multilaminares que encapsulan a un agente activo, p.ej. a unos agentes de regeneración de huesos y/o de cartílagos, tales como la CD/RAP, pueden proporcionar beneficio en un cierto número de sectores de tratamiento, tales como el de la regeneración de cartílagos en el caso de defectos osteocondrales, defectos de espesor completo, efectos de espesor parcial, unas artritis, tales como osteoartritis, artritis reumatoide, artritis

5 psoriásica, artritis crónica juvenil, pseudoartritis rizomélica, poliartritis reumatoide, sinovitis o sinovitis villonodular, trastornos espinales, la enfermedad de disco degenerado, inducción de tendones y/o ligamentos, tendinitis, roturas de menisco y/o una lesión del ligamento crucial anterior (ACL, acrónimo de Anterior Crucial Ligament). La ventaja de tal modo de suministro de liposomas de los agentes activos es un suministro localizado, más eficiente, al deseado tejido circundante. Los liposomas pueden ser diseñados para proporcionar un depósito de liberación prolongada en un sitio establecido como diana y una lenta liberación del fármaco encapsulado.

10 Otra ventaja de las MLV's del presente invento, en contraste con, por ejemplo, las SUV's, consiste en que en el caso del tratamiento de una osteoartritis por la vía de una inyección en la sinovia, las MLV's que contienen un fármaco son restringidas en el sitio de la aplicación debido a su gran tamaño y a su lenta liberación del agente activo encapsulado.

15 Por lo tanto, otro aspecto del invento es el uso de la composición farmacéutica estéril secada por congelación del invento para la producción de una composición farmacéutica destinada el tratamiento de un defecto de hueso y/o de cartílago, de una enfermedad inmunológica, preferiblemente de una osteoartritis, una artritis reumatoide, y de un trastorno espinal tal como una enfermedad de disco degenerado en un individuo, preferiblemente por una inyección o por inyecciones repetidas después de una rehidratación de la composición secada por congelación con una solución acuosa.

20 En una forma de realización preferida, el trastorno espinal es un dolor idiopático de la parte baja de la espalda, una herniación de disco, una rotura interna de disco o discos fisurados, una radiculopatía, una estenosis espinal, una ciática inducida por el núcleo pulposo herniado, una ciática, una escoliosis idiopática o una mielopatía.

En una forma preferida de realización la inyección es una inyección local o no sistémica, preferiblemente dentro de la sinovia, del espacio de la sinovia, del núcleo pulposo, del espacio del núcleo pulposo, intradiscalmente o transdiscalmente.

25 El esquema de las dosis puede fluctuar entre una pluralidad de veces por semana y una pluralidad de veces por mes, con un intervalo preferido de no más de una vez cada tres días. El periodo total de tratamiento es preferiblemente de por lo menos una vez por semana, más preferiblemente de por lo menos una vez por mes.

La composición farmacéutica puede ser también apropiada para una administración a largo plazo durante por lo menos 3 meses, durante por lo menos 6 meses, durante por lo menos 12 meses, hasta durante 18 meses, hasta durante 24 meses o incluso más largo tiempo.

30 La composición farmacéutica del invento puede ser administrada preferiblemente en única unidad de dosificación de aproximadamente 0,25 mg hasta aproximadamente 25 mg, de manera especial de aproximadamente 0,5 mg hasta aproximadamente 15 mg y de manera más preferible de aproximadamente 5 mg hasta 15 mg de una proteína liposomal.

Un protocolo de tratamiento preferido adicional comprende administrar dicha composición farmacéutica del presente invento

- 35 a) por lo menos 1 vez, especialmente de 1 a 3 veces en la primera semana, seguida por un intervalo de 1 a 5 semanas sin ninguna administración, y opcionalmente una o más repeticiones del protocolo de administración,
 b) una vez por semana o una vez por varias semanas sucesivas,
 c) una vez por mes o una vez durante varios meses sucesivos,

40 en donde la dosis mensual es de manera preferible desde aproximadamente 1 mg hasta aproximadamente 100 mg, de manera especial desde aproximadamente 2 mg hasta aproximadamente 60 mg y de manera más preferible desde aproximadamente 20 mg hasta 50 mg de la proteína liposomal.

La estabilidad de los liposomas en almacenamiento es de por lo menos tres meses, de manera preferible de por lo menos 6 meses, de manera más preferible de por lo menos un año.

45 El invento es descrito adicionalmente por las Figuras adjuntas y los siguientes Ejemplos

La **FIGURA 1** muestra la morfología de unos liposomas producidos por el método de congelación y descongelación (A) de acuerdo con el Ejemplo 3, en comparación con el método de acuerdo con el Ejemplo 1 del invento (B).

La **FIGURA 2** ilustra la morfología de unos liposomas rehidratados, analizados por microscopía óptica en una luz doblemente polarizada.

50 La **FIGURA 3** muestra la distribución media de tamaños \pm la desviación típica de las MLV's, producidas de acuerdo con el Ejemplo 6 B después de una reconstitución, dependiente de la cantidad de palmitato de ascorbilo usado.

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de liposomas reconstituidos secados por congelación (DRV's) con un agente favorecedor de la fusión

5 A: 750 mg de fosfatidilcolina (Lipoid S100), 250 mg de colesterol con o sin 10 mg de palmitato de ascorbilo se disolvieron en 20 ml de etanol dentro de un matraz de fondo redondo. El disolvente se eliminó cuantitativamente en un evaporador rotatorio. La delgada película de lípidos generada fue rehidratada en 10 ml de agua para obtener unos liposomas (10 % (p/v) de lípidos) por suave agitación a la temperatura ambiente. Se prepararon unas vesículas unilaminares (SUV's) con un diámetro de aproximadamente 100 nm por subsiguiente tratamiento con ultrasonidos.

10 300 µl de las SUV's se mezclaron con 250 µl de una solución de CD-RAP (3 mg/ml en arginina/H₃PO₄ 420 mM, de pH 7,5) y se liofilizaron. La encapsulación tuvo lugar durante la rehidratación de la torta liofilizada con 300 µl de agua destilada y suave movimiento en vórtice. Esto condujo a una eficacia de atrapamiento de más que 40 % dentro de unas MLV con un diámetro promedio de 1,5 µm, sin ninguna alteración química del fármaco atrapado, tal como se determinó por una HPLC (cromatografía de fase líquida de alto rendimiento) y por inmunoensayos enlazados con una enzima (ELISA).

B: 111,4 g de fosfatidilcolina (Lipoid S100), 37,1 g de colesterol y 1,5 g de palmitato de ascorbilo se disolvieron en 800 ml de terc.-butanol para obtener una mezcla dispersada molecularmente. El disolvente se eliminó cuantitativamente mediante una desecación por congelación. Por hidratación de los lípidos secos con 1,5 l de agua y por agitación enérgica se formaron liposomas de múltiples capas con unos diámetros de varios micrómetros. La dispersión de lípidos fue homogeneizada usando un homogeneizador de alta presión y subsiguientemente extrudida a través de una membrana de 100 nm para obtener unas pequeñas vesículas unilaminares (SUV's) monodispersas.

20 Se añadieron 3 ml de las SUV's a 2,5 ml de una solución de CD-RAP (3 mg/ml en arginina/H₃PO₄ 420 mM, de pH 7,5) y se secaron por congelación. Una reconstitución de la torta liofilizada homogénea estable con 3 ml de agua destilada y una subsiguiente agitación condujeron a una dispersión homogénea de liposomas de múltiples capas (DRV) con un diámetro de aproximadamente 1,5 µm y con una eficacia de encapsulación de más que 40 %.

Ejemplo 2: Preparación de DRV's con diferentes excipientes, p.ej. agentes favorecedores de la fusión.

Se analizó la influencia de diferentes excipientes o aditivos p.ej. agentes favorecedores de la fusión, sobre la formación de vesículas reconstituidas secadas (DRV's) que comprenden una proteína hidrófila, p.ej. la CD-RAP que es útil para el tratamiento de diversas enfermedades, tales como una enfermedad de cartílagos y de huesos, p.ej. una osteoartritis, defectos osteocondrales o la enfermedad de disco degenerado. En vez de usar arginina/H₃PO₄ de pH 7,5 como aditivos y/o agentes favorecedores de la fusión de acuerdo con el Ejemplo 1, se ensayaron varios otros aditivos y/o sistemas tamponadores, y se recopilaron en la Tabla 1. Se analizaron los siguientes parámetros: la distribución de tamaños por una espectroscopia de correlación de fotones (PCS, acrónimo de photon correlation spectroscopy), la osmolaridad mediante un osmómetro, la estabilidad de la proteína mediante una HPLC, el aspecto visual de las vesículas reconstituidas y la eficacia de encapsulación.

Tabla 1: Caracterización de DRV's con diferentes agentes favorecedores de la fusión

Aditivos	Estabilidad de la proteína	Tamaño medio	Dispersión	EE [%]	Fisiol. Osmol
Trehalosa al 5 % (p/v)	+	-	+	nd	+
Trehalosa al 3 % (p/v) / manitol al 2% (p/v)	+	-	+	nd	+
Trehalosa al 2 % (p/v) / manitol al 3% (p/v)	+	-	+	nd	+
Manitol al 5 % (p/v)	+	-	+	nd	+
PEG 4000 al 5 % (p/v)	+	+	-	nd	+
Glicina al 1,1 % (p/v)	-	+	+	-	+
Glicina al 1,1 % (p/v)/ 20 mM de KCl/ 150 mM de KH ₂ PO ₄	+	+	+	-	-
350 mM de arginina/ H ₃ PO ₄ / de pH 7,5	+	+	+	+	+
350 mM de histidina/ H ₃ PO ₄ / de pH 7,5	+	+	+	+	+
350 mM de L-lisina/ H ₃ PO ₄ / de pH 7,5	+	+	+	+	+
Solución salina tamponada con fosfato de pH 7,4	-	+	+	Nd	+

La estabilidad de la proteína, el tamaño medio de los liposomas, la dispersión homogénea y la eficacia de encapsulación (EE, acrónimo de encapsulation efficacy) se determinaron después de una rehidratación de los liposomas secados. nd: significa no determinado, los parámetros no se determinaron si no se cumplían otros requisitos.

5 Por uso de trehalosa, de manitol y de mezclas de los mismos como un agente crioprotector se obtuvo un efecto estabilizador tanto de la proteína como de la membrana liposomal dando como resultado unas vesículas unilaminares pequeñas sin afectar, en vez de unas MLV's grandes. Otra formulación comprendía poli(etilenglicol) 4000 como agente crioprotector, que no cumplía la especificación de una dispersión homogénea después de haber rehidratado la torta liofilizada a la forma de liposomas. La aplicación de una solución salina tamponada con fosfato como un sistema tamponador de formulaciones bien conocido, y la adición de ácido acético de pH 6,0 y de pH 4,2 a solas no podrían estabilizar a la proteína en el proceso de desecación dando como resultado una fuerte destrucción de la proteína. Sin embargo, los autores del invento encontraron que unas formulaciones que comprendían ciertos aminoácidos conducían a diferentes resultados sorprendentes. La glicina como aditivo requería la adición de una sal para el mantenimiento de la estabilidad de la proteína, pero conducía a una formulación liposomal reconstituida en un medio no fisiológico. Sin embargo, sorprendentemente, la adición de unos aminoácidos de carácter básico, tales como pero sin limitarse a, arginina, histidina y lisina, cumplió todos los requisitos para obtener una solución o dispersión homogénea en liposomas de CD-RAP encapsulada en grandes liposomas de múltiples capas ($\geq 1,5 \mu\text{m}$) con una alta eficacia de atrapamiento ($\geq 40 \%$) sin ninguna alteración química de la proteína durante el proceso de producción.

20 **Ejemplo 3: Producción de liposomas con el método de "congelación y descongelación"**

742 mg de fosfatidilcolina (Lipoid S100), 248 mg de colesterol y 10 mg de palmitato de ascorbilo se disolvieron en 20 ml de etanol en un matraz de fondo redondo. El disolvente se eliminó cuantitativamente en un evaporador rotatorio. La delgada película de lípidos generada fue rehidratada en 7,8 ml de agua para obtener liposomas (con 12,8 % (p/v) de lípidos) por suave agitación a la temperatura ambiente. Se prepararon unas vesículas unilaminares (SUV's) con un diámetro de aproximadamente 100 nm por un subsiguiente tratamiento con ultrasonidos. Se mezclaron 234,8 μl de la solución de SUV's con 65,2 μl de una solución de CD-RAP (1,15 mg/ml en arginina/ H_3PO_4 420 mM, de pH 7,5). La dispersión de liposomas se volvió lechosa después de 3 ciclos de congelación y descongelación (por un enfriamiento en N_2 líquido y una subsiguiente descongelación a la temperatura ambiente) debido a la fusión de las membranas de lípidos y a la formación de liposomas. La morfología de los liposomas permaneció con un número aumentado de ciclos de congelación y descongelación p.ej. con 5 ciclos. El producto era una suspensión lechosa viscosa con una eficacia de encapsulación (medida de acuerdo con el método A del Ejemplo 5) de más que 40 %. Sin embargo, en contraste con las MLV's preparadas de acuerdo con el método del presente invento, la mayoría de los liposomas generados por el método de congelación y descongelación eran solamente unilaminares. La determinación del carácter laminar (de la laminaridad) por un microscopio óptico en una luz doblemente polarizada mostró menos de 5 % de cruces de Malta (parámetro de detección en liposomas de múltiples capas), mientras que los liposomas preparados por una desecación por congelación de acuerdo con el invento (p.ej. en el Ejemplo 1) condujo a $\geq 95 \%$ de liposomas de múltiples capas (Figura 1). La formación de liposomas unilaminares en lugar de las MLV's en el caso del método de congelación y descongelación está apoyada adicionalmente por la bibliografía (Liposomes, A Practical Approach [Liposomas, un enfoque práctico] compilada por R. R. C. New, IRL Press (1990), página 58 último párrafo).

45 **Ejemplo 4: Liposomas producidos después de una reconstitución de polvos de lípidos**

750 mg de fosfatidilcolina (Lipoid S100), 250 mg de colesterol y 10 mg de palmitato de ascorbilo se disolvieron en 20 ml de etanol en un matraz de fondo redondo. El disolvente se eliminó cuantitativamente en un evaporador rotatorio. La delgada película de lípidos generada fue rehidratada en 10 ml de arginina/ H_3PO_4 200 mM, de pH 7,5 para obtener liposomas (10% (p/v) de lípidos) por suave agitación a la temperatura ambiente. Se prepararon vesículas unilaminares (SUV's) con un diámetro de aproximadamente 100 nm por un subsiguiente tratamiento con ultrasonidos. Se mezclaron 3.000 μl de SUV's con 2.500 μl de agua destilada y se liofilizaron. La encapsulación tuvo lugar durante la hidratación de la torta liofilizada de lípidos con 3.000 μl de una solución de CD-RAP (0,3 mg/ml en Arg/ H_3PO_4 150 mM, de pH 7,5) y suave movimiento en vórtice.

50 Los liposomas generados de esta manera fueron comparados con los producidos de acuerdo con el Ejemplo 1A. La eficacia de atrapamiento se determinó de acuerdo con el Ejemplo 5A.

Sorprendentemente, la hidratación de la torta liofilizada de lípidos con una solución de CD-RAP condujo a una muy mala eficacia de encapsulación de $20 \pm 4 \%$ de CD-RAP ($n = 4$) mientras que la hidratación del material concomitantemente liofilizado de la CD-RAP y de los lípidos de acuerdo con el Ejemplo 1 A condujo a una eficacia de encapsulación aumentada en 3 veces, de $60 \pm 10 \%$ ($n = 10$).

El íntimo contacto homogéneo de ambos lípidos y de la proteína destinada a ser atrapada es esencial para obtener una alta eficacia de atrapamiento, que se alcanza óptimamente por una liofilización concomitante de los componentes.

Ejemplo 5: Determinación de la eficacia de encapsulación de la CD-RAP

Se usaron tres diferentes métodos para determinar la eficacia de atrapamiento de la CD-RAP en liposomas producidos de acuerdo con los Ejemplos anteriores. Se usó el método A para separar por centrifugación la CD-RAP encapsulada dentro de los liposomas con respecto de la CD-RAP no encapsulada. El método B determinó la encapsulación usando una etapa de diálisis. El método C es una determinación modificada por centrifugación/ultrafiltración.

Método A: Determinación por una etapa de centrifugación

100 µl de la solución liposomal rehidratada se diluyeron muy cuidadosamente y con lentitud con 300 µl de agua para inyección con el fin de obtener una diferencia en cuanto a las densidades entre los liposomas. Una dilución más rápida dio como resultado una rotura de los liposomas y además una pérdida de proteína incorporada. La etapa de dilución es necesaria para crear una diferencia entre los liposomas y el disolvente circundante, que a su vez constituye una necesidad para una satisfactoria separación por centrifugación de los liposomas. La solución diluida de liposomas fue centrifugada a la temperatura ambiente a 16.000 rcf durante 15 minutos y dio como resultado un considerable sedimento y un material sobrenadante claro. El material sobrenadante se eliminó cuidadosamente, el nivel de la proteína (= proteína no encapsulada) se determinó por una HPLC de fase inversa después de haber diluido con una solución salina tamponada con fosfato y con 0,01 % (v/v) de Tween 80.

El sedimento fue solubilizado con 300 µl de una solución al 20 % (p/v) de Triton X-100, seguido por una enérgica agitación. Sorprendentemente, los autores del invento encontraron que era necesaria la adición de una poli-L-lisina, p.ej. de 50 µl de una solución al 2 % (p/v) de poli-L-lisina, para disociar la proteína unida a los lípidos por interacción iónica. Después de una dilución con 550 µl de una mezcla de 50 % (v/v) de acetonitrilo / 0,1 % (v/v) de ácido trifluoroacético, la concentración de proteína se determinó por una HPLC de fase inversa.

Método B: Determinación por diálisis

1 ml de liposomas reconstituidos se transfirió a una manguera de una membrana de éster de nitrocelulosa. La solución fue subsiguientemente dializada frente a 30 ml de arginina/H₃PO₄ 350 mM, de pH 7,5 / 0,1 % (p/v) de albúmina de suero bovino. La purificación de la solución liposomal se completó después de 4 horas de incubación a 4°C y de suave agitación. La cantidad de la proteína no encapsulada dializada dentro del medio aceptor fue determinada por una HPLC de fase inversa.

Método C: Determinación por centrifugación/ultrafiltración

125 µl de la solución liposomal rehidratada se centrifugaron en una unidad de ultrafiltración (Amicon Microcon Ultracel YM -100 unidades, de Millipore, N° de CAT.: 42413, corte con 100.000 Da) a 13.200 rcf durante 60 minutos. Esta etapa condujo a la separación de los liposomas desde la solución circundante. En el material filtrado se determinó la cantidad de la BMP-2 no encapsulada midiendo la concentración de BMP-2 mediante una RP-HPLC (de fase inversa) usando una curva patrón y el volumen del material permeado.

Ejemplo 6: Preparación de DRV's usando diversos lípidos

En vez de usar la fosfatidilcolina y el colesterol como componentes para la preparación de liposomas, se ensayaron varios otros lípidos para una sustitución total o una adición parcial para la composición de lípidos.

A. Lípidos completamente saturados

1 g de lecitina de soja (LIPOID SPC-3) completamente saturada se dispersó en 20 ml de etanol y se podría obtener una solución al 10 % de SUV's después de una preparación de acuerdo con el Ejemplo 1A. Se mezclaron 300 µl de la solución de SUV's con 250 µl de una solución de CD-RAP (0,3 mg/ml en Arg/H₃PO₄ 420 mM, de pH 7,5) y se liofilizaron en un vial de vidrio, dando como resultado una torta liofilizada muy estable. Después de una adición de 300 µl de agua destilada la rehidratación de la torta liofilizada tuvo lugar de una manera muy lenta no por debajo de 20 minutos, que no cumplía los requisitos para un producto inyectable rápidamente.

B. Adición de lípidos cargados negativamente

La formulación liposomal de la CD-RAP en DRV se realizó de acuerdo con el Ejemplo 1A, excepto la introducción de lípidos cargados negativamente en la composición de lípidos de lecitina de soja y colesterol.

1. Adición de cardiolipina

Se añadió cardiolipina en unas cantidades de 0 mg, 5 mg, 10 mg, 15 mg, 25 mg y 100 mg a 375 mg de fosfatidilcolina (Lipoid S100) y 125 mg de colesterol, y se disolvió subsiguientemente en 10 ml de etanol. El tratamiento ulterior, p.ej. por preparación de SUV's, formulación y desecación por congelación, se realizó de acuerdo con el Ejemplo 1A. Después de una rehidratación de la torta de lípidos y de proteína con 0,3 ml de agua destilada y una agitación, se obtuvieron vesículas multilaminares en las muestras que contenían 0 mg - 25 mg de cardiolipina, mostrando un rápido aumento de la viscosidad. La muestra que contenía 100 mg de cardiolipina dio como resultado una solución a modo de gel con una alta viscosidad con unas vesículas solamente muy pequeñas (400 nm medido por espectroscopía de correlación de fotones).

El diámetro de los liposomas se determinó por espectroscopía de correlación de fotones, dando como resultado un aumento que comienza con un diámetro medio de 1.500 nm hasta los 2.500 nm finales con una adición de cardiolipina de 25 mg.

2. Adición de palmitato de ascorbilo

5 Se añadió palmitato de ascorbilo en unas cantidades de 0 mg, 2,5 mg, 5 mg, 10 mg, 25 mg, 50 mg y 100 mg a 750 mg de fosfatidilcolina (Lipoid S100), y 250 mg de colesterol y se disolvió en 20 ml de etanol. El tratamiento ulterior, p.ej. por preparación de SUV, formulación y desecación por congelación, se realizó de acuerdo con el Ejemplo 1A. Después de una rehidratación de la torta de lípidos y de proteína con 0,3 ml de agua destilada y de una agitación, se obtuvieron vesículas multilaminares solamente en las muestras que contenían 0 mg - 50 mg de palmitato de ascorbilo, mostrando un rápido aumento de la viscosidad de acuerdo con la adición de cardiolipina. La muestra que contenía 100 mg de palmitato de ascorbilo dio como resultado una solución a modo de gel con una viscosidad muy alta.

15 Sin embargo, de manera sorprendente, los liposomas multilaminares muestran una fuerte tendencia a la aglomeración con altas proporciones p.ej. 1 % o más de palmitato de ascorbilo (Fig. 2) y mayores diámetros (Fig. 3) con una cantidad creciente de palmitato de ascorbilo después de una rehidratación, en contraste con lo que se ha descrito en la bibliografía (Liposomes 2ª edición, A Practical Approach, compilada por Vladimir P. Torchilin y Volkmar Weissig, Oxford University Press (2002), página 7) incorporada por su referencia a la presente.

Ejemplo 7: Encapsulación de rh-BMP-2 en DRV's reconstituidas

20 Se produjeron unos liposomas secados por congelación de acuerdo con el Ejemplo 1A usando 750 mg de fosfatidilcolina (Lipoid S100) y 250 mg de colesterol. Se mezclaron 300 µl de las SUV's con 250 µl de una solución de rh-BMP-2 (0,50 mg/ml en arginina/H₃PO₄ 420 mM, de pH 7,5 y 5,0) y se liofilizaron subsiguientemente. Se usaron dos diferentes formulaciones de rh-BMP-2, una de la rhBMP-2 derivada de *E.coli* (Ruppert, R. y colaboradores (1996). Human bone morphogenetic protein 2 contains a heparin.binding site which modifies its biological activity [La proteína morfogenética ósea humana 2 contiene un sitio de fijación a heparina que modifica su actividad biológica]. Eur.J Biochem. 237: 295-302) y otra de la rh-BMP-2 derivada de CHO (InductOs, Wyeth Pharma GmbH). Una rehidratación con 300 µl condujo a una eficacia de atrapamiento de más que 80 % dentro de unas MLV's con un diámetro de aproximadamente 1,5 µm. La eficacia de encapsulación fue determinada de acuerdo con el método C – de centrifugación y ultrafiltración. Todas las mediciones se hicieron en duplicado. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

30 **Tabla 2: Balance de masas de encapsulación liposomal de rh-BMP-2 en arginina/H₃PO₄ a diferentes valores del pH**

Variante	No encapsulada	Encapsulada
rh-BMP-2, no glicosilada, de pH 7,4	18 %	82 %
rh-BMP-2, no glicosilada, de pH 5,0	17 %	83 %

Ejemplo 8: Modelo de transección del ligamento crucial anterior de conejo

35 Para evaluar si la MIA/CD-RAP alivia o impide la degradación de un cartílago en un modelo con animales de osteoartritis, se usó un modelo de transección del ligamento crucial anterior de un conejo. Bajo una anestesia general y en condiciones estériles, se aproximaron las juntas de rodillas de conejos a través de una incisión parapatelar media (entre el ligamento colateral medio y el ligamento patelar). La patela fue desplazada lateralmente y la almohadilla grasa infrapatelar se movilizó y retrajo para exponer el ligamento crucial anterior entero. La incisión fue suturada en capas y se aplicó un vendaje adhesivo después de haber suturado. La inyección intraarticular se realizó bajo fluoroscopia y sedación. El esquema de operación quirúrgica e inyección fue como sigue: se usaron 6 animales por grupo (grupo 1: simulado (el ACL no fue transecado), grupo 2: con liposomas, grupo 3: con liposomas más MIA/CD-RAP en una dosis baja, grupo 4: con liposomas más MIA/CD-RAP en una dosis mediana, grupo 5: con liposomas más MIA/CD-RAP en una dosis alta) n = 30). Los animales, con la excepción de los animales en el grupo simulado fueron sometidos a 5 inyecciones. Las inyecciones se realizaron una vez cada 10 días. Los animales fueron sacrificados a los 10 días después de la inyección final y se obtuvieron radiografías con rayos X.

Subsiguientemente, las muestras fueron fijadas en formalina tamponada neutra al 10 %, fueron descalcificadas en EDTA y empotradas en parafina. Los cortes fueron teñidos con verde rápido de safranina O y con hematoxilina y eosina y fueron analizados histológicamente.

50 En este modelo, unos liposomas multilaminares que suministraban la CD-RAP disminuyeron la destrucción de cartílagos y su progresión. El análisis histológico demostró la eficacia de la inyección de CD-RAP encapsulada en liposomas dentro del espacio intraarticular en una dosis mediana y en una dosis alta de CD-RAP que redujo el desarrollo de OA (p < 0,05). La CD-RAP suministrada en una dosis mediana manifestó ser sumamente potente para impedir el desarrollo de OA, tal como se demuestra por la intensidad de la tinción con safranina O que fue mantenida en el grupo con dosis mediana en comparación con el grupo simulado (p < 0,05). El análisis radiológico mostró la prevención de la progresión de OA en todos los grupos en tratamiento, con CD-RAP en los grupos con dosis baja, mediana y alta (p < 0,05).

Ejemplo 9: Modelo de punción del anillo fibroso

En este ejemplo, una inyección de CD-RAP es efectiva para restaurar parcialmente la altura del disco en un modelo de punción anular de un conejo.

5 La degeneración del disco se puede inducir en conejos blancos de Nueva Zelanda adolescentes por punción del anillo fibroso (AF) dentro del disco usando unos definidos calibres de agujas (Singh, K. Y colaboradores (2005) Animal models for human disc degeneration [Modelos con animales para la degeneración de discos humanos]. Spine [espina dorsal] J 5: 267S-279S). Después de haber proporcionado una anestesia local por inyección de lidocaina a la región dorsal del disco lateral, se obtienen unas radiografías planas para determinar los valores en la línea de base antes de la inyección para las alturas de los IVD (discos intervertebrales). Subsiguientemente los conejos son colocados en una posición supina lateral y se usa un acercamiento retroperitoneal posterolateral para exponer los IVD's lumbares. En cada conejo, el AF será puncionado con una aguja de 18G. Después de cuatro semanas, el animal recibe una inyección de una solución salina tamponada (en PBS) o de liposomas en un vehículo como un testigo, o una solución de proteína de 2,5 mg/ml de la CD-RAP (en PBS) o de la CD-RAP encapsulada en liposomas (2,5 mg/ml) dentro del núcleo pulposo y se vigila durante 12 semanas. El resultado preclínico es analizado por exploraciones de imágenes de resonancia magnética (MRI = acrónimo de magnetic resonance imaging) de la espina lumbar, la altura de los IVD's se vigiló por observación radiológica medida con un programa custom usando un software de formación de imágenes y se calculó el % de DHI (desplazamiento humeral inferior) ($DHI_{postoperatorio} / DHI_{preoperatorio} \times 100$). Para un análisis histológico de los IVD's, unas secciones se tiñen con hematoxilina eosina y safranina O. Las diferencias entre grupos se comprueban en cuanto a significancia estadística usando el análisis de una vía de la varianza (ANOVA).

20 Cada conejo tendrá un disco tratado con la CD-RAP en una solución salina y el otro con una solución salina o con liposomas o con la CD-RAP encapsulada en liposomas.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica secada que comprende un agente activo secado por congelación que también comprende unas vesículas, que comprende
- 5 a) por lo menos un lípido,
 b) por lo menos un agente activo,
 c) un agente favorecedor de la fusión, en donde el agente favorecedor de la fusión es un aminoácido de carácter alcalino seleccionado entre arginina, histidina, lisina o citrulina, y
 d) ningún agente estabilizador de membranas,
- 10 en la que la que una rehidratación con una solución acuosa de la composición farmacéutica secada da como resultado la formación de unos liposomas multilaminares que tienen un diámetro liposomal medio de más 1 μm , cuyos liposomas encapsulan al agente activo.
2. La composición farmacéutica secada de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el por lo menos un agente activo es una proteína, en particular una proteína hidrófila o un fragmento activo de la misma.
3. La composición farmacéutica secada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que no está presente ningún azúcar protector, alcohol de azúcar o glicósido.
- 15 4. La composición farmacéutica secada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además un anión inorgánico u orgánico.
5. La composición farmacéutica secada de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la proteína hidrófila es un agente de regeneración de huesos y/o cartílagos.
- 20 6. Un procedimiento para la preparación de una composición secada de liposomas que, después de una rehidratación con una solución acuosa, forma unos liposomas multilaminares con un diámetro liposomal medio de más que 1 μm , que encapsulan a un agente activo, el cual comprende las etapas de
- 25 a) hidratación de un lípido, de una mezcla de lípidos o de una película de lípidos en la ausencia de un disolvente orgánico,
 b) generación de pequeñas vesículas unilaminares que tienen preferiblemente un diámetro medio comprendido entre 50 y 200 nm,
 c) adición de una solución acuosa de un agente activo,
 d) después de, antes de o conjuntamente con la etapa c), adición de un agente favorecedor de la fusión, en donde el agente favorecedor de la fusión es un aminoácido de carácter alcalino seleccionado entre arginina, histidina, lisina o citrulina, y opcionalmente de un anión inorgánico u orgánico, y
 30 e) deshidratación de dicha dispersión de lípidos sin la adición de un agente estabilizador de membranas.
7. Un procedimiento para la preparación de una composición administrable de liposomas, que comprende liposomas multilaminares con un diámetro medio de liposomas de más que 1 μm , que encapsulan a un agente activo, el cual comprende las etapas de
- 35 a) hidratación de un lípido, de una mezcla de lípidos o de una película de lípidos en la ausencia de un disolvente orgánico,
 f) generación de pequeñas vesículas unilaminares que tienen preferiblemente un diámetro medio comprendido entre 50 y 200 nm,
 g) adición de una solución acuosa de un agente activo,
 40 h) después de, antes de o conjuntamente con la etapa c), adición de un agente favorecedor de la fusión, en donde el agente favorecedor de la fusión es un aminoácido de carácter alcalino seleccionado entre arginina, histidina, lisina o citrulina, y opcionalmente de un anión inorgánico u orgánico, y
 i) deshidratación de dicha dispersión de lípidos sin la adición de un agente estabilizador de membranas,
 45 j) rehidratación con una solución acuosa y formación de unas vesículas multilaminares que tienen un diámetro liposomal medio de más que 1 μm , que encapsulan al agente activo,
- en el que la etapa de filtración en condiciones estériles se realiza después de las etapas b) y/o c).
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 6 hasta 7, en el que el lípido comprende por lo menos un lípido neutro, de manera preferible por lo menos dos lípidos neutros.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 6 hasta 8, en el que el agente favorecedor de la fusión es un aminoácido seleccionado entre el conjunto de arginina, histidina, lisina o citrulina.
- 50 10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 6 hasta 9, en el que el anión inorgánico u orgánico se seleccionan entre el conjunto de los de succinato, fumarato, citrato, malato, fosfato, acetato y cloruro.
11. Una composición farmacéutica secada por congelación, obtenible por el procedimiento de la reivindicación 6.

12. Una composición farmacéutica obtenible por el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 7 hasta 10.

5 13. Uso de una composición farmacéutica secada por congelación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 5 u 11 para la producción de una composición farmacéutica destinada al tratamiento de un defecto de hueso y/o de cartílago, de una enfermedad inmunológica, preferiblemente de una osteoartritis, una artritis reumatoide y un trastorno espinal en un individuo, por inyección después de una rehidratación con una solución acuosa de la composición secada por congelación.

10 14. Uso de una composición farmacéutica secada por congelación de la reivindicación 13, en el que la inyección es una inyección local o no sistémica, de manera preferible dentro de la sinovia, del espacio sinovial, del núcleo pulposo o del espacio del núcleo pulposo, intradiscalmente o transdiscalmente.

Figura 1

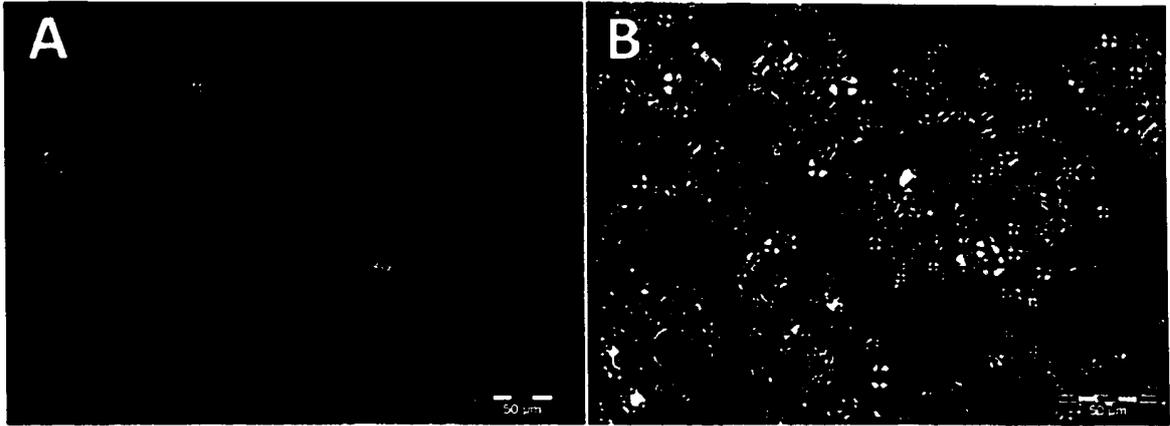


Figura 2

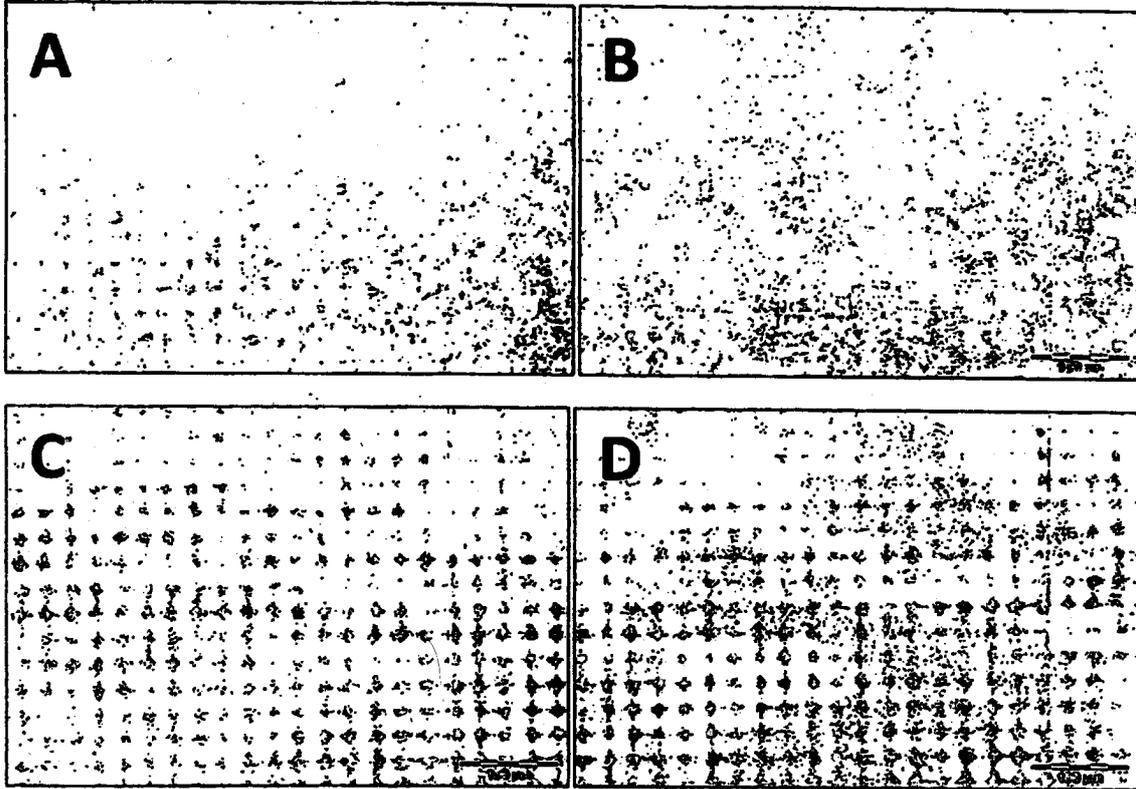


Figura 3

